



Universitat Autònoma de Barcelona

**Desenvolupament i caracterització de
biomaterials amb propietats restauradores
i benèfiques dels teixits dentals**



**Marc Campillo Funollet
2007**



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Ciències
Departament de Química
Unitat de Química Analítica

TESI DOCTORAL

**Desenvolupament i caracterització de biomaterials amb
proprietats restauradores i benèfiques dels teixits dentals**

Memòria presentada per **Marc Campillo
Funollet** per aspirar al grau de Doctor en
Química

Directors:
Dr. Manuel Valiente Malmagro
Dra. Anna Torrado Bonals

Bellaterra, Juny 2007





Universitat Autònoma de Barcelona

Manuel Valiente Malmagro, Catedràtic de Química Analítica del Departament de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona i

Anna Torrado Bonals, Doctora en Química,

CERTIFIQUEM: Que els estudis descrits a la present memòria, sota el títol ‘Desenvolupament i caracterització de biomaterials amb propietats restauradores i benèfiques dels teixits dentals’, que presenta el Llicenciat en Química Marc Campillo Funollet per optar al grau de Doctor en Química han estat realitzats sota la nostra direcció.

I, perquè així consti, signem aquest certificat.

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 30 de Maig de 2007

Manuel Valiente Malmagro

Anna Torrado Bonals





Universitat Autònoma de Barcelona

Els estudis que es recullen en la present memòria s'han desenvolupat dins dels projectes de recerca en biomaterials que es porten a terme al Centre Grup de Tècniques de Separació en Química en col·laboració amb el departament d'odontologia restaurativa de la University at Buffalo (New York, USA) i amb el laboratori de propietats òptiques de l'Institut de Ciència dels Materials de Barcelona.

Igualment voldria agrair:

- Al Ministerio de Educación y Ciencia la concessió d'una beca predoctoral per a la formació de personal investigador així com els ajuts addicionals per dur a terme dues estades a la University at Buffalo (New York, USA) (Projectes PPQ2002-04267-C03-01 i CTQ2005-09430-C05-01/PPQ).
- A la Universitat Autònoma de Barcelona per la concessió d'una beca de suport a la recerca. El projecte "Nuevos sistemas de liberación controlada de iones inorgánicos para la remineralización de tejidos dentales" (Ref PRP2006-03) ha contribuït al finançament dels estudis finals de la present tesi.

ÍNDIX

SUMMARY	1
CAPÍTOL 1: INTRODUCCIÓ GENERAL	9
1.1 LA DENT: UN TEIXIT DUR ESPECIAL	13
1.1.1 ESTRUCTURA DE LES DENTS	13
1.1.2 LA CÀRIES DENTAL	15
1.1.3 ESTÈTICA DENTAL I BLANQUEIG	23
1.2 ALLIBERACIÓ CONTROLADA DE FÀRMACS	25
1.2.1 APLICACIÓ DE L'ALLIBERACIÓ CONTROLADA A LA REMINERALITZACIÓ DENTAL	27
1.3 BESCANVI IÒNIC	28
1.3.1 RESINES DE BESCANVI IÒNIC	29
1.3.2 EQUILIBRI DE BESCANVI IÒNIC	34
1.3.3 MECANISME I CINÈTICA DEL BESCANVI IÒNIC	37
1.4 OBJECTIUS	41
1.5 BIBLIOGRAFIA	42
CAPÍTOL 2: METODOLOGIA EXPERIMENTAL	49
2.1 TÈCNiques ANALÍTIQUES	53
2.1.1 POTENCIOMETRIA AMB ELÈCTRODE SELECTIU A IÓ FLUORUR	53
2.1.2 ESPECTROSCÒPIA D'EMISSIÓ ATÒMICA EN PLASMA D'ACOBLEMENT INDUÏT	56
2.1.3 MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA	58
2.1.4 DIFRACCIÓ DE RAIGS X	59
2.1.5 ESPECTROSCÒPIA RAMAN	62
2.1.6 SHEAR BOND STRENGTH TEST	64
2.1.7 COLORIMETRIA EN SUPERFÍCIE	67
2.2 PROCEDIMENT EXPERIMENTAL PER A L'ESTUDI DE LA INCORPORACIÓ D'UNA RESINA DE BESCANVI IÒNIC COM A AGENT D'ALLIBERACIÓ CONTROLADA A UN MATERIAL DENTAL	69
2.2.1 CÀRREGA DE LA RESINA	69
2.2.2 MÒLTA, TAMISAT I DETERMINACIÓ DE LA MIDA DE PARTÍCULA	70
2.2.3 SEGUIMENT EN DISCONTINU DE L'ALLIBERACIÓ	71
2.2.4 SEGUIMENT EN CONTINU DE L'ALLIBERACIÓ	73
2.2.5 ESTUDI D'ADHESIÓ DEL MATERIAL MODIFICAT	75
2.2.5.1 Preparació de l'adhesiu modificat	75
2.2.5.2 Preparació de les mostres	76
2.2.5.3 Obtenció dels valors de força d'adhesió	78
2.3 PROCEDIMENT EXPERIMENTAL PER A L'ESTUDI DE LA INCORPORACIÓ DE FLUORUR AL MINERAL DENTAL	79
2.3.1 OBTENCIÓ DELS MINERALS	79
2.3.1.1 Síntesi d'hidroxiapatita parcialment substituïda amb fluorur	79
2.3.1.2 Síntesi de fluoroapatita	79
2.3.1.3 Anàlisi elemental dels materials obtinguts	80
2.3.2 ESTUDI DELS MINERALS MITJANÇANT DIFRACCIÓ DE RAIGS X	80
2.3.2.1 Quantificació de fluorur de calci en matriu d'hidroxiapatita	81
2.3.2.2 Estudi dels processos de gravat i remineralització en dents bovines	81
2.3.3 ESTUDI DELS MINERALS MITJANÇANT ESPECTROSCÒPIA RAMAN	82

2.4	PROCEDIMENT EXPERIMENTAL PER A L'ESTUDI DE L'EFECTE DE L'ADDICIÓ DE FE (III) A UN BLANQUEJADOR COMERCIAL	83
2.4.1	PREPARACIÓ I TACAT DELS ESPECIMENS	83
2.4.2	PREPARACIÓ DEL MATERIAL MODIFICAT	84
2.4.3	MESURA DEL BLANQUEIG	84
2.5	BIBLIOGRAFIA	86
 CAPÍTOL 3: DISCUSSIÓ GLOBAL DELS RESULTATS		89
3.1	INCORPORACIÓ D'UNA RESINA DE BSCANVI IÒNIC COM A AGENT D'ALLIBERACIÓ CONTROLADA A UN ADHESIU DENTAL	93
3.1.1	CARACTERITZACIÓ DE LA RESINA	93
3.1.2	GRAU DE CONVERSIÓ DE LA RESINA	95
3.1.3	EFECTE DE LA FORMA D'APLICACIÓ SOBRE EL PERFIL D'ALLIBERACIÓ DEL IÓ FLUORUR (ANNEX 1)	97
3.1.4	EFECTE DE LA MATRIU D'ADHESIU SOBRE EL MECANISME DE BSCANVI IÒNIC DE LA RESINA (ANNEX 2)	104
3.1.5	EFECTE DE LA RESINA DE BSCANVI IÒNIC SOBRE LA FORÇA D'ADHESIÓ DEL MATERIAL FINAL (ANNEX 3)	107
3.1.6	RELLEVÀNCIA DELS RESULTATS OBTINGUTS	112
3.2	DETERMINACIÓ DE LA INCORPORACIÓ DE FLUORUR AL MINERAL DENTAL	114
3.2.1	ANÀLISI ELEMENTAL DELS MINERALS SINTETITZATS	114
3.2.2	ESTUDI DE LA INCORPORACIÓ DE FLUORUR A L'ESMALT DENTAL MITJANÇANT DIFRACCIÓ DE RAIGS X (ANNEX 4)	116
3.2.3	ESTUDI DE LA INCORPORACIÓ DE FLUORUR A L'ESMALT DENTAL MITJANÇANT ESPECTROSCÒPIA RAMAN (ANNEX 5)	122
3.2.4	RELLEVÀNCIA DELS RESULTATS OBTINGUTS	127
3.3	MILLORA DE LES PROPIETATS D'UN BLANQUEJADOR COMERCIAL	128
3.3.1	ESTUDI DE L'EFECTE DE L'ADDICIÓ DE FE(III) A UN BLANQUEJADOR COMERCIAL (ANNEX 6)	128
3.3.2	RELLEVÀNCIA DELS RESULTATS OBTINGUTS	131
3.4	BIBLIOGRAFIA	132
 CAPÍTOL 4: CONCLUSIONS		137
 CAPÍTOL 5: ANNEXOS		143

ANNEX 1

Campillo, M.; Torrado, A.; Muñoz, C.A.; Valiente, M. Effect of the application mode on the release rate of fluoride from an ion exchange resin incorporated in a dental adhesive. Submitted to *European Journal of Oral Sciences*.

ANNEX 2

Campillo, M.; Torrado, A.; Muñoz, C.A.; Valiente, M. Kinetics release of fluoride from a dental adhesive modified with an ion exchange resin. To be submitted.

ANNEX 3

Campillo, M.; Torrado, A.; Muñoz, C.A.; Valiente, M. Bond Strength of a Total Etch Adhesive Modified with an Ion Exchange Resin. To be submitted.

ANNEX 4

Campillo, M.; Torrado, A.; Muñoz, C.A.; Valiente, M. X-ray diffraction patterns of etched and remineralized bovine enamel. To be submitted.

ANNEX 5

Campillo, M.; Lacharmoise, P; Torrado, A.; Goñi, A. Valiente, M. Calcium speciation on dental enamel by Raman scattering to assess effective teeth fluoridation. To be submitted.

ANNEX 6

Campillo, M.; Torrado, A.; Gonzalez, J.L.; Muñoz, C.A.; Valiente, M. Effect of iron (III) on the kinetics of a commercial whitener containing carbamide peroxide. Submitted to *Dental Materials*

Summary

Oral care has reached a very high interest in both the scientific and social communities. From the scientific side, oral care has the attractive of being a multidisciplinary field where scientists from different areas can contribute and produce unique pieces of knowledge. In the present case, the studies grow from the Analytical Chemistry area and are focused to two different oral care applications: the demineralisation disease represented by caries and the dental aesthetics represented by whitening.

Dental caries, also known as tooth decay, is nowadays one of the most common chronic diseases affecting people worldwide. Bacteria in the mouth metabolize carbon hydrates from food and release acids. These acids dissolve the tooth mineral, leading to the formation of cavities. The most common strategy for caries prevention is to enhance the caries resistance of the mineral by means of the topical application of fluoride. Fluoride is the most used remineralising agent. Its action against caries is due to both its bactericide properties and mainly to the reaction of fluoride with hydroxyapatite, the natural mineral forming dental enamel. As a result of this reaction fluorapatite is obtained. Hydroxyapatite and fluorapatite have very similar structure but the later shows lower solubility and is more resistant to acid attack.

At this moment, perspectives in fluoride application to the prevention of dental caries are focused to the increase of the efficiency of the treatments. Whereas the role of fluoride in caries prevention is well known, the mechanisms of incorporation of fluoride into the tooth structure are not fully understood. Success of fluoride treatments is sometimes below the expected goals because it is difficult to assess the formation of fluorapatite in the dental mineral.

An important aim of the present studies is to contribute to the development of new remineralising materials and to develop new analytical techniques to study the effect of fluoride on the tooth mineral. On the other hand, the increasing demand of aesthetic treatments led to a study to improve the efficiency of a dental whitener.

In the first part of the work, a commercial dental adhesive (3M Single Bond[®]) has been modified by the addition of a weak base ionic exchange resin previously loaded with fluoride. Fluoride release of the modified adhesive has been characterised kinetically and thermodynamically in a solution simulating the dentinal fluid. The rate of release of fluoride and the final amount of fluoride released are influenced by the way in which samples are applied. The different degrees of crosslinking achieved by the adhesive depending on its application are thought to be the main reason of these variations. It has also been found that embedding the resin in the adhesive matrix can influence the diffusion rate limiting step of the process. In fact, when the resin is embedded in adhesive, results suggest that this step changes during the process due to the progressive hydration of the adhesive. On the other hand, an adhesion study has been conducted in order to assess the influence of including the ion exchange resin in the adhesive on its adhesion strength. Results of adhesion show similar strength values at 24 h for original and modified adhesive formulations whereas immediate adhesion decreases when the resin is mixed with the adhesive. SEM observations reveal that the ion exchange resin enhances the formation of voids in the adhesive phase. These voids are probably responsible for the lower adhesion strength at short times. After complete adhesive setting, the effect of these voids does not alter the bond strength significantly.

The second part of the studies has been focused on the development of analytical techniques to assess the quantity and the chemical form of the fluoride incorporated to dental enamel after different in vitro treatments. First, a method based on X-ray diffraction has been developed in order to study calcium fluoride deposition in dental enamel. After calibration using standards of calcium fluoride in a hydroxyapatite mineral matrix, the method was applied to bovine teeth. After selecting the optimal teeth position, diffraction patterns of teeth were obtained before and after pH cycling treatment with NaF or CaF₂. None of the treatments showed deposition of calcium fluoride on teeth surfaces.

Incorporation of fluoride into the mineral as fluorapatite has been studied by means of Raman spectroscopy. Mineral samples of fluorapatite with different substitution degrees were synthesised and analysed. Raman spectra show slight displacements of phosphate peaks when hydroxyapatite and fluorapatite are compared. However, all the fluoride substituted hydroxyapatite samples without complete substitution showed the same spectra as hydroxyapatite. After a heating treatment above 200°C, partially fluoride substituted hydroxyapatite samples undergo a phase transformation process. Between 200°C and 700°C samples go through intermediate states which show Raman spectra typical of amorphous materials. After heating above 800°C, samples with more than 20% of the hydroxyl groups substituted by fluoride show the fluorapatite Raman spectra. The same phase transformation takes place in dental enamel samples treated with fluoride but at a higher temperature: 1000°C. The increase of the phase transformation temperature is attributed to both the size and the spatial disposition of fluorapatite crystals on teeth enamel.

The developed Raman method was used to assess the remineralisation potential on human dental enamel samples of two remineralisation methods. The first one is based on a material known as NMTD which consists in a mixture of weak acid and weak base ion exchange resins. Resins are loaded with calcium, fluoride and phosphate in the same molar ratio as they are found in fluorapatite. A fourth resin loaded with zinc, which acts as a bactericide, is also included in the mixture. The second tested method is a pH cycling process in a calcium fluoride solution. This process resembles the method used in the mineral synthesis for the incorporation of fluoride to hydroxyapatite. Results showed a high fluoridation efficiency of NMTD whilst the calcium fluoride method did not show formation of fluorapatite.

Finally, the effect of the addition of Fe(III) to a commercial dental whitener (Vivastyle[®]) has been characterised. Although iron can act as a catalyser of the whitening reactions by enhancing the formation of free radicals, a decrease of the whitening speed is detected when iron is added to the whitener. However, whitening speed increases with the amount of added iron. This fact is indicative of a possible double effect of iron on the whitening process.

Capítol 1

Introducció general

ÍNDEX**1 INTRODUCCIÓ GENERAL**

1.1 LA DENT: UN TEIXIT DUR ESPECIAL	13
1.1.1 ESTRUCTURA DE LES DENTS	13
1.1.2 LA CÀRIES DENTAL	15
1.1.3 ESTÈTICA DENTAL I BLANQUEIG	23
1.2 ALLIBERACIÓ CONTROLADA DE FÀRMACS	25
1.2.1 APLICACIÓ DE L'ALLIBERACIÓ CONTROLADA A LA REMINERALITZACIÓ DENTAL	27
1.3 BESCANVI IÒNIC	28
1.3.1 RESINES DE BESCANVI IÒNIC	29
1.3.2 EQUILIBRI DE BESCANVI IÒNIC	34
1.3.3 MECANISME I CINÈTICA DEL BESCANVI IÒNIC	37
1.4 OBJECTIUS	41
1.5 BIBLIOGRAFIA	42

1 Introducció general

Els estudis que es presenten en aquesta memòria van dirigits a profunditzar en el coneixement dels teixits dentals i a la millora de les seves propietats.. S'inclouen estudis amb l'objectiu de millorar alguns materials per tal de prevenir la formació de càries dental així com estudis de nous mètodes d'anàlisi del teixit mineral que permetin una millor comprensió de l'efecte dels materials desenvolupats. Finalment, s'inclou també un estudi de millora de les propietats d'un material blanquejador comercial.

1.1 La dent: un teixit dur especial

Les dents són estructures dures que es troben subjectades als ossos maxil·lars. La seva funció principal és realitzar part de la digestió tallant, molent i triturant els aliments sòlids. Les dents tenen també una funció fonètica, ja que participen en la comunicació oral. D'altra banda, el caràcter estètic de les dents és un factor que pren cada vegada més importància per una bona part de la població.

1.1.1 Estructura de les dents

Les dents estan constituïdes per la corona i l'arrel. La corona és la part que s'observa a simple vista mentre que l'arrel manté la dent fixada al maxil·lar. La Figura 1-1 mostra un esquema de la secció transversal d'una dent on es poden observar les parts mencionades i on s'indiquen els teixits que formen aquestes parts així com els teixits veïns. La dent en si està formada per quatre teixits: l'esmalt, la dentina, la polpa i el cement.

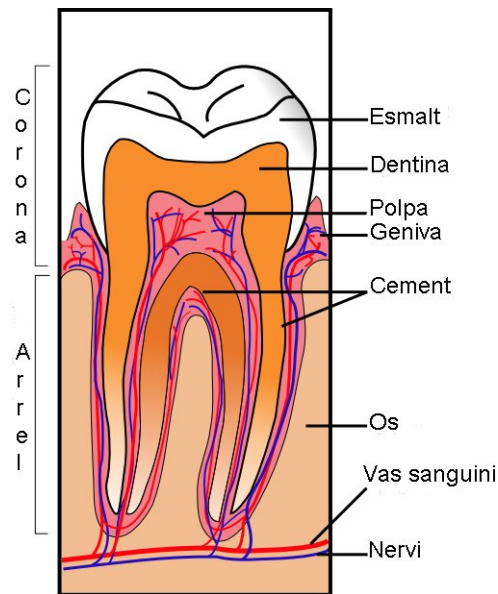


Figura 1-1 Secció transversal d'una dent

L'esmalt és un teixit translúcid que recobreix la corona de la dent. És el teixit més dur i amb més contingut mineral del cos i protegeix la dent del deteriorament i el desgast causats per la masticació. L'esmalt conté aproximadament un 96% en pes de mineral, mentre que només un 1% està format per molècules orgàniques i el 3% és aigua(1). El mineral que forma l'esmalt és la hidroxiapatita càlcica: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, anomenada generalment hidroxiapatita. En realitat, el mineral biològic no està format per hidroxiapatita pura sinó per una hidroxiapatita deficient en calci i amb algunes impureses, principalment carbonat i magnesi. La matriu orgànica de l'esmalt està formada majoritàriament per glicoproteïnes (amelogenines i enamelines). Aquestes proteïnes guien el creixement dels cristalls d'hidroxiapatita de l'esmalt i fan que el mineral creixi en forma de prismes, que acostumen a mesurar aproximadament 160 nm de llargada, entre 40 i 70 nm d'amplada i uns 30 nm de gruix(2,3). El creixement guiat dels nanocristalls que formen l'esmalt fa també que aquests no es trobin distribuïts aleatòriament i que segueixin orientacions preferencials. Aquest fenomen és freqüent en els teixits durs i confereix als materials propietats anisotròpiques, és a dir, fa que les

propietats siguin diferents segons les direccions en l'espai(4,5). Per tant, tot i estar format majoritàriament per hidroxiapatita, l'esfalt no sempre es comporta com el mineral sintètic sinó que la seva estructura singular fa que tingui un comportament especial.

La dentina forma la major part de la dent. Conté, aproximadament, un 70% en pes de mineral (principalment hidroxiapatita), un 20% en pes de substàncies orgàniques (principalment col·lagen) i un 10% en pes d'aigua(1). La matriu sòlida de la dentina conté un elevat nombre de túbuls de diàmetre entre 0,5 i 2,5 µm, que estan plens d'un fluït semblant al sèrum sanguini conegut com líquid dentinari. Aquests túbuls van des de l'esfalt fins a la polpa.

La polpa, coneguda popularment com "el nervi" de la dent, conté vasos sanguinis i terminacions nervioses i manté la pressió de líquid dentinari a l'interior dels túbuls de la dentina.

El cement és un teixit menys dur que la dentina que cobreix l'arrel de la dent.

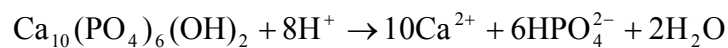
1.1.2 La càries dental

La càries dental és una malaltia que ha afectat a l'home des de sempre i que encara avui és una de les malalties més esteses(6). Es tracta d'una destrucció localitzada del teixit dur que forma les dents com a conseqüència dels subproductes àcids que generen els bacteris de la placa dental. Tot i que la càries havia estat considerada generalment com una malaltia infecciosa, actualment es defineix com una malaltia multifactorial. Els factors que intervenen en la seva formació són, principalment, els bacteris de la placa,

els hidrats de carboni procedents de la dieta i el temps durant el qual aquests dos factors coexisteixen en el medi oral.

1.1.2.1 Formació de la càries

La placa és una pel·lícula formada fonamentalment per proteïnes, saliva i fluït crevicular procedent de les genives que recobreix les dents. Quan el pH de la placa disminueix els cristalls d'hidroxiapatita de la part més externa de la dent es poden dissoldre:



Aquest procés rep el nom de desmineralització, ja que provoca la pèrdua de mineral de la dent. Normalment, aquesta dissolució es compensa per l'acció de la saliva, que està sobresaturada en hidroxiapatita i conté agents tamponadors(7). Així doncs, la saliva afavoreix el procés contrari, conegut amb el nom de remineralització. A la superfície de les dents, doncs, es dona un procés dinàmic de manera que el mineral es va dissolent i reprecipitant. La càries pot aparèixer quan es trenca aquest equilibri entre les etapes de desmineralització i remineralització.

La Figura 1-2 mostra un esquema de les etapes del procés de formació de la càries que afecten als diferents teixits de la dent. Els principals bacteris associats al procés de formació de la caries són els *streptococcus mutans* i els lactobacils. Els primers actuen directament sobre la sucrosa i generen àcid làctic. Aquest àcid afavoreix la desmineralització de l'esmalt a causa del descens de pH que produeix en el medi i de la seva capacitat per complexar els ions calci provinents del mineral dissolt(8). Si les condicions de desmineralització es prolonguen durant un cert temps, es formen cavitats en què els lactobacils, amb capacitat per actuar en condicions anaeròbiques, poden

progressar i generar més àcid (Figura 1-2b). En aquesta etapa, la càries és indolora, ja que l'esmalt no té terminacions nervioses. Així doncs, es van dipositant diferents tipus de bacteris que formen capes cada vegada més compactes. A mesura que va avançant el procés, la lesió passa de l'esmalt a la dentina (Figura 1-2c). La dentina és un teixit sensible i quan es veu afectada per la càries es poden sentir molèsties causades per estímuls tèrmics (de fred o calor) o per la ingesta de sucres. Si no es tracta, la càries arriba a la polpa (Figura 1-2d) i fa que s'inflami (pulpitis), produint dolors espontanis que incrementen considerablement amb els canvis de temperatura. En cas de seguir evolucionant, la càries produeix la necrosi de la polpa, surt a través de l'arrel de la dent i produeix la inflamació dels teixits circumdants (Figura 1-2e). La infecció es pot arribar a estendre a la resta de l'organisme a través dels teixits i vasos sanguinis que envolten la dent.

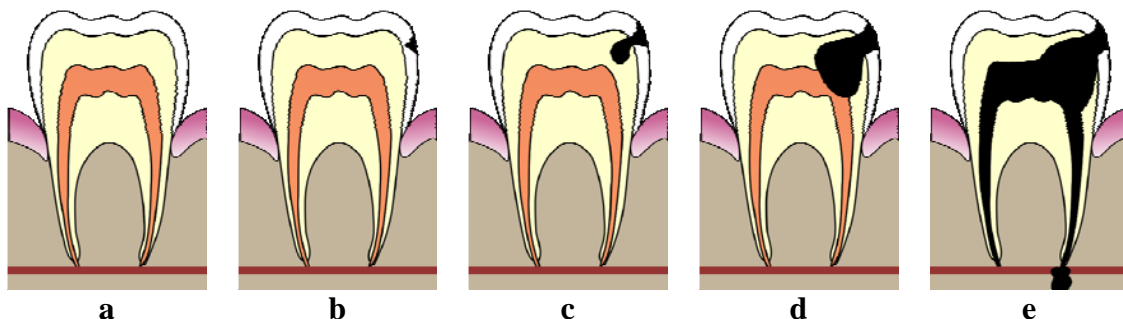


Figura 1-2 Evolució d'un procés de càries: **a)** dent sana; **b)** atac de l'esmalt; **c)** atac de la dentina; **d)** propagació per tota la dent; **e)** afectació de la polpa i infecció del nervi.

1.1.2.2 Tractament i prevenció

Els tractaments contra la càries han anat evolucionant al llarg de la història a un ritme semblant al de la resta de camps de la ciència. Hi ha evidències de certs tipus de tractaments dentals realitzats amb eines rudimentàries durant el neolític i els antics fenicis i etruscs ja utilitzaven pròtesis dentals fabricades amb or(9,10). Tot i així, fins

que l'odontologia va estar ben establerta com a ciència, la formació de càries en una dent comportava, gairebé amb tota seguretat, la pèrdua de la peça dental.

El tractament de la càries depèn de l'estat en què es troba la lesió quan es produeix el diagnòstic. Si la lesió és prou petita, un tractament de remineralització pot ser suficient per recuperar la superfície de l'esmalt i evitar que progressi la infecció(11,12). Si la caries afecta a la dentina cal eliminar el teixit afectat i omplir la cavitat amb un material restaurador. Quan la polpa es veu afectada de forma irreversible, cal realitzar un tractament d'endodòncia consistent en eliminar el teixit de la polpa i omplir la cavitat que queda amb *gutta-percha* (un compost de trans-poliisoprè vulcanitzat i òxid de zinc).

Durant el segle XX, importants avenços produïts en el camp dels materials van permetre desenvolupar les tècniques restauratives emprades actualment. Un dels materials més utilitzats en restauracions dentals durant el segle passat va ser l'amalgama de mercuri. Es tracta d'una mescla de mercuri i plata que es pot implantar a la cavitat de la dent quan encara és pastosa i que s'endureix en poca estona. Mitjançant una preparació adequada de la forma de la cavitat s'aconsegueix que la restauració quedi fixada mecànicament. Actualment, però, l'ús de l'amalgama ha disminuït significativament. El desenvolupament de materials polimèrics i la toxicitat associada al mercuri, tot i que no s'ha pogut demostrar la mobilització del mercuri de les amalgames dentals implantades(13), han estat els factors més importants en la reducció del nombre de restauracions realitzades amb amalgama.

Entre els materials polimèrics emprats en les restauracions dentals destaquen les resines compòsit. Es tracta de materials que, a més de reunir les condicions de biocompatibilitat i resistència química i mecànica necessàries, permeten imitar el color de les dents. De fet, aquests materials es van desenvolupar per restauracions en què l'estètica pot tenir un paper important(14). Les resines compòsit estan formades per quatre components: una matriu polimèrica, partícules inorgàniques que actuen com a *fillers*, un agent d'acoblament i un sistema iniciador-acelerador. La matriu polimèrica acostuma a contenir oligòmers de tipus diacrilat aromàtics o uretans. Per tal de reduir la viscositat de la mescla, s'afegeixen alguns monòmers. Les partícules inorgàniques poden ser de diferents materials com ara vidre o sílica i acostumen a mesurar entre 40 nm i 3 µm de diàmetre. Els agents d'acoblament poden reaccionar tant amb les partícules inorgàniques com amb el polímer a través de diferents grups funcionals. Els més emprats són els organosilans, que s'utilitzen per recobrir les partícules inorgàniques i fan de nexa entre les dues fases. L'activació de les resines compòsit s'aconsegueix normalment mitjançant llum al voltant de 470nm o bé, en alguns casos, addicionant una amina orgànica i un peròxid per tal de produir radicals lliures i iniciar la polimerització. També hi ha formulacions, conegudes com a *dual-cured*, que utilitzen els dos sistemes alhora.

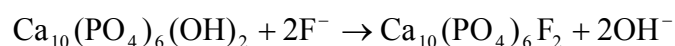
Totes les restauracions dentals requereixen un sistema de retenció, ja sigui mecànica o química, que permeti la seva unió a la dent. Mitjançant els adhesius dentals per unir les resines compostes a la dent, es pot aconseguir una força de retenció adequada gràcies a la combinació dels dos mecanismes esmentats. Això permet preparar restauracions més conservadores, sense necessitat d'eliminar el teixit sa per tal d'aconseguir una cavitat amb la forma adequada que retingui el material mecànicament. Els adhesius permeten

també aconseguir un segellat correcte de la superfície de la dent, que és fonamental per l'èxit de la restauració, ja que si queden buits entre el material restaurador i la superfície de la dent la càries s'hi pot desenvolupar fàcilment. El procés d'adhesió es realitza en tres etapes(15). La primera etapa del procés consisteix en gravar la superfície mitjançant un àcid(16). D'aquesta manera, la superfície on posteriorment es realitzarà l'adhesió es neteja i queda en forma rugosa a causa de la dissolució del mineral. Això afavoreix la retenció mecànica, sobretot a l'esmalt(17,18). Les solucions o gels d'àcid fosfòric són les substàncies més utilitzades per aquesta funció, tot i que també s'utilitzen altres àcids (maleic, tartàric, cítric, EDTA, àcid poliacrílic). Després d'aquest condicionament de la superfície, s'aplica un material imprimidor (de l'anglès *primer*). Els imprimidors són monòmers hidrofílics dissolts en acetona o etanol que s'uneixen a la dentina i preparen la superfície per a l'adhesió. Alguns imprimidors, coneguts com imprimidors autogravables, incorporen grups àcids carboxílics que permeten gravar la superfície mentre s'aplica l'imprimidor. Quan s'afegeix l'adhesiu, els imprimidors actuen com a ponts entre aquest i la dent, afavorint així la retenció química. Els adhesius acostumen a ser oligòmers hidrofòbics de tipus dimetacrilat compatibles amb l'imprimidor i la resina compòsit. Aquests oligòmers es dilueixen normalment amb monòmers de menys pes molecular per tal d'aconseguir augmentar la fluïdesa, igual com succeeix amb les resines compòsit. La majoria dels adhesius moderns incorporen camforquinona i es polimeritzen mitjançant la iniciació del procés amb llum. Alguns, a més, incorporen catalitzadors que permeten una polimerització tipus *dual-cured*. Tot i que no és habitual, els adhesius poden incorporar també *fillers* inorgànics, que tendeixen augmentar la força d'adhesió *in vitro*, o altres ingredients que afavoreixen la remineralització del teixit dental o prevenen la hipersensibilitat.

En els darrers anys, s'han començat a desenvolupar tècniques de restauració encaminades a aconseguir una reconstrucció del teixit(19-21). Aquestes tècniques, però, es troben encara lluny de la seva aplicació directa en pacients.

La lluita contra la càries ha anat evolucionant juntament amb el coneixement de la malaltia. Així, mentre que en un principi l'únic tractament consistia en extreure la dent, posteriorment es va passar a realitzar restauracions de les dents afectades i actualment s'està establint la tendència d'evitar les intervencions sobre lesions de càries ja formades mitjançant la implementació d'una bona prevenció de la malaltia(6). La prevenció de la càries es basa, sobretot, en el manteniment de la higiene oral que s'aconsegueix amb el raspallat de les dents i la utilització de pastes dentals que continguin fluorur.

El fluorur és l'agent remineralitzant més utilitzat. El seu efecte es deu a la capacitat que té per reaccionar amb la hidroxiapatita i formar fluorapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$):



La fluorapatita ($k_{ps} \sim 10^{-55}$) és més insoluble que la hidroxiapatita ($k_{ps} \sim 10^{-40}$), de manera que en incorporar fluorur al mineral es produeix una disminució de la seva solubilitat i augmenta la seva resistència a l'atac dels àcids(22), millorant també la resistència a la formació de càries(23-25). A més, certs estudis demostren també que el fluorur pot tenir un comportament bactericida, sobretot a pH àcid quan es pot formar HF(26-28). Així, si el pH produït pels bacteris és prou baix per dissoldre la fluorapatita, el fluorur que es desprendrà ajudarà a reduir el nombre de bacteris.

L'efecte anticariogènic del fluorur es coneix des dels anys 30 del segle passat, gràcies a estudis epidemiològics. Les primeres teràpies basades en la utilització de fluorur es van iniciar al voltant de l'any 1945, quan en algunes ciutats d'Estats Units i Canadà es va incorporar 1 mg/l de fluorur a la xarxa de distribució pública d'aigua. Diversos estudis han demostrat que la incidència de càries es pot reduir mitjançant aquesta mesura(29,30). Tot i així, la incidència de càries es pot reduir també per mitjà d'altres factors i des de la dècada de 1980 es considera preferible que l'administració de fluorur no es realitzi mitjançant de la fluoració de l'aigua de consum públic(31), ja que la incorporació de fluorur a l'organisme de forma sistèmica pot produir fluorosi. El risc és encara més elevat en nens perquè l'esmalt en etapes de formació és més sensible al desenvolupament de la malaltia(32). La fluorosi es produeix per una fluoració excessiva del mineral que fa que aquest esdevingui més fràgil i que pot afectar tant els ossos com les dents. La forma més habitual d'administració del fluorur són les solucions tòpiques. D'aquesta manera el fluorur només pot arribar a les primeres capes de mineral però es crea una mena de recobriment de fluorapatita sobre la hidroxiapatita original suficient per disminuir la solubilitat (33-35).

L'efecte del fluorur sobre la hidroxiapatita ha estat àmpliament estudiat. Tot i així, no hi ha tècniques que permetin la determinació directa de la fluorapatita formada sinó que tots els estudis es basen en mesures indirectes. Gran part d'aquests estudis es basen en mètodes relacionats amb la mesura de la quantitat de mineral: nanoduresa, microradiografia, espectrometria de dispersió d'energia (EDS), imatge d'electrons dispersats (BSE) o fluorescència(36-42). D'altres mètodes permeten distingir entre diferents espècies químiques de fluorur segons la seva capacitat de mobilització combinant diferents processos de dissolució selectiva(43,44). En aquest cas, es poden

realitzar mapes de distribució del fluorur en el mineral utilitzant dissolucions localitzades o tècniques de microtomia(29). Tot i així, la falta de tècniques per mesurar directament la incorporació de fluorur en forma de fluorapatita al mineral dental fa que els resultats obtinguts en estudis *in vitro* no sempre tinguin una bona correlació amb els resultats clínics. Aquest fet és especialment destacat en el cas dels materials utilitzats en restauracions que tenen capacitat d'alliberar fluorur(45,46).

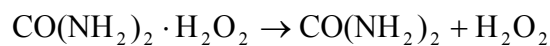
1.1.3 Estètica dental i blanqueig

Actualment l'estètica és un factor important per una gran part de la societat. Molts pacients de les clíniques dentals es mostren preocupats no només per la salut de les dents sinó també pel seu component estètic. En aquest sentit, el color de les dents és un factor clau per la satisfacció del pacient. És per això que en els darrers anys moltes clíniques dentals han incorporat tractaments de blanqueig i s'ha produït una evolució important dels materials i tècniques utilitzats amb la finalitat d'aconseguir unes dents més blanques.

L'aparença de les dents és un fenomen complex afectat per molts factors(47). El color de les dents està influenciat per la combinació entre el seu color intrínsec i per la presència de taques extrínseques que poden formar-se a la seva superfície. El color intrínsec de les dents està associat a les propietats de dispersió i absorció de la llum de l'esmalt i la dentina. Com que l'esmalt és translúcid i la dentina és opaca, les propietats d'aquesta última tenen un paper destacat en el color intrínsec de les dents. El color intrínsec es va enfosquit amb l'edat però es pot veure afectat també per altres fenòmens que alteren l'estructura, composició o gruix dels teixits de la dent(48,49) Malalties metabòliques o congènites, tractaments amb tetraciclina, fluorosi, hemorràgies

a la polpa o traumatismes poden afectar també el color intrínsec de la dent. Les taques extrínseques tendeixen a formar-se en les parts de la dent que són menys accessibles al raspallat o a l'acció abrasiva de la pasta dental. Entre les causes de les taques extrínseques de les dents es poden distingir dos tipus de compostos: els que produeixen les taques per la seva pròpia coloració i els que les produeixen com a resultat de la seva interacció amb la superfície de la dent. El tacat directe acostuma a provenir de cromògens que són absorbits per la placa. El consum de tabac i aliments rics en tanins com vi negre, cafè o te pot afavorir la formació d'aquest tipus de taques. D'altra banda, la incorporació de metalls com coure, ferro o estany al mineral pot produir també un canvi de color.

Les molècules que produeixen les taques a les dents acostumen a tenir com a cromòfors cadenes de dobles enllaços conjugats. La decoloració de les dents es basa en destruir els dobles enllaços de la cadena conjugada mitjançant agents oxidants. La major part de mètodes de blanqueig actuals es basen en el peròxid d'hidrogen. El component actiu que es troba habitualment en els blanquejadors és el peròxid de carbamida (un adducte d'urea i peròxid d'hidrogen), que en contacte amb una solució aquosa com la saliva, pot alliberar el peròxid d'hidrogen:



En general, l'eficàcia dels productes que contenen peròxid de carbamida és aproximadament la mateixa que la dels que contenen una quantitat equivalent de peròxid d'hidrogen(50). El mecanisme de blanqueig del peròxid d'hidrogen no està del tot establert ja que pot donar lloc a diferents espècies oxidants depenent de la temperatura, el pH, la llum i la presència de metalls. Es considera, però, que les espècies més reactives són els radicals $\cdot\text{H}$, $\cdot\text{OOH}$ i $\cdot\text{OH}$, que poden formar-se a partir del

trencament homolític dels enllaços H-O o O-O de la molècula original(51). Per tal d'accelerar el procés de blanqueig, és habitual utilitzar l'activació amb llum del peròxid per tal d'afavorir la formació de radicals $\cdot\text{OH}$. Tot i així, alguns estudis suggereixen que, si bé la llum pot tenir un important efecte en la millora del blanqueig, cal controlar el risc potencial de sobreescalfament de la dent(52).

1.2 Alliberació controlada de fàrmacs

En la primera part del treball que es presenta s'ha estudiat la incorporació d'un sistema d'alliberació controlada de fluorur a un adhesiu dental.

L'alliberació controlada de fàrmacs és una estratègia emprada en l'administració de medicaments que permet reduir els efectes secundaris i millorar la biodisponibilitat del principi actiu. A diferència de l'administració convencional, l'alliberació controlada permet aconseguir perfils de concentració constants (Figura 1-3).

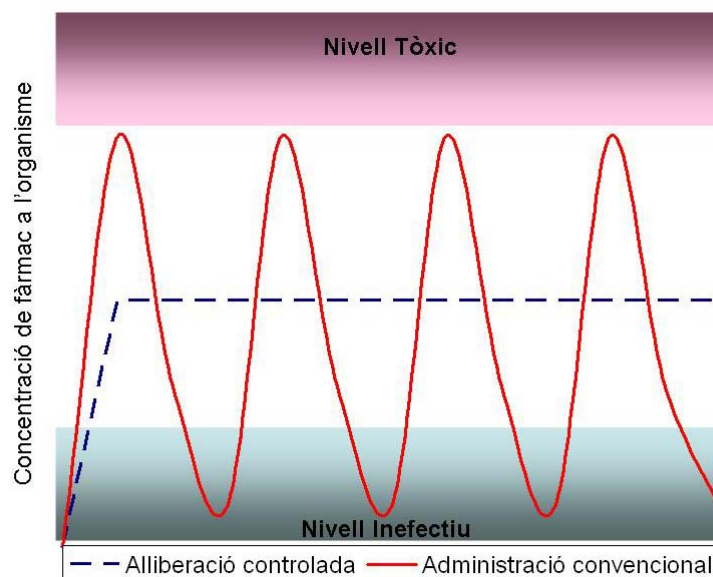


Figura 1-3 Perfils de concentració d'un fàrmac a l'organisme segons el sistema d'administració

Les formulacions d'alliberació controlada estan basades en materials biocompatibles que poden ser implantats a la zona de l'organisme on interessa que es produeixi l'acció del principi actiu del fàrmac. Aquesta estratègia permet aconseguir concentracions òptimes del fàrmac a la zona a tractar i alhora evitar els possibles efectes tòxics derivats de l'acció del fàrmac en altres parts de l'organisme(53).

L'alliberació controlada acostuma a utilitzar combinacions de substàncies biològicament actives amb materials polimèrics. La forma com aquests es combinen permet distingir entre dues estratègies:

- Combinacions físiques.
 - Encapsulació de l'agent actiu en un material polimèric en què la seva alliberació es controla per la difusió a través de les parets del material(54).
 - Dispersió o dissolució de l'agent actiu en una matriu polimèrica la qual pot ser o no biodegradable. L'alliberació de l'agent actiu es controla generalment per difusió a través de la matriu per erosió química o biològica o per combinació d'ambdues(55).
- Combinacions químiques: l'agent actiu s'uneix a la matriu polimèrica mitjançant enllaços iònics o covalents i s'allibera per l'acció d'un medi reactiu que trenca aquests enllaços(56,57).

Algunes vegades, poden combinar-se les dues estratègies i aconseguir un control fisico-químic del procés. Existeixen, per exemple, formulacions en què el principi actiu està enllaçat químicament a un bescanviador iònic i aquest es troba alhora encapsulat en una matriu polimèrica(58,59).

1.2.1 Aplicació de l'alliberació controlada a la remineralització dental

Existeixen diferents materials i estratègies dissenyats per alliberar substàncies que contribueixen a la remineralització dental actuant directament sobre el mineral o bé sobre els bacteris de la placa(60-62).

Com a agent remineralitzant, el fluorur ha estat incorporat a diversos materials. En aquest sentit, un dels materials més estudiats són els ionòmers de vidre. Els ionòmers de vidre són ciments dentals formats a partir d'un vidre d'aluminosilicat en pols i una solució aquosa de polímers i copolímers de l'àcid acrílic. Els ionòmers de vidre tenen la propietat d'alliberar quantitats de fluorur relativament grans en un període de temps curt quan s'acaben d'implantar i de seguir alliberant quantitats més petites durant un període de temps més llarg(63). A més, si la concentració de fluorur en el medi augmenta, es poden recarregar.

Un dels avantatges més destacats dels sistemes d'alliberació controlada a l'hora d'aplicar-los a la remineralització dental és la possibilitat d'incorporar simultàniament substàncies que podrien interferir-se. En aquest sentit, al Grup de Tècniques de Separació de la UAB s'ha desenvolupat un material basat en resines de bescanvi iònic (NMTD) que permet aportar simultàniament els ions calci, fosfat i fluorur(64). L'augment simultani de la concentració d'aquests tres ions satura ràpidament la solució en fluorapatita i afavoreix la seva formació. En general, però, les formulacions dels productes dentals eviten incorporar alhora calci i fluorur, ja que la baixa solubilitat del fluorur de calci ($k_{ps} \sim 10^{-10}$) fa que aquest precipiti, disminuint així la disponibilitat dels dos ions. Mitjançant la combinació de diferents resines de bescanvi iònic en el material

NMTD, s'han pogut aconseguir pastes dentals i xiclets amb un gran potencial remineralitzador(65,66).

1.3 Bescanvi iònic

El bescanvi iònic consisteix en la substitució, generalment reversible, entre els ions làbils immobilitzats en una matriu sòlida o líquida i els d'una dissolució d'electròlit(67). La captació d'ions per part del material bescanviador haurà de suposar l'alliberació simultània d'una quantitat estequiòmicament equivalent d'ions del mateix signe, mantenint-se així l'electroneutralitat del sistema. Aquesta propietat, juntament amb el mecanisme diferenciat de retenció de les espècies, és el que distingeix el procés de bescanvi iònic dels processos d'absorció i adsorció, en què també es dona la interacció entre un sòlid i espècies en dissolució.

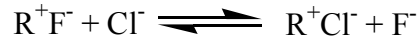
Els materials bescanviadors d'ions es poden classificar segons diferents criteris. Entre ells, un dels més utilitzats distingeix els bescanviadors segons el seu fonament d'actuació, que està determinat pel grup funcional que posseeix el material bescanviador(68). Així, podem distingir entre:

- Bescanviadors aniònics: contenen grups catiónics fixos amb anions units per forces electrostàtiques bescanviables per anions presents a la dissolució.
- Bescanviadors catiónics: contenen grups aniònics fixos amb cations units per forces electrostàtiques bescanviables per cations presents a la dissolució.
- Bescanviadors bifuncionals: contenen dos grups funcionals de la mateixa naturalesa (catiònics o aniònics) o bé un grup de cada naturalesa (cas en què es coneixen com a bescanviadors amfòters).
- Bescanviadors quelants: contenen un grup quelant.

Un exemple de reacció de bescanvi catiónic seria:



mentre que un procés de bescanvi aniònic es podria exemplificar com:



Els materials bescanviadors d'ions són, doncs, polielectròlits insolubles que contenen llocs fixes carregats positiva o negativament neutralitzats per ions del signe contrari, anomenats contraions, que poden bescanviar-se per altres ions del mateix signe.

Els processos de bescanvi iònic s'utilitzen en àrees molt diverses i es troben en una gran quantitat de processos industrials. Destaquen els processos de tractament d'aigües(69,70), les separacions analítiques(71,72), la farmàcia i la medicina(73-75), etc.

1.3.1 Resines de bescanvi iònic

Els polímers funcionalitzats amb grups bescanviadors iònics més destacats són les resines de bescanvi iònic. Aquestes, juntament amb les membranes bescanviadores, són les més utilitzades en processos industrials(67,76).

Els grups funcionals emprats més habitualment en les resines de bescanvi iònic es mostren a la Taula 1-1.

Bescanviadors catiónics	Bescanviadors aniònics
$-\text{SO}_3^-$	$-\text{NH}_3^+$
$-\text{COO}^-$	$\begin{array}{c} + \\ \diagup \text{NH}_2 \end{array}$
$-\text{PO}_3^{2-}$	$\begin{array}{c} + \\ \diagup \text{N} \end{array}$
$-\text{AsO}_3^{2-}$	$\begin{array}{c} + \\ \diagup \text{S} \end{array}$

Taula 1-1 Grups funcionals emprats en resines de bescanvi iònic

La síntesi d'una resina de bescanvi iònic ha de permetre l'obtenció d'una matriu tridimensional de cadenes d'hidrocarburs entrecruades que suportin grups iònics en posicions fixes i amb una estructura tal que permeti una bona difusió dels ions cap als llocs actius de l'interior del polímer. Això dependrà de propietats com el seu grau d'inflament (fenomen conegut com a *swelling*), la compatibilitat amb el medi en el qual es troben, la porositat i l'estabilitat química, tèrmica i mecànica.

Així, en el seu procés de preparació i síntesi cal tenir en compte dos factors importants: la constitució de la matriu polimèrica base i la introducció dels grups funcionals a la matriu. Aquesta es pot dur a terme a partir de monòmers funcionalitzats, o bé fent reaccionar adequadament el polímer per introduir-hi els grups adequats. Les dues estratègies que s'utilitzen per obtenir resines de bescanvi iònic són la policondensació i la polimerització per addició.

Actualment, a la pràctica la polimerització (Figura 1-4 i Figura 1-5) de resines és emprada més àmpliament que la policondensació (Figura 1-6), ja que permet obtenir

resines amb una estabilitat tèrmica i química molt més alta. D'altra banda, entre el polímers més utilitzats destaquen els copolímers d'estirè i divinilbenzè, que permeten controlar l'entrecreuant de forma reproducible i obtenir tant resines microporoses com macroporoses.

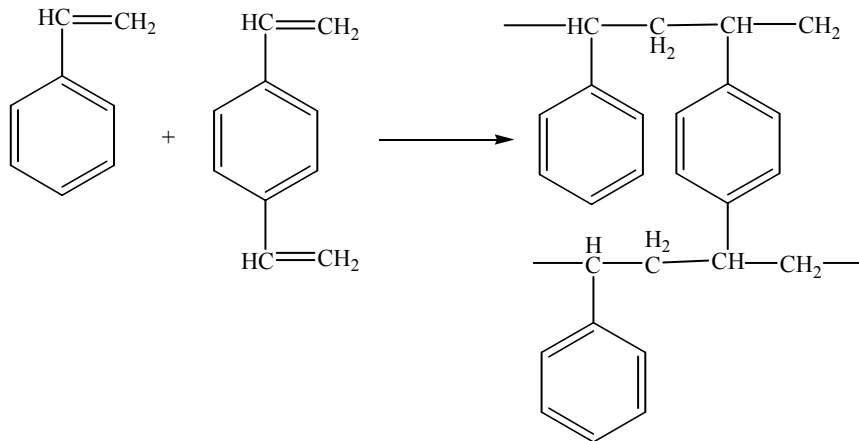


Figura 1-4 Polimerització per addició d'estirè i divinilbenzè

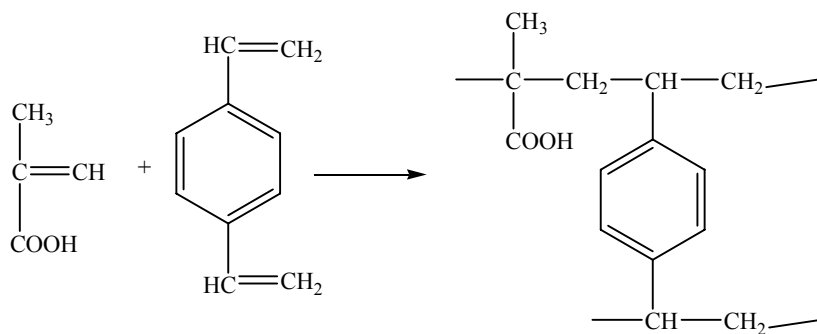


Figura 1-5 Polimerització d'àcid acrílic en presència de divinilbenzè

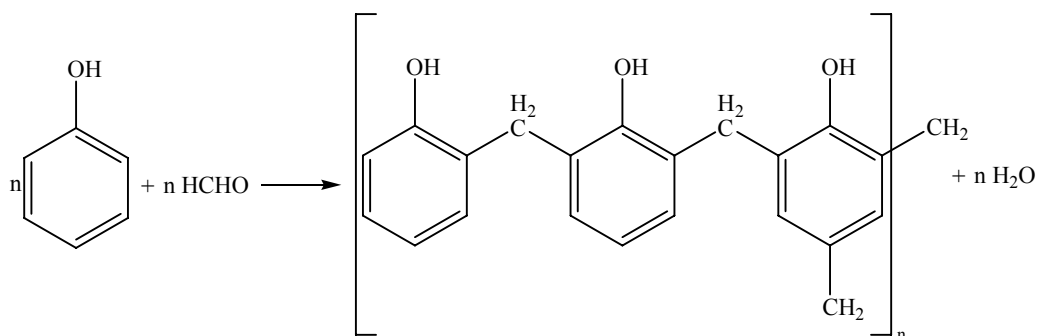


Figura 1-6 Policondensació de fenol i formaldehid

Una vegada construïda la matriu polimèrica base, es poden introduir els grups funcionals d'interès mitjançant reaccions de sulfonació, carboxilació, fosforilació, clorometilació, entre d'altres. Com ja s'ha mencionat, si algun dels monòmers de partida ja conté grups funcionals bescanviadors d'ions, es poden obtenir directament resines amb propietats bescanviadores. Aquest seria el cas, per exemple, de la polimerització entre l'àcid acrílic i el divinilbenzè (Figura 1-5), que permet l'obtenció de resines de bescanvi catiònic gràcies als grups àcid.

Tal i com ja s'ha comentat, l'estructura i el grau d'entrecreuament de la resina determinaran la seva estabilitat química, tèrmica i mecànica així com la mobilitat dels ions làbils a l'interior de la matriu. Així, les resines més entrecreuades són més estables però presenten més dificultats per a inflar-se, de manera que presenten certs impediments al moviment dels ions làbils. Les resines amb un grau d'entrecreuament baix, en canvi, són toves i de tipus gelatinós. D'altra banda, segons l'estructura de la matriu polimèrica obtinguda en el procés de síntesi, les resines de bescanvi iònic es poden classificar en quatre grups:

- **Resines microporoses o de tipus gel:** estan formades per una xarxa macroscòpicament homogènia i elàstica, que conté una certa part del dissolvent

utilitzat en la seva obtenció i que no presenta porus sinó canals en la seva estructura.

- **Resines macroporoses:** la principal característica d'aquestes resines és una matriu amb un alt grau d'entrecreament i una estructura amb macroporus i microporus que fa que tinguin una elevada àrea superficial.
- **Resines isoporoses:** l'estructura dels porus i el grau d'entrecreament d'aquestes resines es modifiquen formant ponts de metilè durant la seva síntesi de manera que s'obtenen polímers amb una mida de porus força uniforme.
- **Resines pel·liculars:** són un tipus especials de bescanviadors iònics formats per capes molt primes de material bescanviador immobilitzades sobre un suport inert.

La concentració dels grups funcionals immobilitzats a la matriu polimèrica determina la capacitat de la resina mentre que la seva naturalesa en determina la selectivitat. D'aquesta manera, es poden establir seqüències de selectivitat en funció de la naturalesa i tipus de resina de bescanvi iònic per a una sèrie d'ions determinats(77). D'altra banda, si els grups de la resina tenen propietats àcid-base el pH afectarà l'equilibri del procés i farà que els grups es trobin en una o altra forma.

La capacitat de bescanvi d'una resina bescanviadora d'ions es pot definir com el nombre de grups funcionals específics units a la matriu polimèrica per unitat de massa de resina i acostuma a expressar-se en meq/g(68). També es defineix la capacitat aparent (o efectiva) com el nombre de contraions bescanviables per unitat de massa de resina. La capacitat aparent és inferior a la capacitat de bescanvi quan els grups

susceptibles de ser ionitzats no estan dissociats completament, fet que dependrà de les condicions experimentals com la concentració de la dissolució, pH, etc.

1.3.2 Equilibri de bescanvi iònic

L'equilibri de bescanvi iònic s'estableix quan un bescanviador iònic es posa en contacte amb una dissolució d'electròlit que conté un contraió diferent del que es troba immobilitzat en el bescanviador. Una vegada assolit aquest estat, tant el bescanviador com la solució contenen ambdues espècies iòniques A i B i la selectivitat que presenti el bescanviador envers un ió en concret determinarà la direcció cap a la qual es desplaçarà l'equilibri, que pot caracteritzar-se mitjançant el factor de separació, el coeficient de selectivitat o el coeficient de distribució.

El factor de separació indica la preferència del bescanviador iònic per un dels ions presents en la dissolució i es representa amb la lletra α amb un superíndex i un subíndex relatiu a les dues espècies (ió d'interès i ió interferent, respectivament) que participen en el procés de bescanvi iònic:

$$\alpha_B^A = \frac{\overline{m_A} m_B}{m_B \overline{m_A}} = \frac{\overline{C_A} C_B}{C_B \overline{C_A}} = \frac{\overline{x_A} x_B}{x_B \overline{x_A}} \quad (\text{Eq. 1.1})$$

on $\overline{m}_i, \overline{C}_i$, i \overline{x}_i corresponen a la massa, concentració i fracció molar dels ions en fase resina i m_i, C_i i x_i a la massa, concentració i fracció molar dels ions en dissolució.

El coeficient de selectivitat s'utilitza per descriure l'equilibri de bescanvi iònic sobretot en estudis teòrics. Es representa amb la lletra K i es defineix com:

$$K_B^A = \frac{\overline{m}_A^{|z_B|} \overline{m}_B^{|z_A|}}{\overline{m}_B^{|z_A|} \overline{m}_A^{|z_B|}} = \frac{\overline{C}_A^{|z_B|} \overline{C}_B^{|z_A|}}{\overline{C}_B^{|z_A|} \overline{C}_A^{|z_B|}} = \frac{\overline{x}_A^{|z_B|} \overline{x}_B^{|z_A|}}{\overline{x}_B^{|z_A|} \overline{x}_A^{|z_B|}} = (\alpha_B^A)^{|z_A|} \quad (\text{Eq. 1.2})$$

on $|z_i|$ correspon al valor absolut de la càrrega de cadascun dels ions que intervenen en el procés de bescanvi iònic.

El coeficient de selectivitat prediu l'afinitat de la resina respecte a un ió determinat en unes condicions experimentals concretes. D'acord amb l'equació 1.2, valors de K superiors a 1 indiquen que la resina és més afí a l'espècie A, mentre que quan K és inferior a 1 la resina és més afí a l'espècie B. Si $K = 1$ el bescanviador no mostra preferència per cap dels dos ions en concret. A diferència del factor de separació, el coeficient de selectivitat inclou factors estequiomètrics en la seva definició, de manera que quan la relació estequiomètrica entre els ions sigui 1:1, el coeficient de selectivitat serà equivalent al factor de separació.

El coeficient de distribució és el més emprat habitualment en algunes aplicacions pràctiques. Per una espècie iònica i determinada, el coeficient de distribució es representa com λ_i i es defineix com:

$$\lambda_i = \frac{\overline{m}_i}{m_i} = \frac{\overline{x}_i \overline{m}}{x_i m} \quad (\text{Eq. 1.3})$$

on m es la massa total de la espècie iònica que es distribueix.

En alguns estudis teòrics s'utilitza també la constant d'equilibri termodinàmic, que a diferència del factor de separació, el coeficient de selectivitat i el coeficient de distribució, no depèn de les condicions experimentals sinó només de la temperatura:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln k_B^A \quad (\text{Eq. 1.4})$$

La selectivitat dels bescanviadors iònics, és a dir, la seva preferència per un ió determinat depèn de diferents factors. Així, com a norma general, els bescanviadors iònics tenen més afinitat pels contraions de major radi iònic (que estan menys hidratats) i de valència més alta, a causa de l'atracció electrostàtica que n'afavoreix la difusió fins als grups carregats del bescanviador iònic. Aquest darrer fenomen es coneix com a electroselectivitat.

L'equilibri de bescanvi iònic també es veu afectat per la solvatació dels ions i la pressió que provoca l'inflat del bescanviador. Els ions que tinguin un radi de solvatació més gran causaran un major inflat del bescanviador, de manera que l'estructura elàstica d'aquest es veurà obligada a estirar-se i tindrà tendència a tornar a la posició original, més relaxada. Aquest relaxament pot aconseguir-se bescanviant un ió de mida gran per un de més petit, de manera que el bescanviador iònic prefereix el contraió de menor volum solvatat equivalent.

També afecten l'equilibri del bescanvi iònic les interaccions específiques entre el bescanviador i un ió (formació de parells iònics, formació d'enllaços, atraccions electrostàtiques) o entre l'ió i una altra espècie en solució (formació de complexos, precipitació). Els bescanviadors iònics tenen tendència a preferir els ions que presenten una interacció més forta amb els grups iònics fixes o amb la matriu i que participen menys en la formació de complexos en la solució.

En resum, doncs, la selectivitat del bescanviador iònic es veurà afectada tant per les seves pròpies característiques (graü d'entrecruament, naturalesa i tipus de

bescanviador, etc.) com per les característiques de la dissolució externa (pH, agents complexants, etc.)

1.3.3 Mecanisme i cinètica del bescanvi iònic

Si suposem partícules esfèriques d'un material bescanviador amb contraions làbils A que es troben en contacte amb una solució agitada d'un electròlit que conté contraions de tipus B, l'equilibri s'assoleix a mida que els ions A difonen de les partícules cap a la solució i els ions B difonen des de la solució cap a les partícules. L'etapa de reacció (és a dir, el procés de bescanvi en si) és sempre molt més ràpida que les diverses etapes de difusió que constitueixen el mecanisme del bescanvi iònic. De manera general, doncs, es pot considerar el procés de bescanvi iònic com a un fenomen de difusió.

Si obviem els fenòmens d'adsorció i absorció d'espècies que poden donar-se a la superfície del bescanviador i considerem que a l'interior de la partícula no es donen reaccions químiques (a part de la que implica el procés de bescanvi iònic) ni es formen parells iònics amb els co-ions (ions que necessàriament acompanyen als contraions en dissolució per a la mútua neutralització de les càrregues), podem distingir cinc etapes, de les quals quatre són etapes de transferència de massa (difusió), i l'altre és la pròpia reacció de bescanvi:

1. Difusió de l'ió B des del si de la dissolució cap a la pel·lícula de dissolució que envolta el bescanviador.
2. Difusió de l'ió B a través de l'interior de la partícula de bescanviador.
3. Bescanvi iònic.

4. Difusió de l'ió A desplaçat del bescanviador a través de l'interior de la partícula i cap a la pel·lícula de dissolució que envolta el bescanviador.
5. Difusió de l'ió A des de la pel·lícula que envolta el bescanviador cap al si de la dissolució.

De totes aquestes etapes, la més lenta serà la que determinarà la cinètica del procés de bescanvi iònic.

Tenint en compte que s'ha de mantenir l'electroneutralitat, el flux dels ions ha de ser simultani, de manera que la difusió del ió A ha de ser contrarestada per la de l'ió B i finalment es consideren només les dues etapes cinètiques que s'esquematitzen a la Figura 1-7:

1. Difusió a la fase líquida: difusió dels ions a través de la pel·lícula de dissolució que envolta el bescanviador (difusió interparticular).
2. Difusió a la fase de bescanviador: difusió dels ions a través de l'interior del bescanviador (difusió intraparticular)

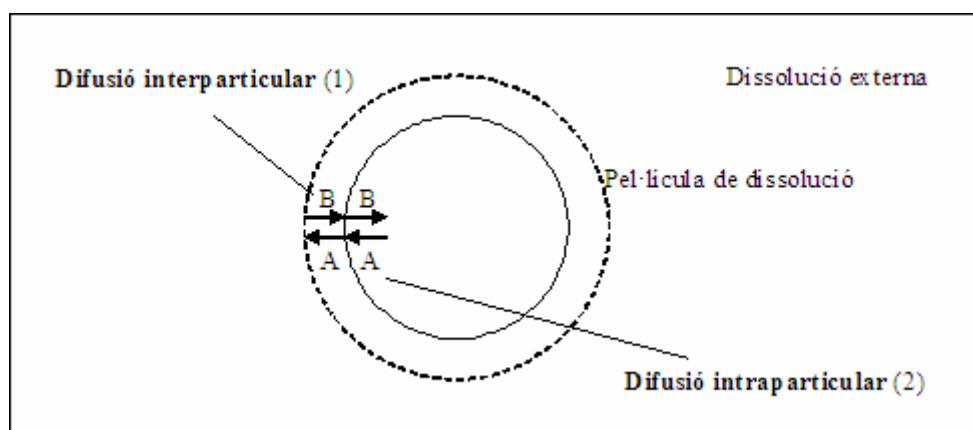


Figura 1-7 Processos de difusió considerats per a l'estudi cinètic del bescanvi iònic

Tractant-se doncs d'un procés de difusió, la velocitat del procés de bescanvi iònic es pot descriure a partir d'un model basat en la primera llei de Fick:

$$J_i = -D_i \nabla C_i$$

on J_i és el flux de l'espècie i que difon, ∇C_i és el seu gradient de concentració i D_i és el coeficient de difusió.

Per tal que la llei de Fick sigui aplicable a un bescanviador iònic, es considera aquest com una fase pràcticament homogènia i s'expressa la concentració d'ions al bescanviador com a mols per unitat de volum de la resina inflada.

A més de la resistència imposada per la matriu, cal tenir en compte la influència sobre la difusió del camp elèctric induït. Si s'inclou la transferència elèctrica al tractament matemàtic s'obté l'equació de Nernst-Planck:

$$J_i = -\bar{D}_i \nabla \bar{C}_i - \bar{U}_i z_i \bar{C}_i \nabla \varphi \quad (\text{Eq. 1.5})$$

on z_i és la càrrega de l'ió, $\nabla \varphi$ és el gradient de potencial elèctric i \bar{U}_i és la mobilitat electroquímica de l'ió a la fase resina, i que s'expressa com:

$$\bar{U}_i = \bar{D}_i \frac{F}{R \cdot T} \quad (\text{Eq. 1.6})$$

on F és la constant de Faraday, R la constant dels gasos ideals i T la temperatura.

Considerant que a l'interior del bescanviador no hi ha presència de co-ions i tenint en compte que tant la concentració de grups funcionals carregats fixes com els coeficients de difusió de les espècies es mantenen constants, es poden combinar les equacions de Nernst-Planck per a ambdós ions en condicions d'electroneutralitat i sense transferència de càrrega neta, obtenint-se l'equació que es mostra a continuació:

$$\overline{J}_A = -\overline{D}_{AB} \nabla \overline{C}_A \quad (\text{Eq. 1.7})$$

on D_{AB} és el coeficient d'interdifusió que es defineix com:

$$\overline{D}_{AB} = \frac{\overline{D}_A \cdot \overline{D}_B \cdot (z_A^2 \cdot \overline{C}_A + z_B^2 \cdot \overline{C}_B)}{z_A^2 \cdot \overline{C}_A \cdot \overline{D}_A + z_B^2 \cdot \overline{C}_B \cdot \overline{D}_B} \quad (\text{Eq. 1.8})$$

El coeficient d'interdifusió depèn de la concentració relativa dels dos ions, de les seves càrregues i de les característiques del bescanviador.

El principal objectiu dels models cinètics que descriuen el bescanvi iònic és la identificació dels paràmetres que en regeixen la velocitat així com la identificació del pas determinant del procés. Una vegada establert el pas determinant de la velocitat, el principal paràmetre és el coeficient de difusió.

1.4 Objectius

Considerant el que s'ha exposat fins ara, el principal objectiu dels estudis que es presenten en aquesta memòria és millorar la funcionalitat de diferents materials dentals comercials mitjançant la seva modificació. A més, es pretén també desenvolupar nous mètodes analítics que permetin avaluar l'efecte de processos de remineralització de l'esmalt dental.

Per tal d'assolir aquests objectius, s'han desenvolupat diferents estudis mitjançant els quals es pretén:

- Estudiar el comportament d'un adhesiu dental modificat amb una resina de bescanvi iònic en forma d'ió fluorur mitjançant:
 - Caracterització cinètica i termodinàmica del procés de bescanvi iònic
 - Avaluació de diferents formes d'aplicació del material modificat
 - Avaluació de la força d'adhesió del material modificat
- Desenvolupar nous mètodes analítics per a la determinació del fluorur incorporat al mineral dental mitjançant l'anàlisi directe de les espècies de calci en el teixit. En aquest sentit, s'han realitzat els següents estudis:
 - Anàlisi del mineral mitjançant difracció de raigs X
 - Anàlisi del mineral mitjançant espectroscòpia Raman.
- Millorar l'efecte d'un blanquejador dental per mitjà de l'addició de Fe(III) com a catalitzador.

1.5 Bibliografia

- (1) Wataha JC. Biocompatibility of dental materials. In: Craig RG, Powers JM, editors. Restorative dental materials. 11th ed. St. Louis: Mosby, Inc.; 2002. p. 125-162.
- (2) Zimehl R, Hannig M. Non metallic restorative materials based on glass ionomer cements — recent trends and developments. *Colloid. Surface. A* 2000;163(1):55.
- (3) Du C, Falini G, Fermani S, Abbott C, Moradian-Oldak J. Supramolecular assembly of amelogenin nanospheres into birefringent microribbons. *Science* 2005 Mar 4;307(5714):1450-1454.
- (4) Nightingale JP, Lewis D. Pole figures of the orientation of apatite in bones. *Nature* 1971 Jul 30;232(5309):334-335.
- (5) Gajjeraman S, Narayanan K, Hao J, Qin C, George A. Matrix macromolecules in hard tissues control the nucleation and hierarchical assembly of hydroxyapatite. *J.Biol.Chem.* 2007 Jan 12;282(2):1193-1204.
- (6) Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet* 2007 Jan 6;369(9555):51-59.
- (7) Baca García P. Saliva y salud oral. In: Cuenca Sala E, Manau Navarro C, Serra Majem L, editors. . 2a ed. Barcelona: Masson; 1999. p. 57-67.
- (8) Hannig C, Hamkens A, Becker K, Attin R, Attin T. Erosive effects of different acids on bovine enamel: release of calcium and phosphate in vitro. *Arch.Oral Biol.* 2005 Jun;50(6):541-552.
- (9) Coppa A, Bondioli L, Cucina A, Frayer DW, Jarrige C, Jarrige JF, et al. Palaeontology: early Neolithic tradition of dentistry. *Nature* 2006 Apr 6;440(7085):755-756.
- (10) Craig RG. Scope and history of restorative materials. In: Craig RG, Powers JM, editors. Restorative dental materials. 11th ed. St. Louis: Mosby, Inc.; 2002. p. 1-18.
- (11) Bodde HE, Nelson DG, Koops PG, Arends J. Influence of repeated APF applications on long-term remineralization of initial lesions in bovine enamel. *J.Dent.Res.* 1985 Jan;64(1):12-18.
- (12) Nyvad B, ten Cate JM, Fejerskov O. Arrest of root surface caries in situ. *J.Dent.Res.* 1997 Dec;76(12):1845-1853.
- (13) A. Bernaus. Application of X-ray Synchrotron Based Techniques to the Study of the Speciation Sorption and Bioavailability of Hg in Environmental and Biological Systems. Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona; 2006.
- (14) Powers JM. Composite restorative materials. In: Craig RG, Powers JM, editors. Restorative dental materials. 11th ed. St. Louis: Mosby, Inc.; 2002. p. 231-258.

- (15) Bayne S. Bonding to dental substrates. In: Craig RG, Powers JM, editors. Restorative dental materials. 11th ed. St. Louis: Mosby, Inc.; 2002. p. 259-288.
- (16) Buonocore MG. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. *J.Dent.Res.* 1955 Dec;34(6):849-853.
- (17) Frankenberger R, Tay FR. Self-etch vs etch-and-rinse adhesives: effect of thermo-mechanical fatigue loading on marginal quality of bonded resin composite restorations. *Dent.Mater.* 2005 May;21(5):397-412.
- (18) Van Landuyt KL, Kanumilli P, De Munck J, Peumans M, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Bond strength of a mild self-etch adhesive with and without prior acid-etching. *J.Dent.* 2006 Jan;34(1):77-85.
- (19) Chen H, Tang Z, Liu J, Sun K, Chang S-, Peters MC, et al. Acellular Synthesis of a Human Enamel-like Microstructure. *Adv Mater* 2006;18(14):1846-1851.
- (20) Zhan J, Tseng Y-, Chan JCC, Mou C-. Biomimetic Formation of Hydroxyapatite Nanorods by a Single-Crystal-to-Single-Crystal Transformation. *Advanced Functional Materials* 2005;15(12):2005-2010.
- (21) Yamagishi K, Onuma K, Suzuki T, Okada F, Tagami J, Otsuki M, et al. Materials chemistry: a synthetic enamel for rapid tooth repair. *Nature* 2005 Feb 24;433(7028):819.
- (22) Moreno EC, Kresak M, Zahradnik RT. Physicochemical aspects of fluoride-apatite systems relevant to the study of dental caries. *Caries Res.* 1977;11 Suppl 1:142-171.
- (23) Driessens FC. Relation between apatite solubility and anti-cariogenic effect of fluoride. *Nature* 1973 Jun 15;243(5407):420-421.
- (24) Moreno EC, Kresak M, Zahradnik RT. Fluoridated hydroxyapatite solubility and caries formation. *Nature* 1974 Jan 4;247(5435):64-65.
- (25) Brown WE, Gregory TM, Chow LC. Effects of fluoride on enamel solubility and cariostasis. *Caries Res.* 1977;11 Suppl 1:118-141.
- (26) Marquis RE. Antimicrobial actions of fluoride for oral bacteria. *Can.J.Microbiol.* 1995 Nov;41(11):955-964.
- (27) Belli WA, Buckley DH, Marquis RE. Weak acid effects and fluoride inhibition of glycolysis by *Streptococcus mutans* GS-5. *Can.J.Microbiol.* 1995 Sep;41(9):785-791.
- (28) Bradshaw DJ, Marsh PD. Analysis of pH-driven disruption of oral microbial communities in vitro. *Caries Res.* 1998;32(6):456-462.
- (29) Thuy TT, Nakagaki H, Ha NT, Morita I, Tatematsu M, Lan HA, et al. Fluoride profiles in premolars after different durations of water fluoridation in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Arch.Oral Biol.* 2003 May;48(5):369-376.
- (30) Ingram GS, Agalamanyi EA, Higham SM. Caries and fluoride processes. *J.Dent.* 2005 Mar;33(3):187-191.

- (31) Leverett DH. Fluorides and the changing prevalence of dental caries. *Science* 1982 Jul 2;217(4554):26-30.
- (32) Lyaruu DM, Bervoets TJ, Bronckers AL. Short exposure to high levels of fluoride induces stage-dependent structural changes in ameloblasts and enamel mineralization. *Eur.J.Oral Sci.* 2006 May;114 Suppl 1:111-5; discussion 127-9, 380.
- (33) deLeeuw NH. Resisting the Onset of Hydroxyapatite Dissolution through the Incorporation of Fluoride. *J. Phys. Chem. B* 2004;108(6):1809-1811.
- (34) Okazaki M, Tohda H, Yanagisawa T, Taira M, Takahashi J. Differences in solubility of two types of heterogeneous fluoridated hydroxyapatites. *Biomaterials* 1998 Apr-May;19(7-9):611-616.
- (35) Barry AB, Zhuang H, Baig AA, Higuchi WI. Effect of fluoride pretreatment on the solubility of synthetic carbonated apatite. *Calcif.Tissue Int.* 2003 Mar;72(3):236-242.
- (36) 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 Dec 15;280(2):442-448.
- (37) Kielbassa AM, Wrbas KT, Schulte-Monting J, Hellwig E. Correlation of transversal microradiography and microhardness on in situ-induced demineralization in irradiated and nonirradiated human dental enamel. *Arch.Oral Biol.* 1999 Mar;44(3):243-251.
- (38) Ten Cate JM, Nyvad B, Van de Plassche-Simons YM, Fejerskov O. A quantitative analysis of mineral loss and shrinkage of in vitro demineralized human root surfaces. *J.Dent.Res.* 1991 Oct;70(10):1371-1374.
- (39) Savarino L, Breschi L, Tedaldi M, Ciapetti G, Tarabusi C, Greco M, et al. Ability of restorative and fluoride releasing materials to prevent marginal dentine demineralization. *Biomaterials* 2004 Mar;25(6):1011-1017.
- (40) Ngo H, Ruben J, Arends J, White D, Mount GJ, Peters MC, et al. Electron probe microanalysis and transverse microradiography studies of artificial lesions in enamel and dentin: a comparative study. *Adv.Dent.Res.* 1997 Nov;11(4):426-432.
- (41) Angker L, Nockolds C, Swain MV, Kilpatrick N. Quantitative analysis of the mineral content of sound and carious primary dentine using BSE imaging. *Arch.Oral Biol.* 2004 Feb;49(2):99-107.
- (42) Pretty IA, Smith PW, Edgar WM, Higham SM. Detection of in vitro demineralization adjacent to restorations using quantitative light induced fluorescence (QLF). *Dent.Mater.* 2003 Jul;19(5):368-374.
- (43) Huang A, Nakagaki H, Tsuboi S, Ji H, Ohno N, Chen R, et al. Fluoride profiles of perikymata in enamel surfaces of human premolars. *Arch.Oral Biol.* 1998 Sep;43(9):669-677.
- (44) Weatherell JA, Robinson C, Hallsworth AS. Changes in the fluoride concentration of the labial enamel surface with age. *Caries Res.* 1972;6(4):312-324.

- (45) Wiegand A, Buchalla W, Attin T. Review on fluoride-releasing restorative materials--fluoride release and uptake characteristics, antibacterial activity and influence on caries formation. *Dent.Mater.* 2007 Mar;23(3):343-362.
- (46) Peris AR, Mitsui FHO, Lobo MM, Bedran-russo AKB, Marchi GM. Adhesive systems and secondary caries formation: Assessment of dentin bond strength, caries lesions depth and fluoride release. *Dent.Mater.* 2007;23(3):308-316.
- (47) Joiner A. Tooth colour: a review of the literature. *J.Dent.* 2004;32 Suppl 1:3-12.
- (48) Watts A, Addy M. Tooth discolouration and staining: a review of the literature. *Br.Dent.J.* 2001 Mar 24;190(6):309-316.
- (49) Sanchez AR, Rogers RS,3rd, Sheridan PJ. Tetracycline and other tetracycline-derivative staining of the teeth and oral cavity. *Int.J.Dermatol.* 2004 Oct;43(10):709-715.
- (50) Joiner A. The bleaching of teeth: a review of the literature. *J.Dent.* 2006 Aug;34(7):412-419.
- (51) Kawamoto K, Tsujimoto Y. Effects of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching. *J. Endodont.* 2003;30(1):45-50.
- (52) Luk K, Tam L, Hubert M. Effect of light energy on peroxide tooth bleaching. *J.Am.Dent.Assoc.* 2004 Feb;135(2):194-201; quiz 228-9.
- (53) Cardot JM, Chaumont C, Dubray C, Costantini D, Aiache JM. Comparison of the pharmacokinetics of miconazole after administration via a bioadhesive slow release tablet and an oral gel to healthy male and female subjects. *Br.J.Clin.Pharmacol.* 2004 Oct;58(4):345-351.
- (54) Shah KP, Chafetz L. Use of sparingly soluble salts to prepare oral sustained release suspensions. *International Journal of Pharmaceutics* 1994;109(3):271-281.
- (55) Majid Khan G, Zhu J. Studies on drug release kinetics from ibuprofen-carbomer hydrophilic matrix tablets: influence of co-excipients on release rate of the drug. *Journal of Controlled Release* 1999;57(2):197-203.
- (56) Scholsky KM, Fitch RM. Controlled release of pendant bioactive materials from acrylic polymer colloids. *Journal of Controlled Release* 1986;3(1-4):87-102.
- (57) Plaizier-Vercammen JA. Investigation of the bioavailability of codeine from a cation ion-exchange sulfonic acid : 1. Effect of parameters. *International Journal of Pharmaceutics* 1992;85(1-3):45-50.
- (58) Sriwongjanya M, Bodmeier R. Entrapment of drug-loaded ion-exchange particles within polymeric microparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 1997;158(1):29-38.
- (59) Jordi Margineda. *Estudios de procesos de adsorción/desorción de iones en resinas encapsuladas. Aplicación a la remineralización de tejidos dentales.* Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona; 2004.

- (60) Ehara A, Torii M, Imazato S, Ebisu S. Antibacterial activities and release kinetics of a newly developed recoverable controlled agent-release system. *J.Dent.Res.* 2000 Mar;79(3):824-828.
- (61) Steinberg D, Friedman M. Development of sustained-release devices for modulation of dental plaque biofilm and treatment of oral infectious diseases. *Drug Dev.Res.* 2000;50(3-4):555-565.
- (62) Steinberg D, Tal T, Friedman M. Sustained-release delivery systems of triclosan for treatment of *Streptococcus mutans* biofilm. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2006;77B(2):282-286.
- (63) De Witte AM, De Maeyer EA, Verbeeck RM, Martens LC. Fluoride release profiles of mature restorative glass ionomer cements after fluoride application. *Biomaterials* 2000 Mar;21(5):475-482.
- (64) Valiente M, inventor. Sociedad Limitado para el Desarrollo Cientifico Aplicado, assignee. Remineralizing material for organomineral tissues. USA patent US 6,413,498 B1. 2002 Jul, 6, 1999.
- (65) Torrado A, Valiente M, inventors. AnonymousDentifrice product. US2004047815. 2004
- (66) Margineda J, Gonzalo A, Valiente M, inventors. Sociedad limitada para el desarrollo científico aplicado, Margineda J, Gonzalo A and Valiente M, assignees. Chewing Gum. WO0249448. 2002
- (67) Dorfner K. *Introduction to ion exchange and ion exchangers*. In: Dorfner K, editor. *Ion exchangers* Berlin-New York: Walter de Gruyter; 1991. p. 7-188.
- (68) Helfferich F. *Ion Exchange*. New York: Dover Publications; 1995.
- (69) Procopio JR, del Mar Ortiz Viana,M., Hernandez LH. Microcolumn Ion-Exchange Method for Kinetic Speciation of Copper and Lead in Natural Waters. *Environ. Sci. Technol.* 1997;31(11):3081-3085.
- (70) Berdal A, Verrie D, Zaganaris E. In: Greig JA, editor. *Ion Exchange at the millenium* Cambridge: Imperial College Press; 2000. p. 101.
- (71) Muraviev D, Noguero J, Valiente M. Tandem Ion-Exchange Fractionation: New Preparative Mode for Separation of Multicomponent Ionic Mixtures. *Anal. Chem.* 1997;69(20):4234-4241.
- (72) Novic M, Gucek M, Tursic J, Liu Y, Avdalovic N. Ion-exchange-based eluent-free preconcentration of some anions. *J.Chromatog.A* 2001 Feb 16;909(2):289-296.
- (73) Sellers EM, Khouw V, Dolman L. Comparative drug adsorption by activated charcoal. *J.Pharm.Sci.* 1977 Nov;66(11):1640-1641.
- (74) Rheinlander T, Caglar G, inventors. AnonymousProcess for the production of pharmaceutical preparations. US2003031626. 2003

(75) Pirotta M. *Ion exchangers in pharmacy, medicine and biochemistry*. In: Dorfner K, editor. *Ion exchangers* Berlin-New York: Walter de Gruyter; 1991. p. 1073-1098.

(76) Mulder M. *Basic Principles of Membrane Technology*. 2nd ed. Dordrecht-Boston-London: Kluwer Academic; 2000.

(77) Korkrisch J. *Handbook of ion exchange resins: their application to inorganic analytical chemistry* Florida: CRC Press; 1989. p. 30-31.

Capítol 2

Metodologia experimental

ÍNDIX

2 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

2.1 TÈCNiques ANALÍTIQUES	53
2.1.1 POTENCIOMETRIA AMB ELÈCTRODE SELECTIU A IÓ FLUORUR	53
2.1.2 ESPECTROSCÒPIA D'EMISSIÓ ATÒMICA EN PLASMA D'ACOBLEMENT INDUÏT	56
2.1.3 MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA	58
2.1.4 DIFRACCIÓ DE RAIGS X	59
2.1.5 ESPECTROSCÒPIA RAMAN	62
2.1.6 SHEAR BOND STRENGTH TEST	64
2.1.7 COLORIMETRIA EN SUPERFÍCIE	67
2.2 PROCEDIMENT EXPERIMENTAL PER A L'ESTUDI DE LA INCORPORACIÓ D'UNA RESINA DE BESCANVI IÒNIC COM A AGENT D'ALLIBERACIÓ CONTROLADA A UN MATERIAL DENTAL	69
2.2.1 CÀRREGA DE LA RESINA	69
2.2.2 MÒLTA, TAMISAT I DETERMINACIÓ DE LA MIDA DE PARTÍCULA	70
2.2.3 SEGUIMENT EN DISCONTINU DE L'ALLIBERACIÓ	71
2.2.4 SEGUIMENT EN CONTINU DE L'ALLIBERACIÓ	73
2.2.5 ESTUDI D'ADHESIÓ DEL MATERIAL MODIFICAT	75
2.2.5.1 Preparació de l'adhesiu modificat	75
2.2.5.2 Preparació de les mostres	76
2.2.5.3 Obtenció dels valors de força d'adhesió	78
2.3 PROCEDIMENT EXPERIMENTAL PER A L'ESTUDI DE LA INCORPORACIÓ DE FLUORUR AL MINERAL DENTAL	79
2.3.1 OBTENCIÓ DELS MINERALS	79
2.3.1.1 Síntesi d'hidroxiapatita parcialment substituïda amb fluorur	79
2.3.1.2 Síntesi de fluorapatita	79
2.3.1.3 Anàlisi elemental dels materials obtinguts	80
2.3.2 ESTUDI DELS MINERALS MITJANÇANT DIFRACCIÓ DE RAIGS X	80
2.3.2.1 Quantificació de fluorur de calci en matriu d'hidroxiapatita	81
2.3.2.2 Estudi dels processos de gravat i remineralització en dents bovines	81
2.3.3 ESTUDI DELS MINERALS MITJANÇANT ESPECTROSCÒPIA RAMAN	82
2.4 PROCEDIMENT EXPERIMENTAL PER A L'ESTUDI DE L'EFECTE DE L'ADDICIÓ DE FE (III) A UN BLANQUEJADOR COMERCIAL	83
2.4.1 PREPARACIÓ I TACAT DELS ESPECIMENS	83
2.4.2 PREPARACIÓ DEL MATERIAL MODIFICAT	84
2.4.3 MESURA DEL BLANQUEIG	84
2.5 BIBLIOGRAFIA	86

2 Metodologia experimental

2.1 Tècniques analítiques

Les tècniques que es descriuen a continuació, han estat utilitzades en el treball que es presenta per tal de caracteritzar els materials estudiats. Aquestes tècniques són:

- Potenciometria amb elèctrode selectiu a ió fluorur, que s'ha utilitzat per mesurar la concentració de ió fluorur en solució.
- Espectroscòpia d'emissió atòmica en plasma d'acoblament induït, emprada per mesurar els continguts totals de calci i fòsfor en mostres en solució.
- Microscòpia electrònica, utilitzada en la determinació de la mida de partícula de les mostres de resina de bescanvi iònic així com en l'estudi morfològic de superfícies.
- Difracció de raigs X, espectroscòpia FTIR i espectroscòpia Raman, que s'han emprat en l'estudi de la composició dels minerals.
- *Shear Bond Strength*, que s'ha utilitzat per caracteritzar l'adhesió de l'adhesiu 3M Single Bond modificat.
- Colorimetria en superfície, emprada en la determinació del percentatge de blanqueig

2.1.1 Potenciometria amb elèctrode selectiu a ió fluorur

La potenciometria amb elèctrode selectiu a ió fluorur s'ha utilitzat per a la determinació d'aquest ió en els estudis d'alliberació de la resina de bescanvi iònic i en la caracterització dels minerals dentals.

Un elèctrode selectiu d'ions (ISE) és un sensor electroquímic capaç de respondre, mitjançant una diferència de potencial, a una espècie concreta present en una solució.

L'elèctrode de fluorur fou desenvolupat l'any 1966(1). Es tracta d'un sensor que dona una resposta nernstiana en un ampli interval d'activitat de l'ió fluorur i que és altament selectiu al mateix en presència de molts altres ions que es troben freqüentment a les aigües públiques i els sistemes biològics. La construcció d'aquest elèctrode de membrana cristal·lina és similar a la de l'elèctrode de vidre utilitzat per la mesura de pH, llevat que el material que constitueix la membrana és una secció en forma de disc d'un monocristall de fluorur d'un element de les terres rares, com LaF_3 , NdF_3 o PrF_3 .

Els fluorurs de terres rares són compostos cristal·lins amb una alta conductivitat elèctrica, gràcies a la mobilitat dels ions fluorur a través de les vacants existents a la xarxa cristal·lina(2). Aquesta conductivitat es pot incrementar dopant el cristall amb un ió divalent com per exemple Eu^{2+} , ja que aquest fet augmenta el nombre de defectes de Frenkel en la xarxa cristal·lina. El sistema basa el seu funcionament en el fet que quan s'introdueix l'elèctrode en una dissolució s'estableix un flux momentani d'ions F^- a través de la interfície existent entre la membrana selectiva i la dissolució:



Aquest fet genera una diferència de potencial a la interfície que origina la resposta de l'elèctrode, mesurada una vegada assolit l'equilibri termodinàmic. L'expressió matemàtica de la resposta d'un elèctrode selectiu a les variacions de concentració ve donada per l'equació de Nernst tal i com ja hem comentat anteriorment:

$$E = E^\circ - 0,0592 \log a_{\text{F}} \quad (\text{Eq 2.1})$$

on E és el potencial, E^0 és el potencial estàndard del sistema i a_F l'activitat de l'ió fluorur a la dissolució.

L'única interferència significativa que presenta el fluorur a l'hora de ser mesurat amb l'elèctrode selectiu és la dels ions hidròxid, degut a les similituds de càrrega i de radi iònic que presenten els ambdós ions. La interferència dels ions hidròxid comença a ser significativa a partir de valors de pH superiors a 8. A pH inferior a 5 són els ions H^+ els que interfereixen en la mesura, degut a la formació d'àcid fluorhídric no dissociat(3).

L'elèctrode no respon directament a la concentració sinó a l'activitat de l'espècie iònica d'interès i ambdues es relacionen mitjançant el coeficient d'activitat, que depèn de la força iònica total del medi. Mitjançant l'ús d'un tampó iònic (conegut com a TISAB – de l'anglès *Total Ionic Strength Adjustment Buffer*), la força iònica es manté pràcticament constant i es pot relacionar el senyal obtingut directament amb la concentració, de manera que és possible utilitzar una sola corba de calibratge per a mostres aquoses de diferents tipus. Els patrons i les mostres es dilueixen amb una solució que compleix simultàniament tres funcions(4):

1. La força iònica total de la dissolució es fixa afegint una concentració d'ions molt més gran que la que presenta la mostra.
2. La dissolució es tampona en un interval de pH que evita la interferència de l'ió hidròxid.
3. S'afegeix citrat o algun altre agent complexant per tal d'evitar les interferències de Ca^{2+} , Fe^{3+} o Al^{3+} , ja que d'aquesta manera es desplacen els ions fluorur que hi puguin estar enllaçats.

En els estudis d'alliberació de fluorur que es presentaran més endavant, l'ús de TISAB es va evitar gràcies a que els patrons de calibratge es van preparar en el mateix medi en el que es trobaven les mostres a analitzar i a l'absència tant d'ions interferents a la senyal de l'ió fluorur com de variacions de pH fora dels límits de mesura de l'elèctrode. D'altra banda, l'elevada força iònica que presenta el medi utilitzat fa que el coeficient d'activitat sigui pràcticament constant i, per tant, l'activitat esdevé directament proporcional a la concentració.

2.1.2 Espectroscòpia d'emissió atòmica en plasma d'acoblament induït

S'ha utilitzat l'espectroscòpia d'emissió atòmica en plasma d'acoblament induït en la determinació quantitativa de calci i fòsfor en els minerals dentals estudiats.

Es tracta d'una tècnica basada en l'atomització, ionització i excitació de les mostres mitjançant una font d'ICP(5). Aquesta font és un plasma d'argó que s'aconsegueix fent fluir el gas per una torxa formada per tres tubs concèntrics de quars. La part superior de la torxa es troba envoltada per una bobina refrigerada per aigua i capaç de produir radiofreqüències a una potència de 2kW a uns 27 MHz (Figura 2-1).

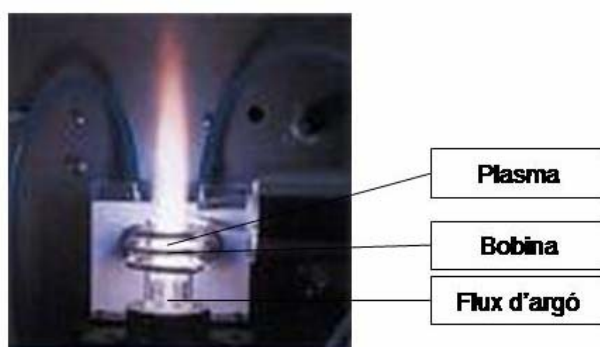


Figura 2-1 Detall de la font ICP

L'argó que flueix per la torxa es ionitza inicialment mitjançant una espurna. Els ions i electrons que es generen, s'acceleren gràcies al camp magnètic creat per la bobina i xoquen amb més àtoms d'argó, de manera que es multiplica la ionització del gas tot incrementant l'efecte joule i aconseguint l'escalfament responsable del manteniment del plasma (6000 – 10000 K).

Les mostres líquides s'introdueixen al sistema en forma d'aerosol mitjançant un sistema de nebulització. En arribar al plasma, la mostra nebulitzada es desolvata, volatilitza, dissocia, atomitza, i finalment s'excita. A mesura que les espècies iòniques i atòmiques passen a través del plasma, es relaxen als seus estats fonamentals emetent una radiació característica de cada element. La llum emesa és enfocada a l'obertura d'entrada d'un monocromador, que separa les diferents longituds d'ona i, finalment, la radiació es capta de forma seqüencial o simultània (segons el tipus d'instrument) obtenint-se el senyal en funció del nombre d'ions (o àtoms) al plasma i de la fracció d'aquests ions (o àtoms) que són excitats(6).

Tot i que es tracta d'una tècnica de costos elevats, l'espectroscòpia de plasma per acoblament induït presenta diversos avantatges que la fan realment atractiva. Les característiques més destacades són(7): capacitat d'anàlisi multielemental, ampli rang lineal (de quatre a sis ordres de magnitud) i baixos límits de detecció. Aquestes característiques fan possible l'ús d'aquesta tècnica per la determinació tant d'elements majoritaris com de traces.

A la taula que segueix es mostren les línies d'emissió emprades en la determinació dels elements d'interès, així com els seus límits de detecció i possibles interferències.

	Ca	P
Línia d'emissió (nm)	422,67	214,94
Límit de detecció (mg/l)	0,15	0,3
Possibles interferències	Fe	Al, Cu

Taula 2-1 Dades espectroscòpiques

Les línies d'emissió es van escollir evitant les interferències espectrals entre els elements de la mostra i amb el rang lineal més ampli possible per tal de disminuir al mínim la manipulació de les mostres.

La determinació es va fer per interpolació sobre una recta de calibratge, preparada amb patrons en el mateix medi de les mostres per tal d'evitar l'efecte matriu i mesurada abans de cada sèrie d'anàlisis.

2.1.3 Microscòpia electrònica

La microscòpia electrònica s'ha utilitzat per a caracterització de les partícules de resina i de la interacció entre l'adhesiu i la dent en l'estudi de l'efecte de la modificació de l'adhesiu amb la resina de bescanvi iònic.

La microscòpia electrònica és una de les tècniques més àmpliament utilitzades per a la caracterització de superfícies. Les dues tècniques més importants de són la microscòpia electrònica de rastreig (SEM – de l'anglès *Scanning electron microscopy*) i la de transmissió (TEM – de l'anglès *Transmission electron microscopy*). En el treball que es presenta s'ha utilitzat la primera de les tècniques citades.

El principi de la microscòpia electrònica de rastreig consisteix en fer xocar contra la mostra un feix estret d'electrons (d'aproximadament 10 nm de diàmetre) anomenat feix d'electrons primari, amb energies de l'ordre dels KeV (generalment entre 1 i 25 KeV). Quan aquest feix d'electrons impacta sobre la superfície de la mostra genera un feix d'electrons reflexat (o secundari), procedent de l'alliberació dels elements presents a la superfície del material. Finalment, es forma la imatge de la superfície del material que s'observa en pantalla mitjançant un tub de raigs catòdics(8).

Quan un material es col·loca sota l'acció d'un feix d'electrons es pot veure greument afectat. Així, per evitar alteracions no desitjades del material estudiat i alhora millorar l'emissió d'electrons secundaris, es realitza un procés de metal·litzat de la mostra, consistent en recobrir-la amb una capa conductora (normalment or o carboni).

El tractament de les imatges obtingudes mitjançant el programari adequat permet utilitzar la microscòpia electrònica per realitzar mesures de diversos paràmetres de les mostres. Així, en el treball que es presenta s'ha utilitzat un programari específic per mesurar el diàmetre mitjà de les partícules en les diferents mostres preparades.

2.1.4 Difracció de raigs X

S'ha emprat la difracció de raigs X en l'estudi de la composició dels minerals estudiats.

La difracció de raigs X és una de les tècniques més eficients en l'elucidació de l'estructura de sòlids(9).

Els experiments de difracció de raigs X requereixen llum de longitud d'ona de l'ordre dels espais interatòmics. Així, és habitual utilitzar rangs entre 0,07 i 0,2 nm. La radiació utilitzada més habitualment és la de CuK_α amb longitud d'ona 0,15406 nm.

Una manera senzilla de descriure conceptualment el fenomen de la difracció en cristalls és considerar que els feixos de raigs X són “reflexats” en els plans de la xarxa cristal·lina de manera anàloga a la reflexió dels objectes en un mirall. L'expressió matemàtica que s'utilitza per descriure com interactuen els raigs X amb els cristalls per produir un espectre de difracció és la llei de Bragg (Eq 2.2):

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (\text{Eq 2.2})$$

on n és un nombre enter, λ és la longitud d'ona de la radiació incident, d és la distància entre els plans adjacents de la xarxa cristal·lina i θ és l'angle d'incidència i “reflexió” dels raigs X.

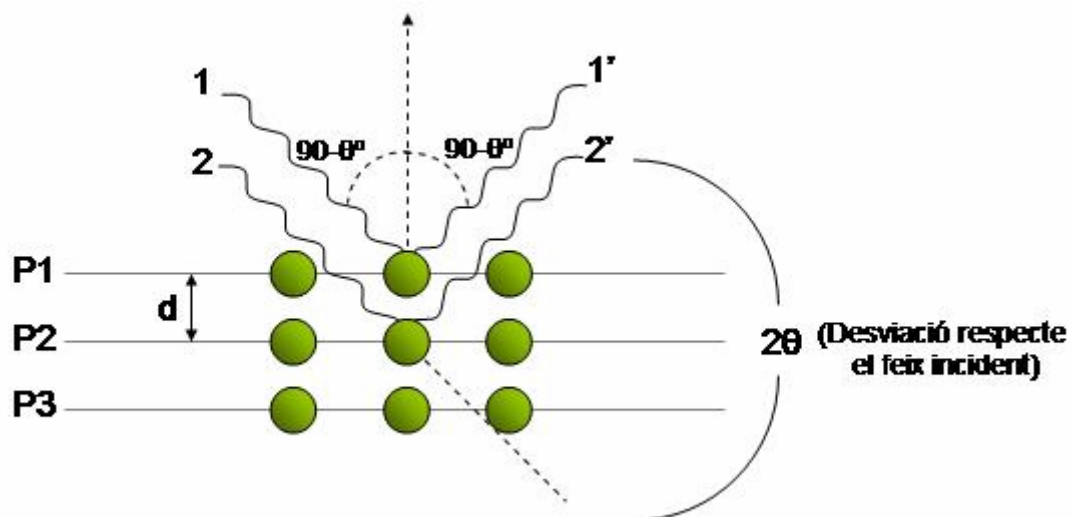


Figura 2-2 “Reflexió” dels raigs X en els plans d'una xarxa cristal·lina

A la Figura 2-2 es mostra un esquema de la reflexió de les ones electromagnètiques en els plans P1 i P2 d'un suposat cristall. Per tal que les ones generades (1' i 2') surtin en

fase (de manera que es doni una interferència constructiva) cal que la diferència entre els camins recorreguts per les ones “reflexades” siguin múltiples enters de la longitud d’ona ($n\lambda$). Aquesta diferència serà igual a $2d\sin\theta$, de manera que la interferència constructiva es donarà quan es compleixi la llei de Bragg.

Instrumentalment, el procés consisteix en fer incidir un feix de raigs X sobre la mostra i variar l’angle d’incidència, de manera que s’obté la intensitat de difracció per cada valor de 2θ .

Per tal d’assignar els plans d’una manera consistent, s’utilitzen els índexs de Miller, representats pels valors (hkl). Aquests índexs s’empren entre parèntesis per designar plans de la cel·la cristal·lina i sense parèntesis per indicar les “reflexions” corresponents o punts de la xarxa.

Entre les aplicacions més destacades de la difracció de raigs X en materials policristal·lins destaquen(10):

- Identificació qualitativa de fases presents, utilitzant l’espectre com a “empremta digital” de la fase amb què es vol comparar.
- Anàlisi quantitativ de concentracions de cada fase present.
- Mesura dels paràmetres de la cel·la unitat.
- Determinació de l’orientació dels cristalls en materials policristal·lins.
- Determinació de l’estrès aplicat i residual en cossos monolítics.
- Determinació de paràmetres microestructurals (mida de cristall, microtensió entre cristalls, densitat de defectes cristal·lins)
- Seguiment de cinètiques de reacció.

- Resolució de l'estructura de mostres en pols.

2.1.5 Espectroscòpia Raman

L'espectroscòpia Raman s'ha utilitzat en els estudis d'incorporació de fluorur a mostres minerals d'hidroxiapatita i a l'esmalt dental.

L'anàlisi mitjançant espectroscòpia Raman es basa en la dispersió que es produeix en fer incidir un feix de llum monocromàtica de freqüència ν_0 sobre la mostra a determinar. La major part de la llum dispersada presenta la mateixa freqüència que la incident. Aquest fenomen rep el nom de dispersió Rayleigh i no aporta informació sobre la composició de la mostra analitzada. Una part de la radiació dispersada, però, presenta freqüències diferents de la incident. Aquest fenomen és conegut com l'efecte Raman. Les noves freqüències, conegudes com $+\nu_r$ i $-\nu_r$ són característiques de la naturalesa química i l'estat físic de la mostra i independents de la radiació incident.

Els canvis de freqüència observats en l'efecte Raman es deuen a canvis en els estats d'energia vibracionals i rotacionals de les molècules. La Figura 2-4 mostra un exemple diagrama energètic.

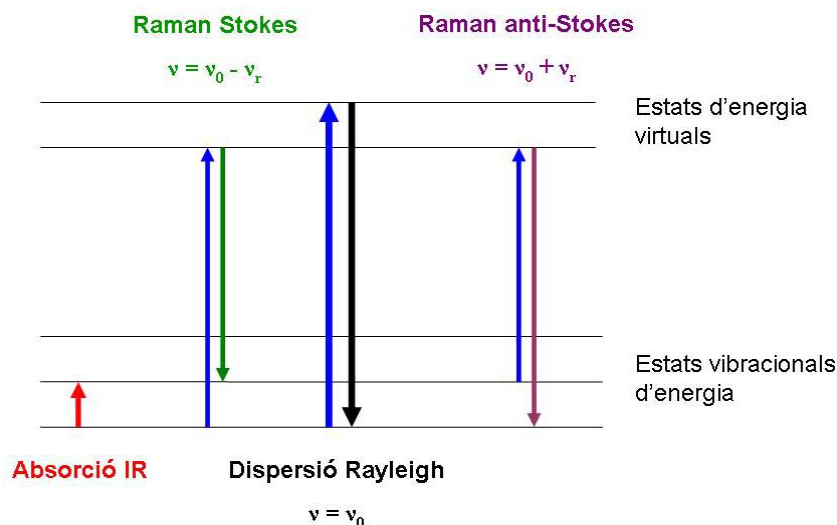


Figura 2-3 Diagrama energètic de les transicions entre estats d'energia vibracionals i rotacionals.

La majoria dels fotons del feix de llum incident, amb una energia $h\nu_0$ molt més gran que la diferència entre els estats rotacionals i vibracionals de la molècula, passen a través de la mostra. Una petita part (de l'ordre de 1 de cada 10^{11} fotons), però, són dispersats. Aquesta dispersió es considera que es deu a que el fotó incident porta la molècula transitòriament a un estat d'energia vibracional o rotacional superior no permès i la molècula abandona ràpidament aquest estat per tornar a un dels nivells d'energia permesos emetent un fotó. La freqüència a la qual s'emet aquest fotó dependrà del salt energètic que hagi realitzat la molècula. Poden distingir-se diferents casos:

- si el resultat de la interacció fotó molècula és un fotó dispersat de la mateixa freqüència que la radiació incident, es diu que el xoc és elàstic (ni el fotó ni la molècula no pateixen variacions d'energia). En aquest cas la molècula torna al mateix nivell energètic que tenia abans de rebre la radiació incident i el fotó dispersat (de freqüència ν_0) dona lloc a la dispersió Rayleigh.

- si el resultat de la interacció fotó molècula és un fotó dispersat de freqüència diferent a la radiació incident, es diu que el xoc és inelàstic (existeix transferència d'energia entre el fotó i la molècula) i poden donar-se dos fenòmens:

- si el fotó dispersat té una freqüència menor que la del fotó incident, es produeix una transferència d'energia del fotó a la molècula que, després de saltar a l'estat d'energia no permès, torna a un estat d'energia major al que tenia inicialment. En aquest cas, el fotó es dispersa amb freqüència $\nu_0 - \nu_r$ i es produeix la dispersió *Raman Stokes*.
- si el fotó dispersat té una freqüència major que la del fotó incident, es produeix una transferència d'energia de la molècula al fotó. En aquest cas, abans de la interacció amb el feix de llum la molècula no es trobava en el seu estat fonamental sinó en un estat vibracional o rotacional de més energia. Després del xoc, la molècula passa a l'estat fonamental i el fotó es dispersa amb freqüència $\nu_0 + \nu_r$, donant lloc a la dispersió *Raman anti-Stokes*.

Cada material té un conjunt de valors ν_r característics de la seva estructura poliatòmica i de la naturalesa dels enllaços químics que la formen.

2.1.6 Shear bond strength test

El test d'adhesió *Shear Bond Strength* es va utilitzar per determinar la força d'adhesió de l'adhesiu modificat amb resina i de l'adhesiu sense modificar.

No existeixen mètodes completament estandarditzats per provar l'adhesió dels materials dentals. Una de les causes d'aquest fet és que la força d'adhesió no es pot considerar una propietat del material, ja que diversos factors (substrats, geometria i mida de la mostra, etc.) poden influir de manera significativa en el comportament de l'adhesiu. Per tant, no és possible obtenir valors absoluts de la força d'adhesió i els resultats de diferents estudis només es poden comparar quan s'han emprat els mateixos substrats i els mateixos mètodes experimentals.

Entre els mètodes utilitzats per estudiar la força d'adhesió dels materials dentals destaca el test de tensió, que ha estat àmpliament utilitzat(11-13). Aquest test, però, no reproduïx massa bé la situació clínica, ja que la direcció de les forces que s'apliquen és just la contrària de la direcció de les forces que suporta el material quan es troba situat a la boca.

El test *Shear Bond Strength* destaca per la facilitat amb què es porta a terme la preparació de la mostra. Això contribueix a disminuir considerablement la influència de l'operador, que pot ser un factor important en els estudis d'adhesió. A més a més, aquest test permet trencar les mostres immediatament després de realitzar l'adhesió, mentre que el test de tensió requereix tallar i tornejar els espècimens després de dur a terme l'adhesió. Tant el test de tensió com el *Shear Bond Strength* es poden adaptar per realitzar un nombre elevat de mesures en un mateix espècimen i aconseguir mapes de força d'adhesió en diferents zones(14,15). En aquest cas, però, sigui quin sigui el test utilitzat, el procés esdevé extremadament laboriós.

Per realitzar el test *Shear Bond Strength* és necessari aconseguir que els espècimens estiguin fixats en resina i que la superfície sigui plana. En primer lloc, es prepara un petit cilindre de material restaurador, que s'adhereix a l'espècimen mitjançant l'adhesiu a estudiar. Aquest cilindre es trenca per mitjà d'un accessori muntat a la màquina de test universal que encaixa amb l'espècimen i aplica la força de manera perpendicular a la base del cilindre de material restaurador distribuint els estressos de manera uniforme i reproducible. Per obtenir resultats amb una bona exactitud és important que els espècimens preparats tinguin tots la mateixa forma i encaixin bé amb l'accessori utilitzat per trencar-los. Els espècimens es col·loquen sempre amb la part oclusal de la dent cap avall per tal que l'orientació dels túbuls dentinaris respecte la direcció de la força sigui sempre la mateixa i no interfereixi en els resultats. Enregistrant el desplaçament de l'accessori de trencament i la força aplicada, s'obtenen perfils de trencament com el que es mostra a la figura:

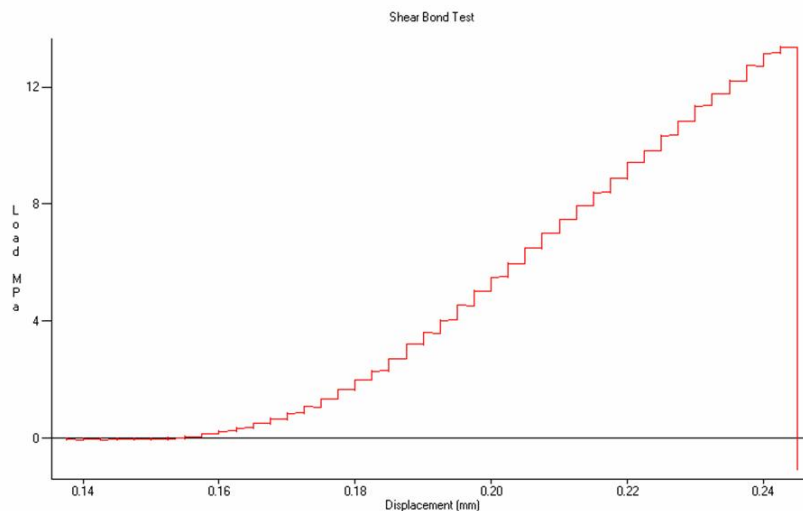


Figura 2-4 Perfil de trencament obtingut emprant el test *Shear Bond Strength*

La força d'adhesió s'obté de la relació entre la càrrega necessària per trencar l'espècimen i l'àrea d'adhesió i s'expressa en MPa.

2.1.7 Colorimetria en superfície

La colorimetria en superfície s'ha emprat en l'estudi d'acceleració del blanquejador dental. Es tracta d'una tècnica basada en el mateix principi que l'espectroscòpia UV-Vis, és a dir, en la capacitat de les substàncies per absorbir la llum d'una determinada longitud d'ona segons la seva estructura.

Una de les principals particularitats de la colorimetria en superfície és que la mesura no es realitza fent passar la llum a través de la mostra (com en les tècniques espectroscòpiques clàssiques) sinó que es fan les mesures a partir de la llum reflexada.

Per tal de poder aplicar directament els resultats de les mesures a l'estudi de les diferències de color, els instruments utilitzats presenten els resultats com a punts en l'espai de colors. Els sistemes d'espais de colors van ser dissenyats per la CIE (comissió internacional de la il·luminació) i serveixen d'estàndard per aquest tipus de mesures. El sistema utilitzat en l'estudi es coneix amb el nom de sistema L^*a^*b . Aquest sistema es basa en coordenades cartesianes on L correspon a l'eix blanc – negre, a correspon a l'eix vermell – verd i b correspon a l'eix groc – blau (Figura 2-5). Cada color es pot definir, doncs, amb un punt dins d'aquest sistema de coordenades.

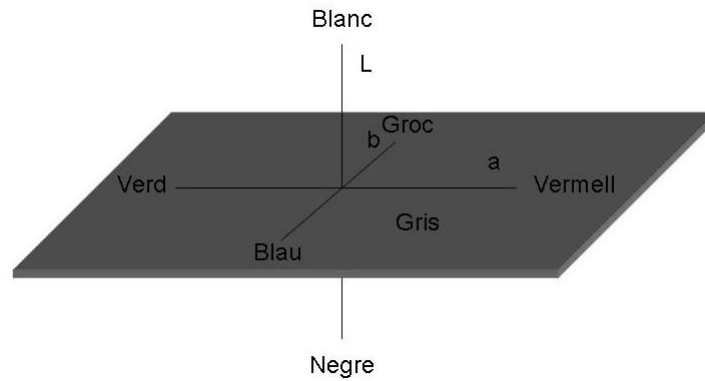


Figura 2-5 Espai de color L*a*b

Aquest sistema de mesura del color s'utilitza en estudis de blanqueig dental i presenta l'avantatge de que les distàncies en l'espai de color són aproximadament proporcionals a les distàncies en percepció. És a dir, en el sistema L*a*b quan dos parells de colors de diferents zones de l'espectre tenen la mateixa diferència per a un observador, també tenen distàncies similars en el diagrama de cromaticitat.

La diferència de color total ΔE^*_{ab} es defineix mitjançant l'equació:

$$\Delta E^*_{ab} = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (\text{Eq. 2.3})$$

Per als estudis de blanqueig realitzats s'ha estudiat el paràmetre ΔL . Aquest paràmetre dóna una mesura directa del canvi de color en la direcció del color blanc.

2.2 Procediment experimental per a l'estudi de la incorporació d'una resina de bescanvi iònic com a agent d'alliberació controlada a un material dental

2.2.1 Càrrega de la resina

Per tal que el procediment de càrrega sigui efectiu, cal dur a terme una etapa prèvia d'activació dels grups funcionals amina terciària de la resina, que es troba inicialment en forma no protonada. La conversió de la resina a la forma d'ió fluorur es va començar amb l'activació i condicionament de la resina en un vas de precipitats amb una dissolució de H_3PO_4 0,1 M. D'aquesta manera els grups amina terciària quedaven protonats i amb l'ió H_2PO_4^- com a contraió. A continuació, la resina es transferia a una columna de vidre de bescanvi iònic de 3 cm de diàmetre intern i es portava a terme la conversió de la resina a forma d'ió F^- en condicions dinàmiques mitjançant la tècnica de flux descendent. Aquesta tècnica consisteix en afegir la solució de càrrega (NaF 0,7 M en aquest cas) per la part de dalt de la columna i fer-la passar a través del llit del bescanviador iònic, de manera que es va produint la substitució (de l'ió H_2PO_4^- per l'ió F^- en el cas que es presenta). Durant el procés, la resina està sempre en contacte amb dissolució de càrrega fresca i, per tant, l'equilibri és àmpliament desplaçat cap a la direcció desitjada. Cada cert interval de temps s'atura el pas de la dissolució durant unes 2 hores i a continuació es recull una mostra que s'analitza mitjançant l'elèctrode selectiu. Es considera que s'ha assolit l'equilibri quan les concentracions de fluorur a la mostra recollida després de la interrupció del flux i la de la dissolució de càrrega són iguals.

Una vegada finalitzat el procediment de càrrega, la resina es va filtrar i rentar amb aigua Milli Q per tal d'eliminar l'excés de solució de NaF 0,7 M. Finalment, va assecat-se la resina a l'estufa a 60°C durant tota la nit.

La capacitat de la resina es determina mitjançant un procés de desorció en condicions dinàmiques. En primer lloc, es pesa una quantitat coneguda de resina (1 g) en un vas de precipitats al qual s'afegeixen uns mil·lilitres d'aigua Milli Q per tal que es dugui a terme el procés d'inflament (de l'anglès *swelling*). Passada una hora aproximadament, la resina es transfereix quantitativament a una columna de vidre de bescanvi iònic de 1 cm de diàmetre i s'elueix amb NaNO₃ 0,5 M a un flux d'1 ml/min. Es recull un volum conegut d'eluat i la concentració de F⁻ es determina mitjançant l'elèctrode selectiu.

2.2.2 Mòlta, tamisat i determinació de la mida de partícula

La resina de bescanvi iònic utilitzada es presenta originalment en forma d'esferes de 1 mm de diàmetre. Per tal d'aconseguir una mida de partícula que fes possible la mescla de la resina amb els materials dentals estudiats, es va moldre la resina emprant un molí d'àgata.

La resina mòlta es va tamisar amb un tamís de 50 µm de llum de malla i es va refinar mitjançant tres tamisos de llum 40 µm, 32 µm i 28 µm, respectivament. D'aquesta manera es van obtenir tres fraccions amb mides de partícula entre 28 i 32 µm, entre 32 i 40 µm i entre 40 i 50 µm. Per tal de caracteritzar les diferents fraccions, es van observar al microscopi electrònic de rastreig després de metal·litzar les mostres amb or. A partir de les imatges obtingudes, i mitjançant la utilització del programa de tractament i anàlisi

d'imatges ImageJ 1.31 v, es va determinar la mida de la de partícula de cadascuna de les fraccions.

Amb l'objectiu de reduir encara més la mida de partícula, la fracció de resina d'entre 28 i 32 μm es va moldre emprant un amalgamador com a molí de bola. Amb aquest sistema es van preparar tres fraccions amb diferents temps de mòlta: 30 s, 60 s i 90 s amb una relació de massa resina / bola de 0,05. Per mesurar la mida mitja de partícula d'aquestes tres fraccions de resina, es van preparar suspensions en metanol, que es van dipositar en els portamostres. Tot seguit, el metanol es va evaporar aprofitant el procés de metal·lització de les mostres i aquestes es van observar al microscopi electrònic.

2.2.3 Seguiment en discontinu de l'alliberació

Es van preparar mostres de l'adhesiu 3M Single Bond modificat mesclant la resina de mida de partícula inferior a 50 μm amb l'adhesiu en una proporció d'un 10% en pes de resina. Tot seguit, es van agitar les mostres manualment per tal de distribuir homogèniament la resina.

A continuació, es van aplicar mostres del material modificat tot seguint les indicacions del fabricant mitjançant un pinzell sobre suports de cel·lulosa de superfície coneguda.

Tot i que és freqüent realitzar els estudis de materials dentals en aigua destil·lada, el medi d'alliberació pot ser un factor crític tant pel que fa a la velocitat com a la quantitat de fluorur alliberat(16). Donat que els materials estudiats s'apliquen a la dentina, a més de realitzar els experiments a 37°C, es va emprar un medi d'alliberació intentant reproduir la composició del líquid dentinari. La dissolució de Ringer, que originalment

va ser desenvolupada com a nutrient per cultius cel·lulars, té una composició semblant a la d'aquest fluid(17). Aquesta dissolució, però, conté calci el qual podria interferir en la mesura de l'ió fluorur degut a la formació de complexos o a la precipitació com a CaF_2 . Així, finalment es va utilitzar una dissolució amb la mateixa composició iònica que la dissolució de Ringer però sense calci (dissolució de Ringer modificada) per tal d'evitar les possibles interferències comentades anteriorment. També es va mantenir una relació entre temps, àrea i volum similar al flux de $0,35 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}\text{cm}^{-2}$ que s'obté en exposar la dentina en absència de pressió exògena, d'acord amb les mesures realitzades en estudis *in vivo* amb humans(18).

Les mostres s'introduïen en vials de 5 ml procurant que tota la superfície quedés exposada a la dissolució. A continuació, s'afegien 5 ml de la dissolució de Ringer modificada, que es mantenia sense agitació durant l'experiment. El conjunt de vials que contenien les mostres es mantenia a 37°C mitjançant un bany d'aigua termostatitzat. Cada cert temps, depenent de l'àrea de la mostra i per tal de mantenir una relació temps/àrea/volum equivalent a la del flux dentinari, es decantava la dissolució en un recipient adequat per tal de dur a terme la posterior determinació mitjançant l'elèctrode selectiu a ió fluorur, s'esbandien les mostres amb aigua Milli-Q i s'afegien de nou 5 ml de dissolució de Ringer modificada fresca.

De la mateixa manera, es van estudiar mostres de l'adhesiu sense modificar, és a dir, sense resina afegida i de mostres de resina de quantitat equivalent a la de les mostres del material modificat, preparades a partir de suspensions en aigua.

2.2.4 Seguiment en continu de l'alliberació

Es van preparar mescles de les diferents fraccions de mida de partícula de la resina amb l'adhesiu d'un sol pas (3M Single Bond) en una proporció aproximada d'un 4% en pes. Es van preparar també mescles amb la mateixa proporció de resina en aigua i en etanol (per simular el dissolvent de l'adhesiu) respectivament, les mescles es van agitar per aconseguir una distribució homogènia de la resina en el material.

Les mostres d'adhesiu modificat amb resina de diferents mides de partícula es van aplicar sobre suports circulars de polipropilè d'1 cm de diàmetre mitjançant un pinzell i de manera similar a l'aplicació clínica del material estudiat. De la mateixa manera, es van preparar mostres d'adhesiu sense resina, per tal de confirmar que tot el fluorur mesurat provenia de l'alliberació corresponent a la resina. D'altra banda, les suspensions de resina en aigua i en etanol es van aplicar mitjançant una micropipeta tot dipositant 10 µl sobre el suport de polipropilè i obtenint així un pes de resina similar a l'introduït a les mostres d'adhesiu.

Les mostres de l'adhesiu d'una sola etapa modificat amb el 4% de resina en forma d'ió F⁻ preparades amb la fracció de resina de mida de partícula entre 32 i 40 µm es van aplicar, a més de com s'ha descrit, mitjançant diferents procediments per tal d'observar la influència que podia tenir la forma d'aplicació sobre l'alliberació de fluorur.

En primer lloc, es va aplicar la mescla mitjançant una micropipeta i dipositant 10 µl sobre el suport circular de polipropilè. Les mostres dipositades amb pipeta es van preparar cobrint-les amb un cercle de cel·lulosa abans o després de que s'endurissin (tal i com es descriurà a l'apartat 3.1.3), de manera que les que es cobrien abans de

l'enduriment quedaven més esteses sobre el cercle de polipropilè. D'altra banda, les suspensions de la resina de bescanvi iònic en aigua i en etanol es van aplicar sobre suports circulars de polipropilè utilitzant un pinzell, tal i com anteriorment s'havia fet amb l'adhesiu modificat.

També es van preparar mostres curades mitjançant una làmpada de llum visible de 470 nm aplicant la llum durant 30 s a cada banda del cercle de polipropilè i mostres sense curar, per tal d'observar l'efecte del procediment d'aplicació clínica de l'adhesiu sobre l'alliberació de fluorur de la resina.

A la Taula 2.2 es mostra un resum de les mostres preparades:

Medi de suspensió	Aplicació	Estès amb cercle de cel·lulosa (S/N)	Polimeritzat amb llum visible (S/N)
Adhesiu	Pipeta	S, N	S, N
	Pinzell	N	S, N
Aigua	Pipeta	N	N
	Pinzell	N	N
Etanol	Pipeta	N	N
	Pinzell	N	N

Taula 2.2 Resum de les mostres preparades per al seguiment en continu de l'alliberació de F⁻

Per tal de mesurar l'alliberació de fluorur de la resina de bescanvi iònic, es va emprar una cel·la de Franz modificada. Les mostres preparades tal i com s'ha descrit es dipositaven al fons de vials de 5 ml i, una vegada endurides (segons el cas), es cobrien amb un cercle de cel·lulosa per evitar l'erosió de la superfície. A continuació, es col·locava un cercle de malla d'acer inoxidable a sobre de les mostres per mantenir-les al fons del vial i s'introduïa un agitador magnètic. L'alliberació s'iniciava afegint 1 ml de solució de Ringer. Inmediatament, s'introduïa al vial l'elèctrode de fluorur i es

col·locava el muntatge en un vas amb una camisa d'aigua (la cel·la de Franz clàssica) termostatitzat amb aigua a 37°C. La Figura 2-6 mostra l'esquema del muntatge utilitzat.

La concentració d'ió fluorur de la dissolució es va seguir enregistrant la resposta de l'elèctrode mitjançant un software programat per a l'adquisició de dades.

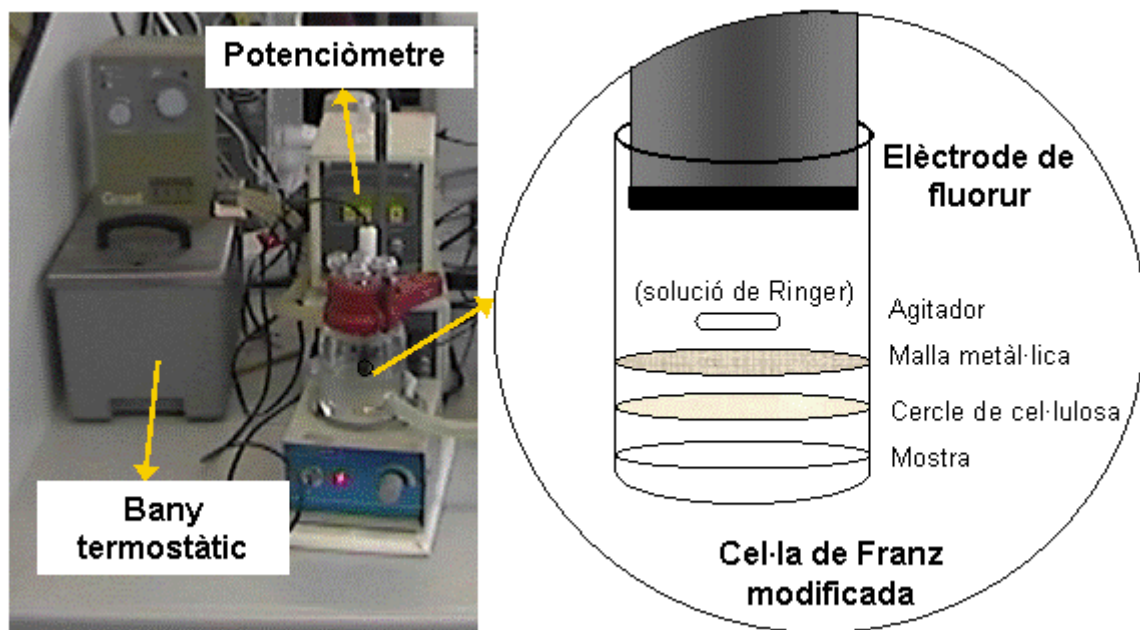


Figura 2-6 Muntatge experimental utilitzat per al seguiment en continu de l'alliberació de fluorur

2.2.5 Estudi d'adhesió del material modificat

2.2.5.1 Preparació de l'adhesiu modificat

L'adhesiu 3M Single Bond es va mesclar amb resina de bescanvi iònic procedent de la mòlta amb molí de boles i es van preparar tres formulacions amb 1%, 2,5% i 5% en pes de resina. Les mostres d'adhesiu modificat es van guardar en recipients opacs fins a la seva utilització per tal de preservar-les de la llum.

2.2.5.2 Preparació de les mostres

Per a la realització de l'estudi es van seleccionar 164 molars humans amb menys de tres setmanes des de la seva extracció. Les dents es van tallar mitjançant una serra de disc de diamant. Per als experiments d'adhesió a esmalt, les dents es van seccionar en mesio-distalment i per als experiments d'adhesió a dentina, el tall es va fer en direcció buco-lingual. D'aquesta manera, s'aconsegueixen espècimens amb superfícies més grans del substrat desitjat.

Després de tallar les dents, la superfície exterior de l'esmalt es va aplanar en una roda de diamant per tal de poder col·locar els espècimens en una posició plana en el procés de fixació en resina. Tot seguit, es van situar els espècimens en motlles cilíndrics de manera que l'esmalt quedés exposat per la base del cilindre i es van fixar en resina acrílica preparada seguint les instruccions del proveïdor. Una vegada endurida la resina, es van polir i aplanar les superfícies de les bases del cilindre mitjançant un motlle. Amb aquest procés s'aconseguia que les dues bases del cilindre fossin totalment paral·leles i que la superfície de la dent quedés exposada. A continuació, es va polir la superfície de la dent amb paper de carbur de silici de grau 600.

Els espècimens preparats es van guardar en aigua desionitzada fins a la realització del procés d'adhesió. Just abans d'aquest procés, la superfície es va tornar a polir amb paper de carbur de silicona de grau 600 per tal d'exposar esmalt o dentina frescos. Els espècimens es van distribuir en 16 grups (8 per esmalt i 8 per dentina) de 10 espècimens cada un de manera aleatòria.

El procediment d'adhesió es va portar a terme per cada una de les formulacions estudiades seguint les indicacions recomanades pel fabricant de l'adhesiu. La superfície exposada es va assecar lleugerament i a continuació es va gravar amb un gel d'àcid fosfòric 35% durant 15 segons. Després d'eliminar completament el gel mitjançant una xeringa d'esprai d'aigua es va eliminar l'excés d'humitat a la superfície mitjançant un paper suau i evitant que l'espècimen arribés a deshidratar-se. A continuació, es va afegir l'adhesiu a través del dosificador del fabricant i es va distribuir amb l'ajut d'un petit pinzell realitzant un moviment circular durant 10 segons per tal d'obtenir una capa uniforme. L'excés de dissolvent de l'adhesiu es va eliminar amb un corrent d'aire suau durant 4 segons i els espècimens es van polimeritzar amb llum visible a 470 nm durant 30 segons.

Una vegada curat l'adhesiu, els espècimens per als experiments d'adhesió es van muntar utilitzant el sistema Ultradent®. Aquest sistema es basa en l'ús de plantilles que permeten obtenir un petit cilindre de resina composta totalment perpendicular a la superfície de la dent. Mitjançant unes altres plantilles que s'adapten al cilindre que suporta la mostra i al cilindre de material compòsit respectivament, es realitzen els experiments de força d'adhesió amb tots els espècimens en la mateixa posició i s'aconsegueix que la distribució de la força aplicada a través del material compòsit sigui homogènia i no es creïn zones de concentració de tensions.

Els espècimens es col·locaven a la plantilla d'adhesió i s'afegia una petita quantitat del material compòsit, que es premsava amb l'ajuda d'un condensador. Tot seguit, es procedia a polimeritzar el material amb llum segons les instruccions del fabricant. Per cada composició d'adhesiu, es van estudiar quatre grups de 10 mostres i es va mesurar

la força d'adhesió en esmalt i en dentina a dos intervals de temps diferents: immediatament després del procés d'adhesió i al cap de 24 hores. Els espècimens per a la mesura de l'adhesió a 24 hores, es van conservar en un ambient al 100% d'humiditat fins al moment de la mesura.

2.2.5.3 Obtenció dels valors de força d'adhesió

El test d'adhesió es va portar a terme amb una màquina de test universal a una velocitat de 1mm/min.

Després de trencar les mostres, les dues cares de la superfície d'adhesió es van observar al microscopi òptic estereoscòpic per tal de determinar la forma de fallada de l'adhesió. Mitjançant aquestes observacions, els espècimens van ser classificats de dues maneres. Segons la zona on s'havia produït el trencament, es van dividir els espècimens en tres grups: fallada a la interfície resina compòsit – adhesiu, fallada a la interfície adhesiu – dent i fallada mixta. D'altra banda, segons la forma de l'adhesiu que quedava sobre la superfície de la dent i del cilindre de resina compòsit, es van dividir els espècimens en quatre grups: superfície plana (grup 0), superfície ratllada (grup 1), superfície amb ratlles i bombolles (grup 2) i superfície amb bombolles (grup 3).

Per cada formulació d'adhesiu, es va preparar una mostra extra que es va seccionar per la meitat i es va tornar a fixar en resina exposant la part de dent perpendicular a l'adhesiu per tal de poder observar la interacció entre l'adhesiu i la dent. Aquestes mostres es van polir consecutivament amb paper de carbur de silici de grau 240, 800, 1000, 2400, 4000 en una polidora automàtica i a continuació es van metal·litzar amb grafit i es van observar al microscopi electrònic de rastreig.

Les dades obtingudes es van tractar estadísticament al 95% de confiança. Es va realitzar un procediment d'ANOVA per cada grup experimental de les formulacions d'adhesiu modificat per tal de determinar diferències estadísticament significatives entre l'adhesiu original i l'adhesiu modificat per l'addició de la resina de bescanvi iònic.

2.3 Procediment experimental per a l'estudi de la incorporació de fluorur al mineral dental

2.3.1 Obtenció dels minerals

2.3.1.1 Síntesi d'hidroxiapatita parcialment substituïda amb fluorur

Les mostres d'hidroxiapatita parcialment substituïda amb fluorur es van obtenir mitjançant un procés de cicles de pH en presència de fluorur(19-21). Es van preparar suspensions de 10g d'hidroxiapatita en 500 ml de solucions de CaF_2 de diferents concentracions per obtenir substitucions de 10%, 20%, 40%, 60% i 80%. Les suspensions es van mantenir sota agitació durant tota la nit per deixar que s'equilibrassin. A continuació es van portar les suspensions a pH 4 afegint HNO_3 1M i es van deixar equilibrar durant 30 minuts. Passat aquest temps, es va afegir NaOH 1M fins a pH 7. El cicle de pH es va repetir 3 vegades. Finalment, les suspensions es van filtrar en un embut Büchner. Els sòlids obtinguts es van rentar 3 vegades amb aigua MilliQ i es van assecar a l'estufa a 80°C durant tota la nit.

2.3.1.2 Síntesi de fluorapatita

La fluorapatita es va obtenir a partir de la reacció en fase sòlida entre CaF_2 i $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (19). 40 g de Ca_3PO_4 i 3,5 g de CaF_2 (relació molar Ca/P = 1,67) es van mesclar en un

molí de morter d'àngata durant 15 minuts. Tot seguit, es va col·locar la mescla en un gresol de porcellana i es va introduir a la mufla a 1100°C durant 3 hores. El sòlid obtingut es va moldre altra vegada al molí d'àngata durant 15 minuts.

2.3.1.3 Anàlisi elemental dels materials obtinguts

Per tal de determinar la composició elemental dels minerals sintetitzats es va dur a terme una digestió en àcid nítric dels sòlids i el fluorur es va atrapar mitjançant NaOH(22). Es van pesar 0,05 g de cada mostra i es van dipositar en vials de 50 ml. A les tapes dels vials es van col·locar 4 gotes de 10 µl de NaOH 1M. A continuació es van afegir a cada vial 5 ml de HNO₃ 1M. Tot seguit es van tapar els vials i es van deixar reposar durant 72 hores. Passat aquest temps, a cada vial es van afegir 30 ml d'aigua i 4,5 ml de NaOH 1M i es va agitar per arrossegar la solució de la tapa.

Les solucions obtingudes es van transvasar a matrassos de 100 ml i es van enrasar amb aigua Milli-Q. El fluorur es va determinar mitjançant potenciometria amb elèctrode selectiu i el calci i el fòsfor es van determinar per ICP-OES.

2.3.2 Estudi dels minerals mitjançant difracció de raigs X

Els espectres de difracció de raigs X es van obtenir mitjançant un difractòmetre amb font de cobalt a 50 kV i 40 mA. Les mostres es van escanejar en passos de 2θ de 0,02° i a una velocitat 2θ de 0,24°/s en tres rangs d'angles diferents corresponents a: el pic de difracció del CaF₂, de 27,8° a 29°, i els pics més intensos dels difractogrames de les apatites, de 25,2° a 26° i de 31,2° a 34,7°.

Es van obtenir els difractogrames de les mostres en pols d'hidroxiapatita, fluorapatita i hidroxiapatita substituïda amb un 60% de fluorur.

2.3.2.1 Quantificació de fluorur de calci en matriu d'hidroxiapatita

Es van preparar patrons de fluorur de calci en hidroxiapatita pesant les quantitats desitjades d'ambdós sòlids i homogeneïtzant les mescles en un agitador rotatori durant 1 hora. A partir de la intensitat del pic de CaF_2 dels difractogrames obtinguts, es va realitzar un calibrat mitjançant una regressió lineal per mínims quadrats.

2.3.2.2 Estudi dels processos de gravat i remineralització en dents bovines

Es van extreure 6 incisius centrals bovins de mandíbules inferiors de vedelles sacrificades per al consum humà. Les dents es van guardar en una solució de cloramina-T 0,5% fins que van ser utilitzades. Les arrels de les dents es van tallar per evitar interferències amb l'esmalt.

Les mesures es van realitzar sobre la part lingual de les dents. Es van obtenir els difractogrames col·locant les dents en quatre posicions diferents: amb la part oclusal encarada a la direcció del feix i en tres posicions més girant la dent 90° cada vegada. Després de determinar la posició en què els senyals de les apatites apareixien amb més intensitat, es van realitzar 5 replicats de la mateixa dent repetint cada vegada el procés de muntatge al difractòmetre.

Les dents es van gravar mitjançant l'exposició seqüencial a solucions HCl 0,12 M durant 60 segons, NaCO_3 saturat durant 30 segons i altra vegada HCl 0,12 durant 60

segons, rentant amb aigua a cada canvi de solució. Aquest procés neteja la superfície de la dent i alhora produeix una lleugera desmineralització de l'esmalt que facilita l'observació dels processos de remineralització (23).

Després d'obtenir els difractogrames de les dents gravades, aquestes es van dividir en dos grups de 3 dents cada un. El primer grup es va introduir en una solució 0,1 M de CaF_2 i el segon en una solució 0,1 M de NaF. A continuació, es va aplicar a ambdues solucions el procés de cicles de pH descrit a l'apartat 2.3.1.1. Les dents es van rentar amb aigua i es van obtenir els difractogrames corresponents.

2.3.3 Estudi dels minerals mitjançant espectroscòpia Raman

Es van preparar pastilles a partir de les mostres en pols d'hidroxiapatita, fluorapatita i hidroxiapatita parcialment substituïda amb fluorur de diferents concentracions mitjançant una premsa. Per cada mostra, es van prendre aproximadament 300 mg i es van premsar a 10000 kg durant 15 minuts. D'aquesta manera es van obtenir pastilles d'1 cm de diàmetre i entre 1 i 2 mm de gruix.

Es van obtenir els espectres Raman de les pastilles preparades. A continuació, cada pastilla es va dividir en diferents porcions i aquestes es van escalfar durant 30 minuts a diferents temperatures: 200°C, 300°C, 400°C, 500°C, 600°C, 700°C i 800°C. Després de deixar refredar les mostres altra vegada a temperatura ambient, es van obtenir de nou els espectres Raman.

Es van seleccionar 9 molars humans extrets per diferents raons que mostraven zones d'esmalt intactes. Les dents es van guardar en una solució de cloramina-T al 0,5% des

de l'extracció fins que van ser utilitzades. Es van obtenir els espectres Raman de cadascuna de les dents i a continuació es van dividir en tres grups. El primer grup es va tractar amb una solució de CaF_2 0,1 M i amb cicles de pH com els descrits a l'apartat 2.4.1.1. El segon grup es va mantenir en una suspensió de 3 g de NMTD(24) en 6 ml de saliva artificial durant 72 hores. L'NMTD és un material destinat a la remineralització de teixits organominerals que es basa en la combinació de diferents resines de bescanvi iònic que aporten al teixit calci, fosfat i fluorur en les mateixes proporcions molars que la fluorapatita i a una velocitat controlada. El tercer grup no es va tractar i es va emprar com a control. Després d'aplicar els tractaments, es van tornar a mesurar els espectres Raman dels grups tractats. Les dents es van sotmetre a dues etapes de calcinació: una primera etapa de 30 minuts a 800°C i una segona de 30 minuts a 1000°C . Els espectres Raman es van obtenir per a totes les dents entre la primera i la segona etapa i després de la segona etapa.

2.4 Procediment experimental per a l'estudi de l'efecte de l'addició de Fe (III) a un blanquejador comercial

2.4.1 Preparació i tacat dels espècimens

Es van seleccionar 54 incisius centrals bovins de mandíbules inferiors de vedelles sacrificades per al consum humà. Les dents es van conservar en una solució aquosa de cloramina-T 0,5% fins que es van utilitzar per l'estudi. Després de tallar les arrels, es van muntar les dents en resina acrílica col·locant la part labial cap a l'exterior de l'espècimen. Una vegada solidificat el polímer, es van polir els espècimens amb paper d'aigua P-200 per exposar la superfície de la dent sense arribar a exposar, però, la dentina. A continuació, es van polir les superfícies amb paper d'aigua P-600 i P-1500

consecutivament, per tal d'aconseguir una superfície llisa i homogènia que permetés mesures precises del color.

2.4.2 Preparació del material modificat

El blanquejador dental VivaStyle®, amb un contingut de diòxid de carbamida del 16%, es va modificar mitjançant l'addició de diferents quantitats d'una solució de FeCl₃. El contingut d'una xeringa de blanquejador (3 ml) es dipositava en un vial de vidre. A continuació, s'afegia el volum adequat d'una solució 76 mM de FeCl₃, s'agitava la mescla amb una vareta de vidre, i tot seguit s'aplicava sobre les dents del grup corresponent. Es van preparar 4 composicions diferents amb continguts de Fe(III) en les mescles finals 1,9 mM, 3,8 mM, 5,7 mM i 7,6 mM, respectivament. El pH de cada formulació es va controlar mitjançant un elèctrode. Es van preparar també mostres de material blanquejador afegint 300 µl d'una solució 0,03 M de HCl. D'aquesta manera, s'aconseguia un pH similar al del blanquejador modificat amb una concentració de Fe(III) de 7,6 mM. Així es va poder estudiar l'efecte del pH en el blanqueig.

2.4.3 Mesura del blanqueig

Les dents preparades tal i com s'ha descrit a l'apartat 2.5.1 es van dividir aleatòriament en 6 grups. Un dels grups es va tractar amb el blanquejador i els altres 5 amb les diferents formulacions de blanquejador modificat amb Fe(III) i HCl respectivament, que s'han descrit a l'apartat 2.5.2.

Es va estudiar el blanqueig en quatre etapes per tal d'estudiar la cinètica dels primers minuts del procés:

1^a etapa: 6 minuts

2^a etapa: 3 minuts (9 minuts de tractament total)

3^a etapa: 5 minuts (14 minuts de tractament total)

4^a etapa: 6 minuts (20 minuts de tractament total)

Per cada etapa de blanqueig s'aplicava el blanquejador corresponent sobre les dents de cada grup. A continuació, les dents es situaven en una safata de plàstic amb la dent cap a baix. Durant tot el procés, les dents es mantenien a 37°C en un incubador. Després del temps de tractament, es netejava la superfície de les dents sota l'aixeta fregant amb un raspall dental durant 20 segons per tal d'eliminar el blanquejador. A continuació, es mesurava el color emprant el paràmetre L de l'espai de color L*a*b.

2.5 Bibliografía

- (1) Frant MS, Ross JW, Jr. Electrode for sensing fluoride ion activity in solution. *Science* 1966 Dec 23;154(756):1553-1555.
- (2) Cattrall RW. *Chemical Sensors* Oxford: Oxford University Press; 1997. p. 8-9.
- (3) Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. *Potenciometría. Principios de análisis instrumental* Madrid: McGraw-Hill; 2001. p. 639-671.
- (4) Frant MS, Ross JW, Jr. Use of a total ionic strength adjustment buffer for electrode determination of fluoride in water supplies. *Anal. Chem.* 1968 Jun;40(7):1169-1171.
- (5) Moore GL. *Introduction to inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy*. Amsterdam: Elsevier; 1989.
- (6) Olesik JW. Elemental Analysis Using ICP-OES and ICP/MS. *Anal. Chem.* 1991;63:12A-16A.
- (7) Boumans PWJM. In: Boumans PWJM, editor. *Inductively Coupled Plasma Emission Spectroscopy - Part I* New York: John Wiley & Sons; 1987. p. 69.
- (8) Wells OC. Scanning electron microscopy. In: Buschow KHJ, Cahn RW, Flemings MC, Ilschen B, Kramer EJ, Mahajan S, editors. *Encyclopedia of materials: Science and Technology* Oxford: Elsevier; 2001. p. 8265-8269.
- (9) Ziller JW, Rheingold AL. X-Ray Crystallography. In: Drago RS, editor. *Physical methods for chemists*. 2nd ed. London: Saunders (W.B.) Co Ltd.; 1992. p. 689-711.
- (10) Misture ST, Snyder RL. X-ray diffraction. In: Buschow KHJ, Cahn RW, Flemings MC, Ilschen B, Kramer EJ, Mahajan S, editors. *Encyclopedia of materials: Science and Technology* Oxford: Elsevier; 2001. p. 9799-9809.
- (11) De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, et al. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *J. Dent. Res.* 2005 Feb;84(2):118-132.
- (12) Pashley DH, Sano H, Ciucchi B, Yoshiyama M, Carvalho RM. Adhesion testing of dentin bonding agents: a review. *Dent. Mater.* 1995 Mar;11(2):117-125.
- (13) Rider M, Tanner AN, Kenny B. Investigation of adhesive properties of dental composite materials using an improved tensile test procedure and scanning electron microscopy. *J. Dent. Res.* 1977 Apr;56(4):368-378.
- (14) Loguercio AD, Barroso LP, Grande RH, Reis A. Comparison of intra- and intertooth resin-dentin bond strength variability. *J. Adhes. Dent.* 2005 Summer;7(2):151-158.
- (15) McDonough WG, Antonucci JM, He J, Shimada Y, Chiang MY, Schumacher GE, et al. A microshear test to measure bond strengths of dentin-polymer interfaces. *Biomaterials* 2002 Sep;23(17):3603-3608.

- (16) Levallois B, Fovet Y, Lapeyre L, Gal JY. In vitro fluoride release from restorative materials in water versus artificial saliva medium (SAGF). *Dent.Mater.* 1998 Nov;14(6):441-447.
- (17) Attin T, Schaller HG, Hellwig E. Fluoride uptake in dentin with and without simulating dentinal fluid flow. *Clin.Oral Investig.* 1997 Sep;1(3):125-130.
- (18) Ciucchi B, Bouillaguet S, Holz J, Pashley D. Dentinal fluid dynamics in human teeth, in vivo. *J.Endod.* 1995 Apr;21(4):191-194.
- (19) Wei M, Evans JH, Bostrom T, Grondahl L. Synthesis and characterization of hydroxyapatite, fluoride-substituted hydroxyapatite and fluorapatite. *J.Mater.Sci.Mater.Med.* 2003 Apr;14(4):311-320.
- (20) Qu H, Wei M. Synthesis and characterization of fluorine-containing hydroxyapatite by a pH-cycling method. *J.Mater.Sci.Mater.Med.* 2005 Feb;16(2):129-133.
- (21) Qu H, Vasiliev AL, Aindow M, Wei M. Incorporation of fluorine ions into hydroxyapatite by a pH cycling method. *J.Mater.Sci.Mater.Med.* 2005 May;16(5):447-453.
- (22) Taves DR. Separation of fluoride by rapid diffusion using hexamethyldisiloxane. *Talanta* 1968;15(9):969-974.
- (23) Kochavi D, Gedalia I, Anaise J. Effect of conditioning with fluoride and phosphoric acid on enamel surfaces as evaluated by scanning electron microscopy and fluoride incorporation. *J.Dent.Res.* 1975 Mar-Apr;54(2):304-309.
- (24) Valiente M, inventor. Sociedad Limitado para el Desarrollo Cientifico Aplicado, assignee. Remineralizing material for organomineral tissues. USA patent US 6,413,498 B1. 2002 Jul, 6, 1999.

Capítol 3

Discussió global dels resultats

ÍNDIX

3 DISCUSSIÓ GLOBAL DELS RESULTATS

3.1 INCORPORACIÓ D'UNA RESINA DE BSCANVI IÒNIC COM A AGENT D'ALLIBERACIÓ CONTROLADA A UN ADHESIU DENTAL	93
3.1.1 CARACTERITZACIÓ DE LA RESINA	93
3.1.2 GRAU DE CONVERSIÓ DE LA RESINA	95
3.1.3 EFECTE DE LA FORMA D'APLICACIÓ SOBRE EL PERFIL D'ALLIBERACIÓ DEL IÓ FLUORUR (ANNEX 1)	97
3.1.4 EFECTE DE LA MATRIU D'ADHESIU SOBRE EL MECANISME DE BSCANVI IÒNIC DE LA RESINA (ANNEX 2)	104
3.1.5 EFECTE DE LA RESINA DE BSCANVI IÒNIC SOBRE LA FORÇA D'ADHESIÓ DEL MATERIAL FINAL (ANNEX 3)	107
3.1.6 RELLEVÀNCIA DELS RESULTATS OBTINGUTS	112
3.2 DETERMINACIÓ DE LA INCORPORACIÓ DE FLUORUR AL MINERAL DENTAL	114
3.2.1 ANÀLISI ELEMENTAL DELS MINERALS SINTETITZATS	114
3.2.2 ESTUDI DE LA INCORPORACIÓ DE FLUORUR A L'ESMALT DENTAL MITJANÇANT DIFRACCIÓ DE RAIGS X (ANNEX 4)	116
3.2.3 ESTUDI DE LA INCORPORACIÓ DE FLUORUR A L'ESMALT DENTAL MITJANÇANT ESPECTROSCÒPIA RAMAN (ANNEX 5)	122
3.2.4 RELLEVÀNCIA DELS RESULTATS OBTINGUTS	127
3.3 MILLORA DE LES PROPIETATS D'UN BLANQUEJADOR COMERCIAL	128
3.3.1 ESTUDI DE L'EFECTE DE L'ADDICIÓ DE Fe(III) A UN BLANQUEJADOR COMERCIAL (ANNEX 6)	128
3.3.2 RELLEVÀNCIA DELS RESULTATS OBTINGUTS	131
3.4 BIBLIOGRAFIA	132

3 Discussió global dels resultats

3.1 Incorporació d'una resina de bescanvi iònic com a agent d'alliberació controlada a un adhesiu dental

En aquest apartat es resumeixen els estudis corresponents a la modificació d'un adhesiu dental comercial amb una resina de bescanvi iònic carregada amb ió fluorur. Es pretén aconseguir un material que sigui capaç d'alliberar fluorur una vegada realitzada la restauració per tal d'aconseguir un efecte remineralitzant sobre la zona de la dent que està en contacte directe amb l'adhesiu. Per això, com es veurà a continuació s'han avaluat diferents formes d'aplicació de les mescles de resina de bescanvi iònic i adhesiu per veure com afecten a l'alliberació de fluorur i s'ha estudiat la influència de la matriu d'adhesiu sobre el mecanisme del bescanvi iònic de la resina. A més, s'ha estudiat també l'efecte de la resina sobre la força d'adhesió del material final.

3.1.1 Caracterització de la resina

3.1.1.1 Determinació de la capacitat

Tal i com s'ha descrit a l'apartat 2.3.1, la determinació de la capacitat de la resina es porta a terme a partir de l'anàlisi quantitatiu del ió després de la seva desorció total.

La capacitat es calcula com els mil·limols d'ió retengut per gram de resina, segons l'expressió que es mostra a continuació:

$$q_i = \frac{V \cdot C_i}{W} \quad (\text{Eq 3.1})$$

on V és el volum de dissolució eluïda; C_i és la concentració de la dissolució que conté l'ió fluorur eluït i W és el pes de resina.

La capacitat de càrrega del ió fluorur obtinguda amb la resina de bescanvi iònic emprada va ser de $3,3 \pm 0,1$ meq/g.

3.1.1.2 Mesura de la mida de partícula

A causa de les característiques de la resina, la separació i determinació de les diferents mides de partícula quan es treballa per sota de $50 \mu\text{m}$ resulta especialment difícil. Les partícules de la resina utilitzada tenen càrregues electrostàtiques que fan que tinguin tendència a formar agregats. Per aquest motiu no s'han pogut observar diferències significatives en el diàmetre mig mesurat. La Taula 3-1 mostra els valors obtinguts a partir de les imatges de microscopi electrònic de les fraccions de resina separades pels tamisos utilitzats.

Fracció de resina (μm)	Diàmetre mig mesurat \pm SD (μm)
28-32	31 ± 21
32-40	39 ± 21
40-50	47 ± 29

Taula 3-1 Diàmetre mig mesurat per a les fraccions de resina obtingudes el tamisat.

La mida mitjana de la resina mòlta amb molí de boles no es va poder determinar degut a la impossibilitat de dispersar les partícules obtingudes per poder-les observar. Tot i així, les imatges SEM permeten veure que el diàmetre mig aconseguit es troba per sota de 300 nm . La Figura 3-1 mostra les imatges SEM de partícules de cadascuna de les fraccions estudiades.

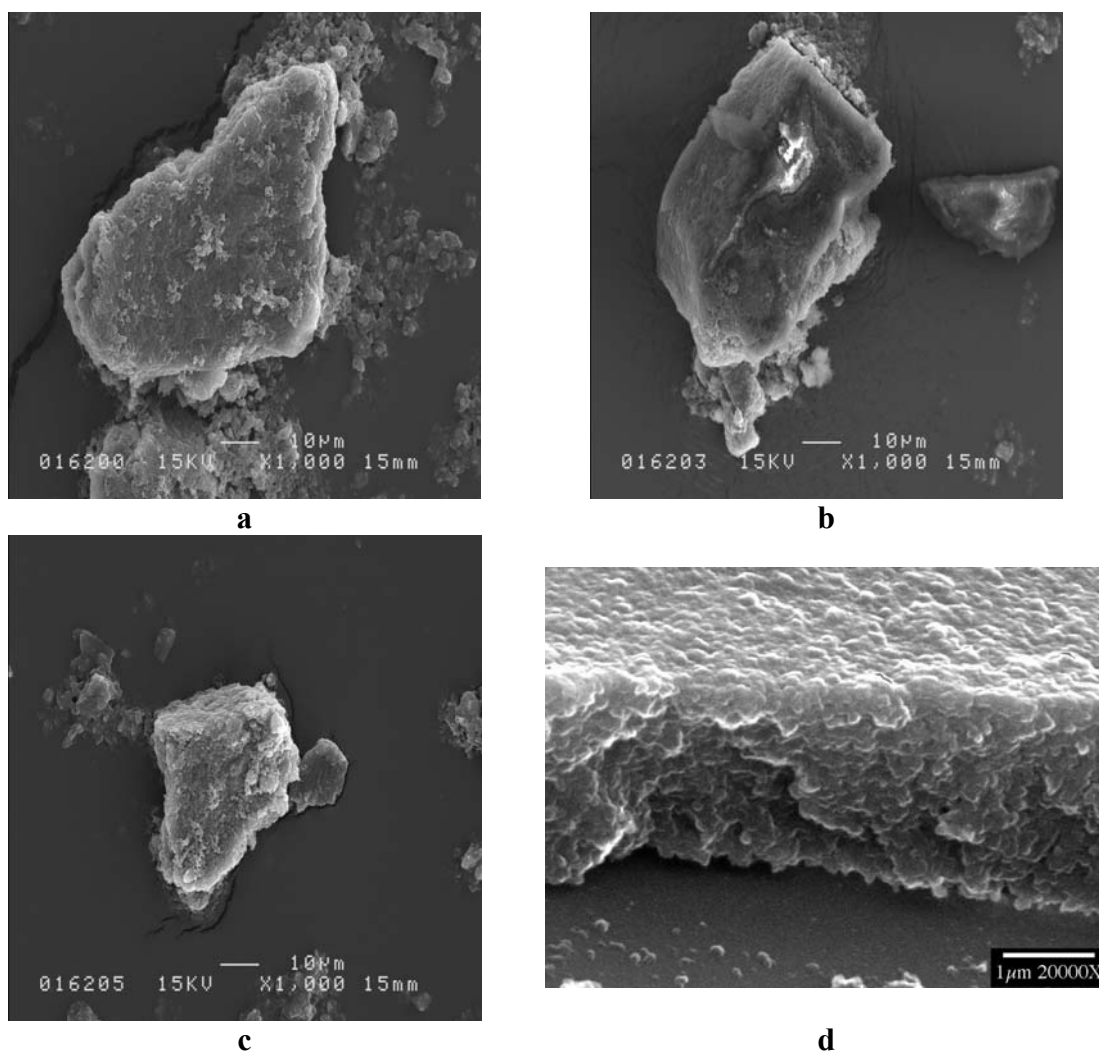


Figura 3-1 Imatges SEM de partícules de resina de les fraccions obtingudes després del tamisat entre 50-40 µm (a), 40-32 µm (b) i 32-28 µm (c). Imatge de les partícules d'aquesta última fracció després de la mòlta amb molí de boles (d).

3.1.2 Grau de conversió de la resina

El grau de conversió (F) de la mescla d'adhesiu i resina de bescanvi iònic carregada amb ió fluorur es va mesurar en sistemes en discontinu amb relacions entre superfície de mostra, volum de solució i temps de contacte similars a les que es produïrien en aplicar els materials sobre la dentina.

Les mostres es van prendre després de diferents temps de contacte entre el material modificat i la solució de Ringer de composició adaptada i es van analitzar per determinar la concentració d'ió fluorur. A partir dels resultats obtinguts, es va calcular el grau de conversió de la resina en les condicions estudiades segons l'expressió:

$$F = \frac{\sum C_i V_i}{Q_0} \quad (\text{Eq 3.2})$$

on V_i és el volum de la dissolució i , C_i és la concentració del ió bescanviat i Q_0 és la quantitat total d'ió present inicialment a la resina.

La Taula 3-2 mostra els valors del grau de conversió obtinguts per a les diferents mostres estudiades. Com es pot observar, el grau de conversió en les mostres d'adhesiu modificat amb resina és inferior al de les mostres de resina sola. En principi, suposant que l'adhesiu actués únicament com a barrera difusora, caldria esperar que la quantitat final de fluorur alliberada fos la mateixa per a totes les mescles de materials estudiades. De fet, altres estudis de bescanvi iònic utilitzant la mateixa resina encapsulada en altres tipus de matriu, han mostrat graus de conversió finals sense diferències significatives(1). Probablement, doncs, els materials que s'han utilitzat en aquest estudi obstrueixen alguns dels porus de les partícules de resina, de manera que, almenys durant el temps d'observació, no permeten el pas dels ions a través d'aquests porus i n'impossibiliten el seu accés als grups actius de la resina.

Temps (h)	3M Single Bond + Resina		Resina	
	mg F/g mostra	F (acumulat)	mg F/g mostra	F (acumulat)
24	1,8 ± 0,3	0,33 ± 0,05	64 ± 7	1,1 ± 0,2
48	0,06 ± 0,02	0,34 ± 0,05	N.D.	-
72	N.D.	-	N.D.	-

Taula 3-2 Quantitat d'ió fluorur alliberada i grau de conversió de les mostres de resina de bescanvi iònic en forma d'ió fluorur i de les mostres d'adhesiu 3M Single Bond modificades amb aquesta resina. (N.D.: No detectat).

A partir dels resultats d'alliberació obtinguts, es van calcular els coeficients de distribució i els factors de separació del sistema de bescanvi fluorur-clorur per la resina sola i per la resina encapsulada en la matriu d'adhesiu. Els valors obtinguts es mostren a la Taula 3-3.

Mostra	λ_F	λ_{Cl}	α_F^{Cl}
3M Single Bond + Resina	12000 ± 5000	$6,5 \pm 0,7$	$7 \cdot 10^{-4} \pm 3 \cdot 10^{-4}$
Resina	$0,4 \pm 0,1$	$19,8 \pm 0,3$	45 ± 15

Taula 3-3 Coeficients de distribució i factors de separació del sistema de bescanvi fluorur-clorur per les mostres de resina de bescanvi iònic en forma d'ió fluorur i de les mostres d'adhesiu 3M Single Bond modificades amb aquesta resina.

Els resultats mostren una major afinitat de la resina utilitzada per al ió clorur que per al fluorur inicialment immobilitzat quan la resina es troba en forma lliure. La major afinitat de la resina utilitzada pel ió clorur que pel fluorur, es dona també en altres condicions experimentals per a solucions de bescanvi similars a les utilitzades en aquest estudi(2,3). Quan la resina es troba encapsulada en la matriu d'adhesiu, però, la tendència s'inverteix. En realitat, no es tracta d'un canvi d'afinitat de la resina sinó que el més probable és, com s'ha mencionat anteriorment, que l'adhesiu obturi alguns dels porus impossibilitant que els ions difonguin a través seu i es bescanviïn.

3.1.3 Efecte de la forma d'aplicació sobre el perfil d'alliberació del ió fluorur (Annex 1)

Com hem vist el fet d'encapsular la resina de bescanvi iònic en la matriu d'adhesiu pot afectar la quantitat de fluorur bescanviada. Quan un bescanviador iònic es troba encapsulat en algun tipus de matriu, la forma d'aplicació pren una especial rellevància. El fet de preparar el material que conté el bescanviador mitjançant diferents metodologies pot fer que la distribució final del bescanviador en el material sigui

diferent. En particular, si l'efecte de barrera difusora que pot exercir la matriu és prou gran, el gruix de la capa de material que envoltarà les partícules de bescanviador pot determinar tant la velocitat com el rendiment del procés de bescanvi.

D'altra banda, tenint en compte les possibles aplicacions de l'adhesiu modificat estudiat en aquest treball, cal controlar i optimitzar la forma d'aplicació per tal de millorar la seva eficiència. La influència de la forma d'aplicació de les mostres en el procés de bescanvi iònic es va estudiar mitjançant el seguiment de l'alliberació de fluorur de la resina encapsulada en l'adhesiu i de la resina lliure, després d'haver aplicat les mostres en diferents condicions.

3.1.3.1 Efecte del dissolvent de l'adhesiu

Per tal de descartar qualsevol efecte del dissolvent de l'adhesiu sobre el bescanvi del ió fluorur retingut a la resina de bescanvi iònic, es van estudiar mostres preparades a partir de suspensions de resina en aigua, en etanol (que és el dissolvent de l'adhesiu) i en adhesiu. Tal i com es podia esperar, els perfils d'alliberació de fluorur de la resina de bescanvi iònic preparada a partir de suspensions en aigua i en etanol van resultar ser pràcticament idèntics. Com que les mostres es deixaven assecar abans de mesurar l'alliberació (com també es feia amb les mostres d'adhesiu) tant l'aigua com l'etanol s'havien evaporat i, per tant, en ambdós casos es partia de la resina de bescanvi iònic en les mateixes condicions. No es van observar diferències significatives ni en la velocitat inicial d'alliberació ni en el grau de conversió final de la resina. Així doncs, és d'esperar que les diferències en els perfils d'alliberació entre les mostres de resina de bescanvi iònic preparades a partir de suspensions aquoses i les mostres de l'adhesiu dental

modificat amb resina siguin degudes a la matriu de l'adhesiu, és a dir, al polímer que forma l'adhesiu quan s'asseca.

Les mostres preparades a partir de suspensions en adhesiu de la resina de bescanvi iònic carregada amb ió fluorur van mostrar perfils d'alliberació diferents als de les suspensions en aigua o etanol. L'efecte de barrera difusora produït per l'adhesiu que envolta les partícules de resina de bescanvi iònic fa que la velocitat del procés de bescanvi sigui més lenta, tot i que el grau de conversió final de la resina és el mateix. En aquest cas, l'aplicació de les mostres va ser diferent a la utilitzada en els estudis del grau de conversió que s'han tractat a l'apartat 3.1.2. És per això que els valors de grau de conversió obtinguts van ser diferents. Les mostres corresponents a l'estudi de l'apartat anterior s'havien aplicat mitjançant un pinzell sobre un suport de cel·lulosa que permetia, en principi, una superfície de contacte més gran de la mostra amb la solució de bescanvi. Les mostres utilitzades per estudiar la influència del dissolvent, en canvi, es van aplicar amb una micropipeta sobre un suport inert de polipropilè i després es van cobrir, una vegada seques, amb un cercle de cel·lulosa que les protegia de l'erosió. Aquesta diferència en la forma d'aplicació de les mostres té, com es veurà a continuació, un efecte destacable sobre l'alliberació del ió fluorur de la resina.

3.1.3.2 Efecte de la forma d'extensió

La forma d'extensió de l'adhesiu modificat amb la resina de bescanvi iònic pot tenir un important efecte sobre l'alliberació. El fet de que la capa d'adhesiu que envolta la resina sigui més o menys gruixuda i que les partícules de resina quedin més o menys disperses després d'aplicar la mescla pot influir en la difusió dels ions i en l'inflament de la resina. Per tal d'observar la influència de la forma d'extensió en l'alliberació de fluorur

del sistema estudiat, es va mesurar l'alliberació de fluorur aplicant les mescles de resina i adhesiu de diferents formes.

Els resultats obtinguts van permetre observar efectes importants de la forma d'extensió del material tant sobre la velocitat de l'alliberació de fluorur com sobre el grau de conversió final de la resina de bescanvi iònic.

Com s'observa a la Figura 3-2, el grau de conversió final de la resina de bescanvi iònic canvia sensiblement segons si les mescles s'apliquen mitjançant un pinzell o una micropipeta.

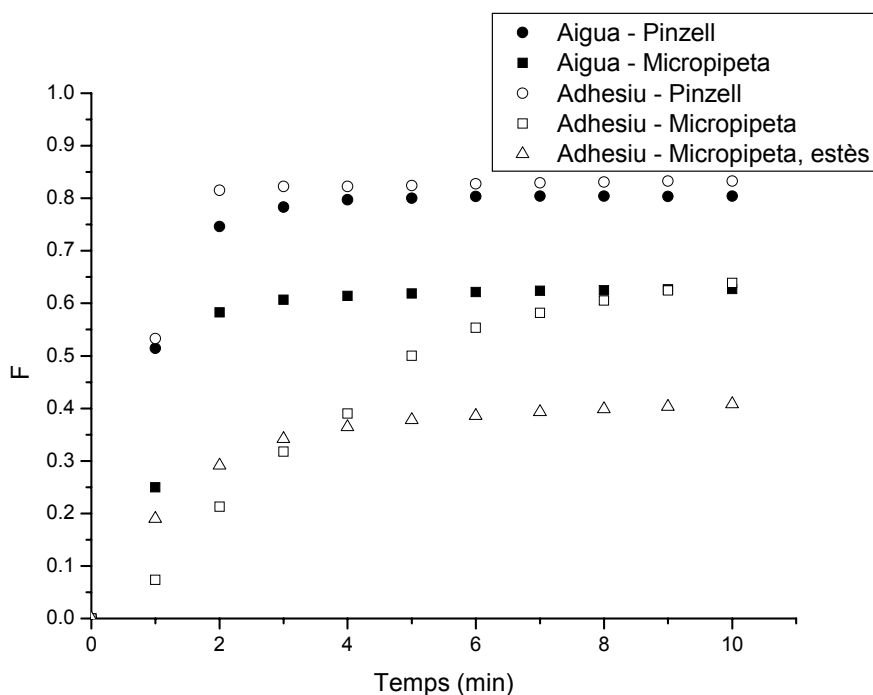


Figura 3-2 Perfils d'alliberació de fluorur de les mostres de suspensions de resina de bescanvi iònic en aigua i d'adhesiu modificat amb resina de bescanvi iònic. Aplicació amb pinzell i amb micropipeta, estenent o no la mostra amb un cercle de cel·lulosa.

Les mostres aplicades amb pinzell a partir de suspensions en aigua van mostrar perfils d'alliberació molt similars a les mostres de resina de bescanvi iònic encapsulada en

adhesiu aplicades de la mateixa manera. L'ús del pinzell per estendre la mostra fa que la capa d'adhesiu que queda sobre les partícules de resina de bescanvi iònic sigui molt més prima que quan la mescla s'aplica mitjançant una micropipeta. És per això que l'efecte de barrera difusora de l'adhesiu disminueix dràsticament i el bescanvi iònic es produeix pràcticament a la mateixa velocitat que en absència de l'adhesiu. A la Figura 3-2 es pot observar també que les mostres aplicades amb pinzell presenten un grau de conversió final superior a les mostres aplicades amb micropipeta tant en el cas de l'adhesiu modificat amb resina de bescanvi iònic com en el cas de la resina sense encapsular. Aquest fet indica que l'aplicació amb pinzell produeix un enriquiment en resina de les mostres. Possiblement, els pinzells emprats retenen el líquid amb més facilitat que les partícules sòlides, de manera que les partícules de resina de bescanvi iònic es dipositen en una proporció més gran que el líquid de la suspensió (adhesiu o aigua, segons el cas).

Pel que fa a les mostres aplicades mitjançant una micropipeta, tal i com era d'esperar, es va observar que la velocitat de bescanvi iònic de les mostres preparades a partir de suspensions aquoses era superior a la de les mostres preparades amb la resina encapsulada en l'adhesiu. Les mostres d'adhesiu modificat que després de dipositar-se mitjançant una micropipeta es van estendre amb un cercle de cel·lulosa van mostrar, però, un comportament a priori inesperat. Tot i tenir una velocitat inicial semblant o fins i tot lleugerament superior (com es veu al perfil de la Figura 3-2) a la de mostres sense estendre, el procés de bescanvi de les mostres d'adhesiu modificat aplicades amb micropipeta i esteses per mitjà d'un cercle de cel·lulosa assoleix un grau de conversió de la resina inferior al de les mostres aplicades de la mateixa manera però sense estendre. Aquest fet suggereix que es dona alguna mena d'interacció entre l'adhesiu i el cercle de cel·lulosa que s'utilitza per estendre i cobrir les mostres. El més probable és que el fet

de cobrir l'adhesiu amb el cercle de cel·lulosa abans que l'adhesiu s'assequi faci que el procés de polimerització de l'adhesiu es vegi afavorit. El cercle de cel·lulosa protegeix l'adhesiu de l'oxigen de l'aire, que dificulta la polimerització de l'adhesiu(4,5). Això fa que, després de solidificar, el polímer que forma l'adhesiu tingui un grau d'entrecreuament més elevat. El major grau d'entrecreuament de l'adhesiu impedeix, probablement, que els ions puguin difondre a través seu. Per tant, el cercle de cel·lulosa, en afavorir la polimerització, provoca que alguns dels porus de la resina de bescanvi iònic quedin obturats a causa del major grau d'entrecreuament de l'adhesiu, de manera que la quantitat de fluorur bescanviable és inferior.

3.1.3.3 Efecte de la polimerització amb llum de l'adhesiu

L'aplicació de llum visible de 470 nm accelera el procés de polimerització de l'adhesiu. La polimerització amb llum de l'adhesiu pot afectar el perfil d'alliberació de fluorur de la resina de bescanvi iònic, ja que l'entrecreuament final de l'adhesiu pot variar respecte a l'adhesiu polimeritzat sense aplicar llum. Per tal d'estudiar aquest efecte es van determinar els perfils d'alliberació de fluorur de mostres d'adhesiu modificat amb la resina de bescanvi iònic aplicades amb pinzell i amb micropipeta tant polimeritzades com sense polimeritzar mitjançant l'aplicació de llum.

La Figura 3-3 mostra els perfils d'alliberació obtinguts per les mostres polimeritzades i sense polimeritzar amb llum. Com es pot observar, la cinètica del bescanvi de fluorur de les mostres aplicades amb pinzell es veu afectada per la polimerització amb llum de l'adhesiu. Tot i que s'arriba al mateix grau de conversió final, el perfil d'alliberació d'aquestes mostres denota un bescanvi més lent a causa, possiblement, del major entrecreuament de l'adhesiu polimeritzat amb llum, que dificulta la difusió dels ions.

Les mostres aplicades amb micropipeta i esteses mitjançant el cercle de cel·lulosa, en canvi, no presenten aquesta variació. El més probable és que l'aplicació de llum per polimeritzar l'adhesiu, que fa que la velocitat de polimerització sigui més ràpida, tingui un efecte important sobre l'adhesiu aplicat amb pinzell, que està exposat a l'aire pràcticament en la seva totalitat. En canvi, quan l'adhesiu s'estén amb el cercle de cel·lulosa queda protegit de l'aire i, per tant, la polimerització no s'inhibeix. Així, tot i que la velocitat de polimerització pugui ser més lenta, les mostres protegides amb el cercle de cel·lulosa arriben al mateix grau d'entrecruament independentment de si s'ha aplicat llum visible o no per accelerar el procés.

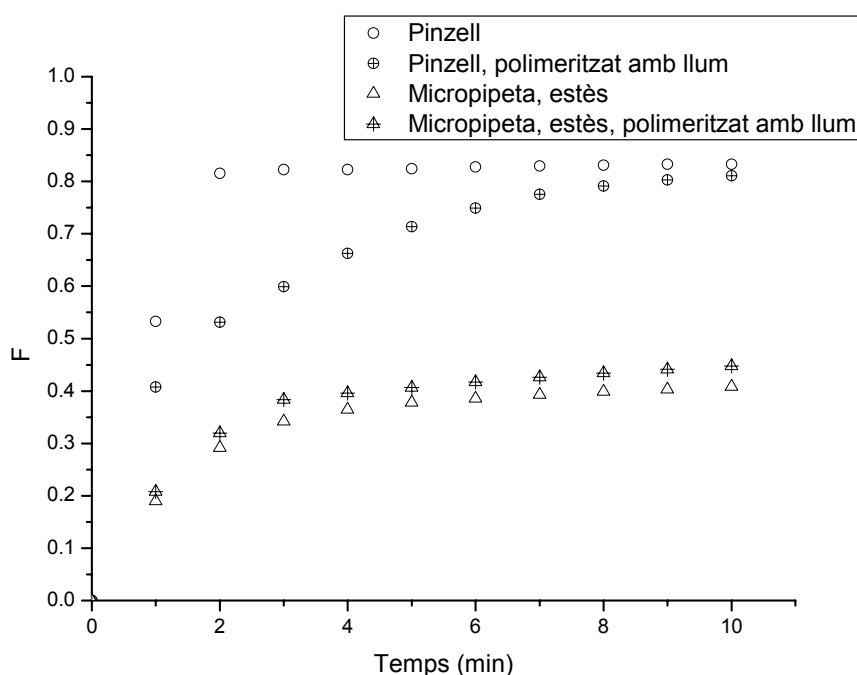


Figura 3-3 Perfils d'alliberació de fluorur de les mostres d'adhesiu modificat amb la resina de bescanvi iònic aplicades amb pinzell i amb micropipeta estenent la mostra amb un cercle de cel·lulosa. Mostres polimeritzades i sense polimeritzar amb llum visible.

3.1.4 Efecte de la matriu d'adhesiu sobre el mecanisme de bescanvi iònic de la resina (Annex 2)

Fins ara hem vist com el fet d'incloure la resina de bescanvi iònic en la matriu d'adhesiu dental afecta el procés de bescanvi i com aquest procés pot variar segons la forma com s'aplica el material. Com s'ha comentat a la introducció, el bescanvi iònic és un procés que es basa fonamentalment en etapes de difusió, que són les que controlen la velocitat del procés. Els models cinètics que s'empren per estudiar el procés de bescanvi iònic es basen, doncs, en aquestes etapes.

L'efecte de l'adhesiu sobre l'etapa determinant de la velocitat del procés de bescanvi iònic es va estudiar mitjançant dos models cinètics diferents. Aquests models es van aplicar a les dades experimentals obtingudes amb mostres de resina de bescanvi iònic preparades a partir de suspensions en aigua i amb mostres d'adhesiu modificat amb la resina. Per tal de comprovar si la mida de partícula de la resina té algun efecte sobre l'etapa determinant del procés, es van realitzar els experiments amb tres fraccions de diferents mides de partícula.

El primer dels models aplicats és un model basat en la difusió intraparticular, és a dir, és aplicable a processos de bescanvi iònic en què l'etapa determinant de la velocitat és la difusió dels ions a l'interior de les partícules de resina. El segon model cinètic emprat es basa en la difusió interparticular, de manera que es pot aplicar als processos de bescanvi iònic en què la velocitat de bescanvi està determinada per la difusió dels ions a la capa de dissolució bescanviadora que envolta les partícules. Ambdós models es van aplicar a les dades obtingudes experimentalment per tal de comprovar quin ajustava millor als valors obtinguts.

Com es pot observar a la Figura 3-4, la mida de partícula de la resina no va mostrar influències en l'etapa determinant de la velocitat del bescanvi iònic en el rang de mides de partícula estudiat. Aquest fet pot estar relacionat amb la proximitat dels valors determinats de mida de partícula.

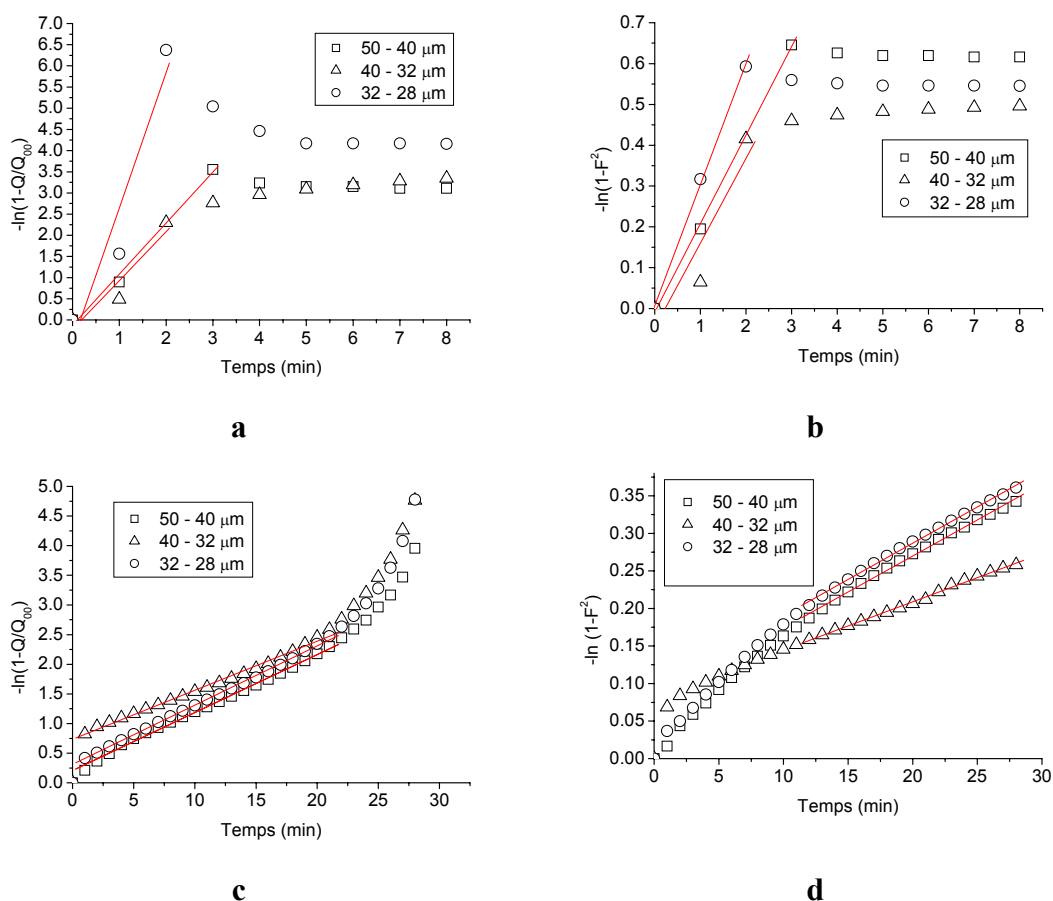


Figura 3-4 Aplicació dels dos models cinètics als resultats de les mostres estudiades: **a)** model interparticular aplicat a les mostres preparades a partir de resina en suspensió en aigua, **b)** model intraparticular aplicat a les mostres preparades a partir de resina en suspensió en aigua, **c)** model interparticular aplicat a les mostres d'adhesiu modificat, **d)** model intraparticular aplicat a les mostres d'adhesiu modificat.

Les dades obtingudes amb mostres preparades a partir de suspensions en aigua de la resina de bescanvi iònic ajusten tant al model interparticular (Figura 3-4a) com al model intraparticular (Figura 3-4b) per als primers minuts del procés. Després de tres minuts, el procés de bescanvi iònic arriba a l'equilibri i, per tant, els models cinètics deixen de ser vàlids per ajustar les dades. L'elevada velocitat del procés de bescanvi en aquestes

mostres dificulta l'ajust dels models degut a que el nombre de punts que es poden utilitzar és petit. En estudis similars realitzats amb partícules de resina de mides més grans, s'ha comprovat que l'alliberació de fluorur està controlada per la difusió intraparticular(6). D'altres estudis, però, emprant mides de partícula de la resina similars a les que s'han utilitzat aquí, donen també ajustos similars per ambdós models cinètics(7).

L'aplicació dels models cinètics a les mostres d'adhesiu modificat amb la resina de bescanvi iònic va mostrar un canvi en l'etapa determinant de la velocitat. Mentre que els punts inicials (aproximadament els 20 primers minuts) de l'alliberació de fluorur de les mostres d'adhesiu modificat ajusten bé al model interparticular, a partir dels 12 minuts des del principi del procés de bescanvi i fins que s'assoleix l'equilibri les dades es poden ajustar al model intraparticular (Figura 3-4c i Figura 3-4d). Per tant, sembla que es produeix un canvi en l'etapa de difusió que determina la velocitat del procés de bescanvi iònic. Possiblement, aquest canvi es deu a una hidratació progressiva de l'adhesiu. Així, durant els primers minuts del procés, la capa d'adhesiu que envolta la resina dificulta la difusió dels ions i això fa que l'etapa de difusió en aquesta capa determini la velocitat del procés. A mesura que l'adhesiu es va hidratant, la difusió dels ions a través seu és més fàcil i s'equipara amb la difusió dels ions a l'interior de les partícules de resina. Durant el temps en què els dos processos de difusió dels ions són semblants, els dos models aplicats s'ajusten a les dades. Finalment, l'adhesiu s'hidrata prou com per permetre que la difusió dels ions a través seu sigui molt més fàcil que a l'interior de les partícules i el procés esdevé controlat per la difusió intraparticular.

3.1.5 Efecte de la resina de bescanvi iònic sobre la força d'adhesió del material final (Annex 3)

La modificació de la força d'adhesió de l'adhesiu després de modificar-lo amb la resina de bescanvi iònic es va estudiar mitjançant el test *Shear Bond Strength*. La força d'adhesió es va mesurar en mostres d'adhesiu modificades amb diferents proporcions de la resina de bescanvi iònic i es va comparar amb la força d'adhesió de l'adhesiu modificat. Es van fer mesures immediatament després de realitzar l'adhesió i al cap de 24 hores.

A la Taula 3-4 es mostren els valors de força d'adhesió obtinguts i els resultats de l'ANOVA entre els grups d'adhesiu modificat i els de l'adhesiu original. Com es pot observar, la força d'adhesió immediata és significativament diferent de la de l'adhesiu original per a tots els grups estudiats.

Adhesiu	Superfície	Temps	Codi de grup	SBS (Mpa)	SD	ANOVA: Adhesiu original vs. Adhesiu modificat	
Original	Dentina	Immediat	OrImDe	17,38	3,10	F	F _{crit}
		24h	Or24De	22,07	7,53		
	Esmalt	Immediat	OrImE	18,94	5,00		
		24h	Or24E	18,56	5,51		
1% Resina de bescanvi iònic	Dentina	Immediat	1ImDe	13,35	2,74	6,28	4,60
		24h	1_24De	16,68	2,91	1,94	4,45
	Esmalt	Immediat	1ImE	13,46	3,63	5,59	4,60
		24h	1_24E	16,68	3,41	2,42	4,60
2.5% Resina de bescanvi iònic	Dentina	Immediat	25ImDe	14,14	2,24	5,25	4,67
		24h	25_24De	18,47	4,76	0,18	4,54
	Esmalt	Immediat	25ImE	12,80	4,06	7,79	4,54
		24h	25_24E	22,99	5,60	2,69	4,54
5% Resina de bescanvi iònic	Dentina	Immediat	5ImDe	12,97	3,84	6,69	4,54
		24h	5_24De	16,91	7,56	0,69	4,45
	Esmalt	Immediat	5ImE	11,74	3,61	8,86	4,74
		24h	5_24E	22,70	8,72	1,35	4,49

Taula 3-4 Valors mitjans de la força d'adhesió *Shear Bond Strength* (SBS) i desviació estàndard (SD) dels grups estudiats. Resultats de l'ANOVA entre els grups de l'adhesiu original i els grups corresponents de l'adhesiu modificat amb resina de bescanvi iònic. Els valors en negreta indiquen diferències significatives respecte de l'adhesiu original.

Possiblement, la resina de bescanvi iònic exerceix certa influència sobre el procés de polimerització de l'adhesiu i fa que sigui més lent. Aquest fet pot ser degut a que la resina interfereix en l'aplicació de la llum visible (absorbint-ne una part) o bé a que reacciona amb alguns dels iniciadors de la polimerització de l'adhesiu. D'altra banda, cal tenir també en compte que la resina de bescanvi iònic absorbia parcialment el dissolvent de l'adhesiu, a causa del procés d'inflament. Aquest fet feia augmentar la viscositat de l'adhesiu i podria dificultar la difusió dels monòmers durant la polimerització, de manera que la cinètica de la reacció es veuria alentida. Aquest efecte és similar al que provoca l'augment de viscositat que resulta de l'addició de bis-GMA o la modificació del contingut de dissolvent en alguns adhesius dentals(8,9).

Els valors de la força d'adhesió a 24 hores de l'adhesiu original i de les diferents formulacions d'adhesiu modificat no difereixen significativament.

Per tant, el procés de polimerització de l'adhesiu no queda col·lapsat per l'addició de la resina, tot i el comportament inicial de l'adhesiu. De fet, aquest procés continua després de l'aplicació del material i l'adhesiu segueix polimeritzant fins a arribar a valors finals de la força d'adhesió semblants als de l'adhesiu original.

Per tal d'observar la interacció física entre l'adhesiu i la dentina i les alteracions produïdes per la modificació de l'adhesiu amb la resina de bescanvi iònic, es van observar mitjançant el microscopi electrònic de rastreig diferents mostres després de realitzar el procés d'adhesió. La Figura 3-4a mostra un exemple de la interacció entre l'adhesiu i la dentina d'una mostra preparada amb l'adhesiu original. Com es pot observar en aquesta figura, els túbuls dentinaris propers a la superfície de contacte amb

l'adhesiu es troben plens, de manera que l'adhesiu ha penetrat al seu interior. A la Figura 3-4b es pot observar una mostra preparada amb l'adhesiu modificat en què succeeix el mateix.

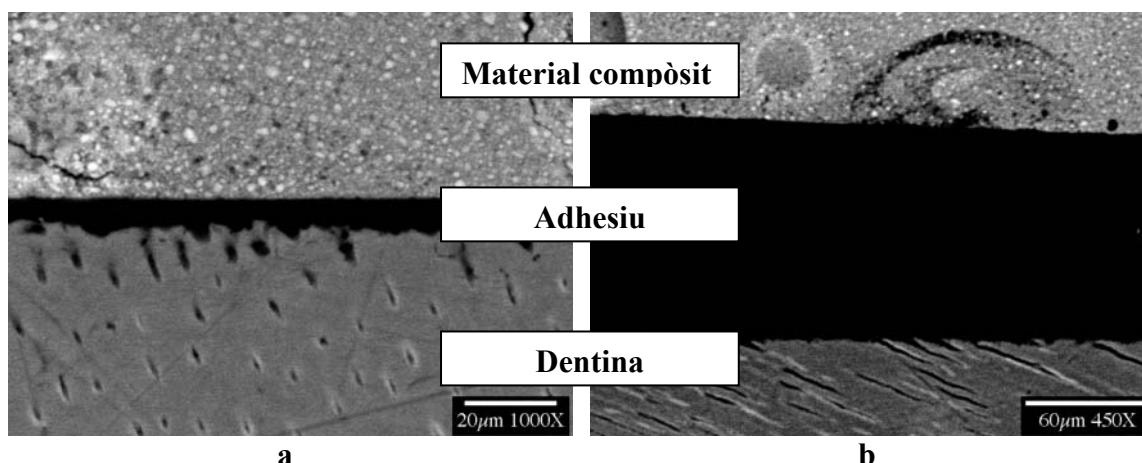


Figura 3-5 Imatges SEM de la interacció entre l'adhesiu i la dentina (a la part inferior de les imatges) en mostres de l'adhesiu original (a) i de l'adhesiu modificat amb un 2,5% de resina de bescanvi iònic (en aquesta mostra la capa d'adhesiu era més gruixuda) (b).

La penetració de l'adhesiu modificat en els túbuls dentinaris indica que després de la modificació amb la resina de bescanvi iònic l'adhesiu encara manté la retenció mecànica a la superfície gravada de la dentina. La penetració de l'adhesiu en la dentina i l'increment de la retenció mecànica que provoca són considerats un factor bàsic del mecanisme d'adhesió en pràcticament tots els adhesius dentals(10). El fet que en les mostres estudiades s'observin diferències significatives en l'adhesió immediata però no en l'adhesió a 24 hores, podria estar influenciat també per les diferències en la penetració a l'interior dels túbuls a temps curts, causades per la diferent viscositat de les formulacions d'adhesiu modificat amb resina de fluorur.

Pel que fa a la zona de fractura, en tots els grups de l'estudi es va observar una gran tendència a la fractura en l'adhesiu, és a dir, després de trencar l'espècimen es podia detectar adhesiu tant a la superfície de l'esmalt o la dentina com sobre la resina

restauradora utilitzada en l'estudi. No es van observar, en canvi, espècimens que mostressin una fallada cohesiva (trencament sense afectar l'adhesiu) ni en l'esmalt o la dentina ni en la resina restauradora. Aquests resultats són similars a les dades qualitatives del trencament d'adhesius dentals del mateix tipus que l'estudiat (sense modificar) publicades en altres estudis(11,12).

Per tal d'estudiar les possibles diferències en els mecanismes de fallada de l'adhesiu dels diferents grups estudiats, es van observar les superfícies dels espècimens després del trencament. Considerant la forma que presentava l'adhesiu tant a la superfície de la dent com a la de la resina composta després del trencament dels espècimens, es van classificar les mostres en quatre grups segons la superfície de la fractura:

- Tipus 0: Superfície llisa
- Tipus 1: Superfície ratllada
- Tipus 2: Superfície amb ratlles i bombolles
- Tipus 3: Superfície amb bombolles

En la majoria de mostres es van observar superfícies dels tipus 1 i 2, essent el darrer el més abundant. A les mostres corresponents a l'adhesiu modificat amb resina de bescanvi iònic es va poder observar un increment de les mostres amb bombolles (grups 2 i 3), tal i com es pot veure a la Figura 3-6.

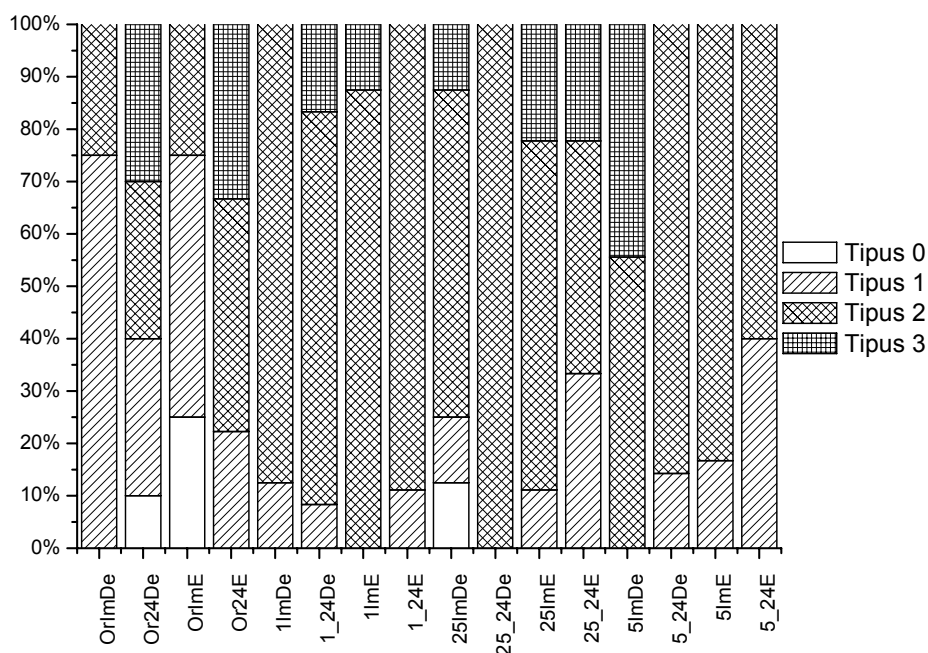


Figura 3-6 Percentatge acumulat del tipus de fractura pels diferents grups estudiats (veure codis de grup a la Taula 3-3).

Els resultats del test t van revelar que la força d'adhesió mitjana de les mostres corresponents als diferents tipus de fractura disminueix a mesura que augmenta la formació de bombolles ($P_{0\leq 1}=0,004$, $P_{1\leq 2}=0,028$, $P_{2\leq 3}=0,001$).

Les bombolles observades es formen possiblement durant el procés d'adhesió. La resina de bescanvi iònic provoca irregularitats en el si de l'adhesiu que afavoreixen la formació d'aquestes bombolles. La Figura 3-7 mostra una imatge SEM d'electrons *backscattered* d'una mostra de l'adhesiu modificat amb resina on es pot observar l'existència de buits en la capa d'adhesiu que estan parcialment ocupats per partícules de resina. Probablement, la resina de bescanvi iònic absorbeix part del dissolvent de l'adhesiu, a causa del procés d'inflat. Quan s'evapora el dissolvent durant el procediment d'adhesió, les partícules de resina disminueixen de mida i això fa que

quedin espais buits al seu voltant, que s'observen en forma de bombolles després de trencar les mostres.

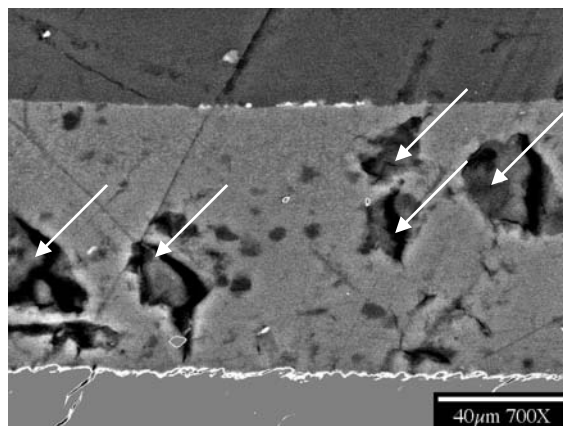


Figura 3-7 Imatge SEM d'electrons *backscattered* d'una mostra d'adhesiu modificat amb un 5% de resina de bescanvi iònic. Les fletxes assenyalen les partícules de resina dins la capa d'adhesiu.

Per tant, sembla que la resina afavoreix la formació de buits a l'interior de la capa d'adhesiu. Aquests buits, provoquen zones d'acumulació de tensions en què les esquerdes es poden propagar quan el material suporta forces, de manera que fan disminuir la força d'adhesió. Aquest fenomen té més influència a temps immediat, ja que en aquesta etapa hi ha menys retenció mecànica. Al cap de 24 hores de l'adhesió, tot i que les bombolles segueixen disminuint la força que pot suportar l'adhesiu, el seu efecte ja no és tan destacat, degut a que el grau de polimerització de l'adhesiu augmenta i a que augmenta també la retenció mecànica.

3.1.6 Rellevància dels resultats obtinguts

En aquest apartat s'ha pogut comprovar que la combinació d'una resina de bescanvi iònic amb un adhesiu dental no impedeix el bescanvi d'ions de la resina. Tot i així, l'adhesiu té un efecte important sobre la velocitat del procés de bescanvi iònic i també

sobre el grau de conversió final de la resina. Quan la resina es troba encapsulada en la matriu d'adhesiu, la forma d'aplicació del material influeix també en la velocitat i en el rendiment del procés de bescanvi iònic. Les causes més importants d'aquest efecte són la distribució final de la resina en l'adhesiu i la influència del procés d'aplicació de la mostra en la polimerització d'aquest últim. Pel que fa als nivells de fluorur en solució aconseguits mitjançant les mescles de resina i adhesiu, aquests són inferiors als que s'aconsegueixen amb altres materials emprats en les restauracions dentals. És el cas, per exemple, dels ionòmers de vidre, que poden alliberar concentracions de fluorur elevades en poc temps i seguir alliberant petites quantitats durant alguns mesos(13). Tot i així, els ionòmers de vidre no són tan eficients com es podria preveure degut a que quan estan recoberts d'adhesiu alliberen quantitats de fluorur sensiblement inferiors(14). És per això que la major part del fluorur no s'allibera a la interfície entre l'empast i la dent sinó a la boca. Aquest fet produeix una remineralització de les dents adjacents a la dent de l'empast però alhora evita que el fluorur arribi a la zona de contacte entre la restauració i la cavitat, que és la més susceptible de desenvolupar una nova càries a causa de la microfiltració(15). En canvi, l'adhesiu modificat amb resina que s'ha presentat en aquest treball presentaria l'avantatge d'aportar el fluorur de manera selectiva a la zona on la remineralització és més necessària. Pel que fa a la força d'adhesió, s'ha pogut comprovar que, tot i que la força immediata disminueix, al cap de 24 hores no hi ha diferències significatives entre l'adhesió de l'adhesiu original i la de l'adhesiu modificat.

Els estudis d'alliberació de fluorur *in vitro* són només un primer indicatiu de la possible eficiència del material per afavorir la remineralització. L'eficiència del fluorur com a agent anticariogènic és coneguda i està provada en diferents estudis. Tot i així, no s'ha

trobat una relació directa que permeti establir els nivells de fluorur que produeixen una remineralització adequada de la dent. Això es deu a que no s'han desenvolupat mètodes que permetin determinar la quantitat i la forma química del fluorur que s'ha incorporat al mineral dental. Per tant, no es pot provar l'eficiència dels processos de remineralització amb fluorur mitjançant una determinació directa. És per això, que la segona part d'aquest treball està enfocada al desenvolupament de mètodes que permetin dur a terme aquesta determinació.

3.2 Determinació de la incorporació de fluorur al mineral dental

Per tal de desenvolupar mètodes analítics que permetessin determinar si els procediments de remineralització dental estudiats havien aconseguit la formació de fluorapatita en el mineral dental, es van analitzar mostres minerals i dents bovines o humanes amb dues tècniques diferents. Les dues tècniques seleccionades van ser tècniques espectroscòpiques, ja que es va considerar que eren les tècniques més adients de cara a futures aplicacions amb potencial de *mapping*.

3.2.1 Anàlisi elemental dels minerals sintetitzats

La composició elemental dels minerals sintetitzats es va determinar mitjançant la digestió en HNO_3 de les mostres i la determinació dels elements per mitjà de tècniques potenciomètriques i espectroscòpiques. Els percentatges en pes obtinguts per cada element es van comparar amb els percentatges esperats per cada mostra. Com es pot observar a la Taula 3-5, les composicions dels minerals obtingudes es corresponen amb els valors esperats de cada element.

Mostra	F		Ca		P	
	% (p/p)	esperat	% (p/p)	esperat	% (p/p)	esperat
HA	N.D.	N.D.	33,0% ± 0,7%	39,89%	17,0% ± 0,3%	18,50%
fHA 10%	0,4% ± 0,2%	0,4%	37,1% ± 0,7%	39,88%	19,0% ± 0,4%	18,49%
fHA 20%	0,9% ± 0,2%	0,8%	36,9% ± 0,7%	39,86%	18,9% ± 0,4%	18,48%
fHA 40%	1,9% ± 0,2%	1,5%	36,3% ± 0,7%	39,83%	18,7% ± 0,3%	18,47%
fHA 60%	2,8% ± 0,2%	2,3%	35,4% ± 0,7%	39,80%	18,3% ± 0,3%	18,46%
fHA 80%	3,1% ± 0,2%	3,0%	36,3% ± 0,7%	39,77%	18,1% ± 0,3%	18,44%
FA	4,1% ± 0,2%	3,8%	37,9% ± 0,8%	39,74%	18,8% ± 0,4%	18,43%

Taula 3-5 Resultats de l'anàlisi elemental dels minerals sintetitzats.

Possiblement, la hidroxiapatita de partida és lleugerament deficient en calci, com sembla indicar el fet que totes les mostres presentin continguts de calci lleugerament inferiors als esperats. Tot i així, també s'observa que pràcticament la totalitat del fluorur emprat en la síntesi s'incorpora al mineral gràcies al procés de cicles de pH.

Aquests resultats difereixen dels que es mostren en d'altres estudis de síntesi d'hidroxiapatita parcialment substituïda amb fluorur, en què el procés de cicles de pH només aconsegueix incorporar aproximadament un 60% del fluorur de la solució de partida(16). Aquests treballs, però, parteixen de fluorur sòdic com a font de fluorur, mentre que en la síntesi que es va realitzar en el treball que es presenta aquí es va partir de fluorur de calci. El fet de que la solució en què es realitzen els cicles de pH contingui calci pot tenir una gran rellevància en l'eficiència de la incorporació de fluorur al mineral. Aquest fet es discutirà més endavant, a l'apartat 3.2.3.

3.2.2 Estudi de la incorporació de fluorur a l'esmalt dental mitjançant difracció de raigs X (Annex 4)

3.2.2.1 Distinció entre apatites i fluorur de calci. Quantificació de fluorur de calci.

La Figura 3-8 mostra els difractograms corresponents a hidroxiapatita, fluorapatita i fluorur de calci. Com es pot observar, el difractograma del fluorur de calci és totalment diferent, a causa de la diferent estructura cristal·lina d'aquest compost. La cel·la cúbica del fluorur de calci fa que el seu difractograma presenti un sol pic. El fet que l'angle on apareix aquest pic de difracció no coincideixi amb els pics importants de les apatites va permetre dur a terme un calibrat per determinar la concentració de fluorur de calci a partir de patrons preparats amb diferents quantitats de fluorur de calci en una matriu d'hidroxiapatita.

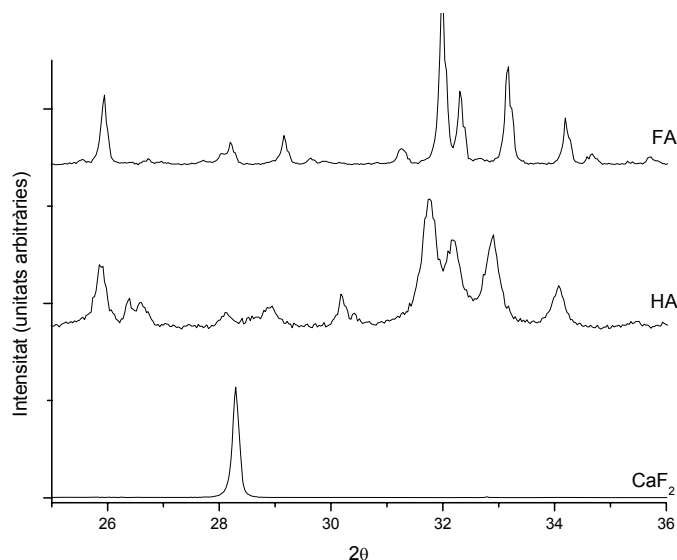


Figura 3-8 Diffractograms de mostres minerals en pols de fluorapatita (FA), hidroxiapatita (HA) i fluorur de calci.

La determinació quantitativa d'una fase en una mostra mitjançant la difracció de raigs X es pot realitzar a partir de la intensitat dels pics. Aquesta intensitat es pot representar com(17):

$$I_{i\alpha} = \frac{K_{i\alpha} X_{\alpha}}{\rho_{\alpha} \left(\frac{\mu}{\rho} \right)_m} \quad (\text{Eq 3.3})$$

on $K_{i\alpha}$ és un conjunt de constants, X_{α} és la fracció en pes de la fase α d'interès, ρ_{α} és la densitat de la fase α i $(\mu/\rho)_m$ és el coeficient d'absorció de massa de la mescla i es calcula com la mitjana ponderada a partir dels valors de (μ/ρ) tabulats per cada element(18). El mètode més general emprat en l'anàlisi quantitativu mitjançant difracció de raigs X es basa en l'ús d'un patró intern, que permet eliminar el terme (μ/ρ) de l'equació 3.3 dividint-la per ella mateixa:

$$\frac{I_{i\alpha}}{I_{js}} = k \frac{X_{\alpha}}{X_s} \quad (\text{Eq 3.4})$$

Considerant que l'objectiu final del mètode és determinar la composició de la fase mineral en dents i per tal d'evitar destruir la mostra per introduir una quantitat coneguda de patró intern, es va utilitzar un calibrat directe a partir de la intensitat obtinguda pel pic corresponent al CaF_2 en patrons de diferents concentracions. Els càlculs de $(\mu/\rho)_m$ no indiquen una variació massa gran d'aquest paràmetre en el rang de concentracions estudiat (0,407 per la hidroxiapatita i 0,419 per una mescla hidroxiapatita/ CaF_2 al 50% en pes). Així doncs, per les mostres objectiu d'aquest estudi no és d'esperar que aquest factor tingui una influència destacable.

A la Figura 3-9 es poden observar els difractogrames obtinguts així com la corba de calibrat calculada mitjançant una regressió lineal per mínims quadrats.

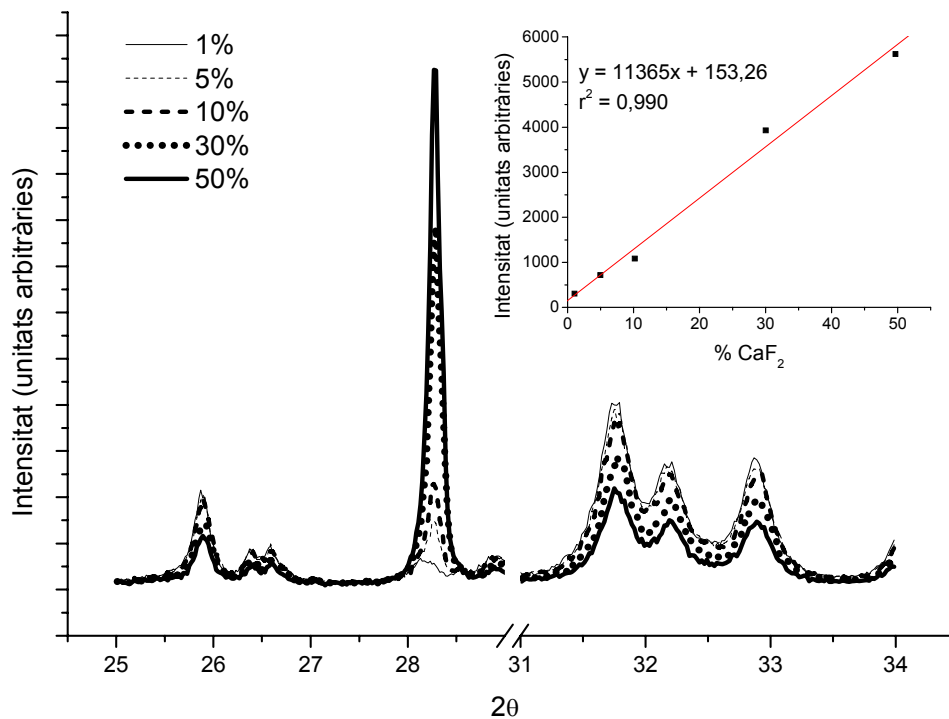


Figura 3-9 Difractogrames de patrons de fluorur de calci de diferents concentracions en pes preparats en una matriu d'hidroxiapatita. Corba de calibrat obtinguda per regressió per mínims quadrats a partir de la intensitat dels pic de fluorur de calci.

La intensitat del senyal obtingut a la zona del fluorur de calci manté una bona correlació amb la concentració. Així doncs, mitjançant la difracció de raigs X es pot quantificar el CaF₂ en mescles amb hidroxiapatita. Considerant que la composició de l'esmalt té un alt contingut en mineral (al voltant del 95%), la difracció de raigs X pot ser una eina útil per observar la possible formació de CaF₂ després dels tractaments de remineralització. Per altres teixits durs amb un contingut de mineral inferior, però, el mètode desenvolupat no es podrà aplicar directament, ja que la diferència en el coeficient d'absortivitat molar serà massa gran. Tot i així, aquest mètode pot resultar útil en estudis de remineralització dental en què la major part de l'acció del fluorur es dona a la part externa de l'esmalt. La formació de fluorur de calci en aquest tipus de processos és coneguda i alguns autors consideren que aquest es pot redissoldre i seguir aportant

petites quantitats de fluorur que es poden incorporar a l'esmalt per formar fluorapatita(19,20). Tot i així, és preferible que el fluorur aportat s'incorpori a l'esmalt en forma de fluorapatita..

3.2.2.2 Difractogrames dels compostos de tipus apatita

A causa de la seva gran similitud estructural, les apatites estudiades en aquest estudi presenten espectres de difracció de raigs X molt semblants. La cel·la de la hidroxiapatita és de tipus hexagonal(grup $P6_3/m$; $a = b = 9,418$, $c = 6,884$) (ICDD PDF n. 09-0432). La fluorapatita presenta una cel·la amb la mateixa simetria però amb unes dimensions lleugerament diferents en la direcció ab (grup $P6_3/m$; $a = b = 9,368 \text{ \AA}$, $c = 6,884 \text{ \AA}$)(ICDD PDF n. 15-0876). Aquesta diferència fa que alguns dels pics de la fluorapatita estiguin desplaçats lleugerament respecte als de la hidroxiapatita en el difractograma.

A la Figura 3-9 es poden observar alguns dels pics de difracció de les apatites que són desplaçats a causa de la incorporació de fluorur. Cal destacar que els pics corresponents a la hidroxiapatita parcialment substituïda, fHA, no es troben en una posició entre la hidroxiapatita i la fluorapatita sinó que es desdoblen. Aquest fet és especialment clar en el cas del pic corresponent al pla (300), en què es poden observar dos màxims. Els pics corresponents als plans (211) i (112) no s'arriben a desdoblar però es pot observar que els màxims dels pics es troben en les posicions de la fluorapatita i apareixen espatlles a les posicions que correspondrien als pics de la hidroxiapatita.

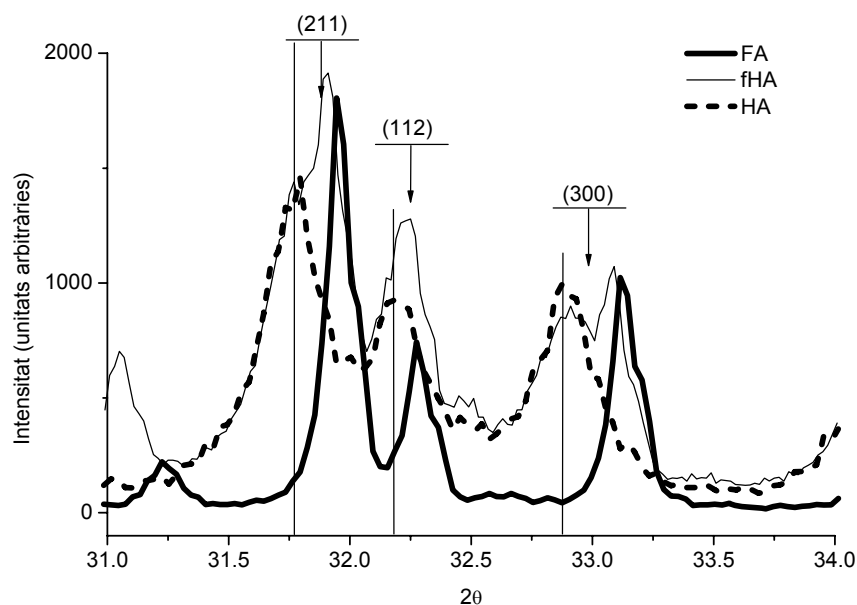


Figura 3-10 Detall dels difractogrames d'hydroxiapatita (HA), hydroxiapatita parcialment substituïda amb fluorur (fHA) i fluorapatita (FA). Les línies verticals marquen les posicions dels pics de la hydroxiapatita.

El desdoblament dels pics en el difractograma indica que en la síntesi de la hydroxiapatita parcialment substituïda amb fluorur no s'ha aconseguit una solució sòlida sinó més aviat una mescla d'hydroxiapatita i fluorapatita. Aquests resultats concorden amb els d'altres estudis realitzats amb mètodes de síntesi semblants(21).

Després de l'estudi dels minerals, es va procedir a obtenir difractogrames de l'esmalt de diferents dents bovines per tal de comparar el comportament dels minerals amb el del teixit. En primer lloc, es van obtenir els difractogrames de les dents en diferents posicions respecte el feix de raigs X. Els cristalls de l'esmalt no es troben en posicions aleatòries sinó que estan orientats en direccions preferencials en l'espai. Aquest fet es deu a que quan es forma l'esmalt, el creixement dels cristalls està guiat per diferents proteïnes(22). Gràcies a això, els cristalls de l'esmalt tenen una mida i orientació que els permet ser més resistents a l'atac àcid (23,24). L'orientació preferencial dels cristalls

d'hydroxiapatita que formen l'esfalt fa que els pics que apareixen en el difractograma variïn d'intensitat relativa segons la posició de la dent respecte del feix de raigs X incident. Per tal de realitzar el seguiment dels processos de desmineralització i remineralització de l'esfalt mitjançant la difracció de raigs X, es va seleccionar la posició de la dent amb la qual s'obtenia una intensitat més gran per al pic del pla (112). Entre els pics que canvien de posició a causa de la incorporació de fluorur al mineral, aquest és el més intens en el difractograma de l'esfalt. La posició de la dent seleccionada va ser finalment amb la part oclusal de la dent encarada a la font del feix de raigs X.

Els procediments de gravat i remineralització aplicats no van permetre observar canvis significatius en els difractograms de l'esfalt, tal i com es pot observar a la Figura 3-11.

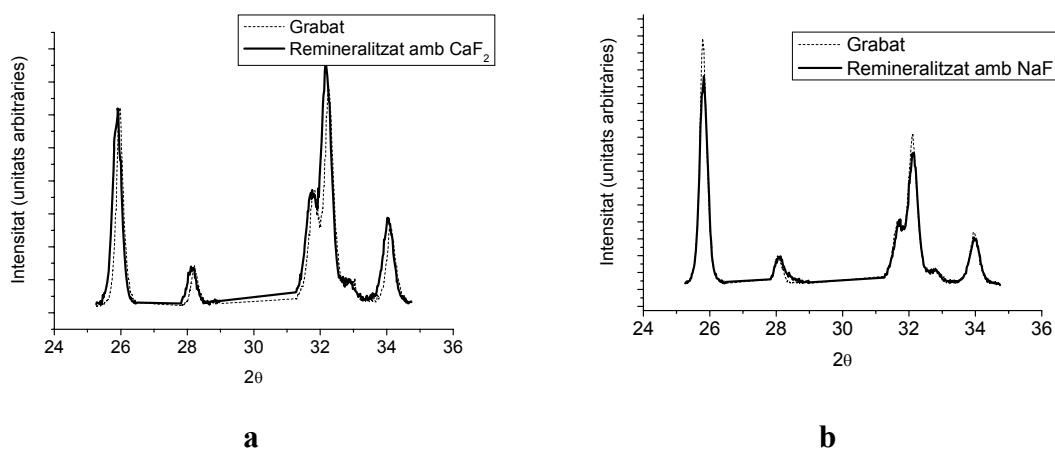


Figura 3-11 Difractograms de mostres de dents gravades i remineralitzades mitjançant remineralització amb cicles de pH solucions 0,1 M de CaF_2 (a) i de NaF (b).

En les condicions utilitzades en aquest estudi, la difracció de raigs X no és prou sensible per detectar els canvis produïts en el mineral de l'esfalt quan s'empren tractaments de fluoració. Les diferències que es van poder observar entre els minerals de tipus apatita

amb diferents continguts de fluorur no es van observar en les mostres d'esmalt tractades.

La concentració de CaF_2 va resultar estar per sota del 1% (p/p) en totes les mostres estudiades. En les condicions experimentals emprades, no es va observar un increment en la concentració d'aquest compost després d'aplicar els tractaments de remineralització.

3.2.3 Estudi de la incorporació de fluorur a l'esmalt dental mitjançant espectroscòpia Raman (Annex 5)

3.2.3.1 Estudi de mostres minerals amb diferents continguts de fluorur

Tal i com succeeix amb els espectres de difracció de raigs X, els espectres Raman de la hidroxiapatita i la fluorapatita són molt semblants a causa de la gran similitud estructural dels dos compostos. Tot i que, a priori, els dos minerals haurien de poder diferenciar-se a partir de la zona de les vibracions O – H, aquesta zona de l'espectre és massa sorollosa per poder obtenir un senyal que permeti determinar el fluorur incorporat al mineral.

Una de les diferències que es detecten entre els espectres Raman de la fluorapatita i la hidroxiapatita és el canvi de posició del mode de vibració ν_1 del grup fosfat, que apareix a freqüències lleugerament més altes en el cas de la fluorapatita. Per tal d'estudiar la relació entre aquest canvi de posició i la quantitat de fluorur incorporada al mineral, es van mesurar mostres d'hidroxiapatita parcialment substituïda amb fluorur amb diferents graus de substitució. Només les mostres de fluorapatita (amb tots els grups hidròxid

substituïts per fluorur) van mostrar el pic en la posició de la fluorapatita. La resta de mostres, amb graus de substitució entre 10% i 80%, van mostrar el pic del mode ν_1 del fosfat a la mateixa posició que la hidroxiapatita. Aquest fet es pot atribuir a l'elevada energia d'activació que requereix el procés de canvi de fase d'hidroxiapatita a fluorapatita. Per tal que un procés d'aquest tipus tingui lloc espontàniament, cal que es formin nuclis de cel·les substituïdes amb una mida per sobre d'un radi crític(25), que varia segons el material. Com que això no succeeix, el grup fosfat segueix vibrant igual que en la cel·la de la hidroxiapatita.

Per tal de comprovar si el procés de transformació de la fase en forma d'hidroxiapatita a la fase en forma de fluorapatita es pot aconseguir aplicant l'energia d'activació suficient després de la fluoració del mineral, es van aplicar temperatures entre 200°C i 800°C a les mostres d'hidroxiapatita parcialment substituïda amb fluorur. Com es pot observar a la Figura 3-12a, després d'escalfar a 400°C les mostres apareixen a l'espectre Raman com un material amorf, on l'únic pic que es pot reconèixer parcialment és el del mode ν_1 del fosfat, que es troba en posicions entre la corresponent a la hidroxiapatita i la corresponent a la fluorapatita. Probablement, després d'escalfar a aquestes temperatures els grups fosfat de les mostres es troben en entorns molt diferents i el gran desordre local fa que el pic del mode ν_1 del fosfat perdi intensitat i els altres pics (menys intensos) s'eixamplin fins a confondre's amb el soroll de fons. Les mostres d'hidroxiapatita parcialment substituïda amb fluorur escalfades per sobre de 600°C mostren altra vegada l'espectre d'un material cristal·lí, amb bandes ben definides. En aquest cas, però, la banda del mode ν_1 es troba en la posició de la fluorapatita, com es pot veure a la Figura 3-12b, indicant que el canvi de fase ha tingut lloc. En canvi, en les mostres d'hidroxiapatita pura o d'hidroxiapatita mesclada amb fluorur de calci

escalfades per sobre de 800°C es van obtenir espectres Raman corresponents a la hidroxiapatita i els seus productes de descomposició, descrits també en altres estudis, principalment fosfat de calci(16). El mateix va succeir amb les mostres d'hidroxiapatita parcialment substituïda amb fluorur amb substitucions iguals o inferiors al 20% i amb mescles de CaF₂ i hidroxiapatita.

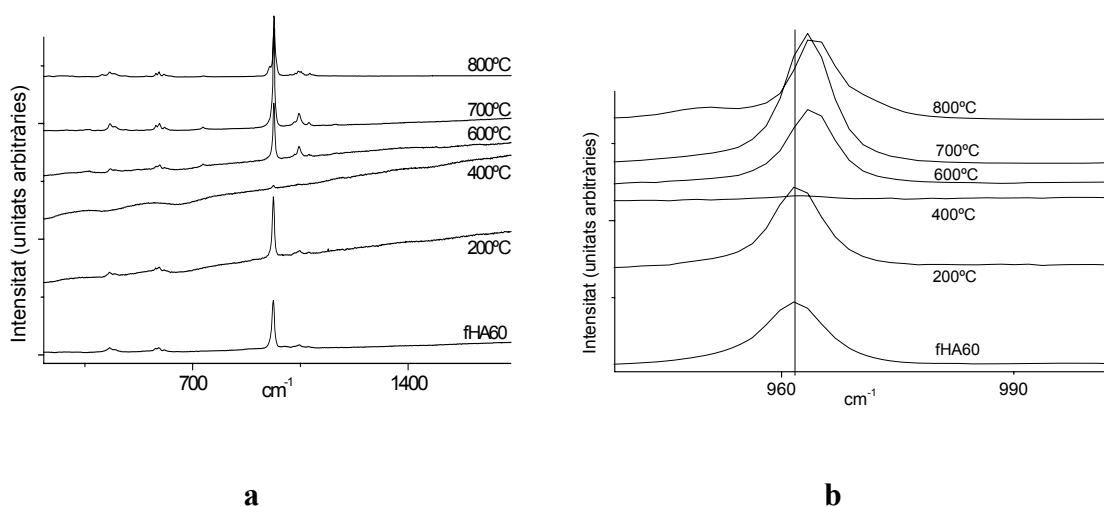


Figura 3-12 a) Espectres Raman de mostres d'hidroxiapatita parcialment substituïda amb fluorur amb un 60% de substitució (fHA60) i de la mateixa mostra després d'escalfar a diferents temperatures. b) Detall del pic corresponent al mode de vibració ν_1 del fosfat. La línia vertical marca la posició original del pic.

Així doncs, es pot comprovar la incorporació de fluorur al mineral mitjançant l'anàlisi per espectroscòpia Raman després d'un tractament tèrmic, gràcies al canvi estructural que es produeix. La mobilitat dels ions dins de l'estructura de la hidroxiapatita augmenta considerablement a partir de 200°C (26). Això fa que aquests es puguin redistribuir de la forma més estable, de manera que l'augment de la temperatura afavoreix la formació de nuclis de fluorapatita prou grans com per produir el canvi de fase.

3.2.3.2 Estudi de la incorporació de fluorur a la hidroxiapatita de

l'esmalt dental

Una vegada observat el procés de la transformació de HA en FA descrit anteriorment, es va estudiar la incorporació de fluorur a l'esmalt dental mitjançant dos processos de fluoració diferents sobre dents humanes i es van estudiar els espectres Raman abans i després d'escalfar les dents.

Les dents sense escalfar van mostrar un espectre Raman pràcticament idèntic al de la hidroxiapatita però amb el pic del mode ν_1 del fosfat lleugerament desplaçat cap a freqüències més baixes. Aquest desplaçament es deu a les impureses que conté el mineral de l'esmalt, principalment carbonat, i ha estat observat també en estudis anteriors(27). Les dents escalfades a 800°C van mostrar espectres de tipus amorf com havia succeït amb les mostres minerals a 400°C. En escalfar a 1000°C, però, es van poder tornar a observar espectres característics de materials cristal·lins. Així doncs, el mateix procés observat en les mostres minerals té lloc en la hidroxiapatita que forma l'esmalt dental però a una temperatura superior. Aquesta estabilitat extra que adquireix el mineral quan es troba formant part de l'esmalt es pot atribuir a la mida i disposició espacial dels cristalls.

Després d'escalfar a 1000°C, les dents sense tractament de fluoració i les dents tractades amb cicles de pH en presència de CaF_2 van presentar el pic corresponent al mode de vibració ν_1 del fosfat en la mateixa posició que la hidroxiapatita. Les dents tractades amb el producte NMTD(28) , en canvi, van mostrar aquest pic en la posició corresponent a la fluorapatita. L'efectivitat del mètode de fluoració mitjançant NMTD resulta encara més evident en observar la zona corresponent al mode ν_3 del fosfat. En

aquesta zona, després d'escalfar a 1000°C, les dents tractades amb CaF₂ mostren els mateixos pics que les dents sense tractar. Aquests pics es corresponen amb els observats en les mostres minerals d'hidroxiapatita. Les dents tractades amb NMTD, en canvi, després d'escalfar a 1000°C mostren en aquesta zona els mateixos pics que les mostres de fluorapatita.

Per tant, el mètode de remineralització basat en el material NMTD és més eficient a l'hora d'incorporar fluorur a l'esmalt que el mètode basat en cicles de pH amb CaF₂. Aquest fet es pot explicar considerant les diferents espècies que poden formar-se quan es porten a terme els procediments de fluoració estudiats.

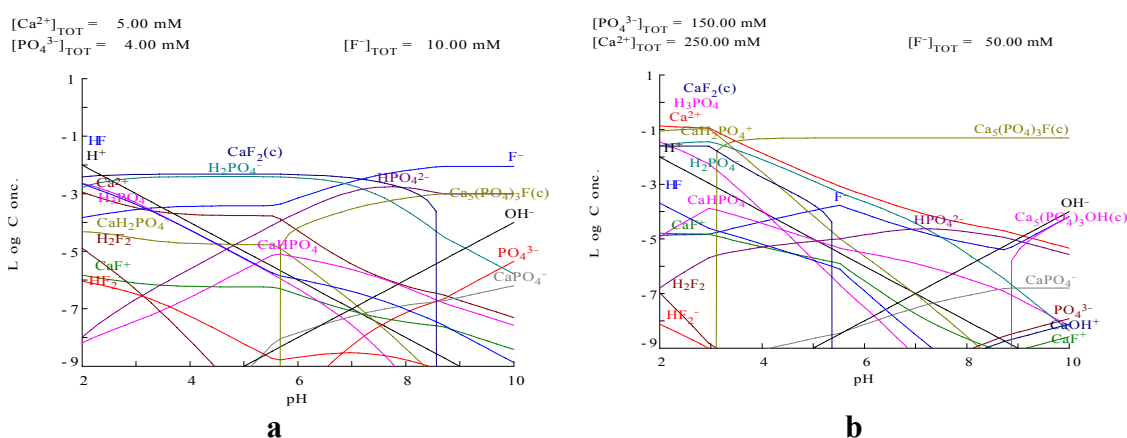


Figura 3-13 Diagrames d'equilibri de les espècies formades en solucions de Ca²⁺, PO₄³⁻ i F⁻ amb les concentracions obtingudes en una solució 0,01 M de CaF₂ en saliva (a) i en una suspensió 50% (p/p) de NMTD que ha alliberat tots els ions (b).

La Figura 3-13a mostra les espècies formades en una solució de CaF₂ 0,01M amb la mateixa concentració de fòsfat que es troba present en la saliva(26). Com es pot observar, en aquestes condicions l'espècie més abundant és el CaF₂, que precipita a causa de la saturació de la solució. Tot i que la fluorapatita també es pot formar amb les concentracions esmentades (de fet, apareix com la segona espècie sòlida més abundant a partir de pH 5,5), la formació de fluorur de calci és cinèticament molt més favorable.

Això fa que amb temps de tractament curts si el mineral es troba sobreestabilitzat, com és el cas de l'esmalt dental, la fluorapatita no s'arribi a formar. L'avantatge que presenta la fluoració mitjançant NMTD respecte d'altres mètodes de fluoració es basa en l'aportació de tots els ions formadors de la fluorapatita alhora i mitjançant una velocitat adient d'alliberació dels ions. Això és possible gràcies a la combinació de diferents resines de bescanvi iònic i permet aconseguir concentracions adequades de calci, fosfat i fluorur en solució en les mateixes proporcions estequiomètriques que en la fluorapatita. Observant la Figura 3-13b es pot veure que aportant els tres ions alhora en aquestes condicions la fase més abundant en l'equilibri és la fluorapatita, de manera que termodinàmicament s'afavoreix la formació d'aquesta espècie mineral.

3.2.4 Rellevància dels resultats obtinguts

En aquest apartat s'han emprat la difracció de raigs X i l'espectroscòpia Raman per tal d'estudiar els processos d'incorporació de fluorur a mostres minerals d'hidroxiapatita i a l'esmalt dental. S'ha comprovat que la difracció de raigs X pot resultar útil en l'estudi de la formació de fluorur de calci en matrius d'hidroxiapatita i s'ha pogut observar que després de tractar dents bovines amb diferents solucions de fluorur el mineral no reté fluorur de calci. Aquest fet sembla indicar que la retenció de fluorur de calci causada per alguns tractaments de remineralització amb fluorur es produeix a causa de la fixació mecànica del mineral.

D'altra banda, s'ha aconseguit desenvolupar un mètode basat en l'espectroscòpia Raman combinada amb un tractament tèrmic previ que permet diferenciar mostres d'hidroxiapatita que han incorporat fluorur a partir d'una certa quantitat. Aquest mètode pot resultar útil en la determinació de l'eficiència dels procediments de fluoració de

l'esmalt. A més a més, s'ha pogut comprovar que un mètode basat en l'alliberació controlada de tots els components del mineral alhora és més eficient que una aportació de fluorur mitjançant fluorur de calci i cicles de pH. S'han detectat també diferències de comportament entre l'esmalt dental i la hidroxiapatita sintètica, totes elles indicant una major estabilitat del mineral biològic. Aquesta major estabilitat s'atribueix a la disposició espacial i la mida dels cristalls en l'esmalt dental.

3.3 Millora de les propietats d'un blanquejador comercial

3.3.1 Estudi de l'efecte de l'addició de Fe(III) a un blanquejador comercial (Annex 6)

Per tal d'estudiar l'efecte cinètic del ió Fe(III) sobre l'acció blanquejadora d'un material comercial, es va avaluar el comportament del blanquejador amb diferents concentracions de FeCl₃. El blanqueig es va mesurar sobre dents bovines prèviament tacades per a temps de tractament de fins a un total de 20 minuts. Tot i que en principi el material original necessita temps d'aplicació entre 1 i 2 hores, es van utilitzar períodes de tractament curts per tal de veure l'acció del Fe(III) sobre la velocitat inicial del blanqueig i poder esbrinar si el temps de tractament es podria reduir amb l'addició del metall.

Per tal d'avaluar l'acció de les diferents formulacions del blanquejador, es va determinar el percentatge de blanqueig després de cada etapa. Aquest paràmetre es va escollir perquè està normalitzat i a més està directament relacionat amb les diferències en la dimensió L de l'espai de color L x a x b. Com s'ha mencionat a l'apartat 2.1.7., es va preferir estudiar aquest paràmetre i no les variacions ΔE (que serveixen per avaluar

el canvi de color global), perquè el paràmetre L està relacionat amb la proximitat al color blanc.

El percentatge de blanqueig es calcula a partir de l'expressió:

$$\%whitening = \frac{L_t - L_s}{L_s} \cdot 100 \quad (\text{Eq 3.5})$$

on L_t és el valor de L obtingut després del tractament i L_s és el valor de L abans del tractament.

No es van poder observar diferències significatives en el percentatge de blanqueig entre les mostres tractades amb el blanquejador original i les mostres tractades amb les diferents formulacions amb Fe(III) afegit. Tot i així, la velocitat de blanqueig (variació del percentatge de blanqueig amb el temps) va mostrar un comportament inesperat, tal i com es mostra a la Figura 3-14: la velocitat de blanqueig disminueix en afegir al blanquejador comercial concentracions de Fe(III) entre 2 i 6 mM. Tot i així, la velocitat de blanqueig incrementa amb la concentració de Fe(III) i quan aquesta arriba a 8 mM la velocitat es troba en el mateix ordre que la del blanquejador original. Aquest fet indica un doble efecte del Fe(III).

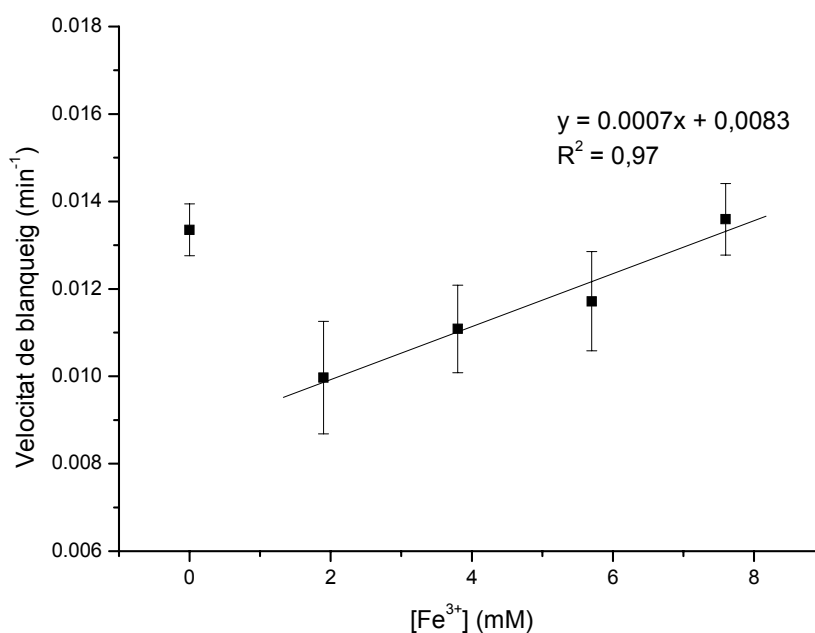
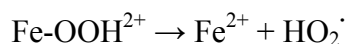
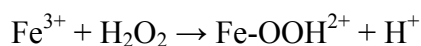


Figura 3-14 Variació de la velocitat de blanqueig amb la concentració de Fe(III)

L'acceleració del procés produïda per l'augment de la concentració de Fe(III), s'atribueix a una reacció de tipus Fenton. El peròxid de carbamida es descompon formant urea i peròxid d'hidrogen, que és la substància que realment actua com a blanquejador. El peròxid d'hidrogen reacciona amb els dobles enllaços que produeixen la coloració de les molècules que taquen les dents i fa que els compostos resultants siguin incoloros. El Fe(III) és capaç d'accelerar aquesta reacció gràcies a la formació de radicals segons els processos:



Tot i aquesta acceleració del procés, però, el ferro pot tenir altres efectes que facin que el blanqueig es vegi perjudicat. Així, part del ferro emprat en el procés podria quedar adsorbit a la dent en forma d'hidroxocomplexes acolorits, tot contribuint a compensar el blanqueig aconseguit.

3.3.2 Rellevància dels resultats obtinguts

S'ha pogut observar que en les mostres que contenen Fe(III) la velocitat augmenta amb la concentració del metall. Per tant, sembla que la reacció de tipus Fenton pot tenir lloc en el medi del blanquejador, de manera que el procés es pot accelerar gràcies a la formació de radicals. Aquests resultats poden servir en un futur com a punt de partida per desenvolupar blanquejadors que aconseguixin el mateix efecte de decoloració de les taques de les dents en períodes de temps més curts. Tot i així, no es pot descartar que l'addició de Fe(III) en petites quantitats interfereixi en el blanqueig, fet que es contrarestarà per l'efecte d'acceleració del blanqueig quan augmenta la concentració de Fe(III).

3.4 Bibliografia

- (1) Jordi Margineda. *Estudios de procesos de adsorción/desorción de iones en resinas encapsuladas. Aplicación a la remineralización de tejidos dentales*. Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona; 2004.
- (2) Anna Torrado. Estudi de processos de bescanvi iònic per a l'alliberació controlada en sistemes aplicats al tractament de teixits organominerals. Desenvolupament i caracterització d'una pasta dental. Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona; 2003.
- (3) Jordi Margineda. *Estudios de procesos de adsorción/desorción de iones en resinas encapsuladas. Aplicación a la remineralización de tejidos dentales*. Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona; 2004.
- (4) Asmussen E, Peutzfeldt A. Influence of pulse-delay curing on softening of polymer structures. *J.Dent.Res.* 2001;80(6):1570-1573.
- (5) Lai SCN, Tay FR, Cheung GSP, Mak YF, Carvalho RM, Wei SHY, et al. Reversal of compromised bonding in bleached enamel. *J.Dent.Res.* 2002;81(7):477-481.
- (6) Torrado A, Valiente M. Calcium and fluoride release from ion exchange polyphasic systems. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 2003;78(12):1209-1218.
- (7) Jordi Margineda. *Estudios de procesos de adsorción/desorción de iones en resinas encapsuladas. Aplicación a la remineralización de tejidos dentales*. Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona; 2004.
- (8) Cho B, Dickens SH. Effects of the acetone content of single solution dentin bonding agents on the adhesive layer thickness and the microtensile bond strength. *Dent.Mater.* 2004;20(2):107-115.
- (9) Bae J, Cho B, Kim J, Kim M, Lee I, Son H, et al. Adhesive layer properties as a determinant of dentin bond strength. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2005;74B(2):822-828.
- (10) Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, Sano H, Endo K, Oguchi H. The extent to which resin can infiltrate dentin by acetone-based adhesives. *J.Dent.Res.* 2002 Jan;81(1):74-78.
- (11) Nystrom GP, Holtan JR, Douglas WH. Effects of fluoride pretreatment on bond strength of a resin bonding agent. *Quintessence Int.* 1990 Jun;21(6):495-499.
- (12) Damen JJM, Buijs MJ, ten Cate JM. Fluoride-dependent formation of mineralized layers in bovine dentin during demineralization in vitro. *Caries Res.* 1998;32(6):435-440.
- (13) De Witte AM, De Maeyer EA, Verbeeck RM, Martens LC. Fluoride release profiles of mature restorative glass ionomer cements after fluoride application. *Biomaterials* 2000 Mar;21(5):475-482.

- (14) Miranda LA, Weidlich P, Samuel SM, Maltz M. Fluoride release from restorative materials coated with an adhesive. *Braz.Dent.J.* 2002;13(1):39-43.
- (15) Itthagaran A, King NM, Wefel JS, Tay FR, Pashley DH. The effect of fluoridated and non-fluoridated rewetting agents on in vitro recurrent caries. *J.Dent.* 2001 May;29(4):255-273.
- (16) Qu H, Vasiliev AL, Aindow M, Wei M. Incorporation of fluorine ions into hydroxyapatite by a pH cycling method. *J.Mater.Sci.Mater.Med.* 2005 May;16(5):447-453.
- (17) Misture ST, Snyder RL. X-ray diffraction. In: Buschow KHJ, Cahn RW, Flemings MC, Ilschen B, Kramer EJ, Mahajan S, editors. *Encyclopedia of materials: Science and Technology*Oxford: Elsevier; 2001. p. 9799-9809.
- (18) Hubbell JH, Seltzer SM. *Tables of X-Ray Mass Attenuation Coefficients and Mass Energy-Absorption Coefficients* (version 1.4). [Online] Disponible a: <http://physics.nist.gov/xaamdi> [2007, March 14]. National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD 2004;Publicació original: NISTIR 5632, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD (1995).
- (19) Larsen MJ. Prevention by means of fluoride of enamel erosion as caused by soft drinks and orange juice. *Caries Res.* 2001 May-Jun;35(3):229-234.
- (20) Larsen MJ, Richards A. The influence of saliva on the formation of calcium fluoride-like material on human dental enamel. *Caries Res.* 2001 Jan-Feb;35(1):57-60.
- (21) Wei M, Evans JH, Bostrom T, Grondahl L. Synthesis and characterization of hydroxyapatite, fluoride-substituted hydroxyapatite and fluorapatite. *J.Mater.Sci.Mater.Med.* 2003 Apr;14(4):311-320.
- (22) Du C, Falini G, Fermani S, Abbott C, Moradian-Oldak J. Supramolecular assembly of amelogenin nanospheres into birefringent microribbons. *Science* 2005 Mar 4;307(5714):1450-1454.
- (23) Cevc G, Cevc P, Schara M, Skaleric U. The caries resistance of human teeth is determined by the spatial arrangement of hydroxyapatite microcrystals in the enamel. *Nature* 1980 Jul 24;286(5771):425-426.
- (24) Tang R, Wang L, Orme CA, Bonstein T, Bush PJ, Nancollas GH. Dissolution at the Nanoscale: Self-Preservation of Biominerals. *Angew. Chem. Int. Edit.* 2004;43(20):2697-2701.
- (25) Velisavljevic. Bioceramic hydroxyapatite at high pressures. *Appl.Phys.Lett.* 2003;82(24):4271.
- (26) Zahn D, Hochrein O. A Molecular Dynamics Simulation Study of (OH⁻) Schottky Defects in Hydroxyapatite. *Z. Anorg. Allg. Chem.* 2005;631(6-7):1134-1138.
- (27) Penel G, Leroy G, Rey C, Bres E. MicroRaman spectral study of the PO₄ and CO₃ vibrational modes in synthetic and biological apatites. *Calcif.Tissue Int.* 1998 Dec;63(6):475-481.

(28) Valiente M, inventor. Sociedad Limitado para el Desarrollo Cientifico Aplicado, assignee. Remineralizing material for organomineral tissues. USA patent US 6,413,498 B1. 2002 Jul, 6, 1999.

Capítol 4

Conclusions

Els resultats descrits en la present memòria constitueixen una nova contribució al desenvolupament de materials dentals en el camp de la salut bucal, tant pel que fa a estratègies de millora dels materials existents com pel desenvolupament de nous mètodes analítics que en permetin la seva avaluació. A continuació es mostra un recull de les conclusions més importants que es poden extreure dels resultats obtinguts en els treballs presentats.

Sobre la incorporació d'una resina de bescanvi iònic com a agent d'alliberació controlada a un adhesiu dental:

- L'alliberació del ió fluorur és compatible amb la combinació de la resina i l'adhesiu. Tot i així, la velocitat de bescanvi iònic es veu afectada per l'efecte de barrera difusora que exerceix l'adhesiu. Aquest fet, a més, fa que la forma d'aplicació de les mescles d'adhesiu i resina de bescanvi iònic influeixi també a la velocitat del bescanvi, a causa de les diferents formes en què pot quedar la mescla final.
- La incorporació de resina en l'adhesiu provoca una disminució de la força d'adhesió inicial però no s'observen diferències significatives en la força d'adhesió a 24 hores.

En relació a la determinació de la incorporació de fluorur al mineral dental:

- La difracció de raigs X permet determinar la quantitat de fluorur de calci en matrius d'hidroxiapatita.
- No s'ha pogut observar la retenció de fluorur de calci en dents produïda per tractaments de cicles de pH *in vitro* amb fluorur de calci i fluorur de sodi.

- L'espectroscòpia Raman permet observar la formació de fluorapatita en mostres d'hidroxiapatita parcialment substituïda amb fluorur després de sotmetre les mostres a un tractament tèrmic.
- La temperatura de transició de la fase hidroxiapatita a la fase fluorapatita és més elevada en les dents que en les mostres minerals, fet que indica una major estabilitat del mineral biològic.

Sobre la millora de les propietats d'un blanquejador comercial mitjançant l'addició de Fe(III):

- L'addició de Fe(III) a un blanquejador comercial exerceix un doble efecte sobre la velocitat de blanqueig: concentracions de Fe(III) al voltant de 2mM provoquen un descens de la velocitat; en canvi, l'augment de la concentració fins a 8mM fa augmentar linealment la velocitat fins a igualar-se amb la del blanquejador original.

Capítol 5

Annexos



Effect of the application mode on the release rate of fluoride from an ion exchange resin incorporated in a dental adhesive

Journal:	<i>European Journal of Oral Sciences</i>
Manuscript ID:	draft
Manuscript Type:	Original Manuscript
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Campillo, Marc; Universitat Autònoma de Barcelona, Química Torrado, Anna; Universitat Autònoma de Barcelona, Química Munoz, Carlos; University at Buffalo, Restorative Dentistry Valiente, Manuel; Universitat Autònoma de Barcelona, Química
Research Area:	Biomaterials, In vitro experiment
Keywords (Please write 3 to 5 keywords according to Index Medicus):	Fluoride release, Application mode, Adhesive, Ion exchange resin



1
2
3 **Effect of the application mode on the release rate of fluoride from an ion exchange**
4 **resin incorporated in a dental adhesive**
5
6

7 Marc Campillo¹, Anna Torrado¹, Carlos A. Muñoz² and Manuel Valiente^{1*}
8
9

10 ¹Centre GTS, Dept. de Química, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra
11 (Barcelona), Spain
12

13 ²Dept of Restorative Dentistry, University at Buffalo, Buffalo, New York, USA
14
15
16
17

18
19 Ion Exchange Resin Modified Adhesive
20
21

22
23
24 *Corresponding author details:
25

26 Manuel Valiente
27

28 Centre Grup de Tècniques de Separació
29

30 Departament de Química
31

32 Edifici CN, Campus UAB
33

34 08193 Bellaterra, Cerdanyola del Valles
35

36 (Barcelona)
37

38 Spain
39
40

41
42
43
44 Phone: +34 93 581 2903
45

46 Fax: +34 93 581 2379
47

48 e-mail: Manuel.Valiente@uab.es
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 **M. Campillo, A. Torrado, C.A. Muñoz, M. Valiente**

4
5 **Effect of the application mode on the release rate of fluoride from an ion exchange**
6
7 **resin incorporated in a dental adhesive**

8
9
10 *Eur J Oral Sci*

11
12 **ABSTRACT**

13
14
15 Dental restorations are placed to recover teeth functionality after a loss of tissue due to
16
17 caries or trauma. Restoration failure is normally produced by secondary caries
18
19 formation due to microleakage. One of the most successful methods against secondary
20
21 caries is the use of restorative materials with a fluoride releasing ability. Ion exchange
22
23 resins are good candidates to modify existing restorative materials and confer them
24
25 fluoride releasing capacity. Here we present a characterization study of the fluoride
26
27 release behavior of a dental adhesive (3M Scotchbond) modified with a fluoride ion
28
29 exchange resin (Lewatit S3428). Fluoride release of the modified adhesive was
30
31 monitored for samples applied with a brush, a micropipette or with a micropipette and
32
33 extended by using a cellulose circle. Samples were also studied with or without light
34
35 curing. Results reveal a strong effect of the application mode on the fluoride release
36
37 profiles of the material. Brush application produces enrichment in resin of the final
38
39 deposited sample. Extending the adhesive with a cellulose cover diminishes fluoride
40
41 release due to a higher setting performance of the adhesive caused by absence of oxygen
42
43 during setting.
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

INTRODUCTION

Secondary caries is one of the most common reasons of failure in dental restorations. The main cause of secondary caries development is microfiltration. When it takes place, oral flora microorganisms find a very favorable environment in the gaps between tooth and restoration, where nutrients are supplied and saliva does not wash the entire cavity. The pH decrease produced by acids generated as a result of the metabolism of these microorganisms, dissolves the hydroxyapatite from the tooth mineral structure and hence a new caries lesion is formed on the previously restored teeth.

Among the wide number of studies which have been focused on the prevention of secondary caries, two main strategies can be pointed out: development of techniques for placing restorations minimizing microleakage and development of restorative materials with remineralization potential(1-5). Without disregarding the former, the later strategy found promising results in glass ionomer cements (GICs), which have the ability to release fluoride to the oral media after the restoration is placed(6). Fluoride is a widely known and used cariostatic agent(7) due to its ability to decrease the solubility of the tooth mineral by reacting with hydroxyapatite and forming fluorapatite(8-10). However, fluoride release of GICs is much lower when they are covered by an adhesive(11) and when they are placed in dental restorations most of the fluoride is released to the oral cavity and not to the restoration-tooth interface.

Another way of supplying fluoride to the tooth-restoration interface is the incorporation of fluoride to the restorative material. In previous studies, we have demonstrated the

1
2
3 ability of fluoride ion exchange resins to release this ion despite being incorporated in
4
5 different matrices such as toothpaste(12), chewing gum(13) or dental adhesives(14).
6
7

8
9
10 The aim of this work was to characterize the influence of different application
11
12 procedures of a dental adhesive modified with a fluoride ion exchange resin on its
13
14 fluoride release behavior.
15
16

17 18 19 20 **MATERIALS AND METHODS**

21 22 23 **Resin loading and fluoride specific capacity determination**

24
25 Tertiary amine (weak anionic) ion exchange resin Lewatit S3428 (highly purified,
26
27 Bayer, Germany) was activated by a batch process using a 0.1 M phosphoric acid
28
29 solution (85%, Panreac Spain) and loaded with a 0.7 M sodium fluoride solution (99%,
30
31 Panreac, Spain) under dynamic conditions. After complete loading, the resin phase was
32
33 successively washed with water to remove the excess of electrolyte solution and then
34
35 quantitatively removed from the column and separated from water by filtration,
36
37 followed by drying overnight in an oven at 60°C.
38
39
40
41
42
43
44

45
46 Fluoride specific capacity of the resin was determined under dynamic conditions. A
47
48 weighed portion of resin was hydrated with milli-Q water for 1 hour. The resin was then
49
50 transferred to a chromatographic column and fluoride ions eluted with a 0.5 M sodium
51
52 nitrate solution (99%, Panreac, Spain). Eluate was collected in a volumetric flask and
53
54 analyzed by an ion selective fluoride electrode JENWAY 924-305 (JENWAY, England)
55
56 connected to an EDT Series 3 potentiometer (EDT Instruments, England). The results
57
58
59
60

of the analysis were used to determine the specific capacity of the resin, q , according to the equation:

$$q = \frac{V \cdot C}{W}$$

where V is the volume of the eluted solution, C is the fluoride concentration of the eluted solution and W is the weight of the resin loaded with fluoride. Under the described conditions, the specific capacity determined experimentally was 3.3 mmol/g.

Grinding and sieving

In order to achieve a suitable particle size to form a homogeneous and stable suspension with the adhesive, the initial size of the resin (particles around 1mm diameter) was reduced. The fluoride-loaded resin was ground in a mechanical agate mortar Retsch RMO (Germany) and sieved by using an R.P.08 automatic sieve (CISA, Spain). The resin fraction of diameter between the 40 μm and the 32 μm sieves was selected for the study. To determine the achieved particle size, a sample of sieved resin was suspended in methanol. Suspension was placed in a Branson 2510 ultrasonic bath (Branson, USA) for 5 minutes. Then, 100 μl of the suspension were placed over a SEM sample holder and coated with gold after drying in air. SEM images were used to confirm that ion exchange resin particles obtained were below 40 μm of diameter.

Modified adhesive samples preparation and application

The sieved ion exchange resin amount necessary to achieve a final concentration of 4% (w/w) was weighted in Eppendorf vials. The corresponding amount of adhesive 3M Single Bond® (3M ESPE, USA) was added to the resin and vials were agitated to obtain a homogeneous mixture. Samples using water or ethanol (96% v/v, Panreac,

Spain) instead of the adhesive were also prepared in order to study the influence of the adhesive matrix and the solvent on the fluoride release.

Some samples were applied by means of a brush. Two layers of the mixture were extended over a previously weighted circular polypropylene support of 1 cm diameter. After application, samples were weighted again and the initial amount of resin was determined. Other samples were applied settling 10 μ l of the mixture on the polypropylene support using a micropipette and covering the samples with a cellulose film to avoid erosion when stirring. Fluoride release was studied placing the cellulose film after adhesive setting for samples applied with brush or micropipette and before setting for the ones applied with micropipette and extended.

To study the effect of the higher crosslinkage achieved when the light curing process of the adhesive takes place, some samples were prepared applying visible light of 470 nm (Flashlite 1001, Discus Dental, USA) for 30 s to each side of the sample just after extending the adhesive.

Fluoride release profiles measurement

Release media has an important influence over the kinetics of the ionic exchange process((15). Thus, regardless most of the fluoride release studies are carried out in distilled water, the release values obtained for dental materials with a fluoride releasing potential is significantly different when the media is natural or artificial saliva(4,16). For the present study, a solution with a composition in ionic species similar to the dentinary fluid, which shows a sodium:potassium ratio similar to the interstitial liquid(17), was used. The release media used had a concentration of 8.6 g/l NaCl (99%,

1
2
3 Panreac, Spain) and 0.3 g/l KCl (99%, Panreac, Spain). This solution has a mineral
4
5 composition equivalent to Ringer's solution without Ca^{2+} ions, to avoid possible
6
7 interferences when measuring fluoride concentration. Ringer's solution has been used,
8
9 with different variations in its composition, in various *in vitro* studies as an emulator of
10
11 the dentinary liquid(18,19)(13,14).
12
13
14
15
16

17
18 Samples were introduced in a 5 ml vial (1.1 cm diameter) and protected with a cellulose
19
20 circle (when necessary) to avoid erosion. A wire mesh was used to keep the sample on
21
22 the bottom of the vial and a small magnetic stirrer was placed on the mesh. Vials with
23
24 samples were kept at 37°C in a modified Franz cell by means of a water bath and 1 ml
25
26 of Ringer's solution was added to start the release process. Figure 1 shows the described
27
28 experimental setting.
29
30
31
32
33

34
35 Fluoride concentration in solution was monitored by an ion selective electrode
36
37 automatically controlled by acquisition data software (EASI Take 1.11, EASI
38
39 Technologies, Spain). Fluoride electrode was calibrated using fluoride standard
40
41 solutions prepared in Ringer's solution media. The high ionic strength of this solution
42
43 allowed the measurements with the fluoride electrode without using any TISAB
44
45 solution and concentration of fluoride could be measured continuously.
46
47
48
49

50
51 The experimental data obtained were expressed in terms of degree of conversion, F , of
52
53 the fluoride ion exchange resin by applying the expression:
54

$$F = \frac{V_{rs} c(t_i)}{q_{\infty}}$$

1
2
3 where V_{rs} is the volume of Ringer's solution, $c(t_i)$ is the concentration of fluoride
4 corresponding to the period t_i and $q_{\infty}=mq$ is the total capacity of the resin sample of
5 mass m and specific capacity q .
6
7
8
9

10
11
12 Initial release rates were calculated for each tested material and mode of application.
13
14 Data were analyzed using unpaired t-test at 95% confidence level.
15
16
17

18 19 20 RESULTS

21
22
23
24 Adhesive samples which did not contain ion exchange resin showed no fluoride release.
25
26
27

28
29 As seen in Figure 2, neither kinetics of fluoride release nor final fluoride amounts were
30 affected by the adhesive solvent (ethanol). However, samples in which the resin is
31 embedded in the adhesive show a slower kinetics release. Initial rates of release shown
32 in Table 1 reveal statistically significant differences between adhesive samples and
33 ethanol or water samples for the same preparation mode while no statistically
34 significant differences are detected between ethanol and water samples. In the same
35 table it can be seen that, despite the observed differences in rates of release, after ten
36 minutes the degree of conversion of samples prepared with adhesive is of the same
37 order of water and ethanol based samples (around 60% of the resin capacity).
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52

53 The mode in which the resin suspension in either adhesive, ethanol or water is applied
54 has a large influence on the fluoride release. Thus, Figure 3 shows a comparison of the
55 kinetics curves for fluoride resin suspensions in adhesive applied in three different
56
57
58
59
60 ways.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Samples applied by means of a brush show a very fast fluoride release and equilibrium is achieved in around 2 minutes. Furthermore, the release profiles and initial release rates obtained (Table 1) are very similar regardless of the resin suspension media (adhesive or water). On the contrary, samples applied with micropipette show a significantly lower rate of release when the fluoride resin is embedded in the adhesive.

When adhesive samples are next extended by means of a cellulose cover after application with the micropipette, the resin suspended in the adhesive show a lower final degree of conversion (Figure 3).

As seen in Figure 4 and Table 1, the observed difference on the rate of release between light cured and not light cured samples applied with brush is not detectable by calculations at initial rate of the process because of the fast velocity at that moment. On the other hand, samples applied by means of a micropipette and extended with the cellulose cover are not influenced by the light curing process because of the important influence of the cover on the polymerization process.

DISCUSSION

The adhesive matrix has a clear influence on the fluoride release profile of the resin. Differences in initial rate of release when the ion exchange resin is embedded in the adhesive matrix and when samples are suspended in ethanol or water reveal that the diffusion of ions through the adhesive matrix is more difficult, and thus slower, than the diffusion through water. It is remarkable that regardless of the extra diffusion barrier

1
2
3 promoted by the adhesive layer, diffusion of ions is not totally inhibited, thus still
4 allowing the ion exchange process. This fact supports previous studies which found that
5 dental adhesives may act like membranes permeable to some substances(20). On the
6 other hand, the final degree of conversion of samples either prepared in adhesive, water
7 or ethanol is similar between each other under the same conditions. Thus, the adhesive
8 does not influence over the final extend of the ion exchange process and equilibrium is
9 equally achieved although it takes different time extensions.
10
11
12
13
14
15
16
17
18

19
20
21
22 The application of the samples by means of a brush seems to affect both rate and final
23 extend of the ion exchange process. However, the increase of the final degree of
24 conversion of samples prepared from ion exchange resin suspensions in water makes no
25 sense, since there is not any matrix that can react with the resin functional groups. The
26 most reliable explanation for the fact that samples extended by means of a brush exhibit
27 a higher amount of fluoride released at equilibrium is that brushes retain the liquids
28 more than the solids. In this sense, when a suspension is applied by means of a brush
29 solid particles are easily deposited on the sampling surface while a greater fraction of
30 the liquid is retained by he brush. In consequence, the final sample is enriched in
31 fluoride resin particles On the other hand, a drastic thickness reduction of the adhesive
32 layer surrounding the resin particles takes place when samples are applied with brush.
33 This fact is supported by the higher rate of release of these samples as compared to
34 samples applied with micropipette and the similarity of rates of release of the samples
35 prepared from suspensions in water or adhesive when both are applied with a brush.
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57

58 Samples of resin suspensions in adhesive applied with micropipette and extended by
59 means of a cellulose cover were not expected to show significant differences in
60

1
2
3 comparison to the corresponding not extended ones. However, these samples exhibit a
4
5 surprising behavior: the fluoride release is slower and a lower degree of conversion is
6
7 achieved. This is indicative of an interaction between the adhesive layer covering the
8
9 ion exchange resin and the cellulose cover used to extend the samples which must take
10
11 place during the adhesive setting. In fact samples which were not extended were also
12
13 covered with the same cellulose after the adhesive setting so, the cellulose cover may
14
15 probably enhance the adhesive setting by preventing it from air contact. It is well known
16
17 that oxygen can reduce the adhesive setting (21,22). Under this situation, a higher
18
19 crosslinked adhesive probably blocks resin and/or the cellulose film pores thus
20
21 decreasing the final amount of releasable fluoride.
22
23
24
25
26
27
28

29 The different effect of the light curing process on samples applied with brush or applied
30
31 with micropipette and extended with a cellulose cover can be explained in terms of
32
33 crosslinking: Light curing increases adhesive crosslinkage in a higher degree when
34
35 light is applied to samples prepared with brush. For samples extended with cellulose
36
37 cover, the light curing process has almost no effect over the final form of the adhesive
38
39 because they are protected from oxygen and the setting reaction takes place slower but
40
41 to the same extend. On the other hand, samples applied with brush substantially increase
42
43 the final adhesive crosslinkage when they are light cured because the reaction is faster
44
45 and the oxygen effect is partially avoided (23).
46
47
48
49
50
51
52

53 Summarizing, the adhesive 3M Scotchbond® is compatible with the fluoride release of
54
55 the ion exchange resin Lewatit® S3428 loaded with this ion although the adhesive
56
57 matrix acts as a diffusion barrier and the fluoride release rate decreases. The adhesive
58
59 solvent has no significant effect over the fluoride rate of release and the final amount
60

1
2
3 released. The mode of application of the adhesive modified by the addition of the
4 fluoride resin shows a significant influence on the fluoride rate of release. Differences
5
6 observed between described application modes can be explained in terms of the
7
8 adhesive polymerization process and by the solid particles enrichment of samples. The
9
10 incorporation of ion exchange resins to the dental adhesive could lead to a new and
11
12 effective way of remineralization of the restoration-tooth interface preventing thereby
13
14 secondary caries formation.
15
16
17
18
19
20
21

22 ACKNOWLEDGEMENTS

23
24 This work was partially supported by Ministerio de Cultura y Deporte project
25
26 PPQ2002-04267-C03-01.
27
28
29
30
31

32 REFERENCES

- 33
34
35 (1) Leung D, Spratt DA, Pratten J, Gulabivala K, Mordan NJ, Young AM.
36 Chlorhexidine-releasing methacrylate dental composite materials. *Biomaterials* 2005;
37 **26**: 7145-7153.
38
39 (2) Peris AR, Mitsui FHO, Lobo MM, Bedran-russo AKB, Marchi GM. Adhesive
40 systems and secondary caries formation: Assessment of dentin bond strength, caries
41 lesions depth and fluoride release. *Dent.Mater.* 2007; **23**: 308-316.
42
43 (3) Xu HHK, Sun L, Weir MD, Takagi S, Chow LC, Hockey B. Effects of incorporating
44 nanosized calcium phosphate particles on properties of whisker-reinforced dental
45 composites. *J. Biomed. Mater. Res. B* 2007; **81B**: 116-125.
46
47 (4) Furtos G, Cosma V, Prejmerean C, et al. Fluoride release from dental resin
48 composites. *Mat. Sci. Eng. C-Bio. S.* 2005; **25**: 231-236.
49
50 (5) Hara AT, Queiroz CS, Freitas PM, Giannini M, Serra MC, Cury JA. Fluoride release
51 and secondary caries inhibition by adhesive systems on root dentine. *Eur.J.Oral Sci.*
52 2005; **113**: 245-250.
53
54 (6) Wiegand A, Buchalla W, Attin T. Review on fluoride-releasing restorative
55 materials--fluoride release and uptake characteristics, antibacterial activity and
56 influence on caries formation. *Dent.Mater.* 2007; **23**: 343-362.
57
58 (7) Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet* 2007; **369**: 51-59.
59
60

- 1
2
3 (8) Driessens FC. Relation between apatite solubility and anti-cariogenic effect of
4 fluoride. *Nature* 1973; **243**: 420-421.
5
6
7 (9) Moreno EC, Kresak M, Zahradnik RT. Fluoridated hydroxyapatite solubility and
8 caries formation. *Nature* 1974; **247**: 64-65.
9
10 (10) deLeeuw NH. Resisting the Onset of Hydroxyapatite Dissolution through the
11 Incorporation of Fluoride. *J. Phys. Chem. B* 2004; **108**: 1809-1811.
12
13 (11) Miranda LA, Weidlich P, Samuel SM, Maltz M. Fluoride release from restorative
14 materials coated with an adhesive. *Braz.Dent.J.* 2002; **13**: 39-43.
15
16 (12) Torrado A, Valiente M, Zhang W, Li Y, Munoz CA. Remineralization potential of
17 a new toothpaste formulation: an in vitro study. *J.Contemp.Dent.Pract.* 2004; **5**: 18-30.
18
19 (13) Margineda J, Gonzalo A, Valiente M. Chewing Gum. 2002; Patent
20 **WO2001IB02703**
21
22 (14) Campillo M, Torrado A, Valiente M, Muñoz CA. Fluoride Release on improved
23 materials for dental restorations. *J.Dent.Res.* 2004; **83** (Spec. Iss. A): 1793.
24
25 (15) Dorfner K. Introduction to ion exchange and ion exchangers. In: Dorfner K, ed. *Ion*
26 *exchangers* Berlin-New York: Walter de Gruyter; 1991. p. 7-188.
27
28 (16) Levallois B, Fovet Y, Lapeyre L, Gal JY. In vitro fluoride release from restorative
29 materials in water versus artificial saliva medium (SAGF). *Dent.Mater.* 1998; **14**: 441-
30 447.
31
32 (17) Coffey CT, Ingram MJ, Bjorndal AM. Analysis of human dentinal fluid. *Oral*
33 *Surg.Oral Med.Oral Pathol.* 1970; **30**: 835-837.
34
35 (18) Attin T, Schaller HG, Hellwig E. Fluoride uptake in dentin with and without
36 simulating dentinal fluid flow. *Clin.Oral Investig.* 1997; **1**: 125-130.
37
38 (19) Szep S, Langner N, Bayer S, et al. Comparison of microleakage on one composite
39 etched with phosphoric acid or a combination of phosphoric and hydrofluoric acids and
40 bonded with several different systems. *J.Prosthet.Dent.* 2003; **89**: 161-169.
41
42 (20) Tay FR, Pashley DH, Suh BI, Carvalho RM, Itthagarun A. Single-step adhesives
43 are permeable membranes. *J.Dent.* 2002; **30**: 371-382.
44
45 (21) Asmussen E, Peutzfeldt A. Influence of pulse-delay curing on softening of polymer
46 structures. *J.Dent.Res.* 2001; **80**: 1570-1573.
47
48 (22) Lai SCN, Tay FR, Cheung GSP, et al. Reversal of compromised bonding in
49 bleached enamel. *J.Dent.Res.* 2002; **81**: 477-481.
50
51 (23) Lovell LG, Newman SM, Donaldson MM, Bowman CN. The effect of light
52 intensity on double bond conversion and flexural strength of a model, unfilled dental
53 resin. *Dental Materials* 2003; **19**: 458-465.
54
55
56
57
58
59
60

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Experimental system designed for the monitoring of fluoride release

Figure 2: Kinetics release of fluoride ions from samples prepared from fluoride ion exchange resin suspensions in adhesive 3M Stotchbond® (empty squares), water (filled squares) or ethanol (half filled squares) and applied on a polypropylene support by means of a micropipette.

Figure 3: Kinetics release of fluoride ions from samples prepared from fluoride ion exchange resin suspensions in adhesive 3M Stotchbond® applied on a polypropylene support by means of a brush (empty circles), a micropipette (squares) or a micropipette and extended using cellulose cover (triangles). Kinetics release of fluoride ions from a sample prepared from a suspension of the ion exchange resin in water and applied by means of a brush (filled circles) is shown for comparison.

Figure 4: Kinetics release of fluoride ions from samples prepared from fluoride ion exchange resin suspensions in adhesive 3M Stotchbond® applied on a polypropylene support by means of a brush with (crossed circles) and without (empty circles) light curing or by means of a micropipette and extended using cellulose cover, with (crossed triangles) and without (empty triangles) light curing.

TABLES

Table 1: Initial rate of release and final degree of conversion of the studied samples

Matrix	Application mode	Initial rate of release (min^{-1})	Final degree of conversion
Adhesive	brush	0.4 ± 0.2	0.82 ± 0.05
Adhesive	brush, light cured	0.3 ± 0.2	0.81 ± 0.06
Adhesive	micropipette	0.100 ± 0.06	0.64 ± 0.07
Adhesive	micropipette, extended	0.15 ± 0.05	0.4 ± 0.1
Adhesive	micropipette, extended, light cured	0.17 ± 0.05	0.4 ± 0.1
Ethanol	micropipette	0.27 ± 0.04	0.55 ± 0.07
Water	brush	0.4 ± 0.2	0.80 ± 0.05
Water	micropipette	0.28 ± 0.05	0.63 ± 0.07

FIGURES

Figure 1

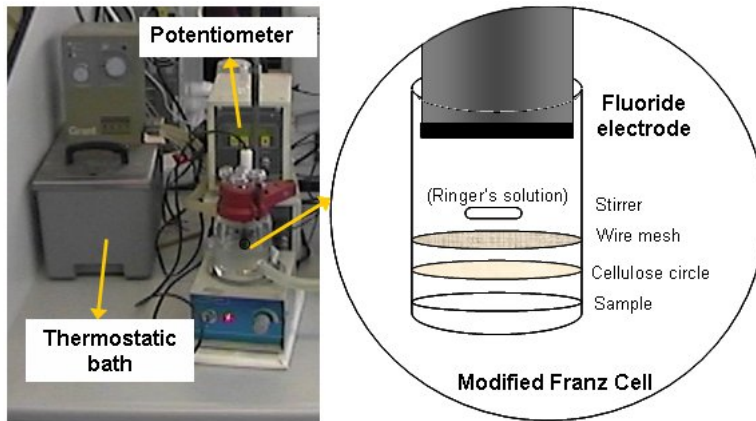


Figure 2

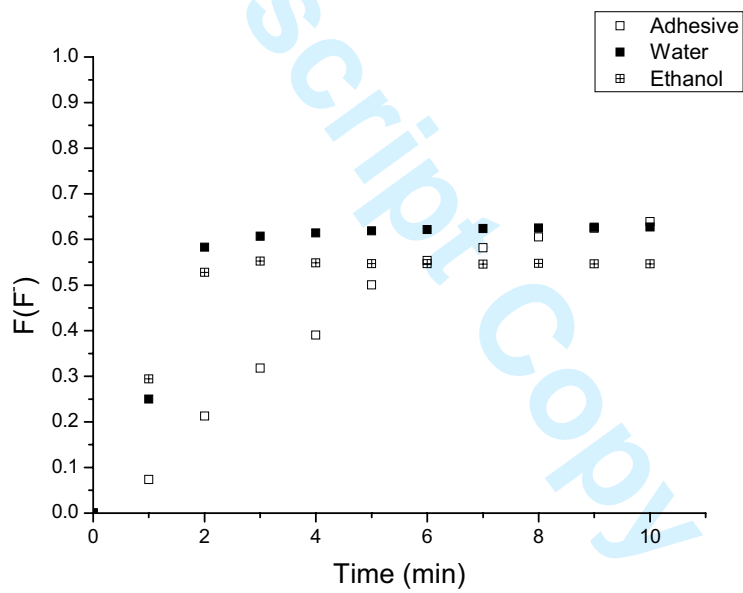


Figure 3

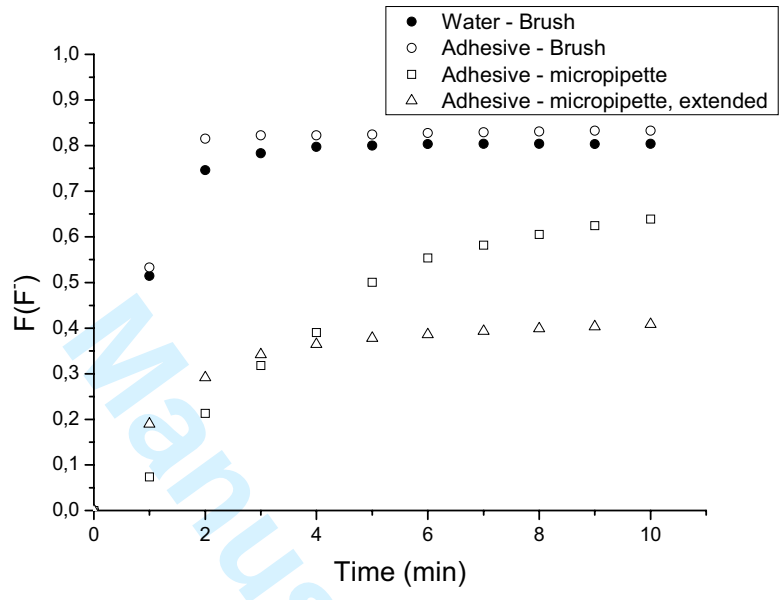
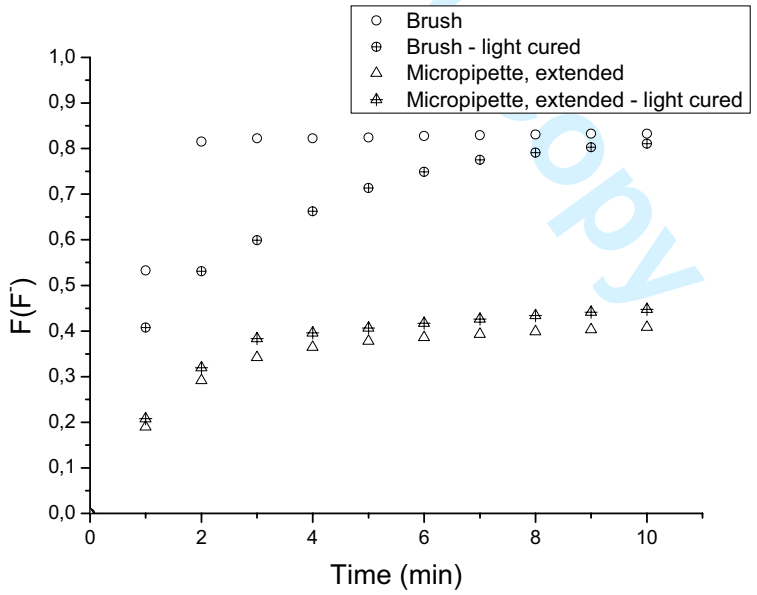


Figure 4



Kinetics release of fluoride from a dental adhesive modified with an ion exchange resin

M. Campillo¹, A. Torrado¹, C.A. Muñoz² and M. Valiente^{1*}

¹Centre GTS, Dept. de Química, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Barcelona), Spain

²Dept of Restorative Dentistry, University at Buffalo, Buffalo, New York, USA

Keywords: Fluoride, Kinetics release, dental adhesive, rate limiting step, ion exchange

Number of words in abstract: 103

Number of words in text: 1978; 1 tables; 3 figures; 17 references.

*Corresponding author details:

Manuel Valiente

Centre Grup de Tècniques de Separació

Departament de Química

Edifici CN, Campus UAB

08193 Bellaterra, Cerdanyola del Valles

(Barcelona)

Spain

Phone: +34 93 581 2903

Fax: +34 93 581 2379

e-mail: Manuel.Valiente@uab.es

ABSTRACT

The present study evaluates the influence of a dental adhesive towards the release of fluoride ions from an ion exchange resin in order to develop a dental adhesive having fluoride controlled release. Kinetic parameters were evaluated under batch conditions. Results obtained are well interpreted by a model based on interparticular diffusion rate that control the ion exchange process for the first minutes. However, this ion exchange release becomes controlled by intraparticular diffusion after a time period in which both diffusion processes are relevant. Thus, to achieve a specific fluoride release rate both resin particle size and adhesive matrix characteristics need to be optimized.

INTRODUCTION

Ion exchange materials are widely used in separation processes in order to remove undesired components from solutions(1). However, they can also be used for the preparation of sustained release formulations. In this way, controlled release dental formulations based on fluoride ion exchange resins such as toothpaste(2), chewing gum(3) or dental adhesives(4), have been developed. Fluoride is a widely known and used cariostatic agent (5) because it decreases the solubility of the tooth mineral by reacting with hydroxyapatite and forming fluorapatite (6-8). Due to the possible formation of fluoride species other than fluorapatite, such as calcium fluoride or calcium phosphate fluoride, the rate of release of fluoride may be a key point in order to achieve a proper teeth remineralization.

The ion exchange process mechanism can be described in terms of diffusion and chemical reaction processes. First, ions from the solution diffuse through the liquid layer coating the ion exchanger particles and through the channels of the particles to the active sites of the material. Then, the ion exchange takes place and the initially retained ions diffuse through the particle and finally through the liquid layer to the bulk solution. These diffusion steps are always slower than the ion exchange reaction itself so the possible ion exchange rate limiting steps are diffusion through the liquid layer coating the particles (interparticular diffusion) or diffusion through the inner part of the particles (intraparticular diffusion). Embedding an ion exchange material in a matrix with ion diffusion coefficients different from those of the bulk solution produces a change in the kinetics process leading to variations of the rate limiting step.

The aim of this study was to characterize the kinetics release of fluoride from an ion exchange resin embedded in a matrix of a commercial dental adhesive in order to develop a fluoride controlled release dental adhesive.

MATERIALS & METHODS

Resin loading and fluoride specific capacity determination

A tertiary amine (weak anionic) ion exchange resin Lewatit S3428 (highly purified, Bayer, Germany) was activated by a batch process using a 0.1 M phosphoric acid solution (85%, Panreac Spain) and loaded with a 0.7 M sodium fluoride solution (99%, Panreac, Spain) under dynamic conditions. After complete loading, the resin phase was successively washed with water to remove the excess of electrolyte solution and then quantitatively removed from the column and separated from water by filtration, followed by drying overnight in an oven at 60°C.

Fluoride specific capacity of the resin was determined under dynamic conditions. A weighted portion of resin was hydrated with milli-Q water for 1 hour. The resin was then transferred to a chromatographic column and fluoride ions eluted with a 0.5 M sodium nitrate solution (99%, Panreac, Spain). Eluate was collected in a volumetric flask and analyzed by an ion selective fluoride electrode JENWAY 924-305 (JENWAY, England) connected to an EDT Series 3 potentiometer (EDT Instruments, England). The results for the analysis were used to determine the specific capacity of the resin, q , according to the equation:

$$q = \frac{V \cdot C}{W}$$

where V is the volume of the eluted solution, C is the fluoride concentration of the eluted solution and W is the weight of the resin loaded with fluoride. Under the described conditions, the specific capacity determined experimentally was 3.3 mmol/g.

Grinding and sieving

In order to achieve a suitable particle size to form a homogeneous and stable suspension with the adhesive, the initial particle size of the resin (particles around 1mm diameter) was reduced. The fluoride-loaded resin was ground in a mechanical agate mortar Retsch RMO (Germany) and sieved by using an R.P.08 automatic sieve (CISA, Spain) with 50 μm , 40 μm , 32 μm and 28 μm sieves. Resin fractions between sieves were selected for the study.

Modified adhesive samples preparation and application

The sieved ion exchange resin amount necessary to achieve a final concentration of 4% (w/w) was weighted in Eppendorf vials. The corresponding amount of adhesive 3M Single Bond® (3M ESPE, USA) was added to the resin and vials were agitated to obtain a homogeneous mixture. Samples using water instead of the adhesive were also prepared in order to study the influence of the adhesive matrix on the fluoride release kinetics.

Samples were prepared settling 10 μl of the mixture on circular polypropylene supports of 1 cm diameter and next covered with a cellulose film to avoid erosion when stirring. Visible light of 470 nm (Flashlite 1001, Discus Dental, USA) was applied for 30 s to each side of the sample.

Fluoride release profiles measurement

Release media has an important influence over the kinetics of the ion exchange process(1). Thus, regardless most of the fluoride release studies are carried out in distilled water(9), the release values obtained for dental materials with fluoride releasing potential is significantly different when the release media is natural or artificial saliva(10). For the present study, a solution with a composition in ionic species similar to the dentinary fluid, which shows a sodium:potassium ratio similar to the interstitial liquid(11), was used. The release media had a concentration of 8.6 g/l NaCl (99%, Panreac, Spain) and 0.3 g/l KCl (99%, Panreac, Spain). This solution has a mineral composition equivalent to Ringer's solution without Ca^{2+} ions, to avoid possible interferences when measuring fluoride concentration. Ringer's solution has been used, with different variations in its composition, in various *in vitro* studies as an emulator of the dentinary liquid(12,13).

Samples were introduced in 5 ml vials (1.1 cm diameter) A wire mesh was used to keep the sample on the bottom of the vial and a small magnetic stirrer was placed on the mesh. Vials with samples were kept at 37°C in a Franz modified cell (Figure 1) by means of a water bath and 1 ml of Ringer's solution was added to start the release process.

Fluoride concentration in solution was monitored by an ion selective electrode automatically controlled by an acquisition data software (EASI Take 1.11, EASI Technologies, Spain).

The experimental data obtained were expressed in terms of degree of conversion, F , of the fluoride ion exchange resin by applying the expression:

$$F = \frac{V_{rs}c(t_i)}{q_{\infty}}$$

where V_{rs} is the volume of Ringer's solution, $c(t_i)$ is the concentration of fluoride corresponding to the period t_i and $q_{\infty}=mq$ is the total capacity of the resin sample of mass m and specific capacity q .

Kinetic models

Two kinetic models were selected and applied to the data obtained in order to determine whether the ion exchange process is controlled by an intraparticle or interparticle diffusion mechanism.

Kressman and Kitchener deduced a model for ion exchange processes controlled by an interparticular diffusion (14), which is based on the equation:

$$\frac{Q_{\infty}}{Q_0} \ln \left(1 - \frac{Q_t}{Q_{\infty}} \right) = -kt$$

where Q_{∞} is the amount of ions released from the resin phase to the solution when the equilibrium has been achieved, Q_0 is the total amount of ions initially retained by the ion exchange resin and Q_t is the amount of ions released from the resin phase to the solution at the time t .

On the other hand the model developed by Vermeulen (15), valid for intraparticle diffusion controlled processes, was also applied to data. This model is applicable over the whole range of degrees of conversion, F , and is based on the following equation:

$$-\ln(1 - F^2) = \frac{D\pi^2}{r^2}t = 2Bt$$

where B is the effective diffusion rate, D the diffusion coefficient, r is the radii of the ion exchange resin particles, which are considered to be spherical and t the experiment time.

RESULTS

In Figure 2 the treatment of data by the Kressman and Kitchener model (interparticular diffusion based model) are shown. When the ion exchange resin is embedded in the adhesive matrix (Figure 2A) the model fits correctly the data obtained at the beginning of the ion exchange process. After 22 minutes, a clear deviation from the model can be appreciated. A similar behavior is observed when the ion exchange resin is not embedded in the adhesive matrix but suspended in water (Figure 2B). The difference is that the fluoride rate of release is much faster and the equilibrium is achieved in less than 3 minutes.

Results of the data treatment by the Vermeulen's approximation model (intraparticular diffusion based model) are shown in Figure 3. When the ion exchange resin is embedded in the adhesive matrix (Figure 3A) the model fits correctly the data obtained from the ion exchange process taking place between minutes 12 and 30 (the total studied time). Again when the ion exchange resin is suspended in water the model fits data obtained from the very beginning of the ion exchange process (<3min) due to the high rate of fluoride release.

Table 1 shows values of calculated kinetic parameters for both models. For water samples, the kinetic parameter k is significantly higher than for the adhesive embedded samples whereas the effective diffusion rate, B , obtained from Vermeulen's approximation is just slightly higher. On the other hand, for the studied size range, no significant effect of particle size can be observed between samples suspended in the same media.

DISCUSSION

The ion exchange process is much more faster when the ion exchange resin is not embedded in the adhesive matrix. In this sense, both models show higher values of the kinetic parameters for the samples prepared from suspensions in water. Thus, the adhesive provides an additional diffusion barrier for the release of fluoride and decreases the rate of the ion exchange process under study.

Assessment of the ion exchange mechanism of the samples prepared from water suspensions is difficult. Due to the high fluoride rate of release, a few data are available before the equilibrium is achieved. This point critically compromises the fitting accuracy of the models. However, the intraparticle model seems to fit slightly better than the interparticle model and also smaller confidence intervals are obtained for the effective diffusion rate, thus indicating a slightly better correlation. Previous studies carried out with the same ion exchange resin but with a bigger particle size (around 1mm diameter), found that the rate determining step of the ion exchange process was the intraparticle diffusion(16). However, the reduction of the particle size diminishes the pathways through which fluoride ions must diffuse what may alter the rate determining step of the process. In fact, studies using the same ion exchange resin and

similar particle sizes also found that both models correlated well with experimental data (17). So probably, in the particle size range studied both interparticular and intraparticular diffusion have an important effect on the ion exchange kinetics.

The interesting behavior exhibited by the samples of ion exchange resin embedded in the adhesive matrix is probably an indication of a combination of both mechanisms. During the first minutes of the ion exchange process, the adhesive layer surrounding the ion exchange resin particles is almost dry and the diffusion of ions through this layer is more difficult than the diffusion through the resin particles. Once the layer has been partially hydrated, the diffusion of ions through it becomes easier and there is a period in which both interparticular and intraparticular diffusion rates are of the same order. During this period, both models fit correctly experimental data. Finally when the adhesive is completely hydrated the diffusion of ions through it is much easier than the diffusion through the resin particles, that's why the process is then controlled by intraparticular diffusion.

In summary, when an ion exchange resin is embedded in an adhesive matrix, the adhesive acts as an additional diffusion barrier and the ion exchange process becomes slower. This effect is significative at the beginning of the ion exchange process but decreases as long as the adhesive becomes hydrated leading in consequence to a change of the rate determining step during the process. Thus the rate of fluoride release is interparticle controlled at the beginning of the ion exchange process and becomes intraparticle controlled after a certain time. The design of proper systems combining ion exchange resins with an adequate particle size and adhesives with controlled hydrophilic properties could lead to new fluoride controlled release dental material.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially supported by Ministerio de Cultura y Deporte project PPQ2002-04267-C03-01.

REFERENCES

- (1) Dorfner K editor. *Ion Exchangers*. 1st ed. Berlin-New York: Walter de Gruyter; 1991.
- (2) Torrado A, Valiente M, Zhang W, Li Y, Munoz CA. Remineralization potential of a new toothpaste formulation: an in vitro study. *J.Contemp.Dent.Pract.* 2004 Feb 15;5(1):18-30.
- (3) Margineda J, Gonzalo A, Valiente M, inventors. Sociedad limitada para el desarrollo científico aplicado, Margineda J, Gonzalo A and Valiente M, assignees. Chewing Gum. WO0249448. 2002
- (4) IADR, editor. Fluoride Release on improved materials for dental restorations. IADR/AADR/CADR 82nd General Session ; March, 2004; Honolulu, HI: IADR; 2004.
- (5) Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet* 2007 Jan 6;369(9555):51-59.
- (6) Driessens FC. Relation between apatite solubility and anti-cariogenic effect of fluoride. *Nature* 1973 Jun 15;243(5407):420-421.
- (7) Moreno EC, Kresak M, Zahradnik RT. Fluoridated hydroxyapatite solubility and caries formation. *Nature* 1974 Jan 4;247(5435):64-65.

- (8) deLeeuw NH. Resisting the Onset of Hydroxyapatite Dissolution through the Incorporation of Fluoride. *J. Phys. Chem. B* 2004;108(6):1809-1811.
- (9) Billington RW, Williams JA, Pearson GJ. Ion processes in glass ionomer cements. *J. Dent.* 2006;34(8):544-555.
- (10) Levallois B, Fovet Y, Lapeyre L, Gal JY. In vitro fluoride release from restorative materials in water versus artificial saliva medium (SAGF). *Dent.Mater.* 1998 Nov;14(6):441-447.
- (11) Coffey CT, Ingram MJ, Bjorndal AM. Analysis of human dentinal fluid. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.* 1970 Dec;30(6):835-837.
- (12) Attin T, Schaller HG, Hellwig E. Fluoride uptake in dentin with and without simulating dentinal fluid flow. *Clin.Oral Investig.* 1997 Sep;1(3):125-130.
- (13) Szep S, Langner N, Bayer S, Bornichen D, Schulz C, Gerhardt T, et al. Comparison of microleakage on one composite etched with phosphoric acid or a combination of phosphoric and hydrofluoric acids and bonded with several different systems. *J.Prosthet.Dent.* 2003 Feb;89(2):161-169.
- (14) Kressman TRE, Kitchener JA. Cation exchange with a synthetic phenolsulphonate resin. Part V. Kinetics. *Discuss.Faraday Soc.* 1949;7:90-103.
- (15) Vermeulen T, Klein G, Hiester NK. Adsorption and Ion Exchange. In: Perry DW, Maloney JO, editors. *R.H. Perry's Chemical Engineer's Handbook*. 6th ed. New York: McGraw-Hill; 1984.

(16) Muraviev D, Torrado A, Valiente M. Kinetics of release of calcium and fluoride ions from ion-exchange resins in artificial saliva. *Solvent Extr. Ion Exch.* 2000;18(2):345-374.

(17) Jordi Margineda. *Estudios de procesos de adsorción/desorción de iones en resinas encapsuladas. Aplicación a la remineralización de tejidos dentales.* Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona; 2004.

TABLES

Table 1

Sample		Kinetic parameter
Resin size	Suspension media	Interparticular model – k (min^{-1})
50 – 40 μm	Adhesive	$0,05 \pm 0,02$
40 – 32 μm	Adhesive	$0,039 \pm 0,006$
32 – 28 μm	Adhesive	$0,054 \pm 0,009$
50 – 40 μm	Water	$0,9 \pm 0,3$
40 – 32 μm	Water	$0,7 \pm 0,4$
32 – 28 μm	Water	2 ± 2
		Intraparticular model – B (min^{-1})
50 – 40 μm	Adhesive	$0,09 \pm 0,01$
40 – 32 μm	Adhesive	$0,0064 \pm 0,005$
32 – 28 μm	Adhesive	$0,086 \pm 0,005$
50 – 40 μm	Water	$0,10 \pm 0,01$
40 – 32 μm	Water	$0,11 \pm 0,03$
32 – 28 μm	Water	$0,15 \pm 0,02$

FIGURES

Figure 1

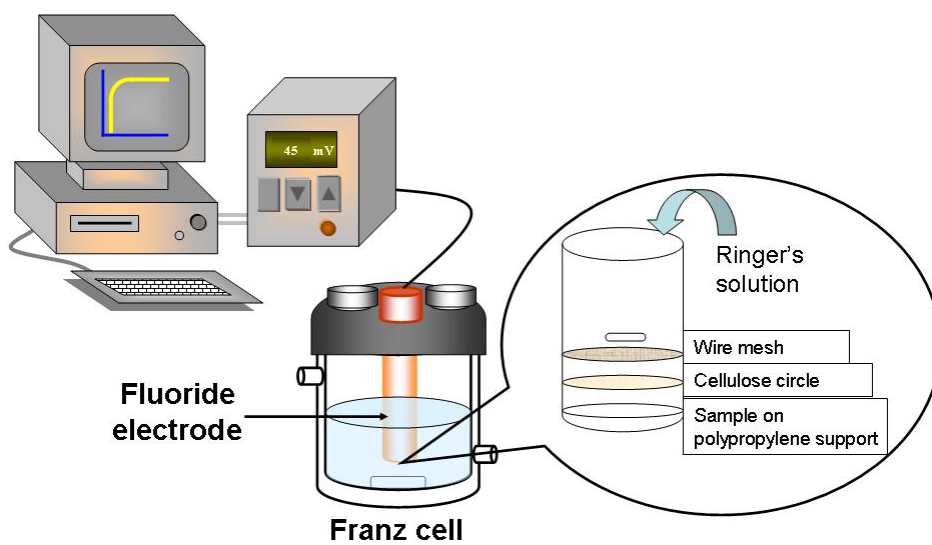


Figure 2A

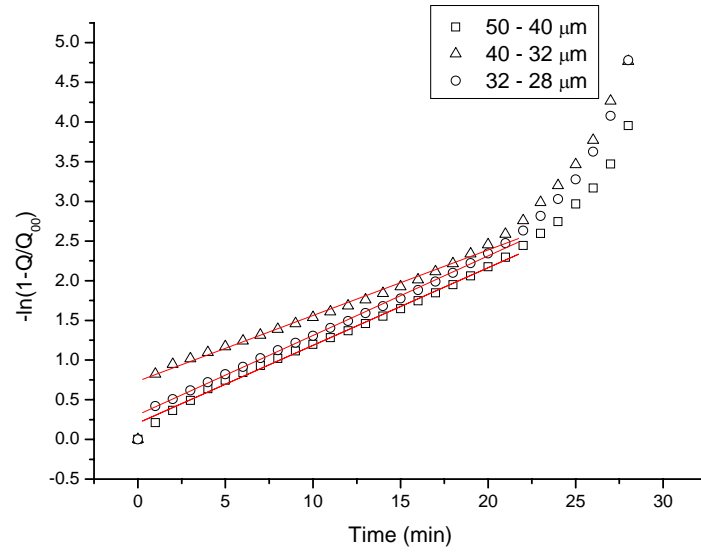


Figure 2B

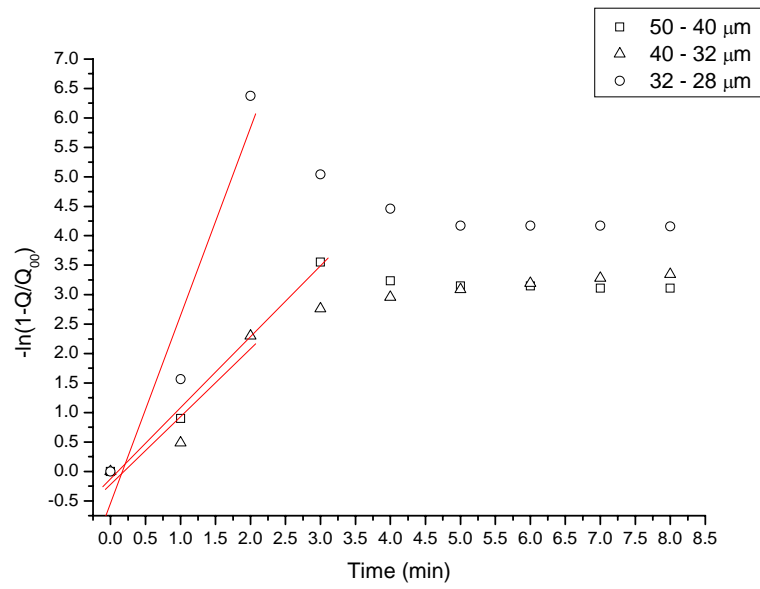


Figure 3A

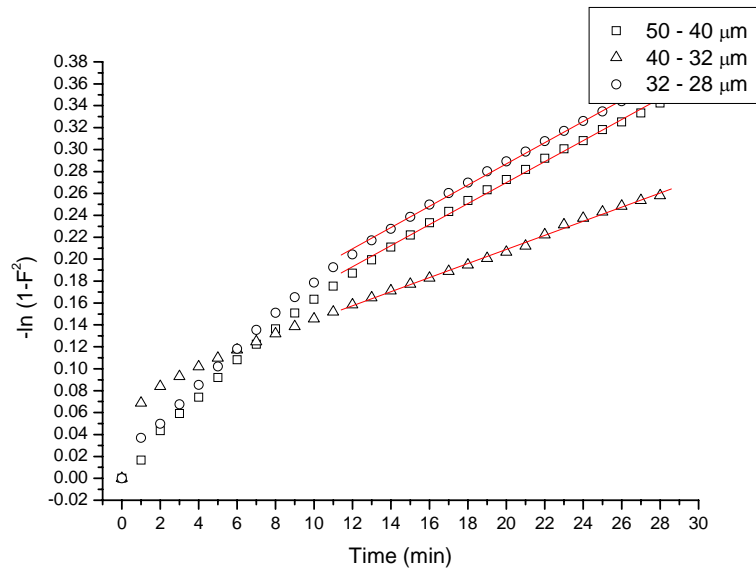


Figure 3B

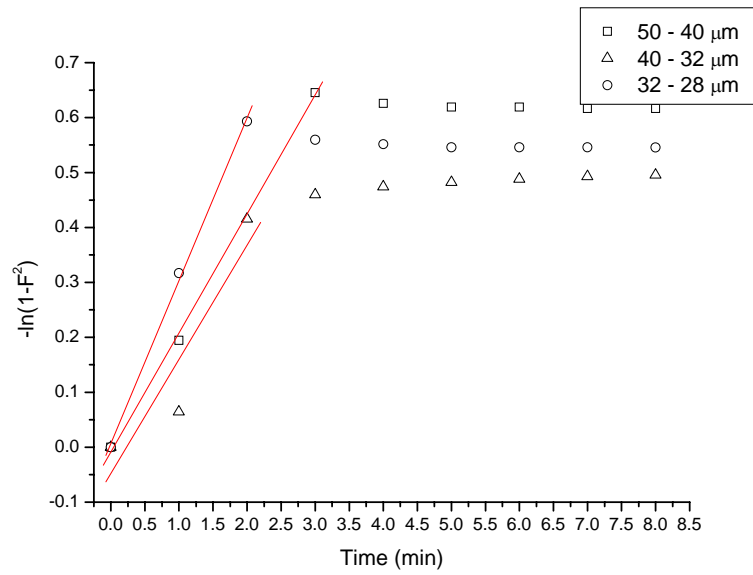


Table 1: Kinetics parameters of fluoride in the resin phase (95% confidence level).

Figure 1: Experimental system designed to monitor the fluoride release of the samples.

Figure 2: Data treatment of suspension samples of resin in adhesive (A) and water (B) with the interparticular Kressman-Kitchener model

Figure 3: Data treatment of suspension samples of resin in adhesive (A) and water (B) with the intraparticular Vermeulen's approximation.

Bond Strength of a Total Etch Adhesive Modified with an Ion Exchange Resin

M. Campillo¹, A. Torrado¹, C.A. Muñoz² and M. Valiente^{1*}

¹Centre GTS, Dept. de Química, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Barcelona), Spain

²Dept of Restorative Dentistry, University at Buffalo, Buffalo, New York, USA

Ion Exchange Resin Modified Total Etch Adhesive

Keywords: Adhesive, fluoride release, shear bond strength

Number of words in abstract: 160

Number of words in text: 2755; 2 tables; 4 figures; 26 references.

*Corresponding author details:

Manuel Valiente

Centre Grup de Tècniques de Separació

Departament de Química

Edifici CN, Campus UAB

08193 Bellaterra, Cerdanyola del Valles

(Barcelona)

Spain

Phone: +34 93 581 2903

Fax: +34 93 581 2379

e-mail: Manuel.Valiente@uab.es

ABSTRACT

The aim of the present study was to characterize the adhesion to dentin and enamel of a total etch adhesive (Adper™ Single Bond Plus) modified with a fluoride ion exchange resin. Immediate and 24 hours shear bond strength on both dentin and enamel was tested for original adhesive and three adhesive formulations modified with 1%, 2.5% and 5% (w/w) of fluoride ion exchange resin. After evaluation, samples were classified by the observed fracture location and the shape of the remaining adhesive. The addition of the fluoride ion exchange resin to the studied adhesive lowers the immediate shear bond strength as compared to the original adhesive. However, at 24 hours such differences were insignificant. Adhesive failure was the most observed mode of fracture. Resin particle aggregates formed in the bulk adhesive promote the formation of bubbles at the adhesive phase and lower the shear bond strength. Both modified and original adhesives can penetrate through the dentinal tubules of the etched dentin.

INTRODUCTION

Dental restorations are generally placed to recover functionality after a loss of a tooth structure due to caries or trauma. In this sense, several restorative materials like composite resins have been developed during the last century trying to achieve good functional, mechanical and aesthetic properties.

Restoration retention is obviously a critical point in the performance of restorations and it has been the focus of numerous studies. Traditionally micromechanical retention in both dentin and enamel is achieved by etching the tooth surface with a phosphoric acid gel (1) and by applying a dental adhesive prior to the placement of the resin composite restoration. The hybrid layer formed reduces the microleakage and consequently the risk of secondary caries formation. Materials such as glass ionomers have been found to adhere well to the tooth (2) due to the formation of a zone of interaction in the interface between the tooth and the restoration (3). The fluoride release by glass ionomers enhances the remineralization process at the tooth-restoration interface. However, resin composite materials do not possess the ability to enhance remineralization or to release fluoride and their success strictly depends on the micromechanical retention and the physical properties of the dental adhesive. It has been shown that fluoride ions enhance mineralization (4) but fluoride treatment of sound dentin prior to the adhesive application results in a decrease of bond strength (5,6). On the other hand, dental adhesives containing fluoride provide good short fluoride release and enhance the physical properties that might contribute to the success of the restoration (7,8). There have been several attempts to develop materials that release fluoride and/or enhance remineralization of the tooth/restoration interface (9-12). Industry for many years has been trying to develop fluoride containing resin composites, primarily by using fluoridated glass

fillers (13). Based on this principle, several studies have focused to the fluoride release and recharge of several esthetic materials (10,12,14).

Dental adhesives with remineralizing capabilities are also interesting materials in orthodontics (15). Fixed appliances promote plaque accumulation that results in a high risk of appearance of white spots of demineralized enamel. Resins used to bond brackets are now available with small amounts of releasing fluoride, but their release profiles strongly depend on the material in which fluoride is embedded (16-18).

No references about a standard dental adhesive with a fluoride releasing potential through an ion exchange resin have been found in the literature. Ion exchange resins are organic polymers containing functional groups with a positive or a negative charge, which allows them to retain ions of the opposite charge. The exchange process takes place when an ion exchange resin contacts a solution which contains ionic species; then ions from the solution replace ions of the same charge from the resin and viceversa until equilibrium is reached (19,20).

The combination of a dental adhesive and a proper ion exchange resin can lead to a particle reinforced adhesive with the ability of releasing fluoride. The aim of the present study was to compare the bond strength of enamel and dentin to a commercially available adhesive (AdperTM Single Bond Plus) modified by the addition of a fluoride ion exchange resin.

MATERIALS & METHODS

Resin loading and determination of its specific capacity

Lewatit S3428 resin (Bayer, Germany) was activated by a batch process using a 0.1 M phosphoric acid solution prepared by dilution of the corresponding concentrated phosphoric acid of p.a. quality (Panreac, Spain) and loaded with a 0.7 M sodium fluoride solution prepared from the solid salt of NaF (Panreac, Spain) pro analysis quality, using a column under dynamic conditions. After complete loading, the resin phase was successively washed with water to remove the excess of electrolyte solution, then quantitatively removed from the column and separated from water by filtration, followed by drying overnight in an oven at 60°C.

Fluoride specific capacity of the resin was determined under dynamic conditions. A known amount of resin was weighted and hydrated with milli-Q water for 1 hour. The resin was then transferred to an ionic exchange column and fluoride ions eluted with a 0.5 M sodium nitrate solution prepared from the Panreac (Spain) pro analysis quality solid NaNO₃ salt. Eluate was collected in a volumetric flask and analyzed by an ion selective fluoride electrode JENWAY 924-305 (JENWAY, England) connected to an EDT Series 3 potentiometer (EDT Instruments, England). The specific capacity of the resin, q , was calculated according to the equation:

$$q = \frac{V \cdot C}{W}$$

where V is the volume of the eluted solution, C is the fluoride concentration of the eluted solution and W is the weight of the resin loaded with fluoride. Under the described conditions, the specific capacity determined was 3.3 mmol/g.

Resin grinding/sieving and particle size measurement

In order to get a particle size able to form a homogeneous and stable suspension with the adhesive, the initial particle size of the resin ($\phi \sim 1\text{mm}$) was reduced.

The fluoride-loaded resin was ground in a mechanical agate mortar Retsch RMO (Germany) and sieved by using an R.P.08 automatic sieve (CISA, Spain). The particle size fraction between the $32\ \mu\text{m}$ and the $28\ \mu\text{m}$ sieves was selected for the study. The approximate average particle size of the resin was determined by the use of an Scanning Electron Microscope (SEM) (S-4000, Hitachi, Japan). A wide range of particle sizes from less than $1\ \mu\text{m}$ up to around $20\ \mu\text{m}$ was observed as a result of the static electricity affecting the resin particles (Figure 1a).

In order to obtain a more homogeneous particle size, the resin fraction between $32\ \mu\text{m}$ and $28\ \mu\text{m}$ sieves was ground again using a Silamat[®] amalgam mixer (Ivoclar, Liechtenstein) and an adapted ball grinder (PIKE Technologies, USA) with a powder:ball weight ratio of 0.05:1 and 90 s of milling time. Powder obtained after this process was observed in the SEM. In this case, the particle size can not be exactly quantified, due to the aggregation of the particles but it is possible to estimate a maximum size of $0.3\ \mu\text{m}$, as shown in Figure 1b.

Adhesive modification

Adper[™] Single Bond Plus adhesive (3M ESPE Dental Products, St Paul, MN) was modified with different amounts of the fluoride ion exchange resin fraction having the particle size below $0.3\ \mu\text{m}$.

The appropriate amount of resin was weighted in an opaque dispenser bottle, which was immediately covered to avoid solvent evaporation after the adhesive was added. Different adhesive formulations were prepared with 1%, 2.5% and 5% fluoride ion exchange resin (w/w). After mixing, samples were stored at room temperature in an opaque box together with the original adhesive samples.

Previous studies on the fluoride release ability of Adper™ Single Bond Plus modified by the addition of Lewatit S3428 resin demonstrated that the fluoride release from the resin still takes place after mixing with the adhesive (21).

Specimen preparation

To accomplish for the study, 160 recently extracted human molars were selected and sectioned mesio-distally for enamel and bucal-lingually for dentin by using an ISOMET diamond saw (Buehler, Lake Bluff, IL).

The outer enamel tooth surface was slightly flattened by a diamond wheel (Great Lakes Orthodontics, Tonawanda, NY) so they can be properly set in a flat position in the embedding molds. Teeth were embedded in acrylic resin (Fastray, H.J. Bosworth, Chicago, IL.) using teflon molds (25 mm in diameter and 30 mm in length). Once the resin polymerized, the exposed molar surface was coarse ground flat, on a model trimmer, until an adequate enamel or dentin surface was exposed. This surface was then finished with 600 grit silicon carbide wet/dry sanding paper.

The prepared specimens were stored in deionized water and prior to bonding, the surface was slightly polished again with 600 grit silicon carbide sand paper to expose either fresh enamel

or dentin. Enamel and dentin specimens were randomly divided into 16 groups of 10 specimens each.

The exposed surface was gently dried, etched with 35% phosphoric acid gel (Ultra-Etch[®], Ultradent Products Inc., South Jordan, UT) for 15 seconds and finally rinsed with an air-water syringe. Excess moisture was removed from the tooth surface taking care of not dehydrating the specimen. Adhesive was then added and gently scrubbed in a circular motion for approximately 10 seconds to create an even layer. Each adhesive formulation was applied following the manufacturer's instructions. Adhesive solvent excess was removed with a gentle air stream for about 3–4 seconds and the specimens polymerized by using a Spectrum[™] 800 curing light (Dentsply, York, PA) for 10 s.

The Ultradent bonding system (UPI) was used as per manufacturer's instruction to bond the composite resin restorative material A3 Z100[™] (3M ESPE Dental Products, St Paul, MN) to either enamel or dentin specimens using the original and modified formulations of Adper[™] Single Bond Plus. The specimens were centered and fixed to the bonding jig in order to pack the composite resin restorative material and polymerize by using the curing light.

Shear bond strength analysis

Shear bond strength measurements were carried out 5 minutes immediately after adhesion process or 24 hours later using a Multitest 2.5 Quantrol Universal testing machine (Dillon-Quantrol, Fairmont, MN) at a test speed of 1mm/min. For the 24 hours adhesion test, the specimens were stored in 100% humidity until tested. A notched crosshead designed to match the diameter of the bonded composite resin restorative material was used to apply the testing load. The specimens were placed in a test base clamp, positioned in order to adjust the notched crosshead against the dentin or enamel surface. Finally, the notch was fitted on the

diameter of the bonded composite resin restorative material. The shear bond strength measurements were determined from the load required to debond the composite resin restorative material and are expressed in MPa's.

Characterization of failure surfaces

After testing the samples, both sides of the adhesion surface were observed using an SM7-U stereomicroscope (Nikon, Japan) in order to determine the adhesion failure mode. Depending on the location where failure took place, specimens were classified in terms of: failure at the resin-adhesive interface, failure at the adhesive-tooth interface or mixed failure. On the other hand, depending on the surface characteristics of both the remaining adhesive on the tooth and the composite resin restorative material, specimens were classified in four groups: flat surface (class 0), stripes (class 1), stripes and bubbles (class 2) and bubbles (class3).

One sample of each tested group was sectioned in half and embedded again in acrylic resin to observe the adhesive interaction with the tooth. Samples were polished consecutively with 240, 800, 1000, 2400 and 4000 grit silicon carbide sandpaper by using an Ecomet 3 Variable Speed Grinder/Polisher with Automet 2 Power Head (Buehler, Lake Bluff, IL) and then observed by SEM after sputter coating with carbon.

Data analysis

Obtained data were analyzed by an ANOVA procedure in order to determine statistically significant differences between the original adhesive and the adhesive modified by the addition of the fluoride ion exchange resin. Mean for shear bond strength of different fracture classes (depending on the surface characteristics) were calculated and compared using one-tail independent t-test. All statistical calculations were performed at a 95% confidence level.

RESULTS

Obtained shear bond strength values and ANOVA results are shown in Table 1. The ANOVA reveals statistically significant differences between the shear bond strength of the original adhesive and all the modified formulations after immediate testing whilst no differences are found for shear bond strength values at 24 hours.

No cohesive failures in dentin, enamel or composite resin restorative material were observed for any of the adhesive systems examined. Cohesive failure in the bulk adhesive, with adhesive in both tooth and restorative resin surfaces, was observed for most of the tested specimens and was the dominant mode of failure. Adhesive failure at the adhesive-tooth interface was observed only in enamel samples of the following groups (see Table 1 for group code): OrImE (30% specimens), Or24E (50% specimens), 1ImE (25% specimens) and 25_24E (30% specimens). Failure at the adhesive-restorative resin interface was not observed.

Figure 2 shows the percentage of fracture classes at each group evaluated. Fracture class 2 (stripes and bubbles) was observed in most of the specimens of modified adhesive formulations. Original adhesive did not show any dominant fracture class but class 1 and class 2 were found in all the groups. Unpaired t-tests (see Table 2) show significant differences between the shear bond strength values of the different fracture modes which decrease following the sequence: Class 0 > Class 1 > Class 2 > Class 3.

Figure 3 shows SEM micrographies of sectioned specimens. In both original and modified adhesive some penetration of the adhesive into the dentinal tubules can be observed. Thus,

the modified adhesive, despite its higher viscosity due to the absorption of the adhesive solvent by the ion exchange resin, is still fluid enough to penetrate into the dentinal tubules.

A backscattered image of a specimen with adhesive modified with 5% of fluoride ion exchange resin is showed in Figure 2. The image reveals voids at the adhesive phase which are partially filled with fluoride ion exchange resin particles. This fact is indicative of shrinkage of the resin particles during the adhesive polymerization.

DISCUSSION

Shear bond strength values obtained for the original adhesive are similar to the values reported in other studies (22). In modified formulations the ion exchange resin makes the setting process of the adhesive slower. The fact that the shear bond strength values of the original adhesive and the different adhesive formulations obtained after 24h do not significantly differ between each other, indicates that the polymerization process of the adhesive is not totally inhibited by the addition of the resin. In fact this process continues after light curing and leads to a final bond strength similar to the original adhesive. The influence of the ion exchange resin over the adhesive setting kinetics is probably due to its interaction with the adhesive solvent. When mixing with the adhesive, the ion exchange resin partially absorbs the adhesive solvent due to the swelling process. This fact increases the viscosity of the adhesive and difficults the diffusion of the monomers during the curing time, thus slowing down the kinetics reaction. This effect is similar to the increase of viscosity that results from the addition of bis-GMA (23) or the modification of the solvent content (24) in some resin adhesives.

Adhesive failure is the most common failure mode of dental adhesives, as reported in other studies (25,26). The adhesive failure on tooth surface observed in four of the enamel tested groups may be explained in terms of a slightly higher affinity of the adhesive towards the composite restorative material rather than the enamel surface. However, adhesive failure at the tooth surface does not seem to be related with shear bond strength thus indicating that the adhesion of these samples is of the same order as the samples with failure in the bulk adhesive.

The shear bond strength differences observed between fracture classes (classified by the characteristics of remaining adhesive) are probably related to the presence of bubbles or voids. Bubbles inside the adhesive phase generate points of high stress from where cracks can be easily propagated, thus lowering the bond strength. Bubbles are probably promoted by the presence of ion exchange resin aggregates that produce irregularities in the adhesive phase. Under this situation it is also possible that bubbles appear when the adhesive solvent is evaporated, due to the smaller size of the resin when it loses the solvent absorbed by the swelling process. Voids observed at the adhesive layer (Figure 4) support this hypothesis and show that the increase in the number of bubbles when the adhesive is modified by the addition of the fluoride ion exchange resin is due to the effect of the resin particles aggregates.

The penetration of the adhesive in the dentin raises the micromechanical retention, which is considered an important part of the bonding mechanism. The fact that modified adhesive samples have different shear bond strengths from the original adhesive after immediate testing but no statistically significant differences at 24 hours, could be influenced by a

different rate of penetration into the tubules, due to differences in viscosity. This fact may be of importance in order to keep mechanical retention to the etched dentin surface.

In summary, the addition of the fluoride ion exchange resin to the studied adhesive lowers the immediate but not the long term shear bond strength. Resin particle aggregates formed in the bulk adhesive promote the formation of bubbles at the adhesive phase, and lower the shear bond strength. Both modified and original adhesives can penetrate through the dentinal tubules of the etched dentin.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors thank Dr. P. Bush for assistance in optical and SEM imaging. This work was partially supported by Ministerio de Cultura y Deporte project CTM2006-13091-C02-02/TECNO.

REFERENCES

- (1) Buonocore MG. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. *J.Dent.Res.* 1955 Dec;34(6):849-853.
- (2) Peumans M, Kanumilli P, De Munck J, Van Landuyt K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Clinical effectiveness of contemporary adhesives: A systematic review of current clinical trials. *Dent.Mater.* 2005;21(9):864-881.
- (3) Nicholson JW. Adhesive dental materials and their durability. *Int. J. Adhes. Adhes.* 2000;20(1):11-16.
- (4) Damen JJM, Buijs MJ, ten Cate JM. Fluoride-dependent formation of mineralized layers in bovine dentin during demineralization in vitro. *Caries Res.* 1998;32(6):435-440.
- (5) Nystrom GP, Holtan JR, Douglas WH. Effects of fluoride pretreatment on bond strength of a resin bonding agent. *Quintessence Int.* 1990 Jun;21(6):495-499.
- (6) Takahashi Y, Arakawa Y, Matsukubo T, Takeuchi M. The effect of sodium fluoride in acid etching solution on sealant bond and fluoride uptake. *J.Dent.Res.* 1980 Mar;59(3):625-630.
- (7) Kameyama A, Tsumori M, Ushiki T, Muto Y, Koga H, Matsukubo T, et al. Fluoride release from newly developed dental adhesives. *Bull.Tokyo Dent.Coll.* 2002 Aug;43(3):193-197.
- (8) Itota T, Torii Y, Nakabo S, Yoshiyama M. Effect of fluoride application on tensile bond strength of self-etching adhesive systems to demineralized dentin. *J.Prosthet.Dent.* 2002 Nov;88(5):503-510.
- (9) Chan WD, Yang L, Wan W, Rizkalla AS. Fluoride release from dental cements and composites: a mechanistic study. *Dent.Mater.* 2006 Apr;22(4):366-373.
- (10) Burke FM, Ray NJ, McConnell RJ. Fluoride-containing restorative materials. *Int.Dent.J.* 2006 Feb;56(1):33-43.
- (11) Okuyama K, Nakata T, Pereira PN, Kawamoto C, Komatsu H, Sano H. Prevention of artificial caries: effect of bonding agent, resin composite and topical fluoride application. *Oper.Dent.* 2006 Jan-Feb;31(1):135-142.
- (12) Xu X, Burgess JO. Compressive strength, fluoride release and recharge of fluoride-releasing materials. *Biomaterials* 2003 Jun;24(14):2451-2461.
- (13) Itota T, Al-Naimi OT, Carrick TE, Yoshiyama M, McCabe JF. Fluoride release from aged resin composites containing fluoridated glass filler. *Dent.Mater.* 2005 Nov;21(11):1033-1038.
- (14) Preston AJ, Agalamanyi EA, Higham SM, Mair LH. The recharge of esthetic dental restorative materials with fluoride in vitro-two years' results. *Dent.Mater.* 2003 Jan;19(1):32-37.

- (15) Basdra EK, Huber H, Komposch G. Fluoride released from orthodontic bonding agents alters the enamel surface and inhibits enamel demineralization in vitro. *Am.J.Orthod.Dentofacial Orthop.* 1996 May;109(5):466-472.
- (16) Trimpeneers LM, Verbeeck RM, Dermaut LR. Long-term fluoride release of some orthodontic bonding resins: a laboratory study. *Dent.Mater.* 1998 Mar;14(2):142-149.
- (17) Evrenol BI, Kucukkeles N, Arun T, Yarat A. Fluoride release capacities of four different orthodontic adhesives. *J.Clin.Pediatr.Dent.* 1999 Summer;23(4):315-319.
- (18) Itota T, Al-Naimi OT, Carrick TE, Yoshiyama M, McCabe JF. Fluoride release and neutralizing effect by resin-based materials. *Oper.Dent.* 2005 Jul-Aug;30(4):522-527.
- (19) Dorfner K editor. *Ion Exchangers*. 1st ed. Berlin-New York: Walter de Gruyter; 1991.
- (20) Helfferich F. *Ion Exchange*. New York: Dover Publications; 1995.
- (21) Campillo M, Torrado A, Valiente M, Muñoz, CA. Fluoride release on improved materials for dental restorations. *Proceedings of IADR/2004. J Dent Res.* 2004 March; 83 (Spec Issue A) 1793.
- (22) Vargas MA, Cobb DS, Denehy GE. Interfacial micromorphology and shear bond strength of single-bottle primer/adhesives. *Dent.Mater.* 1997 Sep;13(5):316-324.
- (23) Bae J, Cho B, Kim J, Kim M, Lee I, Son H, et al. Adhesive layer properties as a determinant of dentin bond strength. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2005;74B(2):822-828.
- (24) Cho B, Dickens SH. Effects of the acetone content of single solution dentin bonding agents on the adhesive layer thickness and the microtensile bond strength. *Dent.Mater.* 2004;20(2):107-115.
- (25) Phrukkanon S, Burrow MF, Tyas MJ. The influence of cross-sectional shape and surface area on the microtensile bond test. *Dent.Mater.* 1998;14(3):212-221.
- (26) Tanumiharja M, Burrow MF, Tyas MJ. Microtensile bond strengths of seven dentin adhesive systems. *Dent.Mater.* 2000;16(3):180-187.

TABLES

Table 1

Shear Bond Strength

Adhesive	Surface	Time	Group code	SBS (Mpa)	SD		
Original	Dentin	Immediate	OrImDe	17,38	3,10	ANOVA: Original adhesive vs. Modified adhesive	
		24h	Or24De	22,07	7,53		
	Enamel	Immediate	OrImE	18,94	5,00	F	F _{crit}
		24h	Or24E	18,56	5,51		
1% Ion exchange resin	Dentin	Immediate	1ImDe	13,35	2,74	6,28	4,60
		24h	1_24De	16,68	2,91	1,94	4,45
	Enamel	Immediate	1ImE	13,46	3,63	5,59	4,60
		24h	1_24E	16,68	3,41	2,42	4,60
2.5% Ion exchange resin	Dentin	Immediate	25ImDe	14,14	2,24	5,25	4,67
		24h	25_24De	18,47	4,76	0,18	4,54
	Enamel	Immediate	25ImE	12,80	4,06	7,79	4,54
		24h	25_24E	22,99	5,60	2,69	4,54
5% Ion exchange resin	Dentin	Immediate	5ImDe	12,97	3,84	6,69	4,54
		24h	5_24De	16,91	7,56	0,69	4,45
	Enamel	Immediate	5ImE	11,74	3,61	8,86	4,74
		24h	5_24E	22,70	8,72	1,35	4,49

Table 2

	Mean	SD	n	Unpaired t-test	
Class0	30,62	10,99	3	Class Means	P
Class1	18,46	6,88	36	Mean0-Mean1 ≤ 0	0,004
Class2	16,20	5,81	98	Mean1-Mean2 ≤ 0	0,028
Class3	12,13	4,36	23	Mean3-Mean3 ≤ 0	0,001

FIGURES

Figure 1

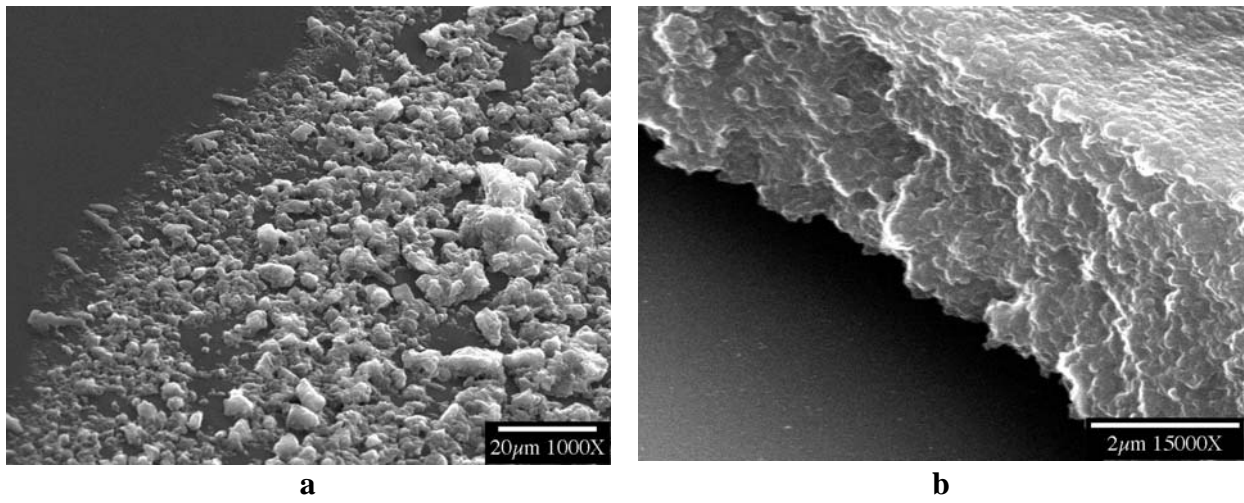


Figure 2

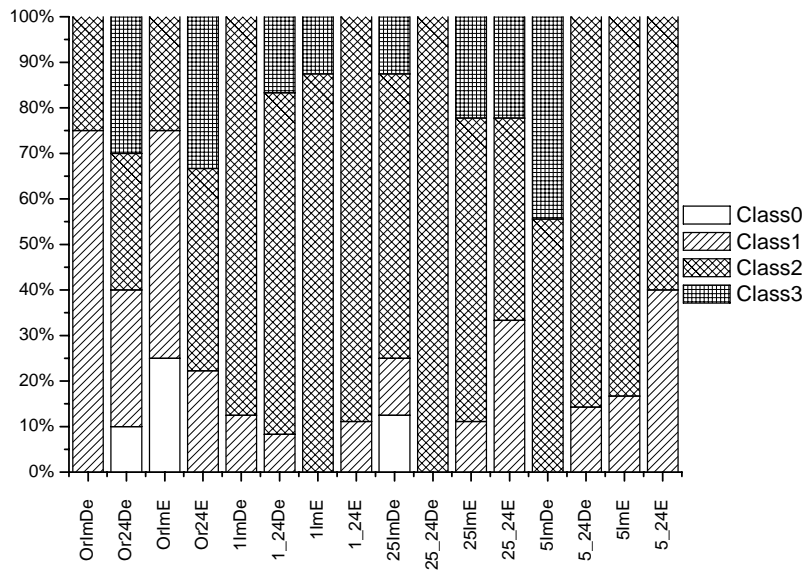


Figure 3

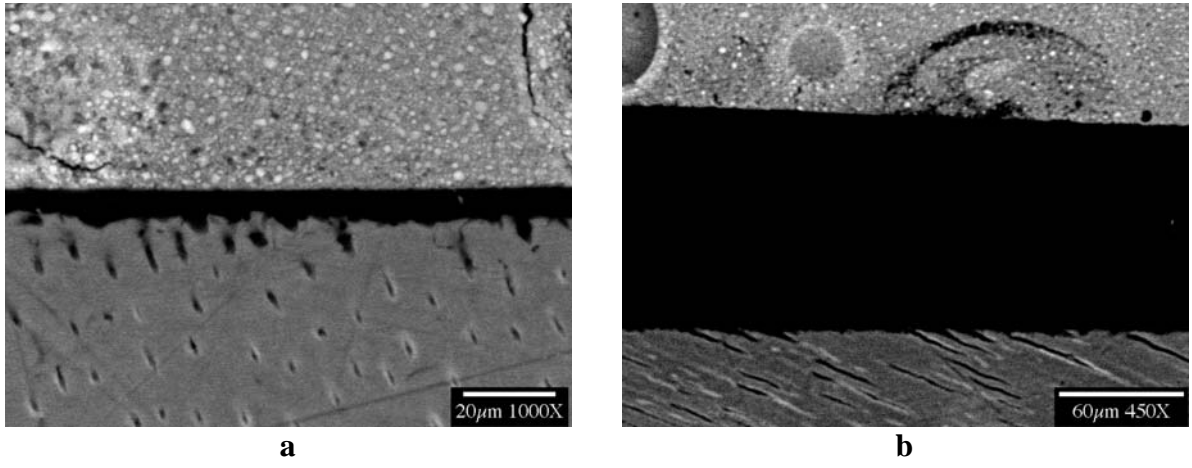
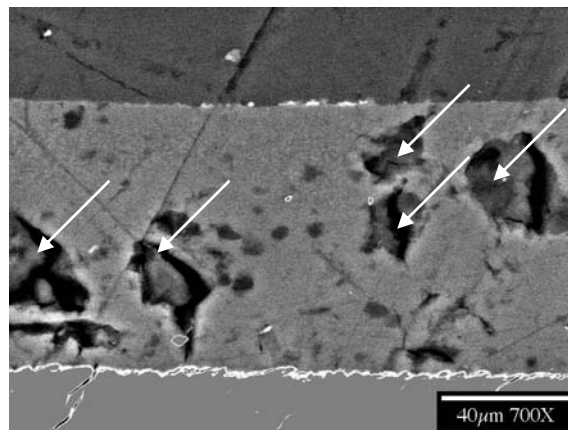


Figure 4



CAPTIONS

Table 1: ANOVA results of the original adhesive vs. ion exchange resin modified adhesive shear bond strength values. Bold numbers indicate significant differences.

Table 2: Unpaired one tail t-test results for shear bond strength mean values of different fracture classes.

Figure 1: SEM images of the fluoride ion exchange resin particles. Particles retained between the 32 μ m and the 28 μ m sieves after milling with agate mortar (a) and particles of the same size fraction after milling with an adapted ball miller in amalgam mixer (b).

Figure 2: Cumulative percentage of fracture classes depending on the shape of the fracture surface for each studied group. Class 0: flat surface, class 1: stripes, class 2: stripes and bubbles, class 3: bubbles.

Figure 3: SEM secondary electron images of the layer between dentin (below) and the restorative composite resin (above) of: a) Original adhesive, b) Adhesive modified by the addition of fluoride ion exchange resin (2.5% w/w).

Figure 4: SEM backscattered image of the layer between dentin (below) and the restorative composite resin (Above) of an adhesive sample modified by the addition of fluoride ion exchange resin (5% w/w). White arrows point to resin particle aggregates in the bulk of the adhesive phase.

X-ray diffraction patterns of etched and remineralized bovine enamel

M. Campillo¹, A. Torrado¹ and M. Valiente^{1*}

¹Centre GTS, Dept. de Química, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Barcelona), Spain

X-ray diffraction of fluoridated teeth

Keywords: Fluoride, enamel analysis, X-Ray diffraction

Number of words in abstract: 136

Number of words in text: 1913; 1 table; 4 figures; 22 references.

*Corresponding author details:

Manuel Valiente

Centre Grup de Tècniques de Separació

Departament de Química

Edifici CN, Campus UAB

08193 Bellaterra, Cerdanyola del Valles

(Barcelona)

Spain

Phone: +34 93 581 2903

Fax: +34 93 581 2379

e-mail: Manuel.Valiente@uab.es

ABSTRACT

This work aimed to develop a method based on X-ray diffraction to determine and quantify the apatite mineral in dental enamel samples and to study demineralization and remineralization processes. CaF_2 powder standards were prepared in a hydroxyapatite matrix and a XRD calibration curve was obtained. Samples of hydroxyapatite, partially fluoridated hydroxyapatite and fluorapatite were analyzed to determine differences between the apatite mineral with different fluoride content. X-Ray diffraction patterns of the minerals revealed that fluoridated hydroxyapatite obtained by pH cycling is not a solid solution of hydroxyapatite and fluorapatite but a mixture of both compounds. Results obtained for synthetic samples were compared to natural (not treated), demineralized and remineralized bovine teeth. No differences were observed between teeth XRD patterns before and after treatments. CaF_2 was not observed on teeth surfaces for any of the studied treatments.

INTRODUCTION

Dental enamel is the most mineralized tissue in humans. It contains about 96% (w/w) of mineral and only 1% of organic molecules and 3% of water. Enamel is mainly formed by tightly packed hydroxyapatite (HA) nanocrystals (160 nm length, 40-70 nm width, 30 nm thick) separated by very small spaces, filled with water and organic molecules. Therefore, dental enamel can be considered as a microporous solid composed of densely packed crystals(1).

Mineral loss, known as demineralization, produces a hard tissue degeneration which can lead to different diseases such as osteoporosis or dental caries. Tooth mineral loss, which leads to dental caries, takes place due to the dissolution of HA by acids(2) produced by oral flora microorganisms when rests of food from diet are metabolized(3). Saliva, which is oversaturated in HA and has a pH buffering effect can regenerate, that is remineralize, the mineral which has been lost as a consequence of the acid attack. Demineralization and remineralization should be balanced in order to prevent caries formation.

Fluoride is a widely known and used cariostatic agent (4) due to its ability to decrease the solubility of the tooth mineral by reacting with hydroxyapatite and forming fluorapatite (FA)(5-7). The mechanism of fluoride incorporation into dental enamel is still unknown. Thus, it can be incorporated as FA but it can also precipitate as CaF_2 , which may have positive effects in tooth remineralization(8).

A wide number of techniques have been proposed to evaluate the teeth mineral content. Physicochemical properties of the tooth, directly or indirectly related to the mineral content, are analyzed for this purpose. Microhardness(9), microradiography(10), backscattered electron imaging(11), and quantitative light induced fluorescence(12) are the most extended methods. These methods can estimate the mineral content but can not distinguish between different mineral compounds. Some other methods can distinguish between CaF_2 and FA but they need to dissolve the sample(13), and thus destroy the tooth. However, this methods when combined with microsampling techniques such as local dissolution(14) or microtomography(15) are able to determine the distribution of fluoride compounds.

X-ray diffraction (XRD) has already been used as a complementary technique(16) but for the time being, no references for a direct determination of the mineral content of teeth and its composition have been found in the literature. Considering that XRD is a non destructive technique, it could allow monitoring the demineralization - remineralization processes without altering the samples and shed light to the mechanism and efficiency of both processes under different conditions.

The aim of this study was to develop a XRD based methodology to determine and quantify the mineral in dental enamel samples.

MATERIALS AND METHODS

Synthesis of fHA was performed following a pH-cycling method previously described in the literature(17). 10g of HA (90% as Ca_3PO_4 , Panreac, Spain) were suspended in

500 ml of a 0.01 M CaF_2 solution (99.5%, Riedel de Haën, Germany) at pH 7. After equilibrating the solution overnight under agitation, pH was slowly decreased to 4 with a 1M HNO_3 solution (65%, J.T. Baker, Holland). Suspension was equilibrated again for 30 minutes and then pH brought back to 7 with a 1M NaOH solution (99%, Panreac, Spain). The pH cycle was repeated 3 times and the resulting solid was filtered, washed 3 times with water and dried overnight in an oven at 80°C. Calcination of the samples was avoided in order to reproduce the same process applied to teeth samples.

FA was synthesized through a solid phase reaction between CaF_2 and $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (99%, Panreac, Spain) (17). Both solids were introduced in an agate mortar (Retsch RMO, Germany) maintaining a Ca:P molar ratio of 1.67 and ground for 10 minutes in order to obtain an homogeneous solid mixture. After grinding, the mixture was transferred to a porcelain holder and heated at 1000°C for 3 hours. Then, the obtained solid was cooled down to room temperature and ground again in an agate mortar miller.

CaF_2 standards in a HA matrix were prepared by weighting the adequate amounts of each solid compound for each concentration. Solid mixtures were homogenized for 1 hour in a rotary mixer.

Six freshly extracted bovine intact incisors were kept in 0.5% (w/w) chloramine-T (99% Riedel-de Haën, Germany) water solution until used. Teeth selected for the study were cut and roots removed. XRD patterns of the teeth were obtained positioning the teeth in four different orientations with respect to the X-ray source in order to optimize the measuring position. Five replicates of the same tooth were measured in order to assess the mounting reproducibility. Enamel specimens were lightly etched to clean the tooth

surface and facilitate the observation of the remineralizing process. This etching procedure consisted of a sequential immersion in a solution of HCl 0.12 M (37%, J.T. Baker, Holland) for 60 seconds, a saturated NaCO₃ solution (99%, Sigma, Germany) for 30 seconds and again HCl 0.12 M for 60 seconds. Tooth remineralization was carried out by reproducing the pH cycling process used for mineral samples either in a CaF₂ 0.1 M solution or in a NaF 0.1 M solution.

XRD patterns of teeth and powder samples were obtained under the same conditions by using a Philips XPert diffractometer with copper target at a voltage and current settings of 50 kV and 40 mA, respectively. All samples were examined at a step size of 0.02° 2θ and at a scanning speed of 0.24° 2θ in three different 2θ ranges corresponding to CaF₂ diffraction peak (from 27.8° to 29°) and the most intense peaks of apatites (from 25.2° and 26° and from 31.2° and 34.7°).

RESULTS

As it can be seen in Figure 1, the analysis of the CaF₂ standards prepared in a matrix of HA by mixing both solid powders showed an increase of the CaF₂ signal intensity with the concentration.

XRD patterns of all the studied apatite compounds (HA, fHA and FA) are shown in Figure 2. Slightly differences due to fluoridation can be observed. In fact, fluoridated and not fluoridated HA samples differ in just a small shift of some peaks. Thus, peaks which are not affected by the incorporation of fluoride into the mineral structure can be used as a reference for the position of the shifted peaks. Values for peak distances

between the (002) peaks and the peaks corresponding to plains (211), (112) and (300), all of them with components in the a-b direction and thereby affected by fluoride substitution, are shown in Table 1. Position of fHA peaks are not in an intermediate situation between HA and FA but some of them are in HA position and other in FA position.

As shown in Figure 3, the relative intensity of hydroxyapatite diffraction peaks depends on the orientation of the teeth with respect to the X-ray source, thus indicating that HA crystals are not randomly distributed but arranged in a preferential orientation into dental enamel. This is common situation in biological tissues and confers anisotropic properties and extra stability to the materials. The tooth position with the occlusal part facing the X-ray source (position 3) showed the highest intensity for the studied peaks in all the samples, was selected for further experiments.

Sample mounting reproducibility showed a variation coefficient of 11.34% in the intensity of CaF_2 peak. Remarkable variations in peak positions were not observed.

Figure 4A shows the diffraction patterns for a tooth after etching and once remineralized with CaF_2 . The comparison of these diffraction patterns to the ones shown in Figure 4B, corresponding to a tooth after etching and once remineralized with NaF, reveals no remarkable differences. The mineral content differences between natural (not treated), etched and remineralized teeth could not be detected by means of X-ray diffraction. However, it could be assessed that no CaF_2 was deposited on tooth surface as a result of the remineralizing treatments, since its concentration was under 1% for all the studied tooth samples.

DISCUSSION

Quantification of CaF₂ in the HA matrix

Although the internal standard is normally used in quantitative determination using XRD, it is not necessary for the compounds studied in this work. XRD quantitative methods normally use an internal standard because the signal intensity depends on the mass absorption coefficient:

$$I_{\alpha} = \frac{K_{i\alpha} X_{\alpha}}{\rho_{\alpha} \left(\frac{\mu}{\rho} \right)_m}$$

where I_{α} is the intensity of a diffraction line from the phase α , $K_{i\alpha}$ is a set of constants, X_{α} is the weight fraction of phase α , ρ_{α} is the density of phase α and $(\mu/\rho)_m$ is the mass absorption coefficient of the mixture, which can be calculated using tabulated values of (μ/ρ) for each element as a weighted average. Due to the fact that for the studied samples, the variation of $(\mu/\rho)_m$ in the studied range is very small (0.407 for HA and 0.419 for a 50% CaF₂/HA mixture) and its effect will be below the instrumental error, the use of the internal standard can be avoided. This will simplify the method and ease the application to teeth samples, where the introduction of an internal standard is difficult.

Diffraction patterns of HA, fHA and FA are easily distinguishable from CaF₂. The cubic structure of CaF₂ is reflected as a single peak at $2\theta = 28.27$ in the XRD pattern. The apatite compounds show a small peak corresponding to the (102) plane at 2θ between 28.12 (HA) and 28.15 (FA) but it does not overlap the CaF₂ peak, thus allowing the determination of CaF₂ from the calculated calibration curve. Considering the high

mineral content of dental enamel, this method can be applied to assess possible formation of CaF_2 on enamel surface after remineralization treatments.

XRD patterns of HA, FA and fHA

HA and FA diffraction patterns are very similar due to their structural similarity. However, the cell dimension change produced when fluoride substitutes hydroxide ion is reflected as a small shift in some of the XRD peaks. Peaks corresponding to planes that only have a component in the c direction do not show any shift because the cell does not undergo any change in this direction when the substitution takes place.

The position of fHA peaks is indicative that the mineral does not have an intermediate structure between HA and FA. Thus fluoridated zones are in the FA form while parts of the mineral in which fluoride did not substitute enough crystal cells remain in the HA form. This fact is a supporting evidence for previous studies reporting that after fluoridation the overall mineral structure remains in the HA form if an enough activation energy is not supplied to achieve the phase transformation to obtain FA(18).

Demineralization/remineralization processes

Under the selected experimental conditions, differences between the mineral content of tooth samples after demineralization or remineralization could not be observed.

The similar XRD patterns obtained from teeth after the different treatments indicate that the applied demineralization and remineralization procedures, although being effective for mineral samples, have no influence on the tooth mineral. This fact may be related to the higher stability of the mineral crystals forming dental enamel due to their size and

orientation (19,20). That restricts the extend of dissolution of the mineral and also makes difficult the fluoridation when it is based on dissolution-reprecipitation series. In fact, according to other studies when fluoridation methods are applied to teeth results are not as successful as expected (21,22).

In summary, XRD is a suitable technique to determine CaF_2 in HA matrixes and to distinguish HA from FA in mineral samples. However, the determination of teeth samples fluoridation is limited by the characteristics of the dental mineral. Thus, demineralization and remineralization methods which are effective for fluoride incorporation to synthetic HA have not a detectable effect in teeth.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors thank Dr. A. Alvarez for assistance in XRD experiments. This work was partially supported by Ministerio de Cultura y Deporte project PPQ2002-04267-C03-01.

REFERENCES

(1) Zimehl. Non metallic restorative materials based on glass ionomer cements — recent trends and developments. *Colloids and Surfaces A Physicochemical and Engineering Aspects* 2000;163(1):55, and references therein.

(2) Brown WE, Gregory TM, Chow LC. Effects of fluoride on enamel solubility and cariostasis. *Caries Res.* 1977;11 Suppl 1:118-141.

- (3) Bradshaw DJ, Marsh PD. Analysis of pH-driven disruption of oral microbial communities in vitro. *Caries Res.* 1998;32(6):456-462.
- (4) Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet* 2007 Jan 6;369(9555):51-59.
- (5) Driessens FC. Relation between apatite solubility and anti-cariogenic effect of fluoride. *Nature* 1973 Jun 15;243(5407):420-421.
- (6) Moreno EC, Kresak M, Zahradnik RT. Fluoridated hydroxyapatite solubility and caries formation. *Nature* 1974 Jan 4;247(5435):64-65.
- (7) deLeeuw NH. Resisting the Onset of Hydroxyapatite Dissolution through the Incorporation of Fluoride. *J. Phys. Chem. B* 2004;108(6):1809-1811.
- (8) Larsen MJ. Prevention by means of fluoride of enamel erosion as caused by soft drinks and orange juice. *Caries Res.* 2001 May-Jun;35(3):229-234.
- (9) Kielbassa AM, Wrbas KT, Schulte-Monting J, Hellwig E. Correlation of transversal microradiography and microhardness on in situ-induced demineralization in irradiated and nonirradiated human dental enamel. *Arch.Oral Biol.* 1999 Mar;44(3):243-251.
- (10) Nyvad B, ten Cate JM, Fejerskov O. Microradiography of experimental root surface caries in man. *Caries Res.* 1989;23(4):218-224.
- (11) Boyde A, Jones SJ. Backscattered electron imaging of dental tissues. *Anat.Embryol.(Berl)* 1983;168(2):211-226.
- (12) Bjelkhagen H, Sundstrom F, Angmar-Mansson B, Ryden H. Early detection of enamel caries by the luminescence excited by visible laser light. *Swed.Dent.J.* 1982;6(1):1-7.

- (13) Attin T, Schaller HG, Hellwig E. Fluoride uptake in dentin with and without simulating dentinal fluid flow. *Clin.Oral Investig.* 1997 Sep;1(3):125-130.
- (14) Weatherell JA, Robinson C, Hallsworth AS. Changes in the fluoride concentration of the labial enamel surface with age. *Caries Res.* 1972;6(4):312-324.
- (15) Thuy TT, Nakagaki H, Ha NT, Morita I, Tatematsu M, Lan HA, et al. Fluoride profiles in premolars after different durations of water fluoridation in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Arch.Oral Biol.* 2003 May;48(5):369-376.
- (16) Epple M. Solid-state chemical methods to investigate the nature of calcified deposits. *Z.Kardiol.* 2001;90 Suppl 3:64-67.
- (17) Wei M, Evans JH, Bostrom T, Grondahl L. Synthesis and characterization of hydroxyapatite, fluoride-substituted hydroxyapatite and fluorapatite. *J.Mater.Sci.Mater.Med.* 2003 Apr;14(4):311-320, and references therein.
- (18) Campillo M, Lacharmoise PD, Torrado A, Goñi AR, Valiente M. Demonstration of an effective teeth fluoridation method for caries prevention. In Press.
- (19) Cevc G, Cevc P, Schara M, Skaleric U. The caries resistance of human teeth is determined by the spatial arrangement of hydroxyapatite microcrystals in the enamel. *Nature* 1980 Jul 24;286(5771):425-426.
- (20) Tang R, Wang L, Orme CA, Bonstein T, Bush PJ, Nancollas GH. Dissolution at the Nanoscale: Self-Preservation of Biominerals. *Angew. Chem. Int. Edit.* 2004;43(20):2697-2701.

(21) Marinho VC, Higgins JP, Logan S, Sheiham A. Systematic review of controlled trials on the effectiveness of fluoride gels for the prevention of dental caries in children. *J.Dent.Educ.* 2003 Apr;67(4):448-458.

(22) Wiegand A, Buchalla W, Attin T. Review on fluoride-releasing restorative materials--fluoride release and uptake characteristics, antibacterial activity and influence on caries formation. *Dent.Mater.* 2007 Mar;23(3):343-362.

TABLES

Table 1

	$\delta(002)-(211)$	$\delta(002)-(112)$	$\delta(002)-(300)$
HA	5.88	6.28	6.98
fHA	5.90	6.38	7.22
FA	6.03	6.36	7.20

FIGURES

Figure 1

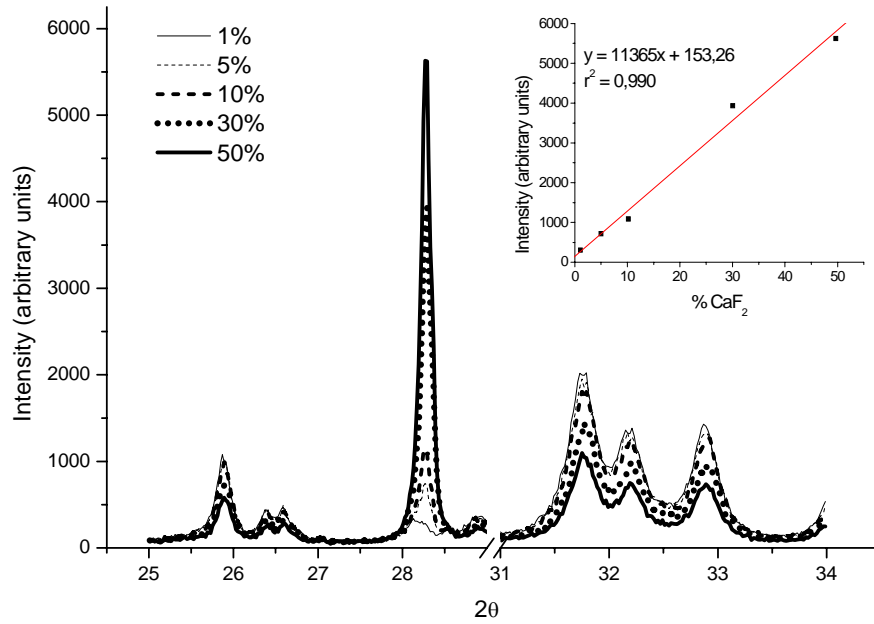


Figure 2

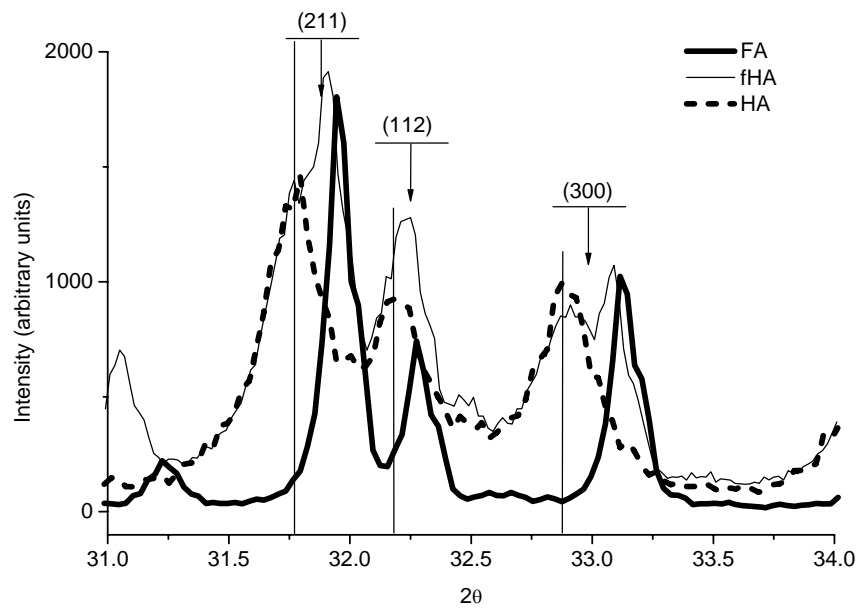


Figure 3

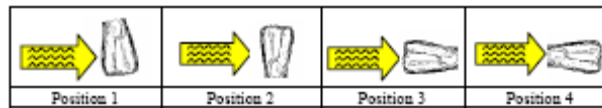
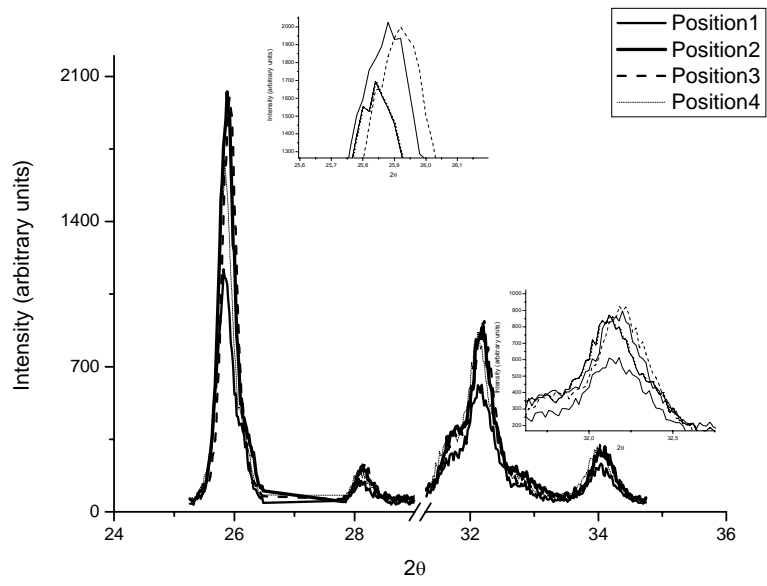


Figure 4A

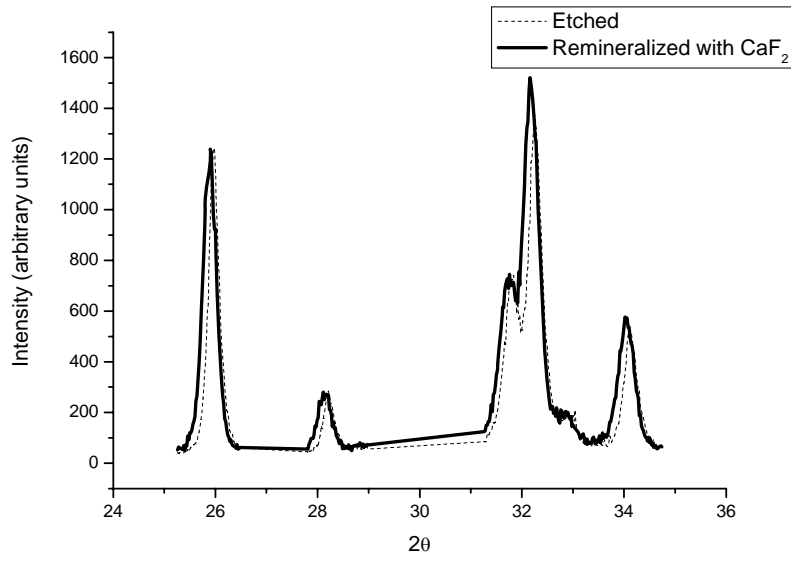


Figure 4B

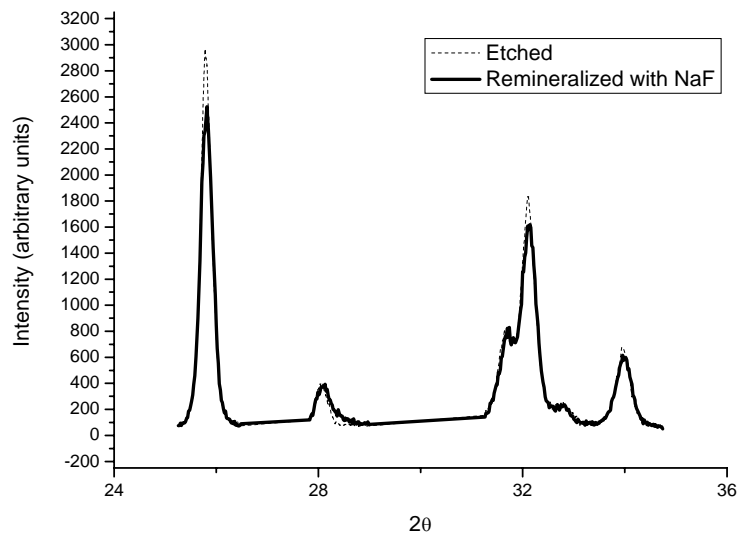


Table 1: Peak shift between plain (002) and peaks affected by fluoridation.

Figure 1: X-Ray diffraction patterns of CaF_2 standards prepared in a matrix of HA. The inset shows a calibration curve calculated as a linear regression of intensity vs concentration.

Figure 2: X-Ray diffraction patterns of HA (dashed line), fHA (solid thin line) and FA (solid bold line). Vertical lines mark central positions of HA peaks.

Figure 3: Representative diffraction patterns of bovine dental enamel in different positions with respect to the X-ray source. Insets show details of peaks.

Figure 4: Representative diffraction patterns of etched and remineralized bovine dental enamel. Remineralization processes were carried on by means of CaF_2 (A) or NaF (B).

Calcium speciation on dental enamel by Raman scattering to assess effective teeth fluoridation

Marc Campillo¹, Paul D. Lacharmoise², Anna Torrado¹, Alejandro R. Goñi^{2*}, and Manuel Valiente¹

¹Centre GTS, Química Analítica, Departament de Química. Campus UAB, CN. Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Barcelona), Spain

² Institut de Ciència de Materials de Barcelona (ICMAB-CSIC), Esfera UAB, 08193 Bellaterra, Spain

Raman scattering to assess teeth fluoridation

Keywords: Raman scattering, fluorapatite, dental enamel

Number of words in abstract: 194

Number of words in text: 2728; 0 tables; 5 figures; 34 references.

*Corresponding author details:

Manuel Valiente

Centre Grup de Tècniques de Separació

Departament de Química

Edifici CN, Campus UAB

08193 Bellaterra, Cerdanyola del Valles (Barcelona) - Spain

Phone: +34 93 581 2903

Fax: +34 93 581 2379

e-mail: Manuel.Valiente@uab.es

* ICREA Research Professor

ABSTRACT

Calcium species are main mineral components of bones and teeth, being hydroxyapatite most abundant on dental enamel. Fluorapatite, a bioceramic that can be obtained from hydroxyapatite by chemical substitution of the hydroxide ions with fluoride, exhibits lower mineral solubility and larger mechanical strength. This has led to the widespread use of fluoride against caries. However, the available methods of fluoridation are not as successful as expected when applied on teeth, because for fluoridation to be effective fluorapatite must be formed. There are two unsolved key issues in caries prevention: The proper method to achieve fluoride incorporation into the enamel as fluorapatite and a reliable characterisation technique for unambiguous assessment of fluoridation. Here, we present a novel methodology to direct evaluation of calcium species on dental enamel by a selective differentiation of hydroxyapatite from fluorapatite. The methodology combines micro-Raman scattering with thermal annealing and has been applied to assess effective teeth fluoridation. Thus, a controlled-release material for dental remineralisation based on ion-exchange resins (NMTD) has been evaluated against the conventional procedure of exposing the enamel to an elevated fluoride concentration. This evaluation observes a much higher efficiency of the NMTD material on the fluoridation process.

INTRODUCTION

Success of fluoride in caries prevention is widely known and it has been demonstrated in several studies(1-3). When a fluoride containing solution contacts hydroxyapatite (the natural mineral forming dental enamel), hydroxide ions can be substituted by fluoride, leading to the formation of fluorapatite. The lower solubility of fluorapatite respect to hydroxyapatite enhances the mineral resistance against caries(4-6). However, the large number of ionic species present in saliva can interfere with fluorapatite formation by reacting with fluoride and leading to other by-products, mainly calcium fluoride. Whereas formation of fluoride containing species other than fluorapatite can also contribute to enhancement of the caries resistance by further fluorapatite formation(7), these species do not directly contribute to the caries prevention. Thus, regardless of fluoride effectiveness in *in vitro* studies, clinical results are most of the times below the expectatives(8,9). This fact is mainly due to the lack of reliable methods to assess fluorapatite formation in enamel.

A wide number of methods based on different techniques have been proposed to evaluate the teeth mineral content. Physicochemical properties of the tooth, directly or indirectly related to the mineral content, are analyzed for this purpose. Microhardness(10), microradiography(11), backscattered electron imaging(12), and quantitative light induced fluorescence(13) are the most extended thecniques. These techniques can estimate the mineral content but can not distinguish between different calcium species. Some other methods can distinguish between CaF_2 and FA but they need to dissolve the sample(14), and thus destroy the tooth. This methods are sometimes combined with microsampling techniques such as local dissolution(15) or microtomography(16) to map the distribution of fluoride compounds.

Associated with the transformation from hydroxyapatite to fluorapatite, there is a unit cell contraction which can be detected, in principle, by monitoring the changes in frequency of

vibrational modes of the phosphate (PO_4^{3-}) units, which are Raman active. In hydroxyapatite, the hydroxide ions placed in hexagonal calcium channels in the *c* direction (see Figure 1) can be partially or totally replaced by fluoride (F^-) to form partially fluoridated hydroxyapatite or fluorapatite, respectively. Due to the smaller ionic radius of fluoride as compared to hydroxide (OH^-), the triangle formed by the three coordinating calcium ions shrinks causing a symmetry-conserving contraction of the unit cell in the *a,b* plane. This volume reduction which amounts to about 1% is responsible for the greater mechanical strength of fluorapatite against hydroxyapatite(19).

MATERIALS & METHODS

A series of partially fluoride substituted hydroxyapatite samples were obtained from synthetic hydroxyapatite through pH-cycling with CaF_2 (20,21). Samples of 10 g of hydroxyapatite (90% as $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, Fluka, Germany) were suspended in 500 ml of CaF_2 solutions (99.5%, Riedel-de Haën, Germany) ranging from 4 mM up to 50 mM. Suspensions were equilibrated at pH 7 overnight under continuous stirring. Then, pH was slowly decreased to 4 with a 1M HNO_3 solution (65%, J.T. Baker, Holland). Suspensions were equilibrated again for 30 minutes and then pH brought back to 7 with a 1M NaOH solution (99%, Panreac, Spain). pH cycles were repeated 3 times and resulting solids were filtered, washed 3 times with water and dried overnight in an oven at 80°C. Fluoridated hydroxyapatite samples with substitutions of 10%, 20%, 40%, 60%, 80%, 95% and 100% were obtained by means of the described procedure.

Fluorapatite was synthesized by means of a solid-phase reaction(20). Calcium fluoride and tricalcium phosphate (35-40% as Ca, Panreac, Spain) were mixed by an agate miller at a Ca/P ratio of 1.67. The mixture was put in a porcelain crucible and heated to 1000°C for 4h in an electrical furnace. The resulting solid was milled in an agate miller to reduce particle size.

Elemental analysis of F, P and Ca was performed in all the studied solids. Fluoride was measured with a combined ion selective electrode (JENWAY 924-305, England). Ca and P were determined using ICP-OES (Iris Intrepid II, Thermo Electron, USA). All solids showed fluoride and phosphate concentrations expected for each the substitution degree (in a range of $\pm 0.3\%$ w/w for F and $\pm 1.5\%$ w/w for P). Ca concentration was found to be around 3% w/w below the expected values for all the samples, thus indicating a slight Ca deficiency in the initial hydroxyapatite.

Raman spectra were collected at room temperature using a LabRam HR800 μ -Raman spectrometer and the 514 nm line of an Ar⁺ laser as excitation source. The size of the laser spot was 2 μ m and the power on the sample was about 3.5 mW. A cooled CCD was used for detection. The spectral resolution was about 0.5 cm^{-1} . Back scattering measurements were performed in different regions of the samples in order to prevent inhomogeneity effects.

For each powder sample, a pellet was prepared. Pellets were analysed by Raman scattering and then each pellet was divided in 7 pieces. For each pellet, pieces were heated in an electric furnace at 200°C, 300°C, 400°C, 500°C, 600°C, 700°C and 800°C for 30 min. After cooling to room temperature, each piece was measured again.

Nine extracted human molars were stored in chloramine-T 0.5% water solution (99% Riedel-de Haën, Germany) until used for the study. Teeth were randomly divided in three groups. The first group was used as control and it did not undergo any fluoridation process. The second group was treated with a pH cycling process in a saturated CaF₂ solution, resembling the process used in the synthesis of partially fluoridated hydroxyapatite. The third group was treated with a suspension of 3g of the product NMTD(22) in 6 ml of artificial saliva

containing 0.5 g/l NaCl (99.5%, Panreac Spain) and 1 g/l K Cl (99.5%, Panreac, Spain) for 72 hours. NMTD comprises a powder mixture of cationic and anionic ion-exchange resins loaded with calcium, fluoride, phosphate in the same molar ratio as in fluorapatite and a small amount of zinc. The use of resins as ion carriers allows for the simultaneous delivery of the mineral constituents avoiding undesired interactions between them before the application of the material. When NMTD is in contact with a saline solution such as a body fluid, calcium, fluoride and phosphate ions are released and the corresponding chemical interactions take place. Although fluorapatite is the most thermodynamically stable solid product in a solution containing the mentioned ions, formation of other by-products such as calcium fluoride or calcium phosphate is kinetically favoured. Thus, in contrast of conventional methods based on the supply of high amounts of fluoride(23), the key feature for a successful remineralisation is to control the release rate of the ions to the solution. NMTD overcomes this issue using weak acid and weak base ion-exchange resins with controlled particle size. Figure 2 shows, as an example, the release profiles of calcium loaded in both weak and strong resins. Calcium release rate is critical for an effective remineralisation of the enamel. Only for extremely low Ca release rates of the order of $2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ the precipitation of calcium fluoride and calcium phosphate is minimized, leading to the preferential formation of fluorapatite. In addition, when the ions are released from a resin mixture instead of a resin loaded with a single ion type, weak resins also behave as ion buffer providing the respective ions when they are needed and withdrawing them from the solution, if they are in excess. A unique property of NMTD as compared to conventional remineralisation methods is that the release-rate engineering allows not only for the correct fluoride substitution of the hydroxide ions of the hydroxyapatite but also for the crystallisation of fluorapatite in the dental tissue.

Raman spectra of both treated and natural teeth were obtained for not heated teeth and after heating at 800°C for 30 min and later at 1000°C for 30 min.

RESULTS AND DISCUSSION

Raman spectra of synthetic hydroxyapatite and partially fluoridated hydroxyapatite, however, did not show any remarkable difference for fluoride substitutions ranging from 10% to 95%.

As illustrated in Figure 3, the most notorious differences in the Raman spectra of hydroxyapatite and fluorapatite correspond to the blueshift of the main peak ν_1 and the changes in splittings of the ν_3 vibrations. The blueshift of ν_1 is ascribed to the volume reduction of the unit cell, $\Delta V/V = 1\%$. In fact, using the measured pressure coefficient(24) $d\omega_{\nu_1}/dP=3.8 \text{ cm}^{-1}/\text{GPa}$ and the bulk modulus $B_0=106 \text{ GPa}$ of hydroxyapatite(25) the frequency shift of that mode is readily estimated according to $\Delta\omega_{\nu_1}=d\omega_{\nu_1}/dP \cdot B_0 \cdot \Delta V/V$ to be approximately 4 cm^{-1} . This estimation is in good agreement with the observed value of 3 cm^{-1} (see inset to Figure 3).

The data points in the inset to Figure 3 represent the frequency ω_{ν_1} of the main Raman peak in spectra of a series of partially fluoridated hydroxyapatite minerals with different fluoride concentration. Incorporation of fluoride into the crystal structure of hydroxyapatite could be assessed by the blueshift of the ν_1 mode *only* for almost fluoride-saturated apatite. For reasons that will be clear below, instead of taking this result as evidence against the effectiveness of the fluoride substitution process, we consider this as an indication that changes in the crystal lattice take only place when the amount of incorporated fluoride is close to saturation.

Typically, high free-energy barriers are associated to first-order phase transitions involving unit cell deformations as for the transformation from hydroxyapatite to fluorapatite. Hence, at room temperature there exists a critical radius for nucleation of the target phase before the

transition would take place(26). Since the c axis remains unchanged for this phase transition, we performed a simple two-dimensional statistical calculation in which the hydroxide ions of a single hydroxyapatite crystal are randomly substituted by fluoride ions up to a given concentration. The calculation considers a minimum-size cluster for nucleation composed by three adjacent and fully fluoride substituted unit cells in the a,b plane. Within this model, the fraction η of nucleating clusters with radius a (axis length) becomes significant only for almost complete fluoride substitution (solid line in the inset to Figure 3). In other words, although partial fluoride substitution of the OH^- groups of hydroxyapatite might have been successful, a transition into the fluorapatite form would only take place when a substantial number of nucleation centres with radii above critical are formed. We believe that this effect has been the main reason for the failure of previous characterisation attempts to probe the degree of fluoride incorporation, misleading many researchers on the efficiency of the fluoridation method employed(8,9).

A way to circumvent the problem posed by a high thermal barrier for the fluoridated mineral to undergo the transformation into the more stable fluorapatite phase consists in annealing the fluoride-substituted samples for 30 min at different temperatures up to 800°C. A striking result of this work concerns the observation of the blueshift of the phosphate ν_1 mode to its position in fluorapatite for all samples with more than 20% fluoride substitution, provided they were previously annealed at temperatures between 600 and 800°C. The Raman spectra of the fluoridated hydroxyapatite sample with 60% substitution shown in Figure 4 are representative for the effects of thermal annealing on the partially fluoridated hydroxyapatite series with fluoride substitution between 40% and 95%. The general behaviour that comes out from the Raman data can be described as follows: after heating a sample at a temperature between 300°C and 600°C a Raman spectrum characteristic of an amorphous material is

obtained. The ν_1 -mode peak strongly decreases in intensity, whereas the background becomes very intense, and the groups of sharp lines of the ν_2 -- ν_4 vibrations vanish, giving rise to redshifted broad bands. This is a clear indication of a high degree of disorder present in the partially fluoridated hydroxyapatite crystal structure due to an extremely non-uniform local deformation of the fluoride-substituted unit cells. Partially fluoridated hydroxyapatite samples heated above 600°C, however, *crystallize* again but in the fluorapatite structure, displaying Raman spectra with sharp and very intense lines identical to that of pure fluorapatite. Thus, although fluoride was incorporated into the hydroxyapatite crystal structure replacing the hydroxide ions, the overall mineral lattice remained unaltered, turning into fluorapatite only when the appropriate thermal energy was supplied to overcome the free-energy barrier for the phase transformation(27,28).

In contrast, when pure hydroxyapatite or even hydroxyapatite mixed with calcium fluoride is heated above 800°C, a decomposition process sets in and the corresponding Raman spectrum shows a mixture of hydroxyapatite and other compounds, mainly tricalcium phosphate(29). The top spectrum in Figure 4 is an example. In an analogous way, fluoride-substituted hydroxyapatite with 20% substitution or less exhibits a similar behaviour. Thus, after going through the amorphous-like state for annealing temperatures between 300°C and 600°C, its Raman spectrum revealed a mixture of hydroxyapatite and calcium phosphate rather than crystallizing into fluorapatite. These facts demonstrate that only a sufficiently fluoride-substituted hydroxyapatite can be transformed into fluorapatite by thermal annealing.

Raman spectra of not treated (natural) and remineralised dental enamel measured at ambient temperature conditions are shown in Figure 5A (green curves). Except for the small redshift of the ν_1 -mode by about 1 cm^{-1} due to the presence of carbonate ions in dental enamel(30,31), the Raman spectra of the fluoridated and non fluoridated teeth are similar to that of the

hydroxyapatite. Again and only after a heat treatment at a more elevated temperature of 1000°C the Raman spectra allowed us to distinguish between samples of different effective degree of fluoridation. Only NMTD treated teeth exhibit a blueshift in excess of 3 cm⁻¹ for the ν_1 -mode like in fluorapatite, whereas natural and CaF₂-treated teeth barely show a shift of about 1 cm⁻¹. But the most compelling evidence that NMTD fluoridated enamel did transform into the fluorapatite form is seen in the spectra of Figure 5B, where the spectral region of the ν_3 -phosphate vibrational modes is displayed. All main features like splittings and relative intensities of the Raman peaks observed for fluorapatite and NMTD treated enamel heated at 1000°C are identical. In contrast, the spectral features in the case of natural and CaF₂-treated enamel are similar to that of the hydroxyapatite spectrum. By comparing the results obtained for teeth with those from the synthetic minerals we are led to the conclusion that NMTD fluoridated dental enamel transforms to fluorapatite upon heating to 1000°C. This is a clear indication of the highly efficient fluoridation obtained with this method. On the contrary, dental enamel fluoridated with the method based on pH-cycling yields the same results as obtained with natural teeth which are not intentionally fluoridated.

There is an important difference between the behaviour upon heat treatment of synthetic minerals and teeth, which, is related to the fact that hydroxyapatite nanocrystals in human enamel are ordered in well defined patterns(32). Changes in the Raman spectra of minerals and teeth are qualitatively the same but the temperatures at which they occur in dental enamel are 100 to 200°C higher. For instance, at 700°C all enamel mineral samples remained in the amorphous-like deformation state observed for partially substituted hydroxyapatite between 300°C and 600°C. The crystallisation into the fluorapatite structure for the NMTD treated enamel or into a phase which resembles much hydroxyapatite in the case of natural and CaF₂ treated teeth was observed at 1000°C instead of 800°C (Figures 5A and 5B). This increased thermal stability of the biological mineral might have the same origin as the increased caries

resistance of human teeth(32) and the reduced solubility of the enamel's hydroxyapatite(33). Both effects are known to be determined by the spatial arrangement of hydroxyapatite crystals in the enamel, achieved during formation and growth of the teeth. In dental enamel there must be an additional interface energy associated with the crystal architecture(34), which raises the activation energy needed to achieve the structural phase transition which is, thus, observed at higher temperatures.

CONCLUSIONS

The monitoring of structural phase transitions of thermally treated apatite samples by means of Raman scattering provides a simple but powerful methodology for fluoridation assessment in fluoride-substituted hydroxyapatite based biomaterials like dental enamel. In this way, we have filled a long-standing gap between development and practical testing of teeth fluoridation methods. In fact, we demonstrate here that the fluoridation method based on pH cycling with CaF_2 , which works well for fluoridation of synthetic hydroxyapatite, is not efficient when applied to teeth. On the contrary, the use of controlled release ion-exchange resins (NMTD method) appears to be an extremely promising candidate for achieving almost complete fluoride incorporation into dental enamel as fluorapatite, with the consequent benefits for caries prevention. Thus, the presented method based on Raman scattering after thermal treatment of teeth samples is suitable for the assessment of fluoride treatments efficiency.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors thank Dr. S. Caselles for assistance in teeth collection and preservation and J.S. Reparaz for his help with the high pressure experiments. This work was supported by grants

from the I3P-CSIC (to P.D.L.) and from the Ministerio de Educación Cultura y Deporte (to M.C.).

REFERENCES

- (1) Attin T, Hartmann O, Hilgers RD, Hellwig E. Fluoride retention of incipient enamel lesions after treatment with a calcium fluoride varnish in vivo. *Arch.Oral Biol.* 1995 Mar;40(3):169-174.
- (2) Waszkiel D, Marczuk-Kolada G, Gradzka-Dahlke M. Efficacy of fluoride varnishes in the profilaxis of dental erosion. *Fluoride* 2006;39(1):49-52.
- (3) Yamazaki H, Litman A, Margolis HC. Effect of fluoride on artificial caries lesion progression and repair in human enamel: regulation of mineral deposition and dissolution under in vivo-like conditions. *Arch.Oral Biol.* 2007 Feb;52(2):110-120.
- (4) Driessens FC. Relation between apatite solubility and anti-cariogenic effect of fluoride. *Nature* 1973 Jun 15;243(5407):420-421.
- (5) Moreno EC, Kresak M, Zahradnik RT. Fluoridated hydroxyapatite solubility and caries formation. *Nature* 1974 Jan 4;247(5435):64-65.
- (6) deLeeuw NH. Resisting the Onset of Hydroxyapatite Dissolution through the Incorporation of Fluoride. *J. Phys. Chem. B* 2004;108(6):1809-1811.
- (7) Larsen MJ. Prevention by means of fluoride of enamel erosion as caused by soft drinks and orange juice. *Caries Res.* 2001 May-Jun;35(3):229-234.
- (8) Marinho VC, Higgins JP, Logan S, Sheiham A. Systematic review of controlled trials on the effectiveness of fluoride gels for the prevention of dental caries in children. *J.Dent.Educ.* 2003 Apr;67(4):448-458.
- (9) Wiegand A, Buchalla W, Attin T. Review on fluoride-releasing restorative materials-- fluoride release and uptake characteristics, antibacterial activity and influence on caries formation. *Dent.Mater.* 2007 Mar;23(3):343-362.
- (10) Kielbassa AM, Wrbas KT, Schulte-Monting J, Hellwig E. Correlation of transversal microradiography and microhardness on in situ-induced demineralization in irradiated and nonirradiated human dental enamel. *Arch.Oral Biol.* 1999 Mar;44(3):243-251.
- (11) Nyvad B, ten Cate JM, Fejerskov O. Microradiography of experimental root surface caries in man. *Caries Res.* 1989;23(4):218-224.
- (12) Boyde A, Jones SJ. Backscattered electron imaging of dental tissues. *Anat.Embryol.(Berl)* 1983;168(2):211-226.
- (13) Bjelkhagen H, Sundstrom F, Angmar-Mansson B, Ryden H. Early detection of enamel caries by the luminescence excited by visible laser light. *Swed.Dent.J.* 1982;6(1):1-7.

- (14) Attin T, Schaller HG, Hellwig E. Fluoride uptake in dentin with and without simulating dentinal fluid flow. *Clin.Oral Investig.* 1997 Sep;1(3):125-130.
- (15) Weatherell JA, Robinson C, Hallsworth AS. Changes in the fluoride concentration of the labial enamel surface with age. *Caries Res.* 1972;6(4):312-324.
- (16) Thuy TT, Nakagaki H, Ha NT, Morita I, Tatematsu M, Lan HA, et al. Fluoride profiles in premolars after different durations of water fluoridation in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Arch.Oral Biol.* 2003 May;48(5):369-376.
- (17) Corno M, Busco C, Civalleri B, Ugliengo P. Periodic ab initio study of structural and vibrational features of hexagonal hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. *Phys.Chem.Chem.Phys.* 2006 Jun 7;8(21):2464-2472.
- (18) Peroos S, Du Z, de Leeuw NH. A computer modelling study of the uptake, structure and distribution of carbonate defects in hydroxyapatite. *Biomaterials* 2006 Mar;27(9):2150-2161.
- (19) Gross KA, Rodriguez-Lorenzo LM. Sintered hydroxyfluorapatites. Part II: Mechanical properties of solid solutions determined by microindentation. *Biomaterials* 2004;25(7-8):1385-1394.
- (20) Wei M, Evans JH, Bostrom T, Grondahl L. Synthesis and characterization of hydroxyapatite, fluoride-substituted hydroxyapatite and fluorapatite. *J.Mater.Sci.Mater.Med.* 2003 Apr;14(4):311-320.
- (21) Qu H, Wei M. Synthesis and characterization of fluorine-containing hydroxyapatite by a pH-cycling method. *J.Mater.Sci.Mater.Med.* 2005 Feb;16(2):129-133.
- (22) Valiente M, inventor. Sociedad Limitado para el Desarrollo Cientifico Aplicado, assignee. Remineralizing material for organomineral tissues. USA patent US 6,413,498 B1. 2002 Jul, 6, 1999.
- (23) Jenkins GN. Review of fluoride research since 1959. *Arch.Oral Biol.* 1999;44(12):985-992.
- (24) Raman scattering results for fluoridated hydroxyapatite under hydrostatic pressure using a diamond anvil cell will be published elsewhere.
- (25) Velisavljevic. Bioceramic hydroxyapatite at high pressures. *Appl.Phys.Lett.* 2003;82(24):4271.
- (26) Venkateswaran UD, Cui LJ, Weinstein BA, Chambers FA. Forward and reverse high-pressure transitions in bulklike AlAs and GaAs epilayers. *Phys. Rev. B* 1992 Apr 15;45(16):9237-9247.
- (27) Zahn D, Hochrein O. A Molecular Dynamics Simulation Study of (OH⁻) Schottky Defects in Hydroxyapatite. *Z. Anorg. Allg. Chem.* 2005;631(6-7):1134-1138.
- (28) Suda H, Yashima M, Kakihana M, Yoshimura M. Monoclinic - Hexagonal Phase Transition in Hydroxyapatite Studied by X-ray Powder Diffraction and Differential Scanning Calorimeter Techniques. *J. Phys. Chem.* 1995;99(17):6752-6754.

- (29) Qu H, Vasiliev AL, Aindow M, Wei M. Incorporation of fluorine ions into hydroxyapatite by a pH cycling method. *J.Mater.Sci.Mater.Med.* 2005 May;16(5):447-453.
- (30) Penel G, Leroy G, Rey C, Bres E. MicroRaman spectral study of the PO₄ and CO₃ vibrational modes in synthetic and biological apatites. *Calcif.Tissue Int.* 1998 Dec;63(6):475-481.
- (31) Chakraborty S, Bag S, Pal S, Mukherjee AK. Structural and microstructural characterization of bioapatites and synthetic hydroxyapatite using X-ray powder diffraction and Fourier transform infrared techniques. *J. Appl. Cryst.* 2006 Jun;39(3):385-390.
- (32) Cevc G, Cevc P, Schara M, Skaleric U. The caries resistance of human teeth is determined by the spatial arrangement of hydroxyapatite microcrystals in the enamel. *Nature* 1980 Jul 24;286(5771):425-426.
- (33) Tang R, Wang L, Orme CA, Bonstein T, Bush PJ, Nancollas GH. Dissolution at the Nanoscale: Self-Preservation of Biominerals. *Angew. Chem. Int. Edit.* 2004;43(20):2697-2701.
- (34) Du C, Falini G, Fermani S, Abbott C, Moradian-Oldak J. Supramolecular assembly of amelogenin nanospheres into birefringent microribbons. *Science* 2005 Mar 4;307(5714):1450-1454.

FIGURES

Figure 1

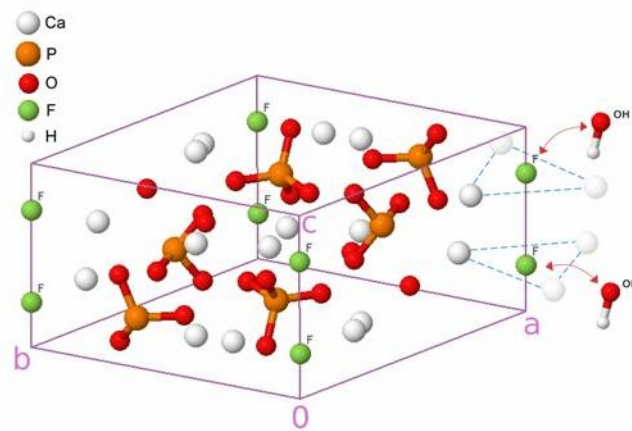


Figure 2

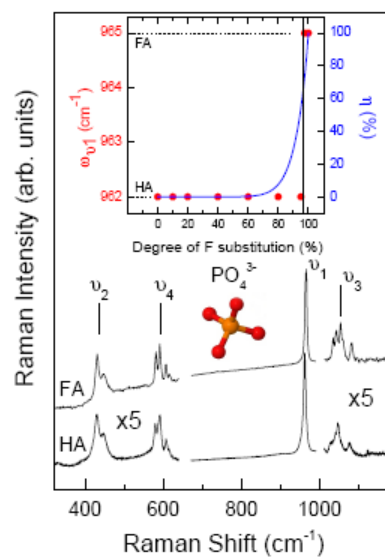


Figure 3

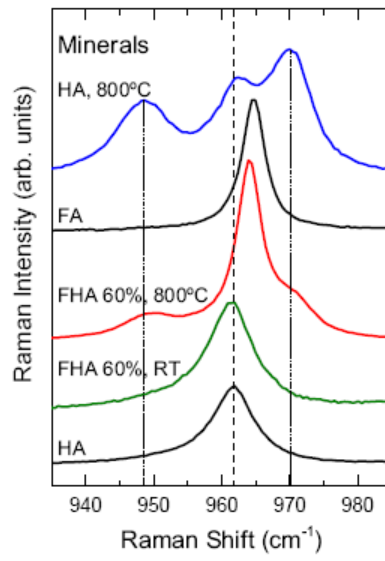


Figure 4

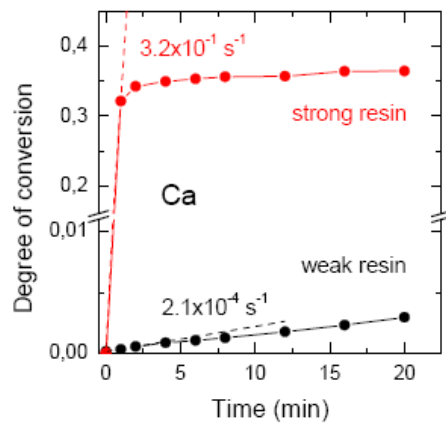
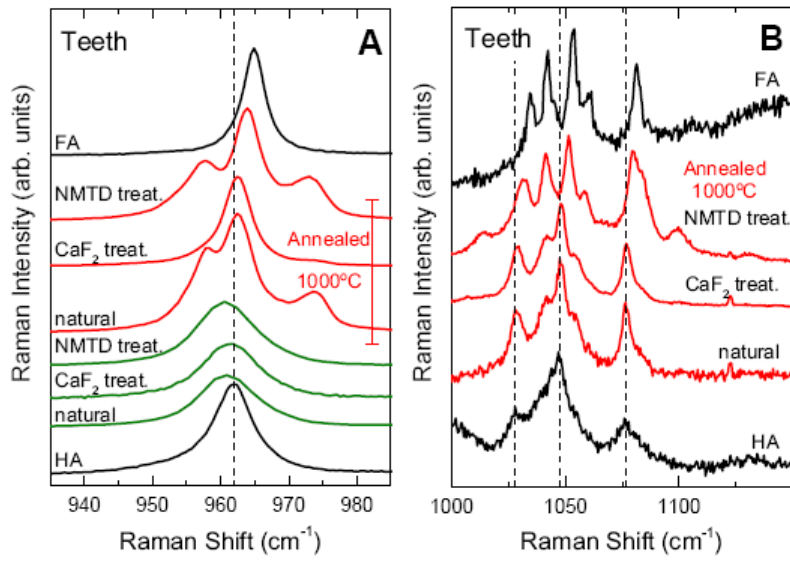


Figure 5



CAPTIONS

Figure 1: Crystal unit cell of fluorapatite (space group $P6_3/m$; $a = b = 9.368 \text{ \AA}$, $c = 6.884 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$) (ICDD PDF n° 15-0876). Hydroxyapatite has the same hexagonal structure, differing only in the substitution of all fluoride ions by hydroxide ions (ICDD PDF n° 09-0432). The apatite crystal structure is characterised by six-fold Ca columns running parallel to the c-axis, which in these cases contain either the F^- or OH^- ions in their central voids, each of them being coordinated to three surrounding calcium ions in the same a,b plane (17,18). Six tilted phosphate tetrahedral units (PO_4^{3-}) share the space within the Ca columnar cage.

Figure 2: Release profiles of calcium ions from strong (red) and weak (black) ion-exchange resins to an artificial saliva solution. The release rates given by the initial slopes are indicated. Mean particle size of the solid resins for both samples was refined below $50 \mu\text{m}$ in diameter. The release rate of the weak resin, which is at least three orders of magnitude slower than for the strong one, favours the formation of fluorapatite against other undesired by-products like calcium phosphate and calcium fluoride precipitates.

Figure 3: Representative Raman spectra of hydroxyapatite (HA) and fluorapatite (FA) in the spectral region of the phosphate (PO_4^{3-}) vibrations. The main Raman peak denoted as ν_1 corresponds to a symmetric mode which involves mainly the vibration of the P central atom of the tetrahedral unit. Other oxygen-phosphorous vibrations give rise to groups of Raman lines labelled ν_2 , ν_3 and ν_4 , whose splittings are due to the fact that the O atoms of the phosphates occupy non-equivalent crystallographic positions. The inset shows (closed symbols) the peak position of the ν_1 mode measured in pure HA and FA minerals and in a series of fluoridated hydroxyapatite samples (FHA) with different F concentrations. The solid line represents the results of a simple statistical calculation of the fraction η of fully F-substituted clusters composed of three adjacent primitive hexagonal unit cells for a FHA crystal of given F concentration.

Figure 4: Raman spectra of 60% fluoride-substituted hydroxyapatite (FHA) before (green) and after heat treatment at 800°C (red) in the spectral region of the main phosphate vibrational mode ν_1 . For comparison we show the spectra (black) of pure hydroxyapatite (HA) and fluorapatite (FA). The top spectrum (blue) corresponds to a hydroxyapatite mineral sample heated for half hour to 800°C, which exhibits a broadening but no shift of the ν_1 mode and the appearance of two side peaks marked with dotted lines. Exactly these two peaks are present in Raman spectra measured on calcium phosphate, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, one of the decomposition products of heat-treated HA. The spectrum of 60% fluoridated hydroxyapatite annealed at 800°C also shows traces of calcium phosphate but none of HA.

Figure 5: Raman spectra in the spectral region (A) of the main phosphate vibrational mode ν_1 and (B) in that of the ν_3 symmetric O-P phosphate vibrations of natural teeth and teeth treated with two different fluoridation methods: pH cycling in a CaF_2 solution and using a controlled-release material (NMTD) based on an ion-exchange resin. Green curves correspond to spectra taken at ambient conditions and red curves represent spectra measured on the same teeth after annealing at 1000°C. For comparison we show the spectra (black) of pure hydroxyapatite (HA) and fluorapatite (FA). In the high temperature spectra of part (A), for all three tooth specimens two Raman bands are apparent at higher and lower frequencies of the main ν_1 mode. The former is again assigned to a calcium phosphate mode, whereas the latter is tentatively attributed to the temperature-induced formation of A-carbonated HA (substitution of hydroxide by carbonate ions) (18,30) present in dental enamel.

Elsevier Editorial System(tm) for Dental Materials

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Effect of iron(III) on the kinetics of a commercial whitener containing carbamide peroxide

Article Type: Research Paper

Section/Category:

Keywords: whitening enhancement; Fenton type reaction

Corresponding Author: Mr. Marc Campillo,

Corresponding Author's Institution: Universitat Autònoma de Barcelona

First Author: Marc Campillo

Order of Authors: Marc Campillo; Anna Torrado; Johannes L Gonzalez; Carlos A Muñoz; Manuel Valiente

Manuscript Region of Origin:

Abstract: Objectives: The present study aims to characterize the effect of the presence of Fe (III) on the whitening kinetics of a carbamide peroxide commercial whitener.

Methods: Bovine teeth were embedded in acrylic resin and polished to obtain a smooth flat surface of enamel. Specimens were subjected to a staining procedure and then bleached by the application of either the commercial whitener or the whitener modified by the addition of FeCl₃ solution during different periods of time. Fe (III) concentrations ranging from 1.9 to 7.6 mM and treatment times from 6 to 20 minutes were studied. Differences in the L* parameter of the L*a*b color space were recorded and whitening % was calculated.

Results: ANOVA data treatment did not reveal significant differences between the whitening % of the specimens treated in presence or absence of Fe(III). However, kinetic whitening rates show an enhancement with Fe (III) concentration.

Significance: Fenton type reactions may be applied to the acceleration of the dental whitening process. The Fe (III) ability to generate OH* radicals from H₂O₂ can also take place in the whitening gel media.

**Effect of iron(III) on the kinetics of a commercial whitener
containing carbamide peroxide**

Marc Campillo 1, Anna Torrado 1, Johannes L. Gonzalez 1, Carlos A. Muñoz 2 and
Manuel Valiente 1

1 Centre GTS, Dept. de Química, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra
(Barcelona), Spain

2 Dept of Restorative Dentistry, University at Buffalo, Buffalo, New York, USA

Acceleration of whiteners

Corresponding author details:

Marc Campillo

Centre Grup de Tècniques de Separació

Departament de Química

Edifici CN, Campus UAB

08193 Bellaterra, Cerdanyola del Valles

(Barcelona)

Spain

Phone: +34 93 581 4638

Fax: +34 93 581 2379

e-mail: Marc.Campillo@uab.es

1. Introduction

Fuelled by patients desired for an esthetic smile, bleaching has become one of the most popular and common aesthetic procedures in modern dentistry. It is a relatively easy and conservative procedure compared to other forms of restorative treatment such as crowns or veneers. At home dentist-prescribed treatment was the first mode of treatment for whitening. However the patients quest for a faster procedure lead to the development of higher concentrations of hydrogen peroxide and the use of light activators to accelerate the procedure. These procedures commonly known as in-office power bleaching techniques have gained popularity in an ever faster moving world and the quest for instant gratification.

There are several peroxide sources that are commercially available and they all rely on the same chemistry: whitening by hydrogen peroxide and in the foreseeable future, hydrogen peroxide will continue to be the primary agent used to whiten teeth [1]. The focus for improving the performance of whitening agents is to accelerate the reaction of hydrogen peroxide to improve the whitening performance.

Among the different methods to accelerate the whitening process is the use of some form of light source [2-5]. These combinations of different light sources and different bleaching products have created a variety of systems sold in the market that in many cases have unsubstantiated whitening claims by the manufacturers. They all work by matching the energy required to excite or activate the peroxide or organic stains into a higher energy state. If the energy match is not achieved, then the light will be converted into heat [6].

Another method is the addition of chemical activators and the use of natural sources of hydrogen peroxide [1]. One such method is the addition of manganese gluconate to toothpaste which showed that it enhances tooth whitening efficacy [4]; and the use of L-amino Acid Oxidase and Aminoacids such as hydroxyproline which convert oxygen from the air to hydrogen peroxide [7].

Metal activation of hydrogen peroxide and other peroxide compounds have the potential for improving the performance of whitening products [8, 9]. Dental whiteners based on carbamide peroxide achieve the teeth whitening effect by means of the generation of hydrogen peroxide and his reaction with double bonds that are responsible of the color of tooth stains. This sort of reaction may be accelerated in some cases by the addition of iron (II) or iron (III). Those are known as the Fenton and the Fenton type reactions respectively.

The aim of this study is to characterize the iron effect on the whitening kinetics of a commercial whitener. The final goal is to optimize the iron concentration that needs to be added to the original whitener to get the best process efficacy.

2. Materials and methods

Specimen preparation

Sixty three freshly extracted bovine intact incisors were kept in 0.5% (w/w) chloramine-T water solution until mounted in acrylic resin. Teeth selected for the study were cut and roots removed. When necessary, pulp was extracted using forceps. Teeth were embedded in acrylic resin (Probase Cold, Ivoclar Vivadent, Shaan, Liechstenstein) positioning the labial side facing the outer side of the specimen. Once the polymer was set, specimens were lightly polished using water paper P-200, P-600 and P-1500, respectively, avoiding the exposure of dentine. The first water paper was used to expose the tooth surface and the two last papers made the surface smooth. This allows for precise tooth color measurements.

The whitening material (15% carbamide peroxide, VivaStyle, Ivoclar Vivadent, Shaan, Liechtenstein) was purchased in the open market from a dental wholesaler.

In order to enhance the staining process, specimens were sequentially exposed to solutions of HCl 0.12 M for 60 seconds, saturated NaCO₃ for 30 seconds and again HCl 0.12 M for 60 seconds. This etching process allows colored substances to penetrate deeply in the tooth. After the etching process, teeth were rinsed with deionised water for 1 minute.

The staining solution was prepared with 1600 ml of tea (Hornimans Classic Tea, Sara Lee Southern Europe, Spain), 5.5 g of soluble coffee (Natural coffee, Carrefour, Spain) and 4 g of gastric mucin (Gastric mucin powder, American Laboratories Inc., USA). After mixing all the components, the solution was kept at 37°C and stirred using a special designed device that stirs the solution with the specimens for 7 days. Once this

period was finished, specimens were washed and kept in water until measured. The solution was renewed every 24 hours [10].

Specimens were randomly divided in seven groups containing nine specimens each group. Group size was calculated in order to distinguish variations of 3 units of the L parameter of the color space considering $\alpha=0.05$ and $\beta=0.8$ and standard deviation values obtained in preliminar studies conducted previously. Each group was treated with different amounts of iron added to the whitener:

Group 0: pH Blank. 0mM Fe(III). (1syringe + 300 μ l 0.03 M HCl for whitening step)

Group 1: Reference. Original commercial whitener. (1 syringe for whitening step)

Group 2: Level I. 1.9 mM Fe (III), (1 syringe + 75 μ l FeCl₃ 76 mM for whitening step)

Group 3: Level II. 3.8 mM Fe (III), (1 syringe + 150 μ l FeCl₃ 76 mM for whitening step)

Group 4: Level III. 5.7 mM Fe (III), (1 syringe + 225 μ l FeCl₃ 76 mM for whitening step)

Group 5: Level IV. 7.6 mM Fe (III), (1 syringe + 300 μ l FeCl₃ 76 mM for whitening step)

A pH control of each whitening formulation used was performed before the study in order to assess the influence of the FeCl₃ solution on the whitener pH. This factor may be relevant in two different ways. Low pH values can demineralize teeth and could be harmful to the enamel. On the other hand, the Fenton type reaction is promoted by acidic pH values, which increase the availability of non complexed iron (III) ion. The relative pH of each formulation was determined using 1 dose (1 syringe + additive)

diluted in 25 ml of water. Solution pH was measured using a glass electrode (Crison 52-02, Spain) connected to a potentiometer (EDT Instruments series 3, England).

Measurement of the whitening effect

The colour of the stained specimens was measured using a Minolta CR-321 colorimeter using the L parameter, from the L*a*b colour space [11]. After the first set of measurements was made, the position of each specimen was marked in order to perform all the measurements on the same point.

The whitening treatment was performed extending the whitener or the modified whitener with the corresponding composition on the specimens' surface using a small plastic spatula. Specimens were kept in a plastic tray with the tooth facing the tray at 37 °C during the whitening time. The whitening steps were designed to study the kinetics of the first minutes of the process:

1st step: 6 minutes

2nd step: 3 minutes (9 minutes of total whitening)

3rd step: 5 minutes (14 minutes of total whitening)

4th step: 6 minutes (20 minutes of total whitening)

After each step, specimens were rinsed with water and gently brushed with a soft toothbrush for 20 seconds to remove the whitener from the tooth surface. Then, the colour was measured.

The whitening ratio was calculated as:

$$\%whitening = \frac{L_t - L_s}{L_s} \cdot 100$$

Where L_t is the L* chromameter value for specimen after the treatment and L_s is the L* chromameter value for specimen before the treatment

Data obtained were studied using ANOVA to detect the existence of significant differences. In case of differences among the means, a Student Newman Keuls test was used to identify such differences. All the statistical tests were conducted at the 95% confidence level.

3. Results

Effect of whitener modification

Low pH values can demineralize teeth whereas Fenton type reaction is promoted by acidic pH values due to the higher availability of free iron (III) ion.

The larger volumes of iron (III) ion solution added (pH=1.54) to the commercial whitening material the lower pH values are obtained as can be appreciated from Figure 1 where there is a linear relationship between the concentration of Fe^{3+} and H^+ at the commercial whitening material.

<Figure 1>

A slight modification of the pH value of the whitener is observed. The pH difference between the unmodified whitener and the whitener modified with the largest volume of FeCl_3 is 0.4 pH units. This pH difference is not expected to have any influence neither in the tooth mineral nor in the iron complexation.

Regarding the possible differences in the whitener performance induced by its dilution when the modifying iron solution is added, no differences between Group 0 (whitener modified with HCl solution) and Group 1 (original whitener) were observed at any of the treatment times studied.

Whitening values

Whitening % values after each whitening step show an increase on the whitening percentage with the whitening time for all studied groups. During the first six minutes

whitening values around 10% are achieved. After three more minutes, whitening values are close to 15%. The whitening values increase up to 20% after 14 minutes of total whitening time and up to 25 – 30 % after 20 minutes of treatment.

ANOVA

Table 1 shows calculated and critical F values for each of the specimen groups and each whitening step.

<Table 1>

ANOVA does not show any significant differences between the reference group and the groups with iron added to the whitener.

Kinetics

Figure 2 shows kinetic data of the whitening process for the different groups.

<Figure 2>

As observed, differences between the various kinetic curves are very small.

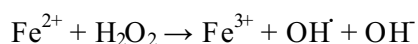
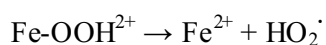
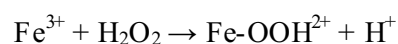
<Figure 3>

In Figure 3, it is observed that small amounts of iron decrease the initial speed values of the process but the original speed can be achieved again by increasing the iron concentration. This suggests a double effect of the iron on the whitening process.

4. Discussion

Previous in-vitro investigations have evaluated color changes after whitening using bovine teeth [12, 13]. As the chemical composition and structure of bovine teeth are similar compared with human teeth, bovine dental hard tissues are frequently used as a substitute for human teeth in investigations [14-16]

Iron concentrations added to the whitener and treatment times were chosen after a preliminary screening study. Fe concentrations and the applied treatment times were selected in order to minimize both parameters. The observed increase on the whitening rate with the increase of iron concentration may be attributed to the increase of OH radicals by the catalytic Fe (III) effect. Such effect is consistent with the Fenton type reaction when using Fe (III) by the following mechanism, which has been widely studied [17]:



Whitening % values were used because of they are directly related to differences in the L parameter (value) of the color space. Differences in L were studied instead of ΔE differences because the L parameter expresses the lightness or darkness of a color, while E is related to of the mean change in color. The use of whitening % instead of ΔL or ΔE was due to the normalization of the whitening %, which is less affected by the differences between target teeth.

Besides the process acceleration, iron can have another effects interfering on the whitening process. Part of the iron used to catalyze the whitening process might be absorbed by the tooth and be responsible for a staining effect, which would partially neutralize the increase of whitening rate by the presence of iron. On the other hand, the later increase of the whitening rate with Fe(III) concentration is consistent with the Fenton type mechanism that overcome the initial staining effect of the low iron to lead a faster bleaching process.

5. Conclusions

Most important finding in the present study concerns with the observed increase on the whitening speed when iron concentration increases. Such effect can be attributed to the generation of OH[·] radicals by the catalytic Fe(III) effect on the H₂O₂.

References

1. Viscio D, Gaffar A, Fakhry-Smith S, Xu T. Present and future technologies of tooth whitening. *Compend Contin Educ Dent Suppl*, 2000; 28:S36-43.
2. Jone AH, Diaz-Arnold AM, Vargas MA, Cobb DS. Colorimetric assessment of laser and home bleaching techniques. *J Esthet Dent*, 1999; 11:87-94.
3. ADA council on scientific Affairs: Laser assisted bleaching: an update. *J Am Dent Assoc*. 1998; 129:1484-1487.

4. Gaffar A, Fakhry-Smith S. Oral composition having accelerated tooth whitening effect. US patent 5,648,064. July 15, 1997.
5. Sulieman M, MacDonald E, Rees JS, Addy M. Comparison of three in-office bleaching systems based on 35% hydrogen peroxide with different light activators. *Am J Dent.* 2005;18: 194-197.
6. Luk K, Tam L, Hubert M. Effect of light energy on peroxide tooth bleaching. *J Am Dent Assoc.* 2004; 135:194-201.
7. Geng X, Li K, Xu F. Investigation of hydroxamic acids as laccase-mediators for pulp bleaching. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004; 64: 493-496.
8. Ziembra SL, Felix H, MacDonald J, Ward M. Clinical evaluation of a novel dental whitening lamp and light-catalyzed peroxide gel. *J Clin Dent.* 2005;16: 123-127.
9. Kawamoto K, Tsujimoto Y. Effects of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching. *J Endod.* 2004; 30: 45-50.
10. Sulieman M, Addy M, Rees JS. Development and evaluation of a method in vitro to study the effectiveness of tooth bleaching. *J Dent.* 2003; 31:415-422
11. Cronin MJ, Charles CA, Zhao Q, Dembling WZ. Comparison of two over-the-counter tooth whitening products using a novel system. *Compend Contin Educ Dent.* 2005; 26:140, 142, 144-148.

12. Wiegand A, Vollme D, Foitzik M, Attin R, Attin T. Efficacy of different whitening modalities on bovine enamel and dentin. *Clin Oral Investig.* 2005;9: 91-97.
13. Attin T, Manolakis A, Buchala W, Hannig C. Influence of tea on intrinsic colour of previously bleached enamel. *J Oral Rehabil*; 2003; 30: 488-494.
14. Ten Cate JM, Arends J. Remineralization of artificial enamel lesions in vitro. *Caries Res.* 1977;11: 277-286.
- 15.- Ruse, ND, Smith DC, Torneck CD, Titley KC. Preliminary surface analysis of etched, bleached, and normal bovine enamel. *J Dent Res.* 1990: 69:1610-1613.
16. Schilke R, Lisson JA, Bauss O, Geurtsen W. Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. *Arch Oral Biol.* 2000; 45: 355-361.
17. Neyens E, Baeyer J. A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique. *Journal of Hazardous Materials B.* 2003; 98: 33-55.

Figure 1

[Click here to download high resolution image](#)

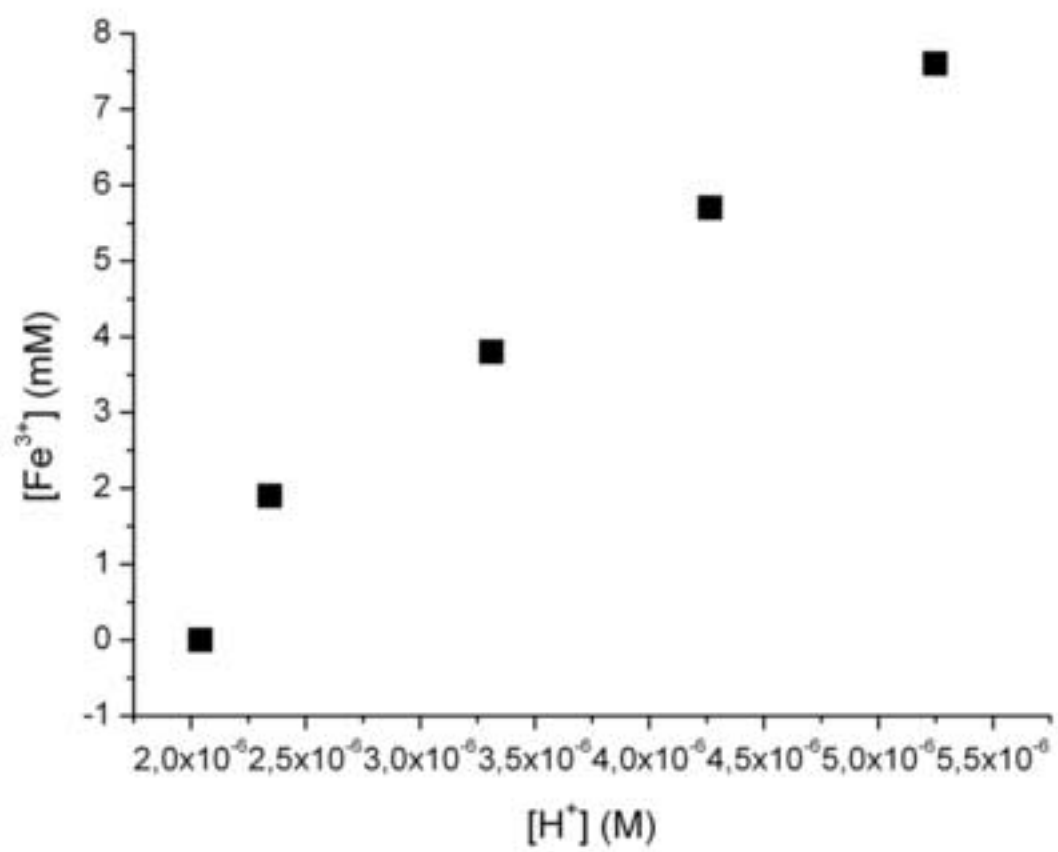


Figure 2

[Click here to download high resolution image](#)

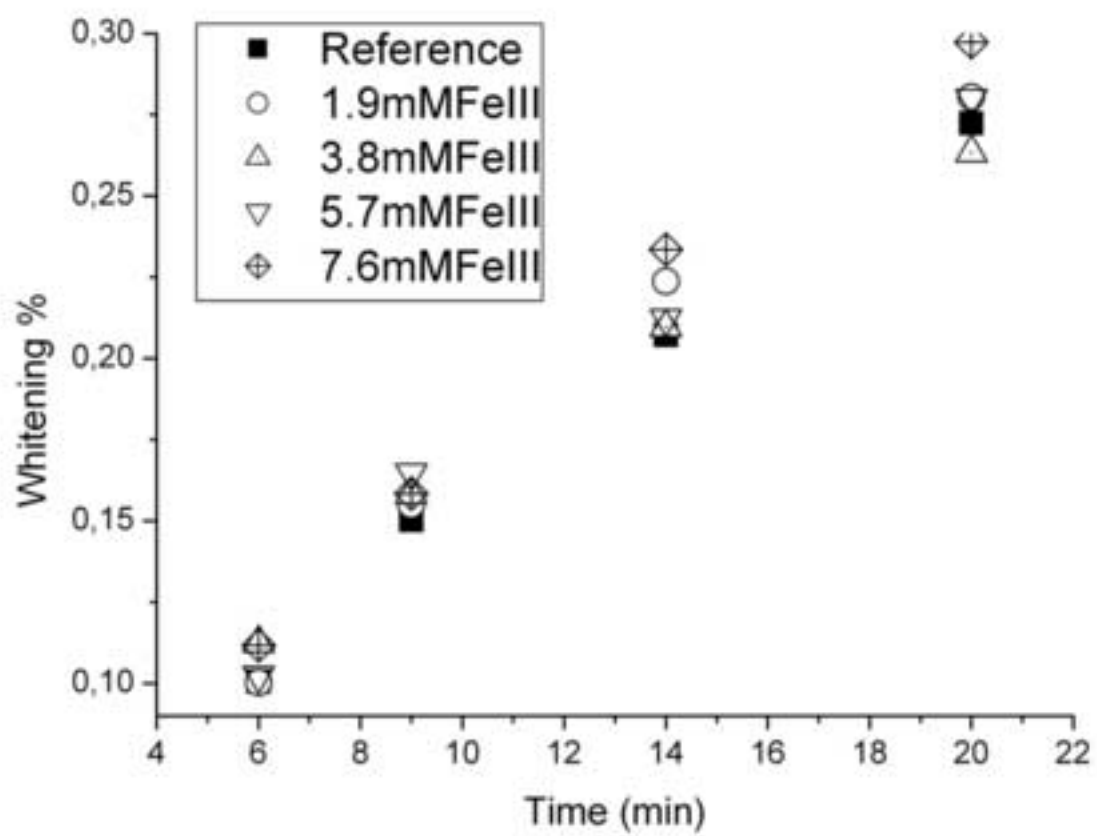
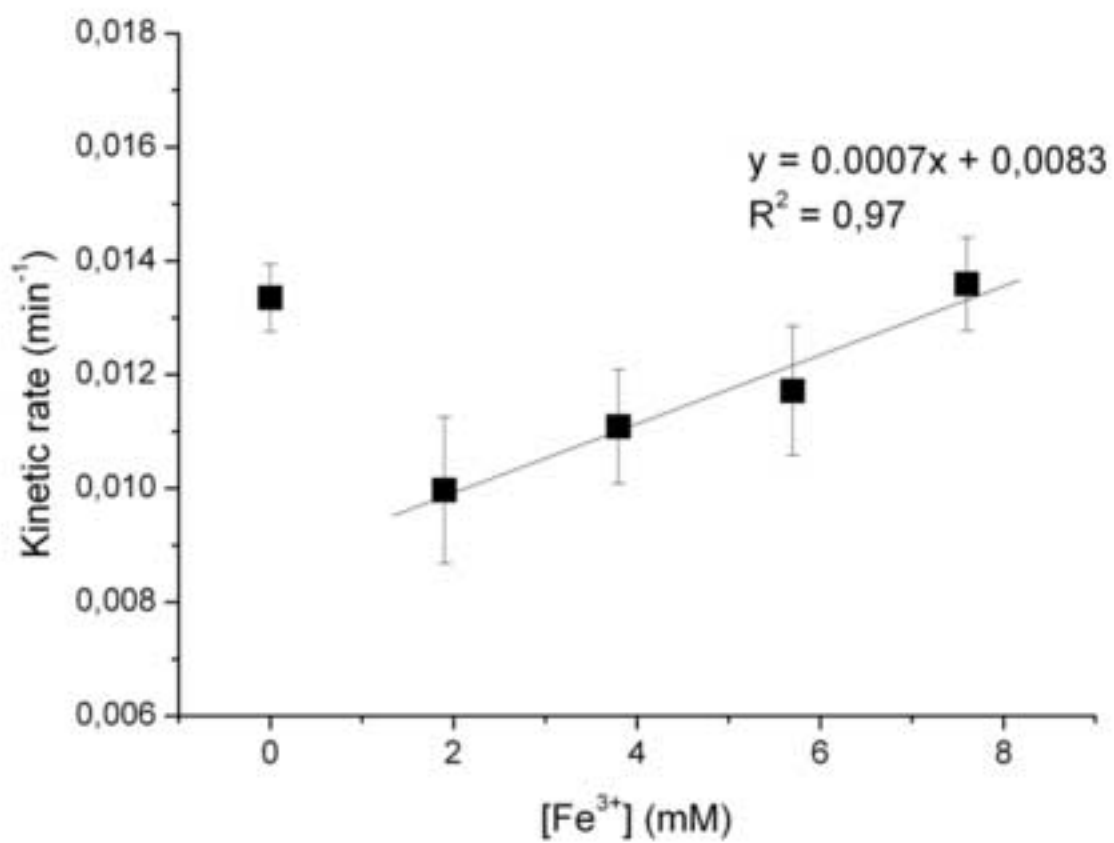


Figure 3

[Click here to download high resolution image](#)



Tables

		6 min		9 min		14 min		20 min	
Groups		F _{calc}	F _{crit}	F _{calc}	F _{crit}	F _{calc}	F _{crit}	F _{calc}	F _{crit}
1	2	2,152	4,600	3,465	4,600	0,87	4,600	2,824	4,747
1	3	3,155	4,600	2,211	4,600	1,662	4,543	3,027	4,600
1	4	0,059	4,600	0,821	4,600	0,208	4,600	0,809	4,667
1	5	2,000	4,600	3,146	4,543	3,102	4,667	2,015	4,600

Captions

Table 1: ANOVA results

Figure 1: Measured $[H^+]$ in 25 ml for original and modified whitener

Figure 2: Kinetic data plotted as whitening% vs time

Figure 3: Influence of the amount of iron on the whitening kinetics

Els treballs recollits en la present Tesi Doctoral han estat focalitzats a la caracterització i millora de propietats dels materials dentals, tot desenvolupant metodologies que en permetin l'avaluació.

La Tesi que es presenta s'ha estructurat en tres blocs. En primer lloc, s'ha desenvolupat un adhesiu dental amb propietats d'alliberació de fluorur mitjançant la modificació d'un producte comercial amb la inclusió d'una resina de bescanvi iònic carregada amb aquest ió i s'han caracteritzat tant l'alliberació del ió fluorur del nou material com la seva força d'adhesió. En segon lloc, s'han estudiat nous mètodes d'anàlisi basats en la difracció de raigs X i l'espectroscòpia Raman destinats a estudiar la incorporació de fluorur al mineral dental, tot determinant l'especiació de calci a l'esmalt dental. Finalment, s'ha estudiat l'efecte de l'addició de Fe(III) a un blanquejador dental basat en peròxid de carbamida per tal d'estudiar la possibilitat d'acceleració del procés de blanqueig per mitjà d'una reacció tipus Fenton.



Centre Grup de Tècniques de Separació en Química

Universitat Autònoma de Barcelona
Bellaterra

