

**Aplicación de Microscopia Electrónica y  
Radiación Sincrotrón al Estudio de  
Materiales y Procesos Avanzados para la  
Salud y la Estética Dental**

**Pilar Ortiz Alías**  
**Tesis Doctoral**

**Director: Manuel Valiente**  
**Año 2012**





**Aplicación de Microscopia Electrónica y Radiación  
Sincrotrón al Estudio de Materiales y Procesos  
Avanzados para la Salud y la Estética Dental**

Pilar Ortiz Alías

Tesis Doctoral

Programa de doctorat en Química

Director: Manuel Valiente Malmagro

Departament de Química

Facultat de Ciències

Any 2012

Memoria presentada para aspirar al Grado de Doctor por

Pilar Ortiz Alías

Visto bueno, el director

Dr. Manuel Valiente Malmagro

Bellaterra, 26 de Setiembre de 2012

*Once upon a time a little and cute girl, who cried when standing longer than 2 minutes at the sunlight, was born. Immediately, she knew she had been born for saving the world population teeth from the evil bacteria causing caries...*

**s,H**

Los estudios que se recogen en la presente memoria se han desarrollado dentro de los proyectos de investigación que se llevan a cabo en el Centro Grup de Tècniques de Separació en Química de la Universitat Autònoma de Barcelona gracias a los siguientes proyectos:

- Al Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) el soporte económico para la realización de los estudios gracias a la concesión del proyecto CTQ2009-07432 (Subprograma PPQ).
- Al proyecto SOWAEUMED (referencia 245843) por el soporte económico para la realización de dos estancias (de mes y medio cada una) en el KTH Material Chemistry Division (Stockholm. Sweden).
- Al Sincrotrón SOLEIL por la concesión de dos becas: Proposal 20100419 y Proposal 20101061 dentro de los programas European support ELISA (TNA program), facilitando las instalaciones, la ayuda económica y la asistencia del personal en las instalaciones de SMIS beamline.

## Summary

---

---

Title: *Electronic Microscopy and Synchrotron Radiation Applied to the Study of Materials and Processes for Advanced Dental Care and Aesthetics.*

The health of our teeth and mouth are linked to overall health and well-being in a number of ways. The ability to process our food for obtaining the nutrients, maintaining high self-esteem and a good speech are some of important reasons to preserve a good oral care and healthy teeth. Dental diseases impose both financial and social burdens as treatment is costly and require time. All these causes make oral care to reach a very high interest in both scientific and social communities. From the scientific side, oral health is a multidisciplinary field where scientifics from different areas are interested and contribute in the development of new knowledge and novel goals. In the present work, the studies are developed from Analytical Chemistry area and are focused to three main targets: teeth remineralisation process, dental aesthetics represented by teeth whitening and prevention of dental calculus.

The most common oral diseases are dental caries, 60-90% children and nearly 100% of adults suffer this illness, often leading to pain, discomfort and occasionally the loss of tooth. Dental caries is an infection, usually bacterial in the origin, that causes demineralization of the hard tissues (enamel, dentin and cementum) and the destruction of the organic matter of dental tissues due to the production of acid by hydrolysis of the food that remains accumulated on the teeth surface. Hydroxyapatite, as the main component of tooth enamel, undergoes a continuous cyclic demineralization and remineralization process. Protective factors which include salivary calcium, phosphate and proteins, salivary flow and fluoride in saliva can balance, prevent or reverse dental caries. Fluoride administration is one of the main caries prevention agents. Fluoride works primarily via topical mechanisms which include (1) inhibition of demineralization at the crystal surfaces of the tooth, (2) enhancement of remineralization at the crystal surfaces (the resulting remineralized layer is very resistant to acid attack), and (3) inhibition of bacterial enzymes. The formation of a layer of fluoroapatite in the external enamel is one important goal of the present studies, thus providing higher mechanical strength and acid resistance against the caries process.

Most of the fluoride release systems developed up to now are inefficient for that purpose, since the release mechanism is not appropriate to generate fluoroapatite and only phosphate calcium species are obtained.

In this first part of the work, two ion-exchange systems have been studied, macro and nanoparticles, loaded with fluoride and the other remineralizing ions. The macrosystem consist 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. This product has been developed by our group several years ago under the name of NMTD and is being tested to the application in commercial products. The second system is based on the appropriate derivatization of silica nanoparticles. Nowadays, nanosystems are being developed because of their technological advantages in several fields including drug carriers due to the high stability, high carrier capacity and feasibility of variable routes of administration and non-



toxicity matrix. The nanoparticles can be modified in order to control the ion release for its application on teeth treatments. The present study is one of the primary steps towards the development and design of advanced bionanomaterial for future application in restorative dentistry. For this purpose, several conditions were tested in order to obtain the highest loading of target ions in the particular nanoparticles system. In addition, it is known the importance of specific proteins in the formation process of dental tissues, in particular, the structure of dental enamel. In this work, the results obtained in presence of amelogenin are evaluated when each of the two remineralization systems under study are applied in the mineralization process.

A wide number of methods based on different techniques have been proposed to evaluate the teeth mineral content and the results from fluoridation processes. These techniques can estimate the mineral content but can not reveal the spatial position and/or chemical speciation in dental tissues. In the present work Raman scattering and Infrared microspectroscopy have demonstrated the ability to determine the presence and spatial distribution of chemical species present in dental materials by obtaining high quality spectra at high spatial resolution. Additionally, scanning electro microscope technique allowed a better assessment of the apatites created in the tooth surface and has enabled the observation of the enamel surface of both reference and treated samples before and after the treatments.

Concerning the results, Raman and synchrotron IR microscopy techniques reveal differences in morphology and composition between treated and reference samples. Characteristic Raman and IR shift for fluorapatite material are observed in the external layer of treated samples. On the contrary, both the dentin, internal and intermediate enamel layers presents strong similarities with the hydroxyapatite reference spectra. The observation of surface thoughts scanning microscope show the importance of proteins (amelogenin in this study) during the remineralization process. The surface of samples treated in presence of amelogenin present organized calcium phosphate crystals attributed to the control role of the protein on the crystallization and enamel formation.

The second part of the present work consists on a modification of a commercial dental whitener product to enhance the bleaching results. The application of a Fenton-like reaction in the process of bleaching provided a powerful source of hydroxyl radicals obtaining faster results. The problem of staining emergence caused by iron ions from Fenton reaction is solved using a zeolite system which fix the cations in its matrix. The main purpose is to study the catalytic effect when a commercial whitening material is applied in presence of both oxidation states Fe (II) and Fe (III). The results show an increase in the whitening speed with the amount of added Fe (III). In the case of Fe (II), the need to add a relatively high resin quantity produces a decrease of the whitening results. This fact is indicative of a possible kidnapping effect of free radicals as hydroxyl radical by zeolite material, causing a decrease of the whitening speed.

Finally, the study of a novel antitartar system based on the *in-vitro* inhibition of oxalate calculi formation was realized. The system exploits the synergism effects between phytate and pyrophosphate as crystallization inhibitors. The binary mixture produces an inhibition effect in calculi crystallization in synthetic saliva, increasing the inhibition when the amount of inhibitor

increases. Its harmless characteristics to possible enamel damage have also been tested, observing that the enamel hardness is preserved for low inhibitors concentrations. The tested antitartar results are a primary step to the use of this agent in toothpaste formulation or in other dental products.

# Contenido

---

---

# 1. INTRODUCCIÓN

<b>1.1 Tejidos dentales</b> .....	<b>3</b>
1.1.1 Estructura de los dientes .....	3
1.1.2 Proteínas en los tejidos dentales .....	5
<b>1.2 Caries dental</b> .....	<b>6</b>
1.2.1 Formación de la caries.....	6
1.2.2 Tratamiento de las caries.....	7
1.2.3 Prevención de las caries.....	8
<b>1.3 Estética dental y proceso de blanqueo</b> .....	<b>12</b>
1.3.1 Catálisis heterogénea: Zeolitas.....	13
<b>1.4 Cálculo dental</b> .....	<b>16</b>
<b>1.5 Liberación controlada de fármacos</b> .....	<b>18</b>
1.5.1 Intercambio iónico .....	19
1.5.2 Resinas de intercambio iónico .....	20
1.5.3 Nanopartículas mesoporosas de sílica .....	22
<b>1.6 Objetivos</b> .....	<b>24</b>

# 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

<b>2.1 Técnicas analíticas</b> .....	<b>27</b>
2.1.1 Potenciometría con electrodo selectivo de fluoruro (ISE).....	27
2.1.2 Espectroscopía de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES).....	28
2.1.3 Microscopía electrónica de rastreo y de transmisión (SEM y TEM).....	28
2.1.4 Difracción de rayos X.....	30
2.1.5 Espectroscopia Raman .....	31
2.1.6 Colorimetría en la superficie .....	32
2.1.7 Espectrometría infrarroja (IR) .....	33
2.1.8 Radiación sincrotrón .....	34
<b>2.2. Procedimientos experimentales</b> .....	<b>36</b>
2.2.1 Procedimiento de carga de las resinas de intercambio iónico .....	36
2.2.1.1 <i>Determinación de la capacidad de carga</i> .....	36
2.2.2 Procedimiento de carga de nanopartículas de sílice mesoporosa (MSNP).....	37
2.2.2.1 <i>Diagramas de distribución de especies mediante el programa Medusa</i> .....	37
2.2.2.2 <i>Carga de las nanopartículas</i> .....	37
2.2.3 Preparación, remineralización y caracterización de las muestras	

dentales para análisis IR y Raman .....	39
2.2.3.1 Preparación de las muestras dentales para el estudio del tratamiento remineralizante con resinas o nanopartículas.....	39
2.2.3.2 Preparación de las referencias de fluorapatita e hidroxiapatita .....	40
2.2.3.3 Condiciones del análisis IR .....	41
2.2.3.4 Condiciones del análisis Raman .....	41
2.2.4 Estudio invitro previo de remineralización con amelogenina.....	42
2.2.4.1 Expresión de la proteína amelogenina.....	42
2.2.4.2 Procedimiento de cristalización en presencia de amelogenina .....	43
2.2.4.3 Estudio de los minerales mediante difracción de rayos X.....	43
2.2.4.4 Estudio microscópico de los minerales .....	44
2.2.4.5 Procesos de remineralización con resinas y nanopartículas en presencia de amelogenina .....	44
2.2.5 Evaluación carácter antitártar de fitato y pirofosfato.....	45
2.2.6 Procedimiento experimental blanqueo dental.....	47
2.2.6.1 Carga y cuantificación de la capacidad de la zeolita .....	47
2.2.6.2 Proceso de blanqueamiento.....	47

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 ESTUDIO REMINERALIZACIÓN MEDIANTE NANOPARTÍCULAS

<b>DE SÍLICA MESOPOROSAS (MSNP).....</b>	<b>51</b>
3.1.1 Condiciones de pH estudiadas siguiendo la predicción de los diagramas de distribución de especies (obtenidos mediante el programa Medusa.....)	51
3.1.2 Caracterización microscópica de las nanopartículas .....	52
3.1.3 Optimización de la carga de las nanopartículas .....	54
3.1.4 Caracterización de la remineralización dental por microscopía electrónica de rastreo (SEM) .....	56

#### 3.2 ESTUDIO DE LA CRISTALIZACIÓN DE HIDROXIAPATITA EN PRESENCIA DE AMELOGENINA.....

<b>3.2.1 Análisis Rayos X de las diversas cristalizaciones de las bolsas de diálisis .....</b>	<b>58</b>
3.2.2 Análisis SEM de las diversas cristalizaciones de las bolsas de diálisis ..	59

#### 3.3 ESTUDIO ESPECTROSCÓPICO CON RADIACIÓN SINCROTRÓN

<b>DE LA REMINERALIZACIÓN DENTAL .....</b>	<b>61</b>
3.3.1 Selección de las regiones de interés (ROI) y análisis por sincrotrón .....	61
3.3.2 Distribución de hidroxiapatita y fluorapatita en el esmalte.....	65

#### 3.4 EFECTO DE LA AMELOGENINA EN EL PROCESO DE REMINERALIZACIÓN .....

<b>3.4.1 Estudios con IR en muestras remineralizadas .....</b>	<b>67</b>
----------------------------------------------------------------	-----------

3.4.2 Estudios con Raman en muestras remineralizadas .....	69
<b>3.5 ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DE CÁLCULOS DENTALES .....</b>	<b>73</b>
3.5.1 Valores de inhibición .....	73
3.5.2 Efecto sobre el esmalte.....	73
<b>3.6 INCORPORACIÓN DE UN CATALIZADOR HETEROGÉNEO AL</b>	
<b>BLANQUEAMIENTO DENTAL .....</b>	<b>75</b>
3.6.1 Determinación de la carga de la zeolita.....	75
3.6.2 Efecto blanqueante en presencia de catalizador heterogéneo (zeolita)..	75
<b>4. CONCLUSIONES .....</b>	<b>83</b>

## ANNEXOS

**Annexo I:** Heterogeneous catalyst improves commercial teeth bleaching  
by using Fenton reactions

**Annexo II:** Advanced Remineralization Processes of Human Dental Tissues.  
Spectroscopic Characterization Using Synchrotron-based Fourier-Transform  
Infrared and Raman Microspectroscopy

# 1

## Introducción

---

<b>1.1 Tejidos dentales</b> .....	<b>3</b>
1.1.1 Estructura de los dientes .....	3
1.1.2 Proteínas en los tejidos dentales .....	5
<b>1.2 Caries dental</b> .....	<b>6</b>
1.2.1 Formación de la caries.....	6
1.2.2 Tratamiento de las caries.....	7
1.2.3 Prevención de las caries.....	8
<b>1.3 Estética dental y proceso de blanqueo</b> .....	<b>12</b>
1.3.1 Catálisis heterogénea: Zeolitas.....	13
<b>1.4 Cálculo dental</b> .....	<b>16</b>
<b>1.5 Liberación controlada de fármacos</b> .....	<b>18</b>
1.5.1 Intercambio iónico.....	19
1.5.2 Resinas de intercambio iónico .....	20

---

Con la finalidad de situar los temas desarrollados en la tesis que se presenta, a continuación se detalla tanto la información general relacionada con los estudios realizados como aquellos aspectos más específicos que recogen tanto los fundamentos como la información actualizada de los estudios referidos.

Los estudios realizados que recoge la presente memoria, tienen como objetivo profundizar en el conocimiento de los tejidos dentales y contribuir a la mejora de los posibles tratamientos dentales. Por ello, se incluyen estudios de mejora de materiales dentales para prevenir la formación de caries, disminuir la formación de cálculos dentales y la mejora estética gracias al blanqueamiento dental eficiente. Todo ello ha requerido la aplicación de técnicas analíticas tanto en el desarrollo y caracterización de los materiales dentales como en la determinación de los efectos producidos. En consecuencia, este capítulo dedica una mayor atención a los temas dentales, incluyendo también los temas relacionados con el desarrollo de materiales dentales basados fundamentalmente en intercambiadores iónicos.

## 1.1 TEJIDOS DENTALES

Los dientes son estructuras anatómicas duras enclavadas en los huesos maxilares. Su principal función se desarrolla en el proceso de digestión donde participan en las actividades de la digestión mecánica. Participan en la comunicación oral actuando como caja de resonancia que permite articular los sonidos, además de tener una gran importancia en el terreno estético. Todo ello causa que la sociedad actual tenga plena conciencia de la necesidad de una buena salud dental <sup>[1]</sup>. El mercado se encarga de cubrir estas necesidades invirtiendo gran capital en el desarrollo de nuevos productos dentales según las necesidades de los consumidores <sup>[2]</sup>.

### 1.1.1 Estructura de los dientes

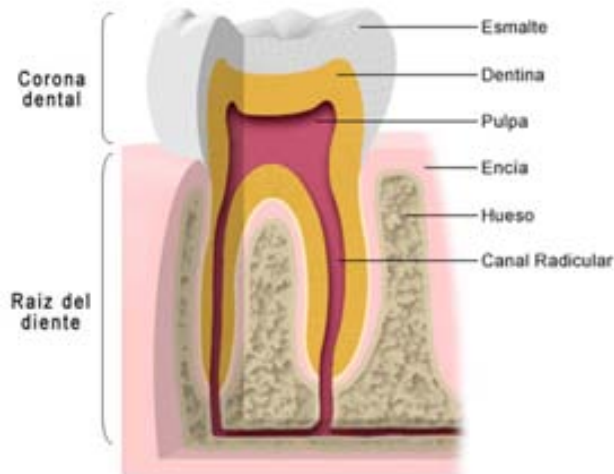
Los dientes constan fundamentalmente de dos partes: corona y raíz. La corona es la parte visible que se encuentra recubierta por el esmalte, mientras que la raíz se encuentra recubierta por el cemento dental insertada en una cavidad ósea llamada alveolo sujeta al hueso maxilar. En la Figura 1.1.1 se observa el corte transversal que permite observar las partes antes mencionadas. Bajo el esmalte se observa la dentina y en el centro la pulpa que contiene vasos sanguíneos y nervios.

---

<sup>[1]</sup> Beazoglou T, Browns LJ, Heffley D. Dental Care utilization over time. *Soc Sci Med.* 1993, 37 (12): 1461-1472.

<sup>[2]</sup> Giff HC, Reisine ST, Larach DC, The social impact of dental problems and visits. *Am J Public Health.* 1992, 82 (12): 1663-1668.



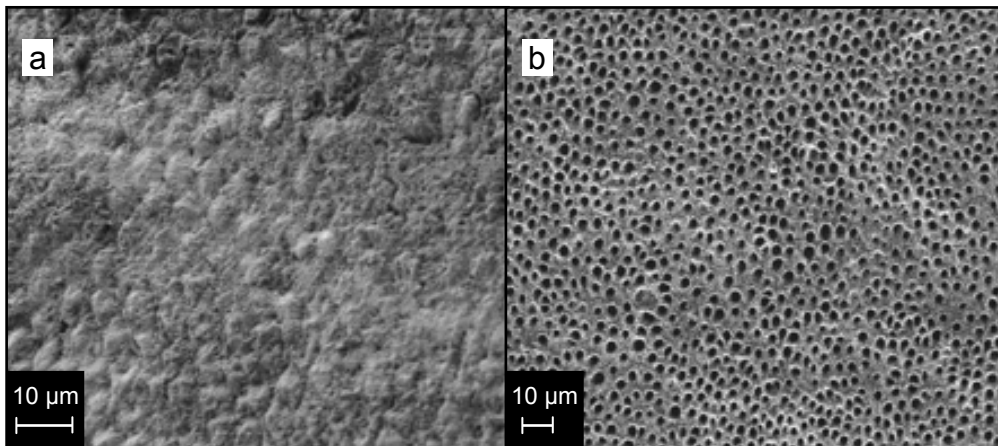


**Figura 1.1.1** Sección transversal de un diente.

El esmalte es la capa externa y dura que cubre la corona. Está considerado como el tejido más duro del cuerpo ya que es capaz de soportar la presión de la masticación, sin embargo, también es muy frágil y puede fracturarse con mucha facilidad. Está compuesto principalmente por material inorgánico (96% en peso) más una pequeña concentración de moléculas orgánicas (1%) y agua (3%) [3]. El mineral que la forma es principalmente cristales de hidroxiapatita cálcica ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) cuidadosamente empaquetados que proveen una apariencia similar al cristal siendo traslúcidos (Figura 1.1.2a). En realidad, el material biológico se encuentra formado por hidroxiapatita deficiente en calcio y con algunas impurezas, principalmente de magnesio y carbonato. La matriz orgánica está formada mayoritariamente por glicoproteínas (amelogeninas y enamelinas).

La dentina es un tejido más blando que el esmalte que forma la mayor parte del diente dotándolo de mayor elasticidad, siendo responsable del color de éste. Contiene, aproximadamente, un 70% en peso de mineral (principalmente hidroxiapatita), un 20% de sustancias orgánicas (en su mayoría colágeno) y un 10% de peso en agua [3]. La matriz sólida de la dentina conecta mediante túbulos el límite pulpar con el esmalte o cemento según la región del diente. Estos túbulos dentinarios (Figura 1.1.2b) tienen un diámetro entre 0,5 y 2,5  $\mu\text{m}$  y se encuentran rellenos de líquido dentinario.

[3] Wataha JC, Biocompatibility of dental materials. En: Craig RG, Powers JM, (ed). Restorative dental materials. St Louis: Mosby, Inc. 2002: 125-162.



**Figura 1.1.2** Micrografía electrónica de barrido de dos superficies del diente: a) esmalte parcialmente grabado y b) dentina que presenta los túbulos abiertos por un tratamiento ácido.

La pulpa dentinaria, conocida popularmente como “nervio”, es el centro del diente en el cual se alojan los vasos sanguíneos, nervios y tejido conectivo. El torrente sanguíneo proporciona los nutrientes que ayudan a mantener la vitalidad del diente además de conservar la presión del líquido dentinario.

Por último encontramos el cemento, capa menos dura que la dentina que cubre la raíz conteniendo las fibras que permiten la sujeción del diente dentro del hueso.

### 1.1.2 Proteínas en los tejidos dentales

Aunque se encuentran en bajas concentraciones las proteínas presentes en los tejidos dentales juegan un importante rol. El colágeno, la proteína más abundante en la dentina (90% de las proteínas dentales), tiene como principales funciones ofrecer la resistencia al estiramiento y participar en la mineralización [4]. En cambio en el esmalte se encuentran proteínas específicas pertenecientes a las amelogeninas y enameloninas. La más abundante es la amelogenina, proteína hidrofóbica la cual contribuye a la estructura primaria responsable de la organización del esmalte durante el desarrollo dental. Regula la iniciación y el crecimiento de los cristales de hidroxiapatita durante la etapa de mineralización [5][6].

---

[4] Abrahão IJ, Martins MD, Katayama E, et.al. Collagen Analysis in Human Tooth Germ Papillae. *Braz Dent J.* 2006, 17(3): 208-212.

[5] Moradia-Oldak J. Amelogenins: assembly, processing and control of crystal morphology. *Matrix Biology.* 2001, 20: 293-305.

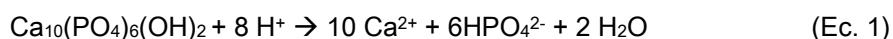
[6] Tarasevicha BJ, Howarda CJ, Larsona JL, et. al. The nucleation and growth of calcium phosphate by amelogenin. *J Crystal Growth.* 2007, 304: 407-415.

## 1.2 CARIES DENTAL

Las caries dentales son una de las infecciones bacterianas más comunes entre la población desde todos los tiempos [7]. El término caries dental se utiliza para describir el resultado de una disolución química localizada de la superficie dental causada por una secuencia de sucesos metabólicos que ocurren en el biofilm (placa dental) de la zona afectada [8]. La lesión puede manifestar una gran variedad de síntomas y desarrollarse en cualquier parte de la estructura dental donde la placa se acumule. Es una enfermedad definida como multifactorial ya que los factores principales son, las bacterias de la placa, los hidratos de carbono de la dieta y el tiempo que estos dos factores coexisten en el medio oral.

### 1.2.1 Formación de la caries

Para que el proceso conocido como caries tenga lugar, se deben dar una serie de condiciones que propicien la indicada disolución del esmalte. El inicio del proceso lo propician las bacterias presentes en la cavidad oral: *streptococcus mutans* y los lactobacilos. Las cuales en contacto con los hidratos de carbono producen ácido láctico causante de una disminución del pH. Según la reacción 1 se origina una disolución de la hidroxiapatita externa, proceso que recibe el nombre de desmineralización, ya que provoca la pérdida del mineral dental.



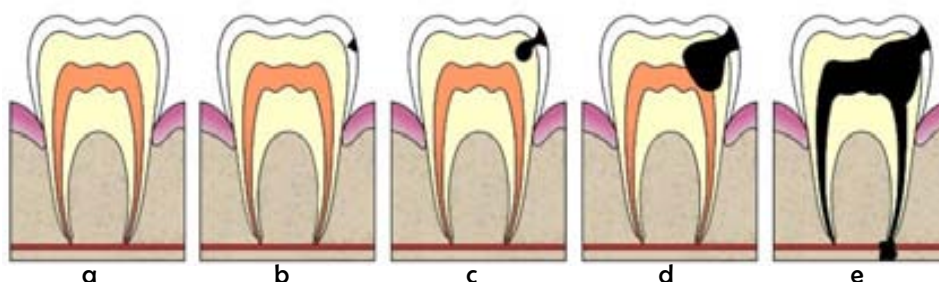
Esta destrucción puntual del esmalte exterior se ve compensada por la acción de la saliva, que se encuentra saturada en iones ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ) juntamente con agentes tamponadores (principalmente bicarbonatos) que mantienen el pH entre 6 y 7.5 [9]. La saliva produce el efecto favorecedor contrario que se conoce como remineralización. De esta manera la superficie dental se encuentra en un proceso dinámico de remineralización-desmineralización donde el mineral se va disolviendo y recristalizando de forma cíclica y continuada. La interrupción de este proceso equilibrado produce la aparición de caries.

---

[7] Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental Caries. *Lancet*. 2007, 369 (9555): 51-59.

[8] Fejerskov O, Kidd E, Nyvad B, et. al. Defining the disease: an introduction (Part I). En: Fejerskov O, Kidd E (ed). Oxford: Blackwell Munksgaard, 2008.

[9] Bardow A, Lagerlöf F, Nauntofte B, et. Al. The role of saliva (Part III). En: Fejerskov O, Kidd E (ed). Oxford: Blackwell Munksgaard, 2008.



**Figura 1.2.1** Etapas de la formación de caries: a) diente sano; b) ataque del esmalte; c) ataque a la dentina; d) propagación por la pulpa; e) infección del diente.

En la Figura 1.2.1 se observan las diferentes etapas de las que consta el proceso de formación de caries. En las primeras etapas, la producción de ácido láctico por parte de las bacterias resulta en un descenso del pH bucal además de una complejación con los iones de calcio producidos por la disolución del esmalte <sup>[10]</sup>. En estas primeras etapas es posible una remineralización, pero si las condiciones de desmineralización se prolongan en el tiempo, se forman cavidades donde los lactobacilos, que pueden actuar en condiciones anaeróbicas, progresan y generan más ácido (Fig 1.2.1b). Durante esta etapa la caries es indolora ya que el esmalte no tiene terminaciones nerviosas, en cambio, la perforación de la dentina (Fig 1.2.1c) provoca cierta sensibilidad a estímulos térmicos (frío/calor) y a la ingesta de azúcares. Si la enfermedad no se trata, la cavidad puede llegar hasta la pulpa donde se produce una inflamación que provoca un dolor más agudo. En el caso de seguir evolucionando, se causará la necrosis de la pulpa (Fig 1.2.1e) inflamando los tejidos circundantes llegando incluso a provocar una infección que puede extenderse al resto del organismo a través de los vasos sanguíneos.

### 1.2.2 Tratamiento de las caries

Las enfermedades bucodentales han afectado a la humanidad a lo largo de la historia, especialmente dolores tan comunes como los causados por caries profundas. Técnicas curativas y rehabilitadoras han sido practicadas por muchos médicos a lo largo de la historia, el registro mas antiguo data de 1250 aC cuando se realizaban las primeras extracciones dentales <sup>[11]</sup>. Pero no fue hasta el siglo XIX cuando se empezó a elucidar la “teoría química de las caries” según la producción de ácido <sup>[12]</sup> en contraste con la existente “teoría inflamatoria de la caries

<sup>[10]</sup> Hannig C, Hamkens A, Becker K, et. al. Erosive effects of different acids on bovine enamel: release of calcium and phosphate in vitro. *Arch Oral Biol.* 2005, 50 (6): 541-552.

<sup>[11]</sup> Coppa A, Bondioli L, Cucina A, et al. Palaeontology: Early Neolithic tradition of dentistry. *Nature.* 2006, 440: 755-756.

<sup>[12]</sup> Black GV. A work on operative dentistry. Pathology of the dental hard tissues of the teeth. Chicago: Medico-Dental Publishing Co, 1914.

dental” la cual explicaba que la caries era resultado de la inflamación de la dentina [13]. A principio del siglo XX, la teoría química ganó credibilidad respecto a la inflamatoria de manera que los tratamientos se focalizaron en combatir sus causas y evitar las pérdidas de las piezas dentales afectadas por caries.

El tratamiento de la caries depende del estado en que se encuentra la lesión en el momento de la diagnosis. En caries incipientes que afectan parcialmente la superficie del esmalte no es necesaria una actuación del especialista ya que es posible su recuperación utilizando agentes remineralizantes y mejorando la higiene oral. Cuando afectan esmalte y dentina sin afectación de la pulpa del diente, la obturación o empaste mediante resinas compuestas o composites es la técnica más apropiada. Cuando la infección llega a tejidos profundos afectando a la pulpa, el tratamiento consistirá en la endodoncia o eliminación del tejido vasculo-nervioso del diente (matar el nervio) y sustitución por un material bacteriostático [14].

### 1.2.3 Prevención de las caries

La lucha contra la caries ha evolucionado juntamente con el conocimiento de la enfermedad. De manera que al principio el único tratamiento posible era la extracción de la pieza dental, posteriormente la salvación del diente afectado, incluyendo la endodoncia, y actualmente se intenta establecer la tendencia de prevenir la enfermedad [7]. Existen tres pilares fundamentales en los que se basa la prevención de la caries:

- Protección del diente.
- Reducción de la presencia de sustrato (restos de alimentos) para las bacterias.
- Eliminación de la placa bacteriana por medios físicos o químicos.

Los cuales a la práctica se traducen en:

- Aplicación de flúor principalmente en pastas de dientes.
- Control de la dieta (reducción de azúcares).
- Mejora de la higiene oral.

El papel del fluoruro en la prevención de la caries representa una de las mayores mejoras en la historia de la salud oral. Es por ello que es el agente remineralizante más utilizado gracias a su capacidad de reaccionar con la hidroxiapatita formando fluorapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ ) o fluorohidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}(\text{OH})$ ) si la sustitución no es completa según la siguiente reacción:



La fluorapatita ( $k_{ps} \sim 10^{-55}$ ) es mas insoluble que la hidroxiapatita ( $k_{ps} \sim 10^{-40}$ ), de manera que al producirse la sustitución, el esmalte resulta más insoluble y resistente al ataque ácido

---

[13] Hunter J. A practical treatise on the disease of the teeth: explaining their structure, use, formation, growth and disease. London: Johnson Inc, 1771.

[14] Kidd EAM, Bjørndal L, Beighton D, et. al. Caries removal and the pulpo-dentinal complex (Part V). En: Fejerskov O, Kidd E (ed). Oxford: Blackwell Munksgaard, 2008.

[15], y por tanto más resistente a las caries [16]. Adicionalmente, el fluoruro que queda libre puede tener comportamiento bactericida sobretodo a pH ácidos debido a la formación de ácido fluorhídrico [17].

Desde principios del siglo XX se conoce la acumulación de fluoruro en los tejidos calcificados del ser humano siendo en 1904 cuando se inicia en Europa la investigación científica sobre los efectos anticaries de los fluoruros [18]. Gracias a los resultados positivos obtenidos se decidió actuar a nivel global añadiendo concentraciones de 1ppm de fluoruro en el agua pública de ciertos países observando una prevención de la caries dental del 50% aproximadamente [19][20]. Pero el flúor, como toda sustancia utilizada con fines terapéuticos, tiene efectos delimitados por la dosificación y la posología con que es administrado. Cuando el flúor se utiliza en dosis superiores a las recomendadas, se produce un daño cuyas consecuencias dependerán de la intensidad y la frecuencia con que se ha producido la dosificación [21]. Esta enfermedad es conocida como fluorosis, intoxicación crónica que afecta principalmente la dentadura, los tejidos óseos y secundariamente el sistema nervioso [22]. En concreto el efecto de una ingesta alta de flúor en los tejidos dentales provoca una hipomineralización donde el esmalte presenta un aumento de la porosidad en la superficie del diente que le supone un aumento de la fragilidad además de un color opaco [23].

En el grado de resistencia de la hidroxiapatita o fluorapatita a las caries influye considerablemente la forma cristalina del material. Un gran número de estudios *in vitro* se han llevado a cabo para elucidar los posibles roles de la proteína en el desarrollo dental. Dichos estudios han demostrado que la concentración de la proteína afecta en la nucleación, crecimiento, regulación del tamaño y medida, y control de la agregación cristal-cristal [24][25][26].

---

[15] Moreno EC, Kresak M, Zahradnik RT. Physicochemical aspects of fluoride-apatite systems relevant to the study of dental caries. *Caries Res.* 1977, 11 (1):142-171.

[16] Cate JM. Review on fluoride, with special emphasis on calcium fluoride mechanisms in caries prevention. *Eur J Oral Sci.* 1997, 105 (5): 461-465.

[17] McIntyre JW. Capítulo 3: Tratamiento y control de la caries, Mount GJ, Hume WR (ed). Conservación y restauración de la estructura dental. Madrid: Harcourt Brace, 1999: 19-27.

[18] Forrai J. The beginnings of dental caries and its treatments. *Rev Clin Pesq Odontol.* 2009, 5 (2): 187-192.

[19] Thuy TT, Nakagaki H, Ha NT, et. al. Fluoride profiles in premolars after different durations of water fluoridation in Ho Chi Minh City, Vietnam, *Arch Oral Biol.* 2003, 48 (5): 369-376.

[20] Ingram GS, Agalamanyi EA, Higham SM. Caries and fluoride processes. *J Dent.* 2005, 33 (3): 187-191.

[21] Ellwood R, Fejerskov O, Cury JA, et. al. Fluorides in caries control (Part IV). En: Fejerskov O, Kidd E (ed). Oxford: Blackwell Munksgaard, 2008.

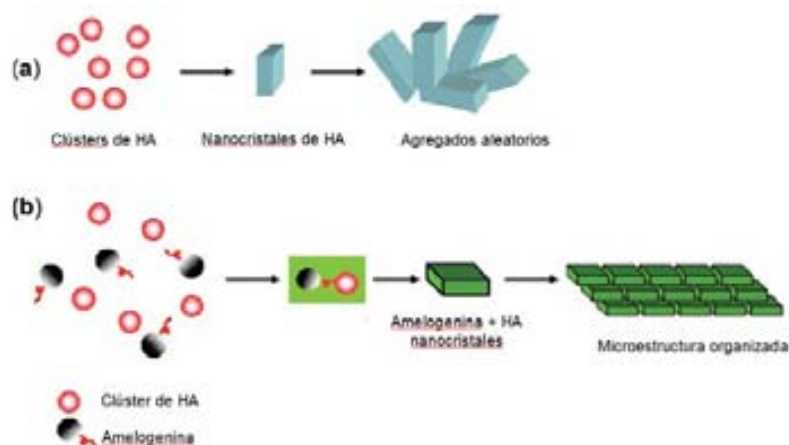
[22] Rivera SV, Godorecci SB, Borgel LA, et. al. Fluor: potenciales efectos adversos. *Rev Chil Pediatr.* 1993, 64 (4); 278-283.

[23] Secretaría de Salud, Subdirección de Salud Bucal. Manual para el uso de fluoruros dentales en la República Mexicana, DF México: 2006.

[24] Moradian-Oldak J. Amelogenins: assembly, processing and control of crystal morphology. *Matrix Biology*, 2001, 20: 293-305.

[25] Tarasevich BJ, Howard CJ, Larson JL, et al. The nucleation and growth of calcium phosphate by amelogenin. *J Crystal Growth.* 2007, 304: 407-415.

El principal constituyente de la matriz proteica del esmalte es la amelogenina, proteína hidrofóbica, que representa el 90% del total proteico [27]. Como se puede observar en la figura 1.2.2, la amelogenina se agrupa en nanoesferas de 15-20 nm alineadas alrededor de los cristales de hidroxiapatita direccionando el crecimiento cristalino [28]. La coexistencia de amelogenina y fluoruros resulta crucial en la organización *rod-like* de la hidroxiapatita/fluorapatita formada, siendo uno de los primeros pasos en el desarrollo y diseño de nuevos biomateriales para futuras aplicaciones en odontología restauradora [29][30][31][32]. La gran mayoría de los estudios de remineralización dental publicados determinan como resultado del proceso la formación de fosfatos de calcio. Estos compuestos no presentan las mismas características que el material principal del diente (hidroxiapatita). Es por ello que el desarrollo de un sistema de liberación controlada de los principales iones produce las condiciones de velocidad y concentración necesarias para favorecer la formación de hidroxiapatita por delante de los fosfatos de calcio.



**Figura 1.2.2** Proceso de remineralización dental: a) en ausencia de proteína, b) en presencia de amelogenina [26].

[26] Wang L, Guan X, Du C, et al. Amelogenin Promotes the Formation of Elongated Apatite Microstructures in a Controlled Crystallization System, *J Phys Chem.* 2007, 111: 6398-6404.

[27] Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP. The Structural Biology of the Developing Dental Enamel Matrix. *J Struct Biol.* 1999, 126: 270-299.

[28] Zhu D, Paine ML, Luo W, et al. Altering Biomineralization by Protein Design, *J Biol Chem.* 2006, 281 (30): 21173-21182.

[29] Fincham AG, Moradian-Oldak J, Diekwisch TG, et al. Evidence for amelogenin "nanospheres" as functional components of secretory-stage enamel matrix, *J Struct Biol.* 1995, 115: 50-59.

[30] Fan Y, Sun Z, Moradian-Oldak J. Controlled remineralization of enamel in the presence of amelogenin and fluoride. *Biomaterials.* 2009, 30: 478-483.

[31] Habelitz S, Kullar A, Marshall SJ, et al. Amelogenin-guided Crystal Growth on Fluoroapatite Glass-ceramics. *J Dent Res.* 2004, 83: 698-702.

[32] Tarasevich BJ, Lea S, Bernt W, Engelhard M, Shaw WJ. Adsorption of Amelogenin onto Self-Assembled and Fluoroapatite Surfaces. *J Phys Chem B.* 2009, 113: 1833-1842.

El efecto positivo del fluoruro contra los procesos de caries ha sido ampliamente estudiado. En cambio, la determinación directa de la fluorapatita formada sobre el esmalte es complicada dado que no hay técnicas que permitan medidas directas. Gran parte de los estudios se basan en métodos relacionados con la medida de la cantidad de mineral: nanodureza, microradiografía, espectrometría de dispersión de energía (EDS), imagen de electrones dispersados (BSE) o fluorescencia [33][34][35][36][37]. De manera que esta falta de técnicas provoca que los resultados obtenidos *invitro* no siempre tengan buena correlación con los resultados clínicos. En el presente estudio se presentan nuevas metodologías analíticas que solventen las limitaciones que presentan las técnicas anteriores permitiendo obtener información sobre la formación de fluorapatita en materiales dentales.

---

[33] Lipper F, Parker DM, Jandt KD. In vitro demineralisation/remineralisation cycles at human tooth enamel surfaces investigated by AFM and nanoindentation. *J Colloid Interface Sci.* 2004, 280 (2): 442-448.

[34] Kielbassa AM, Wrbas KT, Schulte-Monting J, et. al. Correlation of transversal microradiography and microhardness on in situ-induced remineralization in irradiated and nonirradiated human dental enamel. *Arch Oral Biol.* 1999, 44 (3): 243-251.

[35] Ten Cate JM, Nyvad B, Van de Plassche-Simons YM, et. al. A quantitative analysis of mineral loss and shrinkage of in Vitro demineralized human root surfaces. *J Dent Res.* 1991, 70 (10): 1371-1374.

[36] Angker L, Nockolds C, Swain MV, et. al. Quantitative analysis of the mineral content of sound and carious primary dentin using BSE Imaging. *Arch Oral Biol.* 2004, 49 (2): 99-107.

[37] Pretty IA, Smith PW, Edgar WM, et. al. Detection of in vitro remineralization adjacent to restorations using quantitative light induced fluorescent (QLF). *Dent Mater.* 2003, 19 (5): 368-374.



### 1.3 ESTÉTICA DENTAL Y PROCESOS DE BLANQUEO

A lo largo de la historia de la humanidad, el ser humano se ha preocupado por obtener una apariencia física agradable, siendo cada vez más importante lograr una sonrisa bonita [38][39]. El color de los dientes juega un importante papel, es por ello que los productos comerciales y el proceso de blanqueamiento dental tienen un gran impacto social.

La apariencia de los dientes depende de muchos factores, principalmente se ve influenciada por dos variables: el color intrínseco y la presencia de manchas formadas en su superficie. El color intrínseco viene definido por el color de la dentina y la propiedad del esmalte de ser translúcido. Se puede ver oscurecido con la edad y otros fenómenos que pueden cambiar la estructura, composición y grosor de los tejidos dentales [40]. Enfermedades metabólicas o congénitas, tratamientos con tetraciclina, fluorosis, hemorragias o traumatismos pueden afectar a estos cambios de color. Las manchas extrínsecas se forman en las partes del diente que son menos accesibles al cepillado, el origen de estas manchas puede ser metálico (cobre, hierro o estaño) o no metálico. El consumo de tabaco y alimentos ricos en taninos (vino negro, té, café) provocan las no metálicas [40]. Los dientes afectados por coloraciones de tonalidades amarillas uniformes y leves suponen los dientes que requieren un tratamiento más leve con mejores resultados [41].

Los tratamientos de blanqueo dental no son nuevos, el primer estudio relacionado data de 1877 [42] pero no fue hasta las décadas de 1970-80 cuando se realizaron muchas prácticas de blanqueamiento sobre dientes vitales y no vitales usando altas concentraciones de peróxido de hidrógeno, en combinación con luz de alta intensidad o bajo calor. Los compuestos que producen color son típicamente compuestos orgánicos que poseen doble enlaces conjugados con heteroátomos. La decoloración de estos compuestos se produce destruyendo los dobles enlaces u oxidando un grupo funcional de la cadena conjugada [43].

Existen estrategias de blanqueamiento basadas en agentes no oxidantes. Algunas consisten en agentes complejantes que interaccionan de manera temporal o permanentemente con la molécula que provoca la mancha para reducir la coloración. Algunos ejemplos de agentes complejantes son la etilendiamina, el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y clorhidrato de betaína, que poseen grupos complejantes [44]. Otro ejemplo es la papaína, enzima proteolítica proveniente de la fruta tropical papaya, que no daña el esmalte y además de

---

[38] Beall AE. Can a new smile make you look more intelligent and successful?. *Den Clin N Am*. 2007, 51: 289-297.

[39] Van Der Gelda P, Oosterveld P, Van Henck G, et. al. Smile Attractiveness. *Angle Orthod*. 2007, 77 (5): 759-765.

[40] Watts A, Addy M. Tooth discolouration and staining: a review of the literature. *J Dent*. 2006, 34 (7): 412-419.

[41] Albers HF. Odontología estética. Sección y colocación de materiales, Madrid: Labor, Inc, 1988: 166-167.

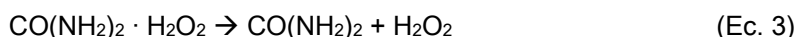
[42] Fasanaro TS. Bleaching teeth: history, chemicals and methods used for common tooth discoloration. *J Esthet Dent*, 1992, 4(3): 71-78.

[43] Gokay O, Tuncbilek M, Ertan R. Penetration of the pulp chamber by carbamida peroxide bleaching agents on teeth restored with a composite resin. *J Oral Rehabil*. 2000, 27 (5): 428-431.

[44] Miller RG, Karolchik JS, inventores. Oral composition having improved tooth whitening effect. EP 0 545 594 B1.

blanquear presenta propiedades antibacterianas y antiinflamatorias [44][45][46]. Actualmente, ninguna de las alternativas al peróxido que se encuentran en desarrollo permite obtener resultados comparables al peróxido de hidrógeno. Es por ello que muchas investigaciones, incluyendo la presente, tienen como objetivo mejorar el proceso con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Las estrategias basadas en un agente oxidante son las más empleadas actualmente debido a que permiten obtener los mejores resultados. Uno de los agentes más empleado es el peróxido de hidrógeno, aun así existen otros compuestos como el peróxido de carbamida que son más estables al proceso redox ya que ha de sufrir una disociación previa en contacto con solución acuosa, que libere el peróxido de hidrógeno (Ec. 3), que finalmente actuará como agente blanqueante. Generalmente el medio de aplicación es un gel viscoso que contiene un polímero llamado carbopol (carboxipolimetileno) que permite un contacto prolongado y una liberación lenta del peróxido de hidrógeno.



El efecto blanqueador obtenido es considerable pero la técnica muestra algunas desventajas, ya que durante el proceso, la irritación gingival y pulpar es frecuente debido a la exposición a altas concentraciones de peróxido. Es agresivo con la matriz del esmalte ya que puede provocar una variación en la composición o estructura que produce efectos de hipersensibilidad y durante las reacciones se pueden formar una serie de especies de oxígeno indeseadas dependiendo de las condiciones de reacción: temperatura, pH, luz o presencia de metales de transición. Es por ello que el desarrollo de los nuevos productos está dirigido principalmente en disminuir el tiempo de contacto y al mismo tiempo obtener resultados de blanqueamiento eficiente. En nuestro caso, hemos abordado esta estrategia mediante la aplicación de procesos catalíticos basados en la reacción de Fenton.

### *1.3.1 Catálisis heterogénea: Zeolitas*

Para acelerar el proceso de blanqueamiento se propone la aplicación de los procesos Fenton que proveen de radicales hidroxilos con un poder oxidante superior al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como indican los potenciales de reducción que se presentan en la tabla 1.3.1.

---

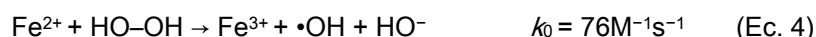
[45] Piva E, Ogiari FA, Ratto de Moraes R. Papain-based gel for biochemical caries removal: influence on microtensile bond strength to dentin. *Braz Oral Res.* 2008, 22(4): 364-70.

[46] Gebreselassie P, Boghani N, inventores. Stable tooth whitening gum with reactive ingredients. USA Patent. 2006, US 2006/0177383 A1.

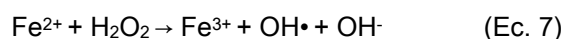
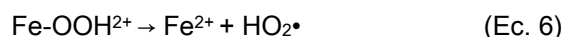
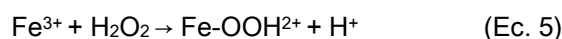
Oxidante	Reacción de reducción	E <sub>o</sub> (V, 25C)
Radical hidroxilo	$\bullet\text{OH} + \text{H}^+ + \text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}$	2,80
Radical hidroxilo	$\bullet\text{OH} + \text{e}^- \rightarrow \text{OH}^-$	1,80
Peróxido de hidrógeno	$\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$	1,77
Peróxido de hidrógeno	$\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$	-0,67
Radical hidroperóxilo	$\text{HO}_2\bullet + 3\text{H}^+ + 3\text{e}^- \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$	1,65
Radical hidroperóxilo	$\text{HO}_2\bullet + \text{H}^+ + \text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$	1,44

**Tabla 1.3.1** Potenciales estándar en medio acuoso para especies presentes en la destrucción de contaminantes orgánicos <sup>[50]</sup>.

Para el proceso Fenton normalmente se utilizan medios homogéneos que incluyen una especie de hierro y peróxido de hidrogeno, siguiendo como reacción general la siguiente partiendo del estado de oxidación II del hierro <sup>[51]</sup>:



En este trabajo también se aplica la reacción tipo Fenton (*Fenton-like*), que permite partir des del ion Fe (III) de mayor estabilidad que Fe (II). Produce una situación más lenta debido a que la constante cinética es más pequeña ya que debe pasar por más pasos de reacción. Las etapas de las que consta el mecanismo del proceso *Fenton-like* son las siguientes <sup>[52]</sup>:



De manera que el hierro se recupera obteniendo globalmente un proceso catalítico. Una vez generado el radical hidroxilo este puede oxidar de manera no selectiva una amplia variedad de moléculas orgánicas. Aun así, estos sistemas presentan una serie de inconvenientes bien conocidos. Uno de ellos es el estrecho rango de pH en el que pueden operar ya que a pH inferiores a 2 el Fe (III) puede formar compuestos hexaacuoferrósos y a medida que el pH aumenta se puede formar oxohidroxocomplejos. La formación de estos compuestos disminuye la concentración de hierro libre en la solución bajando el rendimiento catalítico del proceso <sup>[53]</sup>. Adicionalmente estudios anteriores han demostrados efectos adversos en su aplicación en

<sup>[50]</sup> Milazzo G, Caroli S, Sharma VK. Tables of Standard Electrode Potentials, Chichester: Wiley, Inc, 1978.

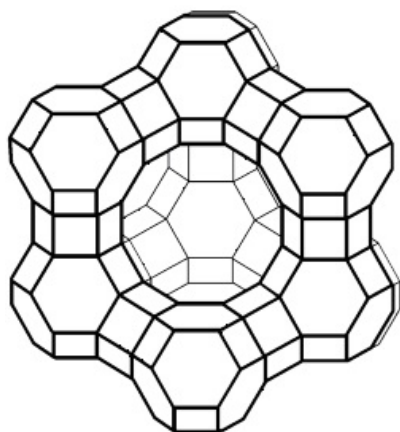
<sup>[51]</sup> Gozzo F. Radical and non-radical chemistry of the Fenton-like systems in the presence of organic substrates. *J Mol Catal Chem*. 2001, 171 (1-2): 1-22.

<sup>[52]</sup> Neyens E, Baeyer J. A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique. *J Hazard Mater*. 2003; 98: 33-55.

<sup>[53]</sup> Kuznetsova EV, Savinov EN, Vostrikova LA, et. al. Heterogeneous catalysis in the Fenton type system FeZSM-5/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Appl Catal B-Environ*. 2004, 51 (3): 165-170.

materiales dentales, tales como, incorporación del hierro en el diente y creación de nuevas manchas afectando negativamente al proceso global [52]. Es por ello que los estudios presentados evalúan los resultados de la utilización de sistemas zeolíticos en un blanqueante dental comercial.

A partir de 1995 diversos estudios abrieron la posibilidad de utilizar sistemas zeolíticos para poder fijar los metales de transición que actuarán como catalizadores solventando problemas [54][55]. Entendemos como zeolita un sistema de aluminosilicatos hidratados altamente cristalinos que al deshidratarse desarrollan una estructura porosa con diámetros de poro de 3 a 10 Å. En la figura 1.3.1 se puede observar la estructura formada por cavidades que pueden ocuparse por iones o moléculas dependiendo del tamaño, confiriendo una gran capacidad de libertad de movimiento que permite el intercambio iónico y la deshidratación reversible. De manera que las mejoras que aportan estos sistemas son la inmovilización del catalizador, evitar su pérdida y actuar como un soporte inerte que no interfiere en las reacciones.



**Figura 1.3.1** Estructura de la zeolita tipo A.

---

[54] Pulgarin C, Peringer P, Albers P, et. al. Effect of Fe-ZSM-5 zeolite on the photochemical and biochemical degradation of 4-nitrophenol. *J Mol Catal A-Chem*. 1995, 95 (1): 61-74.

[55] Mokhtar MM. Catalytic properties of Fe ion-exchanged mordenite toward the ethanol transformation: influence of the methods of preparation. *J Mol Catal A-Chem*, 2003, 200: 301-313.

## 1.4 CÁLCULO DENTAL

Se denomina cálculo dental, tártaro dental, cálculo, piedra o sarro dental a la acumulación de sales de calcio y fósforo sobre la superficie dental. Se trata del resultado de la mineralización de la placa bacteriana, esto corresponde al conjunto de microorganismos, saliva y restos alimenticios que se van depositando sobre las piezas dentales [56]. Los cálculos se pueden clasificar en dos categorías según su posición en el diente. Cálculo supragingival es la expresión usada para referirse al que se forma por encima del margen gingival, mientras que el subgingival se refiere al que se forma por debajo de este [57].

El sarro se compone de una parte orgánica y otra inorgánica, donde predominan el calcio, el fósforo y magnesio; en cantidades traza encontramos sodio, potasio y hasta plomo [58][59]. La estructura cristalina de los cálculos dentales sigue una serie de etapas durante su formación en la cavidad bucal. En las primeras fases aproximadamente la mitad de los cristales corresponden a bruxita ( $\text{Ca}(\text{HPO}_4)\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), en cambio, en etapas más maduras (a partir de 6 meses) la forma cristalina más abundante es hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) [60].

Las estrategias empleadas para el control de la formación de sarro son muy variadas, des de la solubilización de la materia inorgánica y orgánica, pasando por la interferencia en la adhesión del cálculo, hasta evitar la formación inicial de placa y la remineralización de ésta. Por ello una gran cantidad de inhibidores han sido evaluados: sales de pirofosfatos, bifosfato y sales de zinc. Aunque han sido aplicados muchos inhibidores, el mecanismo preciso de actuación no se conoce completamente y la mayoría actúan directamente en la prevención evitando la formación de los cristales sin prácticamente actuar en los ya formados [56].

Los principios de la cristalización de los cálculos dentales tienen muchas similitudes con los de la formación de cálculos renales, es por ello, que muchos de los inhibidores utilizados en urología pueden ser aplicados en el ámbito dental. El primer inhibidor biológico reconocido que, a muy bajas concentraciones, inhibe la precipitación en orina de oxalato cálcico fue el pirofosfato (figura 1.4.1a)[61]. Recientemente, se ha demostrado que el fitato (figura 1.4.1b), presente en la sangre, orina y fluidos intersticiales e intracelulares, presenta una capacidad inhibidora extraordinaria, siendo su efecto mil veces más importante que el del citrato [62].

---

[56] White DJ. Dental calculus: recent insights into occurrence, formation, prevention, removal and oral health effects of supragingival and subgingival deposits. *Eur J Oral Sci.* 1997, 105: 508-522.

[57] Hazen SP. Supragingival dental calculus. *Periodonto 2000.* 1995, 8: 125-136.

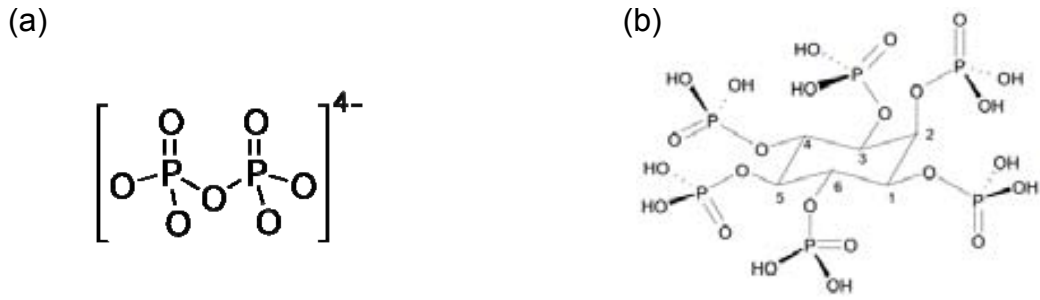
[58] Pérez CA, Sánchez HJ, Barrea RA, et. al. Microscopic X-ray fluorescence analysis of human dental calculus using synchrotron radiation. *J Anal At Spectrom.* 2004, 19: 392-397.

[59] Abraham J, Grenón M, Sánchez HJ, et. al. Spectrochemical análisis of dental calculus by synchrotron radiation X-ray fluorescente. *Anal Chem.* 2002, 74: 324-329.

[60] Gibbons RJ, Van Houte DJ. On the formation of dental plaques, *J Periodont.* 1973, 44 (6): 347-360.

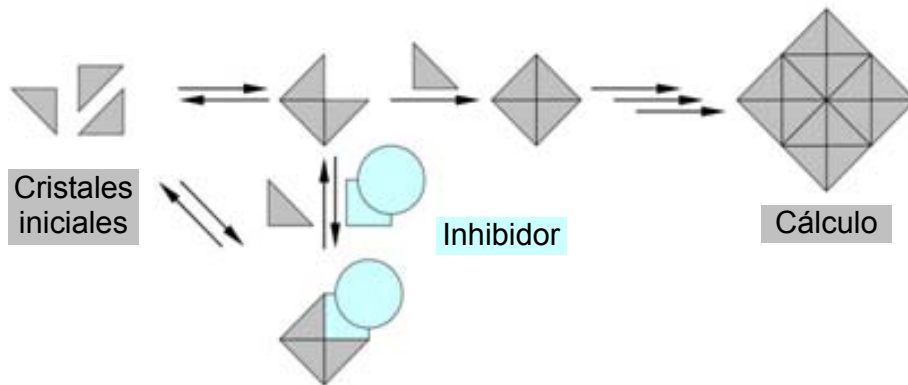
[61] Fleisch H, Bisaz S, Care AD. Effect of orthophosphate on urinary pyrophosphate excretion and the prevention of urolithiasis. *Lancet.* 1964, 283 (7342): 1065-67.

[62] Grases F, Prieto RM, Simonet BM, et. al. Phytate prevents tissue calcifications in female rats. *BioFactors.* 2000, 11: 171-177.



**Figura 1.4.1** Estructura química de: (a) pirofosfato y (b) fitato.

El principio inhibitor del fitato y pirofosfato se basa en la inhibición de la cristalización impidiendo o dificultando la formación del determinado material cristalino al intervenir en una o varias de las etapas implicadas en su formación que puede pertenecer al proceso de nucleación del cristal o de crecimiento <sup>[63]</sup>. Este proceso tiene una alta especificidad ya que depende de las interacciones del sustrato (inhibidor) con el sólido que se está formando, tales como la adsorción/deserción en las superficies del cálculo. En la figura 1.4.2 se observa las etapas que se producen en el proceso de nucleación y crecimiento de un cristal, y como la actuación del inhibidor frena el crecimiento.



**Figura 1.4.2** Proceso de nucleación y crecimiento de un cálculo. Efecto del inhibidor en el proceso <sup>[64]</sup>.

<sup>[63]</sup> Grases F, Costa-Bauzá A, Conte A. Litiasis cálcica: inhibidores de la cristalización. En: Lancina JA. Litogénesis urinaria de origen metabólico. Barcelona: J&C Ediciones médicas S.L., 2002: 59-84.

<sup>[64]</sup> Muñoz JA, Valiente M. Litiasis Renal Oxalocálcica. Avances en la comprensión de su etiología y mejoras en la metodología analítica para su estudio. Universitat Autònoma de Barcelona, 2004: 24-28.

## 1.5 LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS

Los procesos anteriormente descritos implican el suministro de componentes específicos para el tratamiento de las distintas afecciones bucales. El empleo de sistemas de transporte de medicamentos con alta especificidad y actividad en el lugar de aplicación deseado, sin efectos tóxicos, es un modelo ideal aplicable a los estudios que se recogen en la presente memoria <sup>[65]</sup>. Estos sistemas conocidos como sistemas de liberación controlada de fármacos, presentan claras ventajas respecto a los fármacos normales: disminución de efectos negativos secundarios, tiempo de actividad prolongado, protección a fármacos sensibles a ataques enzimáticos o degradación ácida, entre otras <sup>[66]</sup>.

Existen diversos tipos de sistemas de liberación controlada de fármacos que combinan sustancias biológicamente activas con materiales poliméricos. Las partículas poliméricas biocompatibles empleadas en la administración de medicamentos pueden ser de diversas tipologías. En función de su tamaño, se pueden clasificar en micropartículas (de 1 a 250  $\mu\text{m}$ ) y nanopartículas ( $< 1\mu\text{m}$ ). Éstas a su vez, pueden ser de dos tipos según como se encuentre encapsulado el principio activo, bien *cápsulas* que consisten en sistemas vesiculares en los que el fármaco se encuentra confinado en una cavidad rodeado de una membrana polimérica en la cual su liberación se controla por la difusión a través de las paredes del material <sup>[67]</sup>, bien en *esferas* que son sistemas matrices en los que el fármaco se encuentra disperso en la partícula donde se produce una difusión a través de la matriz por su erosión química, biológica o combinación de las dos <sup>[68]</sup>.

Las combinaciones químicas que se pueden dar en sistemas de liberación controlada definen la unión del agente activo con la matriz polimérica, estas pueden ser mediante enlaces iónicos o covalentes y que se liberen por la acción de un medio que rompa los enlaces <sup>[69][70]</sup>. Para la preparación de estos sistemas, se pueden emplear diversos procesos entre los que se encuentran: la evaporación del disolvente, separación de la fase orgánica, polimerización en emulsión o secado por spray <sup>[71][72][73]</sup>.

---

<sup>[65]</sup> Sáez V, Hernández E, Angulo LS, et. al. Liberación controlada de fármacos. Micropartículas. *Rev Iberoam Polimeros*. 2004, 5 (2): 88-101.

<sup>[66]</sup> Mechanisms of Uptake and Targeting, Editor: Prokop A. Intracellular delivery, Tennessee: Springer Inc: 2011: 3-179.

<sup>[67]</sup> Shah KP, Chafetz L. Use of sparingly soluble salts to prepare oral sustained release suspensions. *Int J Pharm*. 1994, 109 (3): 271-281.

<sup>[68]</sup> Majid KG, Zhu J. Studies on drug release kinetics from ibuprofeno-carbomer hydrophilic matrix tablets: influence of co-excipients on release rate of the drug. *J Control Release*. 1999, 57 (2): 197-203.

<sup>[69]</sup> Scholsky KM, Fitch RM. Controlled release of pendant bioactive materials from acrylic polymer colloids. *J Control Release*. 1986, 3 (4): 87-102.

<sup>[70]</sup> Plaizier-Vercammen JA. Investigation of the bioavailability of codeine from a cation ion-exchange sulfonic acid: 1. Effect of parameters. *Int J Pharm*. 1992, 85 (1-3): 45-50.

<sup>[71]</sup> Lo H, Ponticciello MS, Leong KW. Fabrication of controlled release biodegradable foams by phase separation, *Tissue Eng*. 1995, 1(1): 15-28.

<sup>[72]</sup> Berklund C, Kyekyoon K, Pack DW. Fabrication of PLG microspheres with precisely controlled and monodisperse size distributions, *J Control Release*. 2001, 73 (1): 59-74.

### 1.5.1 Intercambio iónico

El intercambio iónico consiste en la permuta, generalmente reversible, entre los iones lábiles inmovilizados en una matriz sólida o líquida y los de una disolución de electrolitos [74]. La eficacia del proceso depende del equilibrio sólido-fluido y de la velocidad de transferencia de materia implicada en este cambio. Los intercambiadores iónicos se suelen clasificar según el signo de la carga de los iones que se intercambian, lo que viene determinado por el grupo funcional que posee el material intercambiador. Así podemos distinguir entre: intercambiadores aniónicos, catiónicos, bifuncionales (combinan aniónicos y catiónicos) y quelatantes.

Los sólidos utilizados suelen ser de tipo polimérico, siendo los más habituales los basados en resinas sintéticas. Son polielectrolitos insolubles que contienen lugares fijos cargados positiva o negativamente neutralizados por iones de la carga contraria (contraiones) que pueden intercambiarse. Estos procesos de intercambio iónico se utilizan en áreas muy diversas y en gran cantidad de procesos industriales, como el tratamiento de aguas [75], separaciones analíticas [76], farmacia y medicina [77], etc.

Una de las características importantes de los intercambiadores iónicos en relación con la velocidad del proceso de intercambio es la superficie de contacto con la disolución a intercambiar. Es por ello que el tamaño de partícula de estos intercambiadores actúa como una de las características críticas y la cual cosa hace que adquiera un interés particular en nuestros estudios. De manera que el tamaño de partícula influye en dos aspectos importantes: los movimientos de convección del intercambiador y su reología (palpabilidad). Es por ello que a continuación se describen algunos sistemas que específicamente inciden en estos aspectos.

En el caso de la remineralización dental, existen diferentes materiales y estrategias diseñadas para la liberación de sustancias que contribuyan a este proceso de intercambio iónico, actuando directamente sobre el mineral o sobre las bacterias de la placa. Respecto este tema, el Grup de Tècniques de Separació de la UAB ha desarrollado un material basado en resinas de intercambio iónico (NMTD) que permite aportar simultáneamente los iones calcio, fosfato y fluoruro [78]. La liberación controlada de estos tres iones satura la solución en fluorapatita y favorece su formación. En general, las formulaciones de productos dentales evitan incorporar calcio y fluoruro a la vez, ya que se podría formar fluoruro de calcio que tiene

---

[73] Li ZZ, Wen LX, Shao L, et. al. Fabrication of porous hollow silica nanoparticles and their applications in drug release control, *J Control Release*. 2004, 98 (2): 245-254.

[74] Dorfner K. Introduction to ion Exchange and ion exchangers. En: Dorfner K, (ed). Ion exchangers. Berlin-New York: Walter de Gruyter, 1991: 7-188.

[75] Shannon M, Bohn PW, Elimelech M, et. al. Science and technology for water purification in the coming decades, *Nature*. 2008, 452: 301-310.

[76] Samuelson O. Ion Exchange separation in analytical chemistry. Stockholm: Alquist & Wiksell, 1963.

[77] Reeves JP, Sutko JL. Sodium-calcium ion exchange in cardiac membrane vesicles. *Proc Natl Acad Sci*. 1979, 76 (2): 590-594.

[78] Valiente M, inventor. Sociedad Limitado para el desarrollo científico aplicado, assignee. Remineralizing material for organomineral tissues. USA patent US 6,413,498 B1, 1999.

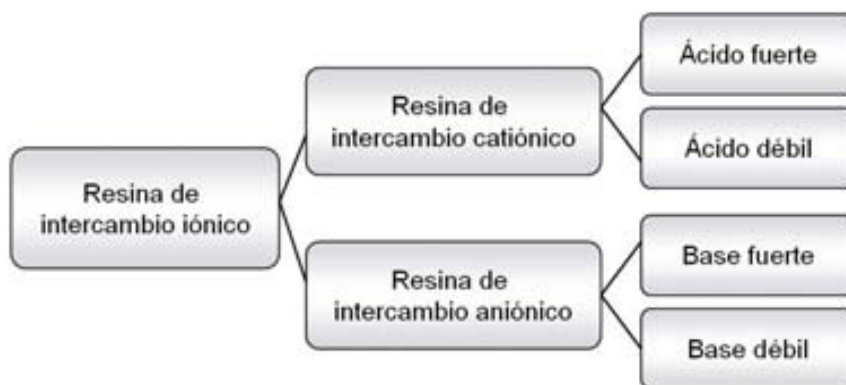


una baja solubilidad ( $k_{ps} \sim 10^{-10}$ ) y que precipitase. Mediante la combinación de diferentes resinas de intercambio iónico o de nanopartículas el material NMTD se ha podido aplicar a pastas dentales y chicles consiguiendo un gran poder remineralizante [79][80].

### 1.5.2 Resinas de intercambio iónico

De los polímeros funcionalizados con grupos intercambiadores iónicos los más destacados son las resinas de intercambio iónico. Son materiales sintéticos, sólidos e insolubles en agua, que se presentan en forma de esferas de 0.3 a 1.2 mm de tamaño efectivo, aunque también las hay en forma de polvo [81].

Están compuestas por una matriz tridimensional de cadenas de hidrocarburos entrecruzados que soportan grupos polares, ácidos o básicos, incorporados a una matriz de un polímero sintético (resinas estirénicas, resinas acrílicas, etc.). El grupo funcional de la resina es ionizable o incluye un par iónico cuyo contra-ión es el ión intercambiado por iones que se desean eliminar o secuestrar de la solución y este intercambio sólo funciona entre iones de igual carga eléctrica: cationes por cationes y aniones por aniones. Los grupos más comunes en resinas catiónicas (que interactúan con cationes) son grupos fosfatos, sulfatos, carboxílicos, etc, en cambio para las aniónicas (interacción con aniones) son frecuentemente compuestos con nitrógeno (aminas). Adicionalmente se encuentra un segundo nivel de clasificación que separa los grupos anteriores en débiles y fuertes como se muestra en la figura 1.5.1.



**Figura 1.5.1** Esquema clasificación de las resinas de intercambio iónico.

El comportamiento de las resinas es similar al comportamiento de los ácidos o bases con el mismo nombre. Las denominadas ácido o base fuerte corresponde a resinas con un poder ionizante alto, y por tanto, se disocian con facilidad obteniendo los iones de intercambio propios de la resina mediante una cinética rápida. De esta manera la capacidad de intercambio no tiene una gran dependencia del pH de la solución. Por el contrario, un ácido o una base débil tienen

[79] Torrado A, Valiente M, inventors. Sociedad Limitado para el desarrollo científico aplicado, asignes. Anonymous dentifrice product. USA patent, US2000447815, 2004.

[80] Margineda J, Gonzalo A, Valiente M, inventors. Sociedad limitada para el desarrollo científico aplicado, Margineda J Gonzalo A and Valiente M, asignes. Chewing Gum. WO0249448, 2002.

[81] Dorfner W. Ion exchangers. Berlin: Walter de Gruyter & Co., 1991.

disociaciones débiles dependientes del pH de la solución. Para el caso de resinas de ácidos débiles el pH óptimo de trabajo corresponde a valores por encima de 6.0, en cambio para las resinas de bases débiles son inferiores a 7.0 [82].

La estructura y el grado de entrecruzamiento determinarán también otras características de la resina como su estabilidad química, térmica y mecánica así como la movilidad de los iones lábiles al interior de la matriz. De manera que su proceso de preparación y síntesis debe tener en cuenta dos factores importantes: la constitución de la matriz polimérica que hace de base y la introducción de los grupos funcionales. Además el proceso debe permitir obtener una matriz tridimensional de cadenas de hidrocarburos entrecruzados que soporten grupos iónicos en posiciones fijas y con una estructura que permita una buena difusión de los iones hacia los lugares activos del interior del polímero [83].



**Figura 1.5.2** Imagen de resinas de intercambio iónico.

La concentración de los grupos funcionales inmovilizados en la matriz polimérica determina la capacidad de la resina mientras que su naturaleza determina la selectividad [84]. La capacidad de la resina se define como el número de grupos funcionales específicos unidos a la matriz polimérica por masa de resina expresándose en meq/g [85].

La principal ventaja de las resinas de intercambio iónico es que pueden recuperar su capacidad de intercambio original mediante el tratamiento con una solución regenerante. Esto las hace útiles en una gran variedad de campos: industria farmacéutica, tratamiento de aguas, catálisis, etc. La aplicación de este sistema en el presente trabajo permite la liberación controlada de los iones necesarios en las proporciones estequiométricas necesarias para la formación de fluorapatita minimizando la precipitación de fluoruro de calcio como ocurre en sistemas de aplicación directa de sales iónicas. Adicionalmente y debido a la utilización de resinas con iones con un carácter ácido o básico débil la liberación ocurre de manera controlada, en particular controlando la velocidad de liberación de iones al medio. El control de

---

[ 82] Srikanth MV, Sunil SA, Rao NS. Ion-Exchange resins as controlled drug delivery carriers. J Sci Res. 2010, 2 (3): 597-611.

[83] Zagorodni AA, Ion exchange materials: properties and applications. Amsterdam: Elsevier, 2006.

[84] Korkisch J. Handbook of ion Exchange resins: their application to inorganic analytical chemistry. Florida: CRC Press, 1989: 30-31.

[85] Helfferich F. Ion Exchange. New York: Dover Publications, 1995.

la velocidad y las condiciones de liberación de iones permiten modular la formación de la fluorapatita según el objetivo deseado, evitando estructuras indeseadas.

### 1.5.3 Nanopartículas mesoporosas de sílice

Una nanopartícula es un corpúsculo microscópico de tamaño inferior a los 100nm definido también como partícula con un área superficial mayor a  $60\text{m}^2/\text{cm}^3$  [86][86]. La amplia variedad de aplicaciones de las nanopartículas ha abierto un área nueva de investigación en los campos biomédicos, ópticos y electrónicos, permitiendo obtener nuevas características mejoradas gracias a la particularidad de su gran relación de superficie/masa. Estos materiales pueden ser clasificados en 4 grandes grupos según su composición:

- Materiales de base de carbón: esféricos, elipsoidales o tubulares, con un peso reducido, duros, elásticos y con conductividad eléctrica.
- Materiales de base metálica: *quantum dots* (transistores de un único electrón) o nanopartículas de oro, plata o metales reactivos como dióxido de titanio, entre otros.
- Dendrímeros: polímeros nanométricos con forma de árbol en las que cada rama puede diseñarse según las funciones químicas deseadas.
- Composites: combinación de nanopartículas con materiales de mayor dimensión.

Las nanopartículas estudiadas en este trabajo son formadas por sílice, nombre común que se les da a los materiales compuestos por dióxido de silicio ( $\text{SiO}_2$ ) que puede presentarse en una estructura cristalina o en forma amorfa. La sílice cristalina se puede encontrar en múltiples formas, una de las más conocidas es el cuarzo, el cual existe de manera natural y sintética. En cambio, la sílice amorfa puede ser dividida en materiales naturales y sintéticos. La multifuncionalidad, robustez y posibilidad de manipulación para poder obtener un material que proporciona una liberación controlada hace de las nanopartículas de sílice (MSNP) una de las nuevas promesas en el desarrollo de materiales nanoestructurados.

Son producidas a escala industrial para aplicaciones de cosméticos, medicamentos, barnices y alimentación. Además de la gran aplicación en los campos biomédicos y biotecnológicos, en tratamientos contra el cáncer, administración de fármacos e inmovilización de enzimas [87][88][89]. En el presente estudio se trabaja con sílice mesoporosa que contiene poros con un diámetro entre 2 y 50 nm. Se presenta en forma de polvo hidrofóbico con una estructura amorfa que tiende a agregarse debido a las calcinaciones. Su síntesis consiste en hacer reaccionar un ortosilicato con una plantilla de barras micelares dando como resultado

---

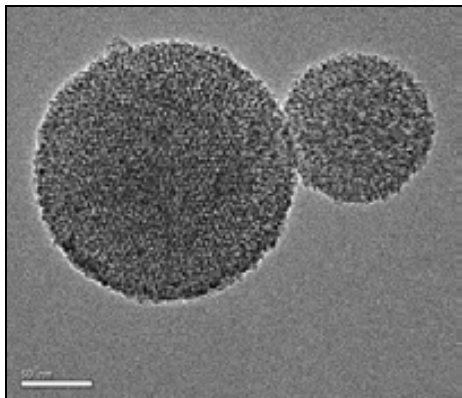
[86] Kreyling WG, Semmler-Behnke M, Chaudhry Q. A complementary definition of nanomaterial. *Nano Today*. 2010, 5:165-168.

[87] Hirsch LR, Stafford RJ, Bankson JA, et. al. Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proc Natl Acad Sci*. 2003, 100: 13549-13554.

[88] Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB J*. 2005, 19: 311-330.

[89] Slowing II, Vivero-Escoto JL, Wu CW, et. al. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008, 60:1278-1288.

esferas (figura 1.5.3) o barras de tamaño nano llenas de poros regularmente distribuidos. A continuación se elimina la plantilla mediante lavado con el pH adecuado [88] y por último se derivatizan adicionando los grupos funcionales de interés en la superficie mediante reacciones que dependen del grupo a adicionar [89].



**Figura 1.5.3** Imagen del microscopio electrónico de transmisión de nanopartículas de sílice.

Un aspecto importante a tener presente al trabajar con este tipo de materiales es la creciente exposición humana a las nanopartículas debido al crecimiento de la comercialización de los nanomateriales. Este hecho está siendo ampliamente estudiado debido a los posibles problemas de seguridad y toxicología que pueden comportar. En el caso de la sílice, este aspecto no implica una toxicidad directa de riesgo para la salud [90].

---

[90] Napierska D, Thomassen LC, Lison D, et. al. The nanosilica hazard: another variable entity. *Part Fibre Toxicol.* 2010, 7(1): 39.

## 1.6 OBJETIVOS

Los aspectos descritos anteriormente junto a la evidencia que en la actualidad es de gran importancia mantener una buena presencia y salud bucodental, conduce a una creciente demanda de nuevos productos dentales con mejoradas propiedades. Es por ello que el principal objetivo de tesis que se presenta es, por un lado, mejorar la funcionalidad de los diversos materiales dentales comerciales y/o patentados mediante la optimización o reformulación de dichos productos y, por otro lado, el desarrollo de nuevos procedimientos que exploten más eficientemente las bondades de estos productos. Adicionalmente, y con la finalidad de conseguir los objetivos anteriores, será necesario el desarrollo y aplicación de nuevas metodologías analíticas imprescindibles en la correcta caracterización tanto de los materiales reformulados como de los resultados obtenidos de su aplicación.

Para poder alcanzar estos objetivos genéricos, se han desarrollado diferentes estudios con metas específicas y que se esquematizan como sigue:

- Desarrollo de sistemas de intercambio iónico nanoestructurados o resinas para su aplicación en procesos de remineralización dental con liberación controlada de iones.
  - Incorporación de elementos reguladores de la remineralización dental (proteínas específicas) a los nuevos materiales remineralizantes.
  - Desarrollo de nuevos métodos analíticos para la caracterización del fluoruro incorporado en el mineral dental mediante el análisis directo de las especies de calcio. Aplicación de metodologías espectrales de difracción de rayos X, espectroscopía Raman y microscopía IR mediante fuente de luz sincrotrón.
- Mejora de la acción de un blanqueador dental comercial mediante reacción Fenton con catalizador heterogéneo. Incorporación de ion Fe(II) o Fe(III) inmovilizado en zeolitas como catalizador.
- Estudio de la inhibición de cálculos dentales mediante la aplicación de inhibidores específicos, en especial sus efectos sinérgicos en la inhibición y evaluando su acción sobre el esmalte dental.

# 2

## Metodología experimental

---

<b>2.1 Técnicas analíticas</b> .....	<b>29</b>
2.1.1 Potenciometría con electrodo selectivo de fluoruro (ISE) .....	29
2.1.2 Espectroscopía de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) .....	30
2.1.3 Microscopía electrónica de rastreo y de transmisión (SEM y TEM) .....	30
2.1.4 Difracción de rayos X .....	32
2.1.5 Espectroscopia Raman .....	33
2.1.6 Colorimetría en la superficie.....	34
2.1.7 Espectrometría infrarroja (IR) .....	35
2.1.8 Radiación sincrotrón.....	36

---

---

---

<b>2.2. Procedimientos experimentales.....</b>	<b>38</b>
2.2.1 Procedimiento de carga de las resinas de intercambio iónico .....	38
2.2.1.1 <i>Determinación de la capacidad de carga.....</i>	<i>38</i>
2.2.2 Procedimiento de carga de nanopartículas de sílice mesoporosa (MSNP) .....	39
2.2.2.1 <i>Diagramas de distribución de especies mediante el programa Medusa .....</i>	<i>39</i>
2.2.2.2 <i>Carga de las nanopartículas .....</i>	<i>39</i>
2.2.3 Preparación, remineralización y caracterización de las muestras dentales para análisis IR y Raman .....	41
2.2.3.1 <i>Preparación de las muestras dentales para el estudio del tratamiento remineralizante con resinas o nanopartículas .....</i>	<i>41</i>
2.2.3.2 <i>Preparación de las referencias de fluorapatita e hidroxiapatita.....</i>	<i>42</i>
2.2.3.3 <i>Condiciones del análisis IR.....</i>	<i>43</i>
2.2.3.4 <i>Condiciones del análisis Raman.....</i>	<i>43</i>
2.2.4 Estudio invitro previo de remineralización con amelogenina .....	44
2.2.4.1 <i>Expresión de la proteína amelogenina .....</i>	<i>44</i>
2.2.4.2 <i>Procedimiento de cristalización en presencia de amelogenina.....</i>	<i>45</i>
2.2.4.3 <i>Estudio de los minerales mediante difracción de rayos X .....</i>	<i>45</i>
2.2.4.4 <i>Estudio microscópico de los minerales.....</i>	<i>46</i>
2.2.4.5 <i>Procesos de remineralización con resinas y nanopartículas en presencia de amelogenina .....</i>	<i>46</i>
2.2.5 Evaluación carácter antitártar de fitato y pirofosfato .....	47
2.2.6 Procedimiento experimental blanqueo dental .....	49
2.2.6.1 <i>Carga y cuantificación de la capacidad de la zeolita .....</i>	<i>49</i>
2.2.6.2 <i>Proceso de blanqueamiento .....</i>	<i>49</i>

---

---

En este capítulo se describen los aspectos experimentales de los estudios realizados, incluyendo, las técnicas analíticas más relevantes, los reactivos y materiales empleados así como las metodologías más significativas. Esta descripción incluye aspectos básicos de las técnicas utilizadas que creemos necesario para una mejor comprensión de la memoria de aquellos lectores no especialistas en técnicas analíticas.

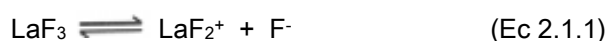
## 2.1 TÉCNICAS ANALÍTICAS

Las técnicas analíticas que se describen a continuación han sido utilizadas en los estudios que se presentan siguiendo las metodologías apropiadas para cada uno de estos estudios, con particular énfasis en la caracterización de los materiales y procesos bajo estudio.

### 2.1.1 Potenciometría con electrodo selectivo de fluoruro (ISE)

La potenciometría con electrodo selectivo de fluoruro se ha utilizado para cuantificar la capacidad de carga tanto de las resinas de intercambio iónico empleadas como de las nanopartículas sintetizadas.

Un electrodo selectivo de iones (ISE) es un sensor electroquímico que posee una membrana selectiva capaz de responder, mediante una diferencia de potencial, a una especie concreta discriminando el resto de compuestos en solución. El fundamento de este electrodo de membrana cristalina es similar al del electrodo de vidrio utilizado para medir pH, con la diferencia que la membrana está formada por un monocristal de fluoruro de un elemento de tierras raras, como  $\text{LaF}_3$ ,  $\text{NdF}_3$  o  $\text{PrF}_3$  [1]. El sistema basa su funcionamiento en el hecho que cuando se introduce el electrodo en una solución se establece un flujo momentáneo de fluoruros a través de la interfaz existente entre la membrana selectiva y la disolución (Ecuación 2.1.1), generando una variación de potencial que responde a la ecuación de Nerst [2].



El electrodo no responde directamente a la concentración sino a la actividad de la especie iónica de interés y ambos valores se relacionen mediante un coeficiente de actividad que depende de la fuerza iónica total del medio. Para mantener una fuerza iónica prácticamente constante se añade un tampón iónico (conocido como TISAB, Total Ionic Strength Adjustment Buffer) que permite relacionar directamente la señal con la concentración.

---

[1] Frant MS, Ross JW. Electrode for sensing fluoride ion activity in solution. *Science*. 1966, 154 (756): 1553-1555.

[2] Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. Potenciometría. Principios de análisis instrumental. Madrid: Mc Graw-Hill. 2001: 639-671.

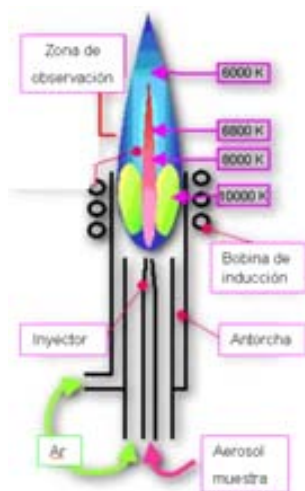


### 2.1.2 Espectroscopia de emisión atómica en plasma acoplado inductivamente (ICP-OES)

La espectroscopia de emisión atómica ha permitido la cuantificación de la capacidad de carga de las resinas y los nanomateriales sintetizados.

Esta técnica se basa en la vaporización, disociación, ionización y excitación de los diferentes elementos químicos de una muestra en el interior de un plasma. El plasma es un gas ionizado (argón en el equipo utilizado) que produce un medio de una alta densidad de electrones, eléctricamente neutro y confinado en un tubo de descarga. Durante el proceso de desexcitación (o relajación) de los átomos neutros e iones en el interior del plasma (Figura 2.1.1) se producen las emisiones de radiación electromagnética en la zona del UV-visible. Estas radiaciones, características de cada elemento, se separan en función de su longitud de onda y finalmente se mide su intensidad. La selección de la longitud de onda nos permite determinar el metal cualitativamente, mientras que la intensidad de la radiación emitida nos proporcionará la información para poder cuantificarlo<sup>[3]</sup>.

En general, se obtiene una excitación de las líneas más sensibles con un rango analítico que comprende constituyentes mayoritarios, minoritarios, trazas y ultratrazas. Las peculiares características del sistema de excitación por plasma hacen de esta técnica una herramienta valiosa para determinar un gran número de elementos, aunque a un coste alto, permite una alta precisión con la corrección de interferencias obteniendo un análisis multielemental en un amplio rango lineal con efectos de matriz mínimos <sup>[4]</sup>.



**Figura 2.1.1** Esquema del funcionamiento del plasma de un ICP-OES.

### 2.1.3 Microscopia electrónica de barrido y de transmisión

La microscopia electrónica de barrido (SEM) se ha utilizado para caracterizar la superficie de las muestras dentales antes y después de los tratamientos. Complementariamente, la

<sup>[3]</sup> Moore GL. Introduction to inductively coupled plasma emission spectroscopy. Amsterdam: Elsevier. 1989.

<sup>[4]</sup> Olesik JW. Elemental analysis using ICP-OES and ICP-MS. *Anal Chem.* 1991, 63: 12A-16A.

microscopía electrónica de transmisión (TEM) ha permitido medir el tamaño de las nanopartículas y estudiar su comportamiento antes y después de la carga.

Las técnicas de microscopía electrónica son ampliamente utilizadas para la caracterización de superficies a altas magnificaciones <sup>[5]</sup>. Utiliza un haz de electrones acelerados por un cañón electrónico en lugar de fotones o luz visible para formar imágenes. Los electrones se deslazan en un medio de alto vacío e interactúan con la muestra, a continuación se produce la amplificación de la imagen sobre una pantalla sensible al impacto de los electrones.

Existen dos tipos principales de microscopios electrónicos: el microscopio electrónico de barrido y el microscopio electrónico de transmisión. El microscopio de barrido hace impactar el haz de electrones sobre la superficie de la muestra produciendo un haz de electrones reflejados procedente de elementos presentes en la superficie del material, lo que determina la formación de una imagen de la superficie. Tiene una gran profundidad de campo, permitiendo enfocar una gran parte de la muestra, además de producir imágenes tridimensionales realistas de alta resolución que permite obtener detalles de alta magnificación. La instrumentación antigua exigía que las muestras fueran conductoras o que se recubriesen con un material conductor (metalizar la muestra), en cambio, los equipos nuevos permiten trabajar con muestras poco conductoras sin necesidad de metalizarlas, esta particularidad ha permitido caracterizar los dientes antes y después de los tratamientos. El sistema de compensación de carga del que están dotados permite la adquisición de la imagen de alta resolución de muestras no conductoras. Los electrones que se acumulan en la superficie de la muestra son arrastrados por un débil flujo de nitrógeno que evita la carga de la superficie de la muestra y, por tanto, obtener imágenes con poca resolución. Los microscopios electrónicos de barrido pueden ampliar los objetos 200.000 veces o más <sup>[6]</sup>.

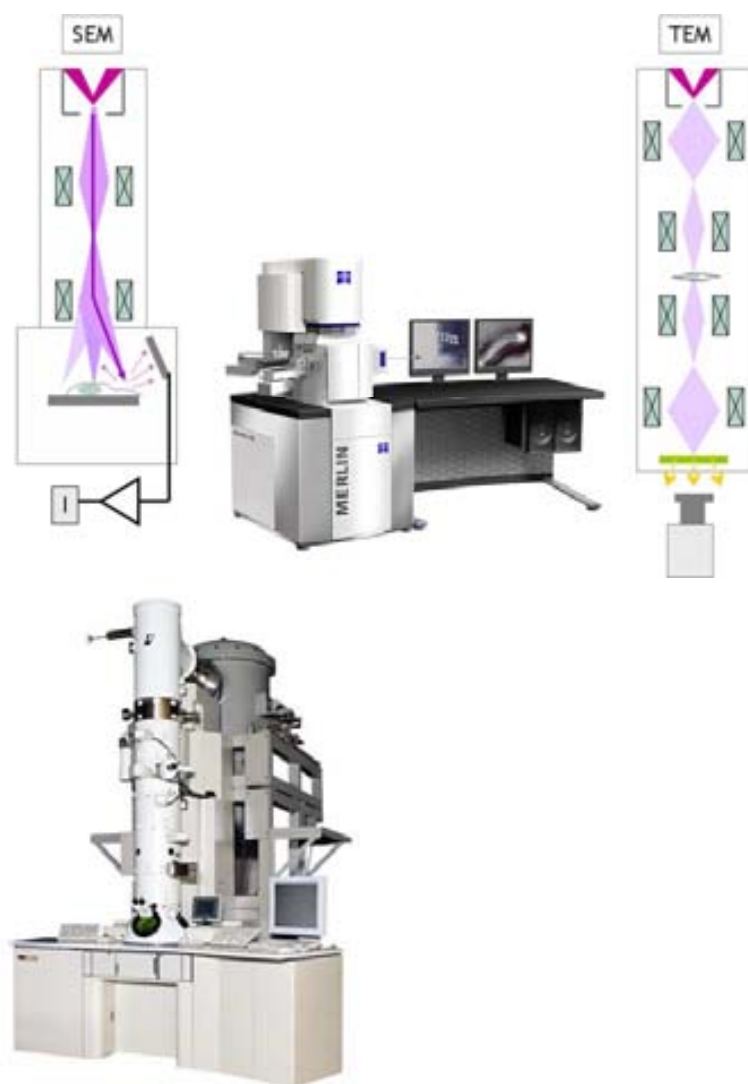
El microscopio de transmisión emite un haz de electrones, de los cuales una parte se reflejan o son absorbidos por la muestra y otra parte la atraviesa formando la imagen aumentada. Para utilizar este microscopio es necesario tener la muestra en forma de capas finas no mayores a unos 0,20  $\mu\text{m}$ . Se coloca una placa fotográfica o una pantalla fluorescente detrás del objeto para registrar la imagen aumentada. Los microscopios electrónicos de transmisión pueden aumentar un objeto hasta un millón de veces <sup>[7]</sup>.

---

<sup>[5]</sup> Hubbard A. The Handbook of surface imaging and visualization. Boca Raton: CRC Press. 1995.

<sup>[6]</sup> Wells OC. Scanning electron microscopy. En: Buschow KHJ, Cahns RW, Flemings MC, et. al.(ed). Encyclopedia of materials: Science and Technology Oxford: Elsevier, 2001: 8265-8269.

<sup>[7]</sup> Williams D Carter CB. Transmission Electron Microscopy. A Textbook for Materials Science. New York: Plenum Press, 1996.



**Figura 2.1.2** Esquema del funcionamiento de los microscopios electrónicos: Microscopía electrónica de rastreo (SEM) y de transmisión (TEM).

#### 2.1.4 Difracción de rayos X

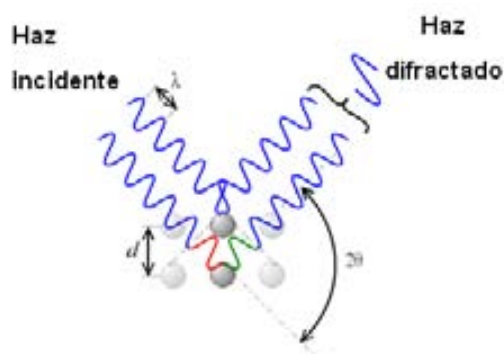
Se ha utilizado la difracción de rayos X para la identificación en muestras dentales de hidroxiapatita producida en presencia o ausencia de proteína.

La difracción de rayos X es uno de los fenómenos físicos que se producen al interaccionar un haz de rayos X, de una determinada longitud de onda, con una sustancia cristalina. Se basa en la dispersión coherente del haz de rayos X por parte de la materia (manteniéndose la longitud de onda de la radiación) y en la interferencia constructiva de las ondas que están en fase y que se dispersan en determinadas direcciones del espacio [8].

La difracción de rayos en muestras permite la identificación de fases cristalinas tanto en su aspecto cualitativo como cuantitativo, debido a que cada sólido cristalino posee un

[8] Ziller JW, Rheingold AL. X-Ray Crystallography. En: Drago RS (ed). Physical methods for chemists. London: Saunders (W.B.) Co Ltd. 1992: 689-711.

difractograma característico. Estudios de polimorfismo, transiciones de fase, soluciones sólidas, medida del tamaño de partícula, determinación de diagramas de fase, etc., se realizan habitualmente por difracción de rayos X <sup>[9]</sup>.



**Figura 2.1.3** Esquema interacción rayos X con una red cristalina (muestra).

### 2.1.5 Espectroscopia Raman

La espectroscopía Raman ha sido la técnica utilizada para caracterizar los resultados obtenidos en los estudios de incorporación de fluoruro en muestras minerales de hidroxiapatita y en el esmalte dental.

La espectrometría Raman es una técnica espectroscópica de alta resolución que proporciona en pocos segundos información química y estructural de casi cualquier material o compuesto permitiendo su identificación <sup>[10]</sup>. Utilizada para el estudio de los modos vibracionales, rotacionales y otros de baja frecuencia en un sistema. Se basa en la dispersión inelástica, o dispersión Raman, de un haz de luz monocromática, que por lo general procede de un láser en el rango visible, infrarrojo cercano o ultravioleta cercano. Una pequeña porción de la luz es dispersada inelásticamente experimentando ligeros cambios de frecuencia que son característicos del material analizado e independiente de la frecuencia de la luz incidente.

Cuando los fotones del haz incidente, con energía  $h\nu_0$  (donde  $h$  es la constante de Plank) mucho mayor a la diferencia de energía entre dos niveles vibracionales (o rotacionales) de la molécula, chocan con ella, la mayor parte la atraviesan pero una pequeña fracción es dispersada. Esta dispersión es debida a que el fotón incidente lleva a la molécula transitoriamente a un nivel de energía superior no permitido, el cual abandona rápidamente para pasar a un nivel de energía permitido emitiendo un fotón. La frecuencia a la cual es liberado dependerá del salto energético realizado por la molécula.

Pueden distinguirse diversos casos (Figura 2.1.4):

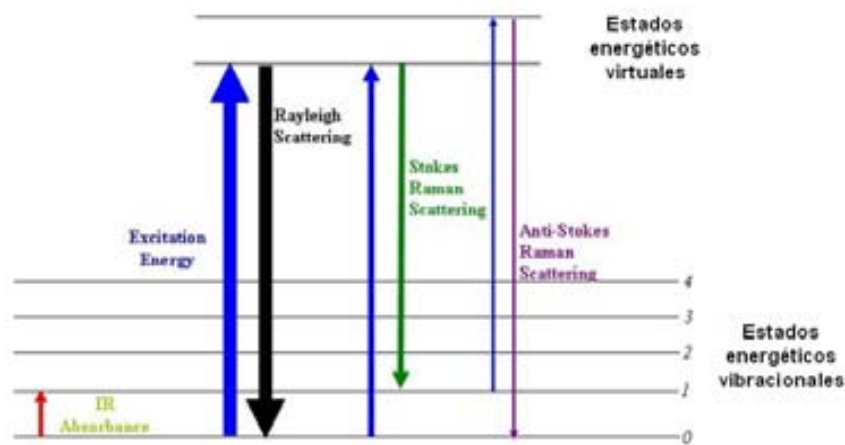
- si el resultado de la interacción fotón-molécula es un fotón dispersado a la misma frecuencia que el fotón incidente, es debido a un choque elástico ya que no sufren

<sup>[9]</sup> Misture ST, Snyder RL. X-Ray diffraction. En: Buschow KHJ, Cahns RW, Flemings MC, et. al.(ed). Encyclopedia of materials: Science and Technology Oxford: Elsevier, 2001: 8265-8269.

<sup>[10]</sup> Das RS, Agrawal YK, Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications. *Vib Spectroscop.* 2011, 57: 163-176.

variaciones en su estado energético. La molécula vuelve al mismo nivel de energía que tenía antes del choque y el fotón la misma frecuencia  $\nu_0$  que el incidente, dando lugar a la dispersión Rayleigh.

- Si el resultado de la interacción fotón-molécula produce un fotón dispersado con frecuencia diferente de la incidente, el choque será inelástico y puede dar lugar a dos fenómenos:
  - o Si el fotón dispersado tiene una frecuencia menor que el incidente, se produce una transferencia de energía del fotón a la molécula que provoca que después de saltar al estado de energía no permitido vuelve a uno mayor al inicial. El fotón dispersado quedará con una frecuencia  $\nu_0 - \nu_r$ . A esta dispersión se la denomina Raman Stokes. Llamados también red shift debido a que absorben energía.
  - o Si el fotón dispersado tiene una frecuencia mayor que el incidente, se produce una transferencia de energía de la molécula al fotón que provoca que después de saltar al estado de energía no permitido vuelve a uno menor al inicial. El fotón dispersado quedará con una frecuencia  $\nu_0 + \nu_r$ . A esta dispersión se la denomina Raman anti-Stokes. Llamados también blue shift debido a que emiten energía.



**Figura 2.1.4** Diagrama energético que muestra las transiciones entre estados energéticos para diferentes interacciones luz-materia.

La luz que recoge la lente se envía a través de un monocromador que permite filtrar las longitudes cercanas a la línea láser (dispersión Rayleigh) mientras el resto es recogida por el detector. Se trata de una técnica de análisis no-destruktiva que se realiza directamente sobre el material a analizar sin necesidad de ningún tipo de preparativa especial y que no conlleva ninguna alteración de la superficie sobre la que se realiza el análisis. Existen una gran variedad

de espectrometría Raman: superficie potenciada, polarizada, estimulada, de transmisión, la compensada espacialmente y la híper-Raman [11].

### 2.1.6 Colorimetría de superficie

En los procedimientos de blanqueamiento dental existe una necesidad de determinar el color para poder clasificarlo y reproducirlo. Para ello es indispensable representar el color mediante coordenadas con el fin de intentar representar la observación del color de una forma objetiva. El procedimiento utilizado en la medida del color consiste sustancialmente en sumar la respuesta de estímulos de colores y su normalización a la curva espectral de respuesta del fotorreceptor sensible al color.

Existen diversos sistemas de medida del color entre los cuales los más importantes son el Sistema Munsell y el CIELab. El primero compara el color percibido de un objeto y lo describe en un sistema de coordenadas tridimensionales donde se consideran las propiedades del matiz (rojo, amarillo, verde...), valor o intensidad (luminosidad de un color comparado en una escala de grises) y la cromacidad o saturación (cantidad de blanco en el color). Pero el sistema utilizado como referencia es la curva espectral codificada de la Comisión Internacional de Iluminación (conocida por sus siglas CIELab en francés). Mide la emisión reflejada del color en tres ejes del espacio (Figura 2.1.5): L\* (luminosidad), a\* (rojo-verde) y b\* (amarillo-azul) [12]. Las diferencias totales del color se pueden calcular según la Ecuación 2.2. Este sistema se ha utilizado en el presente trabajo debido a que permite determinar el color de diferentes secciones del diente obteniendo colores mas consistentes que con la evaluación visual [13].

$$\Delta E^*_{ab} = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (\text{Ec. 2.2})$$

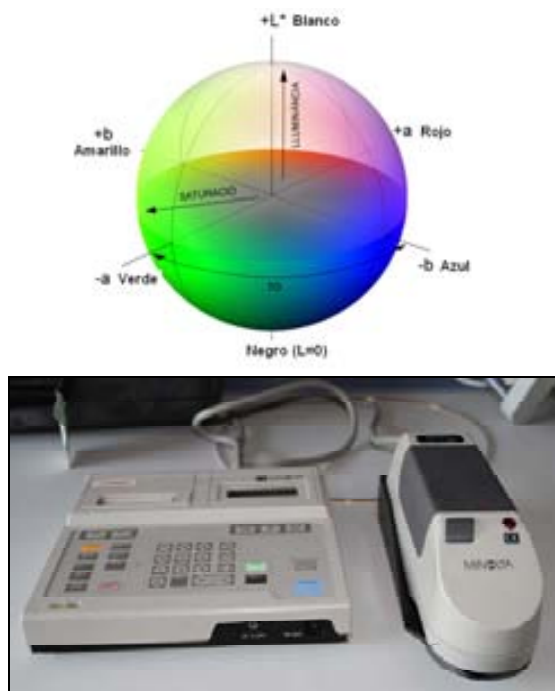
Para los estudios de variación de color durante los procedimientos de blanqueo se ha utilizado un colorímetro Minolta CR-231 con un área de medida de 3mm. El cual utiliza iluminación difusa y capta la luz reflejada por el diente conduciéndola por la fibra óptica para su posterior análisis.

---

[11] Pelletier MJ, Pelletier CC. Spectroscopic theory for Chemicals Imaging. En: Sasic S, Ozaki Y (ed). Raman, Infrared and near-infrared Chemicals Imaging. New Jersey: John Wiley & Sons, 2010.

[12] Joiner A. Tooth colour: a review of the literature. *J Dent.* 2004, 24: 3-12.

[13] Albers HF. Odontología estética. Sección y colocación de materiales. España: Labor Inc., 1988.



**Figura 2.1.5** Espacio de color L\*a\*b\* y colorímetro empleado.

### 2.1.7 Espectrometría Infrarroja (IR)

La espectrometría de infrarrojos ha permitido en este trabajo caracterizar las nanopartículas y su funcionalización. Además, utilizando como fuente la radiación sincrotrón que proporciona una alta resolución, que ha permitido distinguir entre los compuestos de hidroxiapatita y fluorapatita.

La espectrometría de infrarrojos (IR) es un tipo de espectrometría de absorción que utiliza la región infrarroja del espectro electromagnético que comprende tres regiones (infrarrojo cercano, medio y lejano). El infrarrojo lejano (aproximadamente  $400-10\text{ cm}^{-1}$ ) se encuentra adyacente a la región de microondas, posee una baja energía y puede ser usado en espectroscopia rotacional. El infrarrojo medio (aproximadamente  $4000-400\text{ cm}^{-1}$ ) puede ser usado para estudiar las vibraciones fundamentales y la estructura rotacional vibracional, mientras que el infrarrojo cercano ( $14000-4000\text{ cm}^{-1}$ ) puede excitar sobretonos o vibraciones armónicas [11].

La espectrometría IR se basa en que los enlaces químicos de las sustancias tienen frecuencias de vibración específicas que corresponden a los niveles de energía de la molécula, por ello, nos permite identificar un compuesto o investigar la composición de una muestra. Para que una vibración aparezca en el espectro infrarrojo, la molécula debe someterse a un cambio en su momento dipolar durante la vibración.

Con el fin de hacer medidas de una muestra, se transmite un rayo monocromático de luz IR a través de la muestra midiéndose la cantidad de energía absorbida. Repitiendo esta operación en un rango de longitudes de onda de interés (por lo general,  $4000-400\text{ cm}^{-1}$ ) se puede construir un gráfico.

### 2.1.8 Radiación sincrotrón

El sincrotrón es un tipo de acelerador de partículas que mantiene una órbita cerrada. Los primeros sincrotrones se derivaron del ciclotrón (1930), el cual utiliza un campo magnético constante para curvar la trayectoria de las partículas aceleradas mediante un campo eléctrico también constante, en cambio en el sincrotrón ambos campos varían <sup>[14]</sup>. Actualmente hay alrededor de 70 instalaciones de sincrotrón en todo el mundo, que permiten llevar a cabo una gran cantidad de experimentos en una amplia variedad de campos: biología, patrimonio cultural, química, ciencia de los materiales, ingeniería, ciencias ambientales, biomedicina y muchos más <sup>[15]</sup>.

Los sincrotrones pueden usarse como colisionadores de partículas. En este tipo de sincrotrones, dos haces de partículas diferentes se aceleran en direcciones opuestas para estudiar los productos de su colisión. En otros sincrotrones se mantiene un haz de partículas de un solo tipo circulando indefinidamente a una energía fija y una trayectoria curvada, emitiendo radiación sincrotrón. La radiación sincrotrón cubre un amplio rango de energías o longitudes de onda que abarca desde el infrarrojo hasta los rayos X. La intensidad de la radiación es mucho mayor que la de las fuentes convencionales además de ser sintonizable, de gran brillantez y polarizada. Una fuente sintonizable permite escoger, de un continuo de valores de la longitud de onda, la que más se adapta a las necesidades requeridas. La brillantez de la fuente se refiere a la propiedad de localizar la radiación en un área muy pequeña y, por tanto, obtener una alta intensidad siendo la radiación de sincrotrón un millón de veces más brillante que la que proviene de las fuentes convencionales <sup>[16]</sup>. Es por ello que la aplicación de una fuente sincrotrón a un microscopio IR permite una alta precisión espacial para el estudio de las muestras más pequeñas. Ambas cualidades, alta resolución espacial y una relación alta de señal/ruido, hacen posible la caracterización de muestras biológicas y, en este caso, la estructura y morfología de muestras dentales.

Como se observa en la figura 2.1.7 las instalaciones de radiación sincrotrón constan de diferentes componentes comunes en todas ellas:

- *Fuente de partículas*
- *Aceleradores auxiliares*: las partículas se inyectan en un acelerador lineal (*Linac*) y de ahí pasan a un sincrotrón llamado *booster* donde adquieren su energía final antes de ser introducidos en el anillo de almacenamiento (*Storage Ring*).
- *Cavidades de radiofrecuencia*: estructuras huecas donde se aplica el voltaje oscilante que acelera las partículas manteniéndolas en paquetes que circulan aproximadamente a la misma velocidad y frecuencia.

---

<sup>[14]</sup> Baldwin GC. Origin of Synchrotron Radiation, *Phys Today*, 1975, 28 (1): 9.

<sup>[15]</sup> Madden RP. Synchrotron Radiation and Applications. New York: McGraw-Hill Book Company, 1974. Codling K. Atomic and Molecular Physics Using Synchrotron Radiation—the Early Years. *J Synch Rad*, 1997, 6: 316.

<sup>[16]</sup> Codling K. Atomic and Molecular Physics Using Synchrotron Radiation—the Early Years. *J Synch Rad*, 1997, 6: 316.



- *Elementos magnéticos:* son principalmente imanes con los polos orientados perpendicularmente a la órbita. Los dipolos curvan la trayectoria del haz y los cuadrupolos y sextupolos sirven para mantener el haz enfocado.
- *Líneas de luz de sincrotrón (cabina óptica, cabina experimental y estación de trabajo):* la radiación ultravioleta y de rayos X emitida por el sincrotrón puede ser utilizada en variedad de experimentos. Las líneas consisten en cavidades vacías que transportan la radiación hasta instrumentos que adaptan las propiedades de la radiación según los experimentos deseados. En el caso de este trabajo consiste en una serie de espejos, monocromadores y microscopios de IR.



**Figura 2.1.7** Esquema de los componentes de un sincrotrón.

## 2.2 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

A continuación se describen las distintas metodologías y procedimientos empleados en los estudios realizados que se recogen en la presente memoria.

### 2.2.1 Procedimiento de carga de las resinas de intercambio iónico

Para obtener el máximo de carga se realiza una activación de las resinas previa al proceso de carga. Este paso depende del grupo funcional de la resina, para las resinas con grupos carboxílicos que consiste en la desprotonación mediante una solución de hidroxilos, en cambio para las resinas aniónicas que contienen grupos amino se deben protonar mediante una solución de pH ácido que aporte protones. Así, el procedimiento de carga dependerá del ion de interés. (Tabla 2.2.1):

Ion	Solución carga	Tiempo agitación	Nº Ciclos	Limpieza	Secado
F <sup>-</sup>	NaF 0,7M (ajustada a pH~2 con HF)	1h	2	MilliQ	60C – 24h
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,15M				
Ca <sup>2+</sup>	Ca(OH) <sub>2</sub> 0,3M				
Zn <sup>2+</sup>	ZnCl <sub>2</sub> 0.5M Pretratar con NaOH (5min)				

**Tabla 2.2.1** Condiciones del procedimiento de carga de las resinas.

#### 2.2.1.1 Determinación de la capacidad de carga

Se pesa con precisión una cantidad perfectamente conocida de resina cargada completamente seca. A continuación se agita durante una hora en un volumen exacto de solución de descarga, la composición de la solución varía según si se trata de una resina catiónica (HCl 0,5M) o aniónica (NaNO<sub>3</sub> 0,5M). El proceso se realiza por triplicado para obtener un valor medio con un bajo error.

Para determinar si los iones se encuentran enlazados a la resina o si están simplemente adheridos a ella, se lava la resina con agua MilliQ que se analizará también en el ICP-OES o electrodo de F<sup>-</sup>.

El valor de la capacidad se determina aplicando la siguiente ecuación 2.2.1:

$$q_i = \frac{V \cdot C_i}{W} \quad (\text{Ec. 2.2.1})$$

donde V: volumen de la disolución

C: concentración del ion de interés de la solución de descarga

W: peso de resina descargada

## 2.2.2 Procedimiento de carga de nanopartículas de sílice mesoporosa (MSNP)

### 2.2.2.1 Diagramas de distribución de especies mediante el programa Medusa

Para determinar las condiciones de pH ideales para la carga de las MSNP, condiciones en las que se encontraba un mayor número de iones libres, se realizaron los diagramas de especies químicas utilizando el programa MEDUSA (**M**ake **E**quilibrium **D**iagrams **U**sing **S**ophisticated **A**lgorithms) <sup>[17]</sup> para los cuatro iones de interés. MEDUSA es una interfaz de Windows (en MS-DOS) que realiza los cálculos necesarios (basados en constantes de equilibrio y balances de masa) para crear diagramas de equilibrio químico en los cuales se representan las especies químicas y compuestos que pueden encontrarse en solución según las condiciones de la misma (concentración, iones en solución y pH, principalmente).

### 2.2.2.2 Carga de las nanopartículas

Para la carga de las nanopartículas de sílice mesoporosas (MSNP) se realizaron procesos adecuados al ion con el que se quería cargar.

#### *MSNP cargadas con cationes ( $Ca^{2+}$ y $Zn^{2+}$ )*

Antes del proceso de carga, la nanosílice se activó desprotonando el grupo carboxílico con el que estaban funcionalizadas. Para ello se agitó una cantidad de MSNP durante 20 minutos en una solución de NaOH 0,5M repitiendo el ciclo 2 veces. La carga se realizó agitando vigorosamente durante 2 horas (o el tiempo evaluado) las nanopartículas activadas en una solución de 6,76 mM de  $Ca(OH)_2$  o 76,3 mM de  $ZnCl_2$ . Antes de la agitación se sonicó la suspensión para evitar agregados que pudiesen disminuir la efectividad del proceso de carga. Se realizaron 3 ciclos de sonicado de 1 minuto para evitar un sonicado largo que pudiese aumentar la temperatura, y por tanto, variar las propiedades de las nanopartículas.

La separación de las nanopartículas se realizó centrifugando a alta velocidad (80000 rpm) durante 20 minutos a 20C. El sólido centrifugado (*pellets*) se sonicó de nuevo y se lavó con agua MilliQ durante 20 minutos para eliminar la concentración de cationes adheridos a la superficie. La separación del agua de lavado fue por centrifugación utilizando las mismas condiciones anteriores. Finalmente, se secaron durante 12 horas en estufa a temperatura de 60C.

Para cuantificar la capacidad se realizó la descarga, que consistía en agitar durante 1 hora las nanopartículas con una solución de HCl 0,5M, de manera que los protones de la solución de descarga desplazan el ion cargado. Las soluciones de carga, antes y después del proceso, la solución de lavado y la de descarga se analizaron por ICP-OES para cuantificar la concentración de los iones presentes.

#### *MSNP cargadas con aniones ( $PO_4^{3-}$ y $F^-$ )*

Para la carga con aniones la activación previa a la carga de las nanopartículas no se realizó ya que las soluciones utilizadas para las cargas eran suficientemente ácidas para activar los grupos funcionales de la MSNP. Durante 2 horas una cantidad conocida de

---

[17] <http://www.kemi.kth.se/medusa/>

nanopartículas se agitó con  $\text{H}_3\text{PO}_4$  150mM o NaF 10mM, para el caso del fluoruro el pH de carga se ajustó a 2 utilizando HF. El resto del proceso coincide con el descrito en el apartado anterior con carga de aniones, con la diferencia en la solución utilizada para la descarga, que este caso fue  $\text{NaNO}_3$  0,5M, y el método utilizado para determinar la concentración de  $\text{F}^-$  fue potenciométrico utilizando un electrodo selectivo de fluoruro.

### 2.2.3 Preparación, remineralización y caracterización de muestras dentales para el análisis IR y Raman

#### 2.2.3.1 Preparación de las muestras dentales para el estudio del tratamiento remineralizante con resinas o nanopartículas

Para los tratamientos de remineralización controlada se seleccionaron un total de 15 molares humanos suministrados por dentistas. Los especímenes no presentaban ningún tipo de traumatismo o lesión (no caries) manteniendo el esmalte en perfectas condiciones. Hasta su utilización se conservaron en cloramina-T al 0,5%. En los casos de muestras con raíces grandes que pudiesen dificultar la manipulación de las muestras durante el tratamiento, se eliminó la raíz utilizando una sierra de diamante. Adicionalmente los dientes se cortaron en 4 fragmentos para poder utilizar cada fracción en los diferentes tratamientos y poder así realizar posteriormente una comparación minimizando la variabilidad que aporta a los resultados la utilización de dientes diferentes. Previo al proceso de remineralización, la superficie de los dientes fue tratada con  $H_3PO_4$  al 37% con el fin de preparar la superficie para el tratamiento. El resultado del gravado se caracterizó mediante microscopía de rastreo para observar la homogeneidad de la superficie gravada y luego, poder comparar con las imágenes obtenidas después del tratamiento remineralizante.

#### *Tratamiento con resinas (NMTD)*

A continuación se aplicó sobre la superficie del diente una suspensión de NMTD en saliva artificial tanto en ausencia como en presencia de amelogenina (4,5M KCl, 2,3M NaCl, 100µg/ml amelogenina) (Figura 2.2.1) [18]. El NMTD [19] es un material destinado a la remineralización de tejidos organominerales que se basa en la combinación de diferentes resinas de intercambio iónico que aportan al tejido calcio, fosfato y fluoruro en las mismas proporciones molares que la fluorapatita y a una velocidad controlada. Adicionalmente, también se compone de zinc que funciona como un bactericida. El tratamiento se realizó durante 4 días a temperatura ambiente, añadiendo gotas de saliva periódicamente para reproducir las condiciones orales y renovando cada 12 horas la mezcla de NMTD. Al finalizar el tratamiento se elimina de la superficie del diente el NMTD con agua MilliQ y un cepillado suave.



**Figura 2.2.1** Aplicación de NMTD sobre una muestra dental.

[18] Fan Y, Sun Z, Moradian-Oldak J. Controlled remineralization of enamel in the presence of amelogenin and fluoride. *Biomaterials*. 2009, 30: 478–483.

[19] Valiente M, inventor. Sociedad Limitado para el Desarrollo Científico Aplicado, assignee. Remineralizing material for organomineral tissues. USA patent US 6,413,498B1. 2002, Jul, 6, 1999.

### *Tratamiento con nanopartículas*

El producto remineralizante se preparó mediante la mezcla de las 4 tipos distintos de nanopartículas cargadas respectivamente con iones de calcio, fosfato, zinc y fluoruro, en proporciones estequiométricas siguiendo el mismo procedimiento empleado para la remineralización con NMTD. El tiempo de tratamiento fue de 4 días con el fin de reproducir las condiciones del tratamiento anterior y poder realizar una comparativa de resultados. Al finalizar el tratamiento se eliminó el material de la superficie mediante un cepillado suave con agua MilliQ. Adicionalmente y debido a que las imágenes de microscopía de las muestras mostraban residuos de nanopartículas adheridas a la superficie del diente se realizó un ciclo de lavados en agua MilliQ en un medio sonificado.

### *Preparación de las muestras dentales para análisis IR y Raman*

Para ambos casos (resinas y nanopartículas) y tras el tratamiento remineralizante, se observó la superficie dental mediante microscopía de rastreo justo después del procedimiento de remineralización y antes de la preparación de las muestras para análisis IR y Raman.

Cada fragmento de diente se inmovilizó en una resina epoxi que no produce interferencias en las medidas de caracterización. A continuación, la resina se pulió para obtener un corte ecuatorial/transversal de la muestra utilizando diferentes gramajes de pulido de dureza variable logrando una superficie lo más lisa posible. De esta manera, por desgaste, se obtuvieron láminas de 30-35  $\mu\text{m}$  de grosor inmovilizadas sobre un soporte de porta muestras (Figura 2.2.2).



**Figura 2.2.2** Muestra dental preparada para el análisis por IR y Raman

### 2.2.3.2 Preparación de las referencias de fluorapatita e hidroxiapatita

La síntesis de fluorapatita se realizó según una reacción en fase sólida entre  $\text{CaF}_2$  y  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  [20]. Se mezclaron en un mortero ágata durante 15 minutos, 40g  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  i 3,5g  $\text{CaF}_2$  (relación molar Ca/P: 1,67). A continuación, se introdujo la mezcla en la mufla durante 3h a 1100C, el sólido resultante se molturó durante 15 minutos más.

[20] Wei M, Evans JH, Bostrom T, et. al. Synthesis and characterization of hydroxyapatite, fluoride-substituted hydroxyapatite and fluorapatite. *J Mater Sci Mater Med.* 2003, 14 (4): 191-194.

Las muestras referencia de HA y FA se prepararon en forma de pastilla a partir de polvo utilizando una prensa. Para cada muestra, se prensó una cantidad aproximada de 300mg a una presión de 10000kg durante 10 min, obteniendo de esta manera unas pastillas de 1cm de diámetro y entre 1 y 2 mm de grosor.

#### 2.2.3.3 Condiciones del análisis IR

Para poder realizar la selección de las áreas de interés (Regions Of Interest ROI), el microscopio Thermo Scientific Nicolet iN10 FT-IR acoplado a una fuente global, permitió escanear la totalidad de la superficie del diente gracias a la alta velocidad de escaneo que implica también una baja resolución espacial. Los espectros se adquirieron en modo reflexión con una resolución espectral de  $16\text{cm}^{-1}$  en el rango  $4000\text{-}650\text{ cm}^{-1}$  utilizando como *background* para las correcciones de los espectros el espectro de referencia de una lámina de Au.

Para el análisis de las ROI ya identificadas con el detector globbar, se utilizó un microscopio Continuum IR (Thermo Nicolet, USA) acoplado a un espectrómetro NEXUS FTIR bench Nicolet 5700 (Thermo Nicolet, USA) y con un detector refrigerado por nitrógeno líquido mercury cadmium telluride (MCT-A) acoplado a una fuente sincrotrón. El microscopio está equipado con un portaobjetos controlado por ordenador que permite la adquisición de los perfiles o mapas de la muestra. Las condiciones utilizadas en las mediadas de las muestras en modo reflexión fueron: resolución espectral de  $8\text{ cm}^{-1}$  en el rango  $4000\text{-}650\text{ cm}^{-1}$  donde cada espectro era la medida de 200 escaneos. Los espectros con radiación sincrotrón se adquirieron en la dentina, la resina y en tres puntos del esmalte: externo, intermedio e interno, de regiones de interés con áreas de  $300 \times 100\ \mu\text{m}^2$ . El *background* se definió por 500 scans de una lámina de oro de referencia. La adquisición y procesado de datos se realizó utilizando el software Nicolet Omnic v 8.0.

#### 2.2.3.4 Condiciones del análisis Raman

Las medidas Raman se llevaron a cabo utilizando un microscopio Raman confocal Renishaw InVia que consiste de un espectrógrafo con un detector CCD acoplado a un microscopio Leica. Se empleó una línea de excitación de 785 nm proporcionada por un láser de estado sólido, con una potencia de aproximadamente 20 mW sobre la muestra. El haz fue focalizado en la muestra mediante un objetivo x100 (N.A = 0.9) en el microscopio obteniendo un tamaño de foco, y por tanto una resolución espacial, en la muestra de aproximadamente  $1\ \mu\text{m}$ . Los espectros de HA y FA fueron registrados entre  $100\text{ - }3200\text{ cm}^{-1}$  en modo de barrido con un tiempo de exposición de 10s y acumulando 5 barridos. Los espectros de las muestras fueron registrados en el rango espectral entre  $805\text{ - }1185\text{ cm}^{-1}$  con una resolución espectral de  $4\text{ cm}^{-1}$ , empleando un tiempo de exposición de 1 segundo con 80 acumulaciones. Todos los datos espectrales obtenidos fueron tratados utilizando el software Renishaw Wire v3.2.

## 2.2.4 Estudio invitro de remineralización en presencia de amelogenina

### 2.2.4.1 Expresión de la proteína amelogenina

Para obtener la amelogenina a partir del ADN plasmídico suministrado por el Dr. James P. Simmer (Michigan University) se realizó el siguiente protocolo en colaboración con el Institut de Biotecnologia i Biomedicina de la UAB.

La preparación de las células competentes de *E. Coli* se realizó según el método de cloruro cálcico [21]. De esta manera se obtienen células con membranas semipermeables que permiten posteriores cultivos y la inserción de ADN plasmídico que permitirá obtener la proteína deseada según el protocolo [22].

Se resuspendió una alícuota de ADN (1µg liofilizata) en 100 µl de agua MilliQ obteniendo una concentración de 10 ng/µl. A una alícuota de células competentes de *E. Coli* se le añadió el ADN y se mantuvo durante 30 min en hielo. Durante 90 s se incubó la muestra a 42 C y 3 min de nuevo en hielo, esto provoca un choque térmico que ayuda al crecimiento de las colonias. Se sembró las células en una placa de cultivo de LB + ampicilina que se incubó durante 24h a 37C. El medio LB utilizado contenía 10 g de bacto triptona, 10g de NaCl y 5 g de extracto de levadura para 1l de medio.

Las colonias que crecieron se añaden a un tubo esterilizado que contiene 2ml del cultivo 2YT y 2 µl de ampicilina que se mantienen en agitación de 6 a 8h a 37C. A continuación se transfirió los 200 µl de células a 150 ml de un medio de LB y se mantuvo en agitación durante toda la noche a temperatura 37C, paso que produce un crecimiento controlado de las colonias de las cuales se hará el cultivo con glicerol.

A partir del glicerinado de una de las colonias obtenidas se sembró en una placa LB + ampicilina y se mantuvo durante una noche a 37C. Se realizó el seguimiento del crecimiento del cultivo midiendo la densidad óptica a 550nm (OD<sub>550</sub>) hasta el valor deseado donde se añadió el agente inductor (0.4 mM IPTG), a partir de este momento se produce la expresión del gen clonado en el plásmido. El proceso dura 4h a 37C y posteriormente se centrifuga a 7000 rpm durante 30 min a 4C. Se disgregó el sólido (*pellet* del centrifugado) celular para obtener la proteína resuspendiéndolo en una solución de cloruro de guanidinio 6M, sonicación y dilución en ácido fórmico. Para acabar precipitando la proteína con sulfato amónico al 20% para recuperarla.

La purificación de la proteína se hizo mediante cromatografía HPLC en fase reversa. Primeramente en una columna Phenyl Jumbo con un buffer A de 0,05% NH<sub>4</sub>OH y buffer B 0.05% NH<sub>4</sub>OH + 80% acetonitrilo, monitorizando el detector a 220 nm. La siguiente purificación se realizó en una columna Jumbo C18 con un gradiente entre los dos buffers de 0,05% TFA y 0.05% TFA + 80% acetonitrilo. La concentración final de proteína obtenida se cuantificó mediante la medida de la DO a 280nm y se liofilizó para su conservación. Dadas las características de la amelogenina y su conocido papel en la cristalización de fluorapatita y de

---

[21] Mandel M, Higa A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol*, 1970, 53(1):159-162.

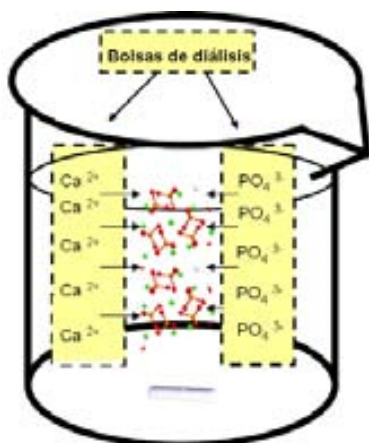
[22] Sambrook J, Maniatis TF. Molecular cloning: A laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor , 1989.



hidroxiapatita, se realizaron una serie de experimentos *invitro* para caracterizar microscópicamente la cristalización que se obtiene en diferentes condiciones y concentraciones.

#### 2.2.4.2 Procedimiento de cristalización en presencia de amelogenina

Los experimentos se realizaron simulando la liberación controlada que caracteriza a las resinas y nanopartículas utilizadas en el proyecto. Por tanto, se rellenaron 2 bolsas de diálisis con soluciones de  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , las características de las bolsas permitían únicamente la liberación de los iones a la solución. El MWCO (Molecular Weight Cut Off) de las membranas correspondía a 2000 Da, permitiendo que por difusión en el seno de la solución se produjera el encuentro de los iones de calcio y los de fosfato para formar hidroxiapatita a diferentes condiciones bajo agitación suave. A continuación se filtraba la solución resultante para obtener el sólido y se desecaba 24h a 65C. El producto obtenido se caracterizó por difracción de rayos X mediante la comparación con el difractograma de la referencia comercial, se identificaba la señal. A continuación se metalizaba la muestra para observarla por microscopia electrónica a diferentes magnificaciones y determinar la cristalización.



**Figura 2.5.1** Estudio de formación de HA *invitro*.

#### 2.2.4.3 Estudio de los minerales mediante difracción de rayos X

Los difractogramas de rayos X se obtuvieron mediante un difractómetro con fuente de cobalto a 50kV i 40mA. Las muestras se escanearon en pasos de  $2\theta$  (que corresponde al ángulo de trayectoria de los rayos X y a los grados de giro que realiza la muestra) de  $0,02^\circ$  y a una velocidad de  $2\theta$  de  $0,24^\circ/\text{s}$  en tres rangos de ángulo diferentes.

Se obtuvieron los difractogramas de las referencias de hidroxiapatita y de fluorapatita, además de las muestras sintetizadas mediante las bolsas de diálisis.



**Figura 2.5.2** Difractómetro de rayos X de polvo

#### 2.2.4.4 Estudio microscópico de los minerales

Los minerales sintetizados según el procedimiento explicado anteriormente con bolsas de diálisis una vez identificados como hidroxiapatita se observaron mediante microscopía electrónica de rastreo para definir la cristalización que habían seguido. Las muestras se recubrieron con película de oro para obtener la superficie conductora necesaria para realizar observaciones con un equipo de SEM no ambiental (incapaz de trabajar a bajo vacío). Las imágenes se realizaron a diferentes magnitudes dependiendo del grado de detalle deseado.

#### 2.2.4.5 Procesos de remineralización con resinas y nanopartículas en presencia de amelogenina

Se siguieron los procedimientos de remineralización anteriormente descritos en el apartado 2.2.3.1 para resinas y nanopartículas incorporando la proteína amelogenina al tratamiento. A la preparación de la saliva artificial se añadió mediante agitación la proteína liofilizada obteniendo una concentración final de 100 µg/ml amelogenina según lo referenciado en los trabajos de Dr. Fan <sup>[23]</sup>, además de las concentraciones de iones anteriores 4,5M KCl, 2,3M NaCl. Los periodos de cambio de material remineralizante y el añadir saliva se realizaron siguiendo el mismo procedimiento experimental con el fin de obtener resultados comparables.

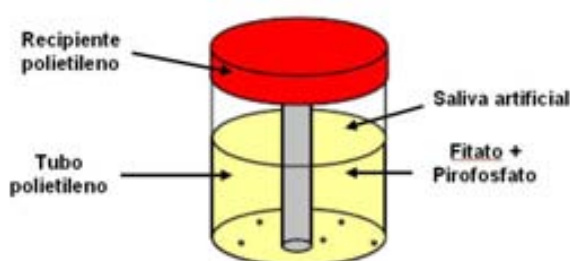
---

<sup>[23]</sup> Fan Y, Sun Z, Moradian-Oldak J. Controlled remineralization of enamel in the presence of amelogenina and fluoride. *Biomaterials*, 2009, 30: 478-483.

### 2.2.5 Evaluación carácter antitártar de fitato y pirofosfato

Para evaluar la acción antisarro de los compuestos de fitato y pirofosfato se realizaron una serie de experimentos a diferentes concentraciones según la siguiente metodología.

El proceso utilizado se basa en el ensayo de riesgo litógeno urinario (ensayo RLU) que permite evaluar de forma simple y precisa la capacidad que posee una determinada orina para inhibir la cristalización de sales cálcicas [24]. El tubo de polietileno situado en el centro del frasco actúa como centro de cristalización donde precipitan las sustancias sobresaturadas de la saliva artificial responsables de la formación de cálculos. Las características y distribución de la unidad de reacción se muestran en la Figura 2.4.1. La saliva sintética se preparó mezclando dos volúmenes iguales de las soluciones A y B. La composición de la solución A era de 25.58 mM KCl y 1mM CaCl<sub>2</sub>. La solución B contenía 1mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.



**Figura 2.4.1** Esquema de la unidad de reacción utilizada en el estudio de formación de cálculos dentales.

Para determinar el proceso de inhibición se realizaron medidas de potencial utilizando un electrodo de calcio que permitió conocer el potencial de la solución antes y después de la precipitación. El cálculo de la inhibición se definió como el porcentaje de inhibición según la ecuación 2.2.2:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 \cdot \left( 1 - 10^{\frac{2E_{mi} - 2E_{blanco}}{g}} \right) \quad (\text{Ec. 2.2.2})$$

No se analizaron los efectos del fitato y pirofosfato por separado ya que se encuentra reportado que el efecto sinérgico de los dos compuestos produce una inhibición superior a la esperada en relación a la suma de los dos compuestos por separados [25].

Adicionalmente se estudió el efecto del pirofosfato y fitato sobre la dureza del esmalte y de la dentina para poder detectar cualquier efecto negativo secundario en colaboración con Department of Restorative Dentistry, University Buffalo.

Para cada formulación estudiada y para el control se seleccionaron 10 molares humanos que se embutieron en resina acrílica dejando al descubierto la parte externa del diente. Los especímenes se pulieron secuencialmente con papel de SiC llegando a un gramaje final del 600, para obtener la superficie completamente plana y limpia. Nueve medidas de dureza se

[24] Muñoz JA, Litiasis Renal oxalocálcica. Avances en la comprensión de su etiología y mejoras en la metodología analítica para su estudio. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona, 2004.

[25] Muñoz JA, López-Mesas M, Valiente M. Inhibitors of oxalocalcic lithiasis. Effect of their interactions on calcium oxalate crystallization. *Urology*. 2012 [Epub ahead of print].

realizaron en cada diente utilizando un equipo de microindentación Vicker (Figura 2.4.2). Se realizó la media de cada espécimen y las muestras se distribuyeron en grupos de 10 de manera que todos los grupos tuvieran valores medios similares. El tratamiento se realizó aplicando la mezcla directamente en la superficie del diente, el grupo de control se mantuvo en agua durante el tiempo del tratamiento.



**Figura 2.4.2** Equipo de microindentación utilizado en el estudio de dureza.

Después del tratamiento, a las muestras se les realizó de nuevo las medidas de dureza siguiendo el protocolo antes descrito para determinar las posibles diferencias que han experimentado. El procedimiento será el mismo para las medidas en la superficie de la dentina.

### *2.2.6 Procedimiento experimental blanqueo dental*

En este estudio, se investiga un método de blanqueo basado en los procesos de oxidación tipo Fenton, utilizando un catalizador heterogéneo que incluye zeolitas como soporte del catalizador.

#### 2.2.6.1 Carga y cuantificación de la capacidad de la zeolita

La carga o inmovilización del hierro en las zeolitas se realizó siguiendo el proceso ya optimizado en estudios anteriores [26].

Una cantidad conocida de zeolita se agitó durante una hora a temperatura ambiente en una solución de Fe (II) o Fe (III). Las soluciones utilizadas fueron  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  (pH 1,88) y  $\text{Fe}(\text{SO}_4)$  (pH 4.03). Para evitar la oxidación del  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ , la carga se realizó burbujeando  $\text{N}_2$ . Acabado el proceso de carga, la inmovilización del estado de oxidación II del hierro en la zeolita actúa como estabilizante evitando la oxidación. A continuación se filtra la zeolita, se limpia con abundante agua y se seca en la estufa a 80C durante 24h.

Para cuantificar la carga, se realizó el proceso de lixiviación (*stripping*) del metal agitando durante 3 horas la zeolita cargada en una solución HCl 1M. Adicionalmente se comprobó realizando el mismo proceso de *release* si la zeolita desprendía metal en agua, agitando durante 3h la zeolita cargada en  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ. El lixiviado se filtró y se analizó mediante ICP-OES, para cuantificar la carga de la zeolita.

#### 2.2.6.2 Proceso de blanqueamiento

En este proceso se utilizaron dientes bovinos debido a la dificultad de obtener el número necesario de dientes humanos. Cabe resaltar que la estructura de los dientes bovinos es similar a los dientes humanos, por tanto, los resultados obtenidos muestran coherencia y son aceptados en estudios convencionales de blanqueamiento [27]. Se utilizaron dientes frontales que fueron extraídas de mandíbulas frescas de vaca y se les cortó la raíz. Se conservaron en cloramina T 0.5% p/p hasta su utilización ya que mantiene las muestras desinfectadas, evitando el crecimiento de bacterias. Se montaron las muestras en resina acrílica para su inmovilización con la cara labial del diente expuesta hacia el exterior. A continuación, los especímenes se pulieron con papel de lija de de grano P-200, P-600 y P-1500 de forma consecutiva para obtener una superficie lisa sin exponer la dentina. Para facilitar la formación de manchas, los especímenes se grabaron ligeramente con una exposición secuencial con soluciones: 60s HCl 0,12M,  $\text{NaCO}_3$  sobresaturado durante 30s, de nuevo HCl 60s y finalmente lavado con agua MilliQ.

La solución de manchado [28] consistía en 400 ml de agua que se hizo hervir con 5 sobres de te comercial para obtener la infusión correspondiente, 1.30g de café soluble y 1g de mucina,

---

[26] Campillo M, Desenvolupament i caracterització de biomaterials amb propietats restauradores i benèfics dels teixits dentals. Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona, 2007.

[27] Nakabayashi N, Pashley DH. Hybridization of dental hard tissues. Japan: Quintessence Publishing, 1998.

[28] Lee BS, Huang SH, Ghang YC, et. al. Development of in vitro toothstaining model and usage of catalysts to elevate the effectiveness of tooth bleaching. *Dent Mater*. 2008, 24 (1): 57-66.

en agitación continua hasta disolución completa de los componentes. Los especímenes se colocaron dentro de la solución a una temperatura de 37C durante 7-10 días, según el grado de manchado deseado. Cada día se midió el cambio de  $\Delta E$  y se renovó la solución de manchado. Pasado el periodo deseado se lavaron los especímenes con abundante agua aplicándoles a continuación el tratamiento deseado.

El blanqueo de las muestras previamente manchadas se realizó utilizando un blanqueante comercial al cual se le había añadido una cantidad conocida de zeolita cargada con Fe para conseguir la concentración deseada. El blanqueador era el producto Vivastyle (Ivoclar Vivadent) que contiene un 16% de peróxido de carbamida. Es un producto de aplicación a domicilio con aplicaciones recomendadas de 2 horas.

La cantidad necesaria de zeolita seca y molturada se mezclaba con el gel para obtener una muestra lo más homogénea posible. A continuación, se aplicaba al grupo de dientes correspondiente y se dejaba durante el tiempo deseado a temperatura constante de 37C. Los periodos de blanqueamientos constaron de 4 etapas:

1ª etapa: 6 minutos

2ª etapa: 3 minutos (9 minutos de blanqueo)

3ª etapa: 5 minutos (14 minutos de blanqueo)

4ª etapa: 6 minutos (20 minutos de blanqueo)

Acabado el tiempo de contacto se retiraba el blanqueante utilizando un cepillo y agua durante 20 minutos. Por último se media el color de las muestras para calcular el blanqueo mediante la ecuación ya referenciada 2.2.

Los resultados obtenidos se analizaron utilizando ANOVA de una cola para detectar la presencia de diferencias entre los grupos estudiados con el mismo estado de oxidación del hierro. Cuando las diferencias eran significativas para su identificación se utilizó el test Student Newman Keuls. Todos los test estadísticos se realizaron a un 95% de intervalo de confianza [29][30].

---

[29] Millar JN, Miller JC. Estadística y quimiometría para química analítica. Madrid: Prentice Hall, 2002.

[30] Bulman JS, Osborn JF. Statistics in dentistry, London: British Dental Journal Books, 2002.

# 3

## Resultados y Discusión

---

<b>3.1 ESTUDIO REMINERALIZACIÓN MEDIANTE NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA MESOPOROSAS (MSNP)</b> .....	<b>53</b>
3.1.1 Condiciones de pH estudiadas siguiendo la predicción de los diagramas de distribución de especies (obtenidos mediante el programa Medusa .....	53
3.1.2 Caracterización microscópica de las nanopartículas .....	54
3.1.3 Optimización de la carga de las nanopartículas .....	56
3.1.4 Caracterización de la remineralización dental por microscopía electrónica de rastreo (SEM).....	58
<b>3.2 ESTUDIO DE LA CRISTALIZACIÓN DE HIDROXIAPATITA EN PRESENCIA DE AMELOGENINA</b> .....	<b>60</b>
3.2.1 Análisis Rayos X de las diversas cristalizaciones de las bolsas de diálisis .....	60
3.2.2 Análisis SEM de las diversas cristalizaciones de las bolsas de diálisis...	61
<b>3.3 ESTUDIO ESPECTROSCÓPICO CON RADIACIÓN SINCROTRÓN DE LA REMINERALIZACIÓN DENTAL</b> .....	<b>63</b>
3.3.1 Selección de las regiones de interés (ROI) y análisis por sincrotrón.....	63
3.3.2 Distribución de hidroxiapatita y fluorapatita en el esmalte .....	67
<b>3.4 EFECTO DE LA AMELOGENINA EN EL PROCESO DE REMINERALIZACIÓN</b> .....	<b>69</b>
3.4.1 Estudios con IR en muestras remineralizadas .....	69
3.4.2 Estudios con Raman en muestras remineralizadas .....	71
<b>3.5 ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DE CÁLCULOS DENTALES</b> .....	<b>75</b>
3.5.1 Valores de inhibición .....	75
3.5.2 Efecto sobre el esmalte .....	75
<b>3.6 INCORPORACIÓN DE UN CATALIZADOR HETEROGÉNEO AL BLANQUEAMIENTO DENTAL</b> .....	<b>77</b>
3.6.1 Determinación de la carga de la zeolita .....	77
3.6.2 Efecto blanqueante en presencia de catalizador heterogéneo (zeolita) ..	77

---

### 3.1 ESTUDIO REMINERALIZACIÓN MEDIANTE NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE MESOPOROSAS (MSNP)

En el presente estudio se describen los resultados de aplicar la tecnología de los materiales nanoestructurados para obtener una mayor aportación de iones en el proceso de remineralización respecto al los resultados obtenidos con el sistema NMTD estudiado anteriormente en nuestro grupo Centro GTS [1]. Estos materiales nanoestructurados permiten utilizar la mínima cantidad de producto en los tratamientos gracias a la gran relación superficie activa/sustrato que ofrecen. En este apartado se detallan los parámetros evaluados para optimizar la capacidad de carga respecto a los iones de interés y los resultados obtenidos en su aplicación a muestras dentales. De esta forma se ha estudiado la influencia del pH y tiempo de carga.

#### *3.1.1 Condiciones de pH estudiadas siguiendo la predicción de los diagramas de distribución de especies (obtenidos mediante el programa Medusa [2])*

Las condiciones idóneas de carga de las nanopartículas son aquellas en las que la concentración del ión libre en disolución que se ha de adsorber es mayor. Uno de los parámetros que tiene mayor influencia en el estado libre del ión deseado en solución es el pH de trabajo, por ello, para poder predecir el mejor rango de pH para cada ion se realizaron los diagramas de distribución correspondientes, utilizando el programa Medusa (Figura 3.1.1).

Para el caso del zinc (Figura 3.1.1 a)) el rango de pH idóneo se encuentra entre 4 y 5, ya que a partir de pH 6 la concentración de ion zinc libre disminuye al producirse compuestos hidroxilados. Y a pH más ácidos el grupo carboxílico de la nanopartículas se protona dando lugar a una resistencia al intercambio por competitividad iónica que dificulta la carga.

En el diagrama del fosfato (Figura 3.1.1 (b)) se ha de evitar por completo condiciones en las cuales haya presencia alta de especies que pueden funcionar como interferentes (mayormente hidrogenofosfatos). Por ello se trabajará a un pH alrededor del 2.5 para obtener el máximo de  $\text{PO}_3^{4-}$  libre.

Para el caso del calcio (Figura 3.1.1 (c)) se trabajará a un pH controlado ya que pH demasiado básicos provocan la precipitación de la especie hidroxilada que puede provocar impurezas sólidas que sean difíciles de separar de las nanopartículas. Por ello, se trabaja en un rango de pH entre 5 y 6 como condiciones óptimas.

En la Figura 3.1.1 (d) la concentración de fluoruro libre aumenta a pH básicos pero el trabajo a pH altos desprotona el grupo amino de las nanopartículas (responsable de la adsorción del ión fluoruro por intercambio iónico) y por tanto, pasiviza la superficie. Para el caso del sistema macro (resina) estudiado, la carga se realizaba añadiendo a la disolución de

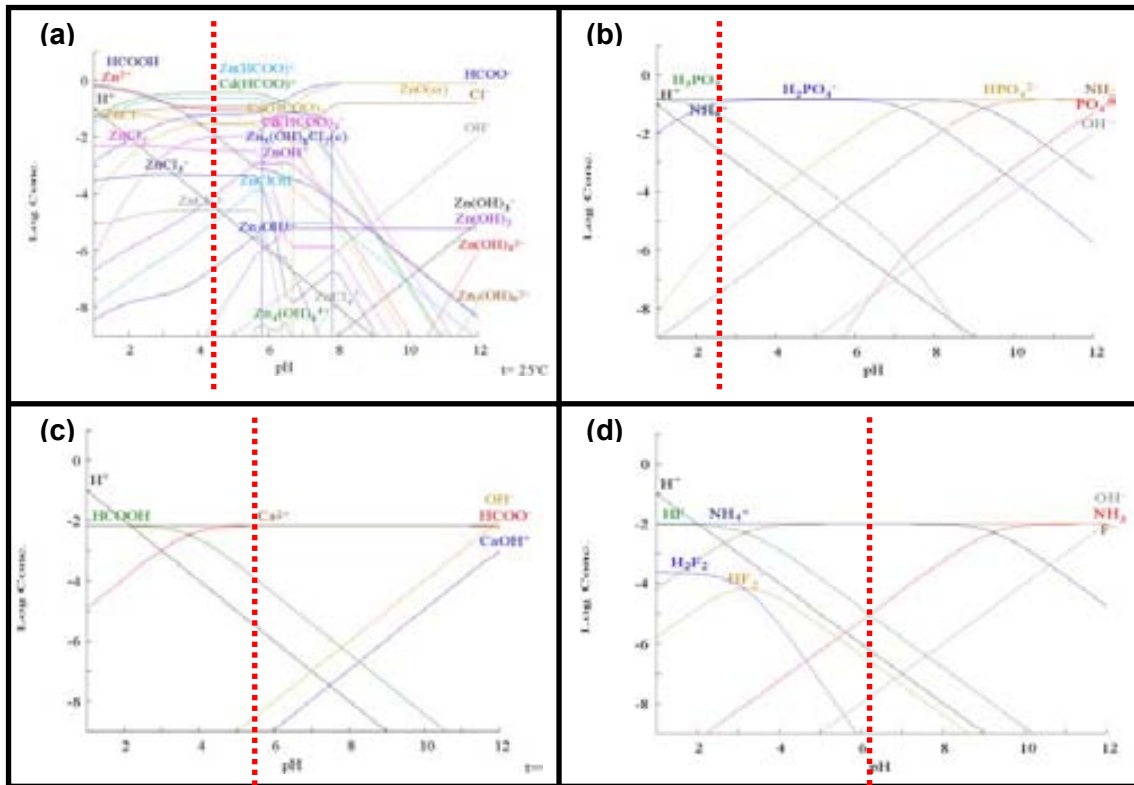
---

[1] Campillo M, Desenvolupament i caracterització de biomaterials amb propietats restauradores i benèfics dels teixits dentals. Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona, 2007.

[2] <http://www.kemi.kth.se/medusa/>



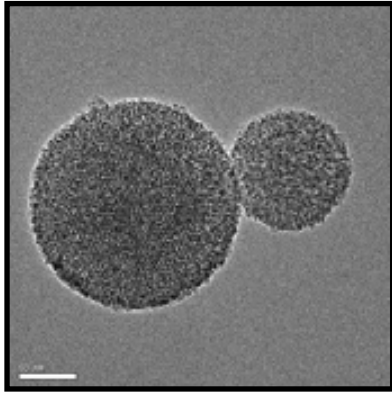
carga directamente HF de alta concentración para obtener un pH lo suficiente bajo como para obtener los grupos amina protonados. Pero en el caso de las nanopartículas de sílice el uso de un ácido tan agresivo como el HF provoca la disolución de las nanos, y por tanto, la eliminación del sistema. Por ello, se trabaja alrededor de un pH de compromiso que se determina como de 6,5 ya que utilizar otro ácido diferente al fluorhídrico puede aportar aniones competitivos con los fluoruros del medio.



**Figura 3.1.1** Diagramas de distribución frente a pH para los iones: (a) zinc, (b) fosfato, (c) calcio y (d) flúor (programa Medusa). Señalado con una línea discontinua roja el pH óptimo de trabajo.

### 3.1.2 Caracterización microscópica de las nanopartículas

La caracterización de las nanopartículas se realizó por dos métodos: por difusión dinámica de la luz (DLS) y por microscopía electrónica de transmisión (TEM). La primera técnica permitió medir el tamaño de las nanopartículas de sílice determinando que existe una amplia variabilidad de valores del diámetro. El rango de valores que se observaron fue des de 150nm hasta 300nm, dato que fue posible corroborar mediante las imágenes de TEM. En la Figura 3.1.2, se puede observar dos nanopartículas de medidas considerablemente diferentes.

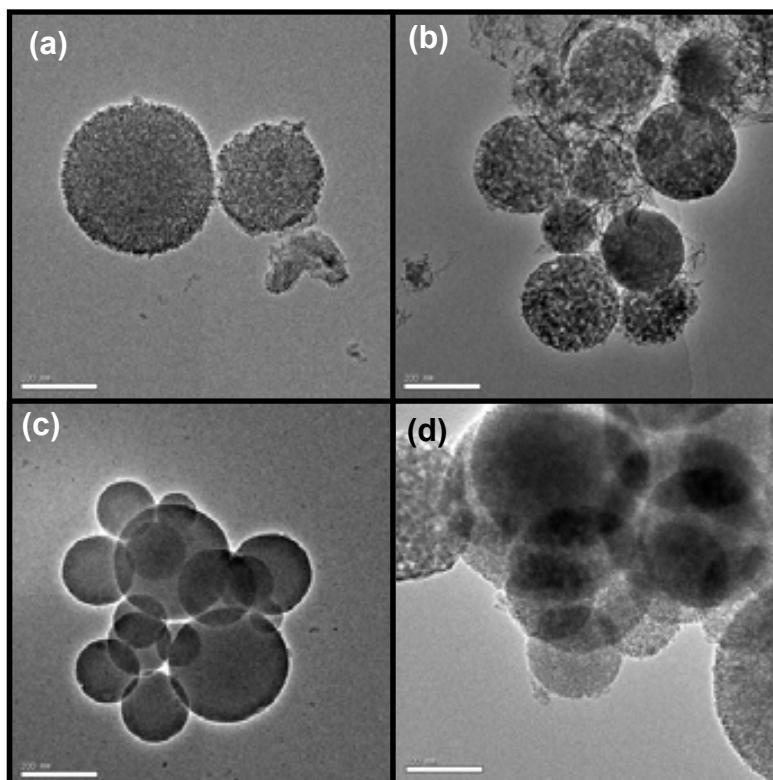


**Figura 3.1.2** Imagen de microscopio electrónico de las nanopartículas antes de la carga.

Adicionalmente, se volvieron a adquirir las imágenes de las nanopartículas después de la carga para poder analizar si las condiciones de dispersión, distribución y tamaño seguían siendo iguales después del proceso. En las Figuras 3.1.3 (a) y (c) se observa que para las cargas de zinc y flúor las nanopartículas conservan la dispersión aunque con pequeños agregados para el caso del flúor. Este efecto de agregación es debido a que las nanopartículas mientras se encuentran en un medio acuoso los grupos funcionales de su superficie se encuentran cargados debido a la interacción con los iones del agua. Esta carga superficial produce unas fuerzas de repulsión con las demás nanopartículas de la solución, evitando las colisiones entre ellas y, por tanto, evitando la aglomeración. Por el contrario, cuando una nanopartícula capta los iones de la solución de carga utilizada cambia quedando en un estado neutro. Este estado neutro no repele de la misma manera las demás nanopartículas provocando colisiones entre ellas y por tanto la agregación que se observa en las imágenes del TEM <sup>[3]</sup>. Las nanopartículas cargadas con ion fosfato presentan una agregación superior a los casos anteriores (Figura 3.1.3 (d)) debido a que el cambio de carga de las nanopartículas antes explicado provoca un acercamiento que favorece la formación de puentes de hidrógeno entre unidades formando un mayor número de agregados. Por último, en el caso de la carga con calcio (Figura 3.1.3 (b)) se observa una capa que envuelve y compacta la sílice, esto es debido a que la concentración de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  utilizada en la carga no llega totalmente a diluirse creando zonas de alto pH lo que provoca una película de hidróxido cálcico que se adhiere entre las nanopartículas provocando su aglomeración.

---

<sup>[3]</sup> Bagwe RP, Hilliard LR, Tan W. Surface Modification of Silica Nanoparticles to Reduce Aggregation and Nonspecific Binding. *Langmuir*. 2006, 22 (9): 4357–4362.



**Figura 3.1.3** Imagen de microscopio electrónico de las nanopartículas después de la carga: (a) zinc, (b) calcio, (c) flúor y (d) fosfato.

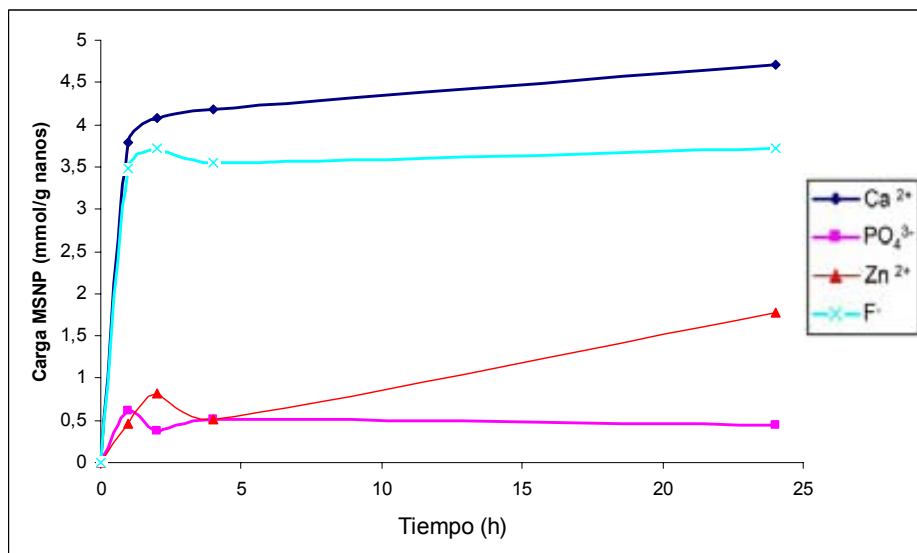
### *3.1.3 Optimización de la carga de las nanopartículas*

Un sistema de nanopartículas no tiene las mismas características ni comportamiento que un macro sistema (como las resinas), por ello, las condiciones ya optimizadas para la carga de las resinas se deben testar y optimizar para obtener la mayor carga posible con el sistema nano. De los factores influyentes en el proceso de carga de las nanopartículas se optimizaron el tiempo de carga y el pH.

Respecto al tiempo de carga se analizaron los tiempos de: 1h, 2h, 4h y 24h (este último tomado como tiempo de estado de equilibrio). Para la mayoría de los iones el máximo de carga obtenido se adquirió a las 2 horas de agitación con la solución de carga como se observa en la Figura 3.1.4. La carga con ion calcio y con fluoruro fue aproximadamente similar a los resultados obtenidos con las resinas (valores de 3-4 mmol/g resina) siendo máxima a las 2h de carga y manteniéndose constante con el tiempo. Por el contrario, los iones fosfato y zinc dieron unos resultados claramente inferiores a los obtenidos en macrosistemas siendo para el zinc cercano a 1,5 mmol/g nano y para el fosfato inferior a 1mmol/g. En los casos de los iones flúor y fosfato se observa un máximo de carga para 2 horas de proceso, disminuyendo a partir de este tiempo, para el fosfato manteniéndose constante hasta 24h y para el zinc aumentando. Esto puede ser debido a un proceso de sobresaturación estacionaria típica de un

comportamiento anti-Langmuir <sup>[4]</sup> que provoca después de llegar al máximo de adsorción una recesión debido a la liberación de los iones que provocaban esta sobresaturación.

La baja capacidad observada en las nanopartículas derivatizadas en relación a lo que se esperaba obtener respecto las resinas convencionales se atribuya a una deficiencia en el proceso de derivatización, no estando del todo optimizado. Es por ello que los estudios que se presentan en este trabajo representan un primer paso para identificar los puntos débiles del proceso y, en este sentido, la derivatización es uno de los más significativos.



**Figura 3.1.4** Efecto del tiempo en la carga de las nanopartículas para los cuatro iones estudiados.

En relación al estudio del pH las condiciones están limitadas por posibles precipitaciones de los iones o cambios en los grupos funcionales de las nanopartículas (ver capítulo 3.1.1). Los resultados se pueden observar en la Tabla 3.1.1 donde se recogen los resultados obtenidos.

<sup>[4]</sup> Langmuir I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. part i. Solids. *J Am Chem Soc.* 1916, 38: 2221-2295.

F-		PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>		Ca <sup>2+</sup>		Zn <sup>2+</sup>	
<i>pH</i>	<i>mmol/g nanos</i>	<i>pH</i>	<i>mmol/g nanos</i>	<i>pH</i>	<i>mmol/g nanos</i>	<i>pH</i>	<i>mmol/g nanos</i>
Formación de HF		Formación de compuestos protonados		Protonación grupo carboxílico de las nanopartículas			
		<b>2,1</b>	<b>0.62</b>	4,2	3.2	1,4	0.4
2,7	0	2,2	0.53	5,0	3.8	3,5	0.82
3,5	3.0	6,3	0.34	<b>10,3</b>	<b>4.7</b>	4,8	0.95
<b>5,2</b>	<b>3.7</b>	7,1	0.	12,07	4.1	5,0	1.2
6,5	2.8	9,8	0.04	Precipitación sólido (Ca(OH) <sub>2</sub> )		<b>5,5</b>	<b>1.8</b>
Desprotonación grupo amino de las nanopartículas						Precipitación sólido (probablemente Zn(OH) <sub>2</sub> )	

**Tabla 3.4.1** Valores de % de ion absorbido por las nanopartículas en función del pH de carga.

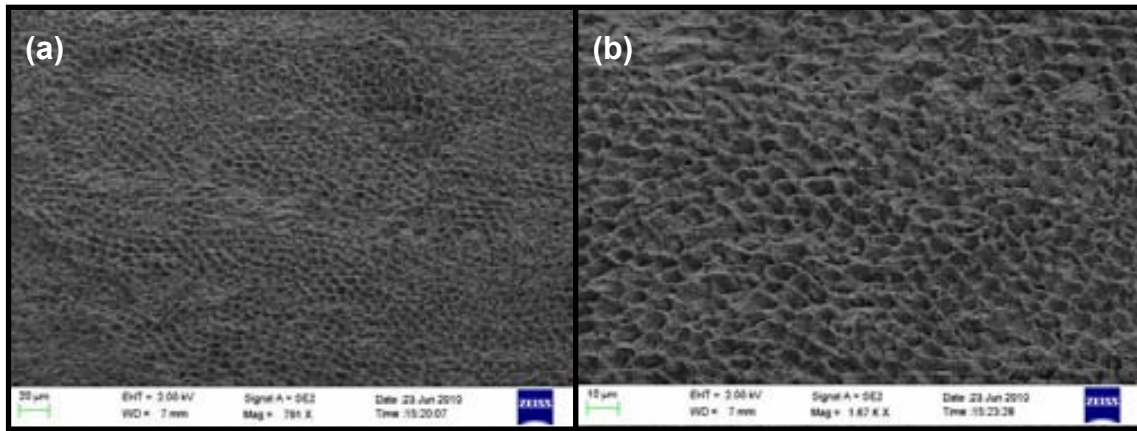
En la tabla se observan los valores máximos de carga obtenidos según el pH de trabajo. En la mayoría de los resultados obtenidos coinciden aproximadamente con el valor elucidado según los diagramas de distribución de especies realizados en el apartado 3.1.1, excepto para el caso del ion calcio. Para este el valor máximo de carga se obtiene a un pH superior al esperado, 10,3. La causa de esto es la precipitación que se produce a pH básicos del hidróxido de calcio de manera que éste queda adherido a las nanopartículas (como se observa en las imágenes de TEM del apartado 3.1.2) dando falsos resultados de carga. Adicionalmente, las variaciones altas de los valores de carga en pequeños cambios de pH nos sugieren lo sensible que es el proceso de carga a pequeños cambios de pH, tanto por la formación de compuestos interferentes como en la variación del estado de los grupos funcionales de las nanopartículas. Esta dependencia del pH de trabajo es mayor al trabajar con nanopartículas que la demostrada por las resinas, según observado en estudios anteriores <sup>[1]</sup>, debido a que la superficie se encuentra más funcionalizada y por tanto, con mayor número de grupos funcionales.

#### 3.1.4 Caracterización de la remineralización dental por microscopía electrónica de rastreo (SEM)

La superficie de las muestras dentales se analizó por SEM antes y después de aplicar el tratamiento para poder caracterizar la cristalización resultante.

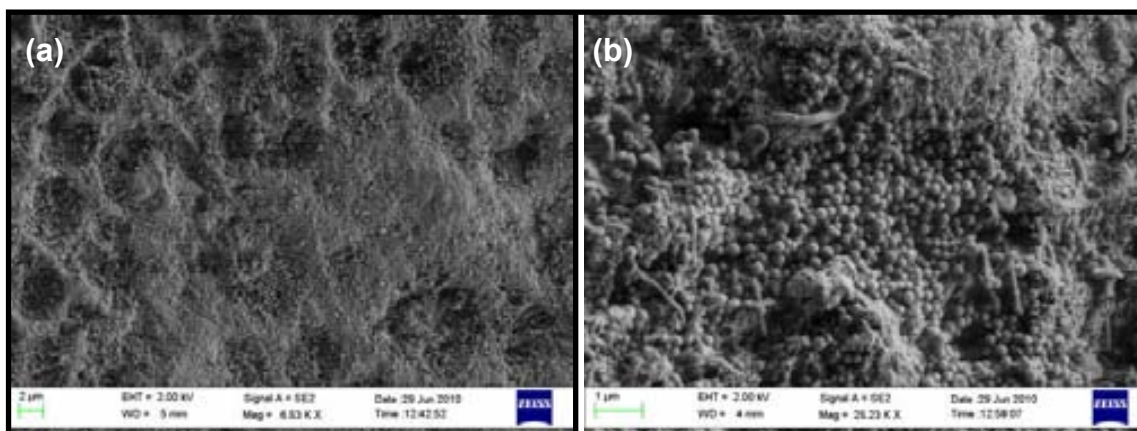
En la Figura 3.1.5 se observa el resultado del grabado ácido, que emula al que se produce en el esmalte en las primeras etapas del proceso de caries. Este proceso inicial se lleva a cabo para obtener una superficie activada por el ácido donde se aplica el agente remineralizante y así evaluar cualitativamente el proceso de remineralización. Como se observa en la Figura 3.1.5 (a) de menor magnificación, el grabado es regular en toda la superficie. En la imagen de mayor magnificación (Figura 3.1.5 (b)), se observa que han aparecido unas estructuras semejantes a escamas que corresponden a capas más internas del esmalte. Por tanto, el

tratamiento de grabado ha realizado una preparación adecuada en la totalidad de la superficie observada a tratar.



**Figura 3.1.5** Imagen a diferente magnificación de la superficie del diente después del grabado ácido.

La Figura 3.1.6 muestra la superficie de la muestra después del tratamiento con la mezcla de nanopartículas cargadas (según descrito en el capítulo de metodología 2.2.3.1). Como se observa, en la Figura (a), las escamas que había provocado el tratamiento ácido han quedado cubiertas por una nueva capa que pertenece a compuestos de hidroxiapatita/fluorapatita, de manera que el tratamiento es efectivo. Observando a una mayor magnificación se descubren restos de nanopartículas adheridas a la superficie que no se han eliminado después del proceso de cepillado. Con el fin de eliminarlas se realizaron dos lavados en agua MilliQ durante 30 segundos cada uno con sonicación. El resultado fue una disminución de la cantidad de nanopartículas presentes pero no total, de manera que la adhesión de la sílice a la superficie del diente es alta, probablemente debida a la porosidad que presenta el esmalte.



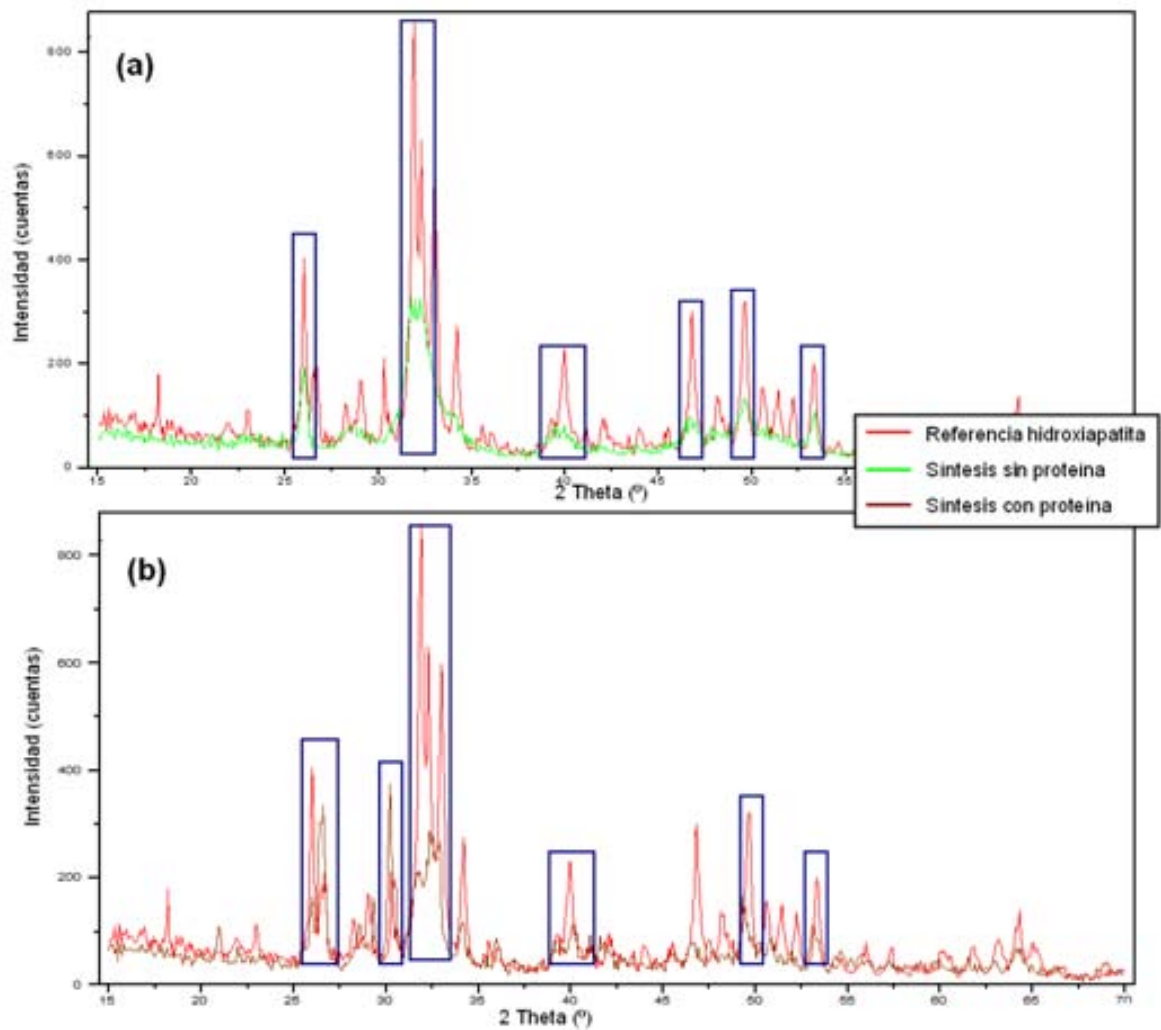
**Figura 3.1.6** Imagen a diferente magnificación de la superficie del diente después del tratamiento remineralizante con nanopartículas y del cepillado utilizado para limpiar la superficie.

## 3.2 ESTUDIO DE LA CRISTALIZACIÓN DE HIDROXIAPATITA EN PRESENCIA DE AMELOGENINA

Para evaluar la acción de la amelogenina en el crecimiento cristalino durante un proceso remineralizante se realizaron una serie de experimentos *invitro* previos a la aplicación en muestras dentales. Se simularon las condiciones de liberación controlada que aportan las resinas/nanopartículas mediante bolsas de diálisis de tamaño de poro concreto y se analizaron los sólidos precipitados en la interfase. La caracterización fue primeramente por difracción de rayos X para poder identificar si se trataba de hidroxiapatita y, a continuación, por microscopía electrónica para determinar si la forma de cristalización es dependiente de la presencia de amelogenina o no.

### *3.2.1 Análisis Rayos X de las diversas cristalizaciones de las bolsas de diálisis*

Los difractogramas obtenidos para las muestras del precipitado correspondiente al resultado de la reacción de los iones liberados a través de las bolsas de diálisis en la solución se compararon con el difractograma de referencia correspondiente a la sustancia comercial de hidroxiapatita para poder identificar el compuesto. Como se observa en la Figura 3.2.1 las señales características correspondientes a la hidroxiapatita están presentes con menor intensidad en las muestras sintetizadas debido a la diferencia de cristalización que muestran las muestras. Aun así, el precipitado obtenido en ambas condiciones se puede identificar como hidroxiapatita.



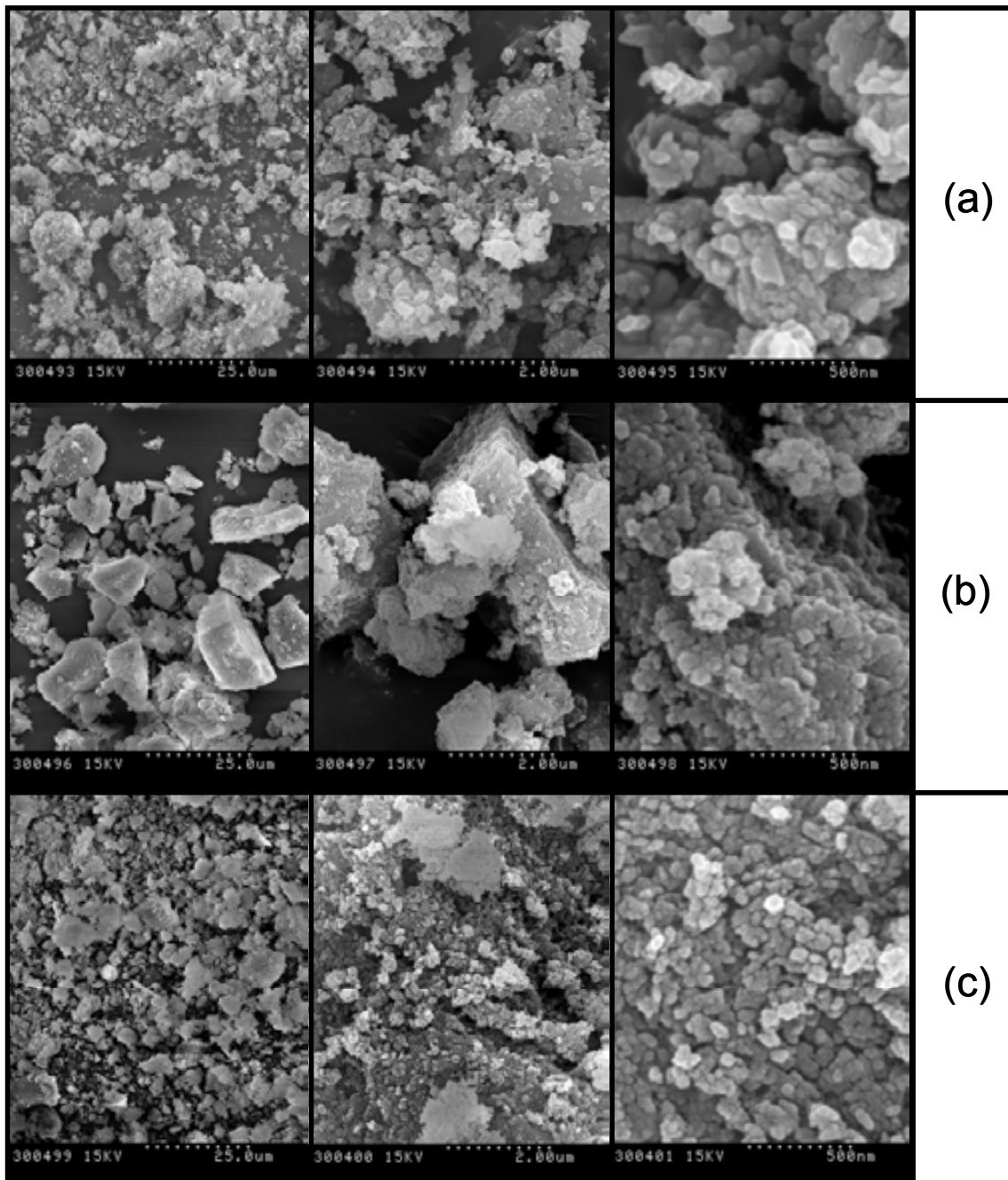
**Figura 3.2.1** Difractogramas de las muestras de hidroxiapatita sintetizada comparados con la referencia: (a) síntesis sin proteína y (b) con amelogenina

### 3.2.2 Análisis SEM de las diversas cristalizaciones de las bolsas de diálisis

Como se ha descrito en la introducción en el apartado 1.1.2, las proteínas tienen un importante efecto en el proceso de remineralización dental. Por ello se caracterizaron los resultados obtenidos en las cristalizaciones *invitro* con bolsas de diálisis sin y con presencia de amelogenina mediante microscopía electrónica de barrido comparándolos con la hidroxiapatita comercial. En la Figura 3.2.2 se observan las tres muestras comparadas a las mismas magnificaciones. La primera corresponde a la hidroxiapatita comercial y presenta aglomeración de cristales algunos de ellos con bordes redondeados que no presentan un crecimiento conjunto. Para el segundo caso sin presencia de proteína (Figura 3.2.2 (b)) se puede observar que los cristales son notablemente más grandes con bordes bien delimitados. El tercer caso (Figura 3.2.2 (c)), con presencia de amelogenina, los cristales que presentan son más pequeños y compactos en comparación con las dos muestras anteriores. Esto se debe a un crecimiento guiado por la proteína que permite obtener cristales con una cierta orientación y



compactación, dicha estructura les dota de características mejoradas como una alta resistencia al ataque ácido [5].



**Figura 3.2.2** Comparación a diferentes magnificaciones de las cristalizaciones de hidroxiapatita en diferentes condiciones: (a) compuesto comercial, (b) sin amelogenina y (c) en presencia de amelogenina.

[5] Zhu D, Paine ML, Luo W, et. al. Altering Biomineralization by Protein Design, *J Biol Chem.* 2006, 281 (30): 21173-21182.

### 3.3 ESTUDIO ESPECTROSCÓPICO CON RADIACIÓN SINCROTRÓN DE LA REMINERALIZACIÓN DENTAL

Como se ha referenciado en la introducción, existe una amplia variedad de dificultades a la hora de determinar y caracterizar el resultado de procesos de remineralización que impliquen la formación de fluorapatita. Es por ello que en este apartado se presentan los resultados obtenidos en la aplicación de la microscopía infrarroja con las mejoras que ofrece utilizar una fuente de luz sincrotrón en el análisis.

Siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.2.3, hemos obtenido los resultados que se describen a continuación.

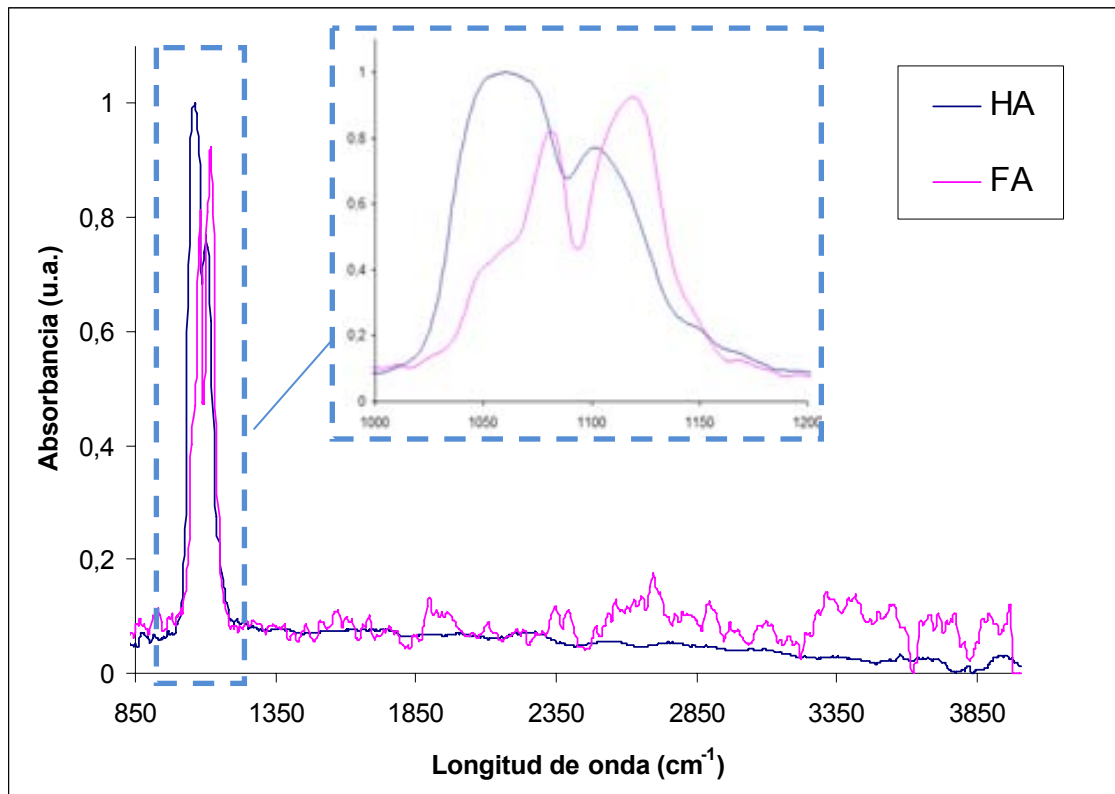
#### *3.3.1 Selección de las regiones de interés (ROI) y análisis por sincrotrón*

Para la localización de las áreas de mayor interés en la muestra dental inicialmente se realizó un escaneo completo de la superficie con un microscopio FT-IR sin radiación sincrotrón que permitió gran velocidad de escaneo para cubrir toda la muestra en un tiempo relativamente corto. Se escanearon muestras de referencia (sin ningún tipo de tratamiento) y muestras con diversos tratamientos. Los datos obtenidos se trataron con el Software Omnic de Thermo Fisher para obtener los correspondientes mapas de intensidad de picos.

Las señales obtenidas en la región del espectro comprendida entre 900 y 1200  $\text{cm}^{-1}$  corresponde, según bibliografía <sup>[6]</sup>, a los *stretching* simétricos ( $\nu_1$ ) y asimétricos ( $\nu_3$ ) de la vibración del grupo fosfato representado como una doble banda en el espectro IR. Para localizar las señales características de los compuestos de fluoroapatita e hidroxiapatita se analizaron muestra de referencia que se observan en la Figura 3.3.1 donde se muestra que los dos compuestos tienen máximos a diferentes longitudes de onda y, por tanto, que son diferenciables realizando el espectro IR.

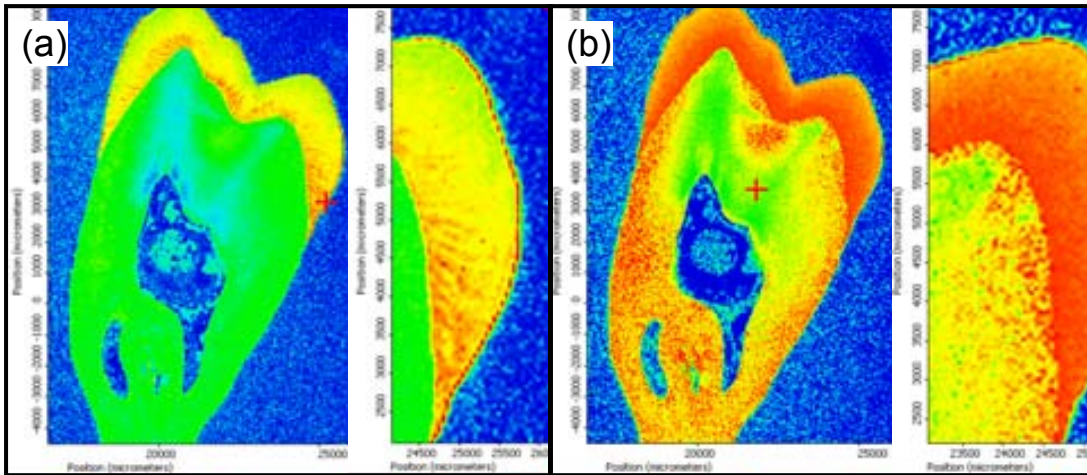
---

<sup>[6]</sup> Penel G, Leroy G, Rey C, et. al. Infrared and Raman microspectrometry study of fluor-fluor-hydroxy and hydroxyl-apatite powders. *J Mater Sci-Mater M.* 1997, 8: 271-276.



**Figura 3.3.1** Espectros IR de las referencias de hidroxiapatita y fluorapatita.

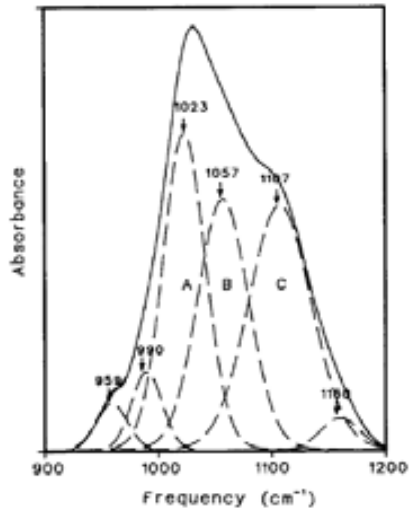
En la Figura 3.3.2 (a) se muestra el mapa de intensidad del pico a  $1094\text{ cm}^{-1}$  y en la (b) se representa el área a  $1061\text{ cm}^{-1}$ . En la representación del pico de  $1094\text{ cm}^{-1}$  se observa una fina capa de máxima intensidad en la superficie del esmalte. Esta nueva capa no presente en las muestras de referencia es consecuencia de la acción del material remineralizante empleado en el tratamiento. Por el contrario, la distribución de la señal característica de la hidroxiapatita se encuentra repartida de manera homogénea en toda el área del esmalte (Figura 3.3.2 (b)). Adicionalmente, al observar el área correspondiente a la dentina, se puede concluir que, la señal de fluorapatita es completamente inexistente, y complementariamente, se encuentran zonas homogéneas correspondientes a hidroxiapatita. La zona verde en el interior del diente que se observa en la figura (b) corresponde a la pulpa y muestra un espectro completamente diferente.



**Figura 3.3.2** Mapas de intensidad representando el área de los picos de IR: (a)  $1094\text{ cm}^{-1}$  (FA) y (b) a  $1061\text{ cm}^{-1}$  (HA).

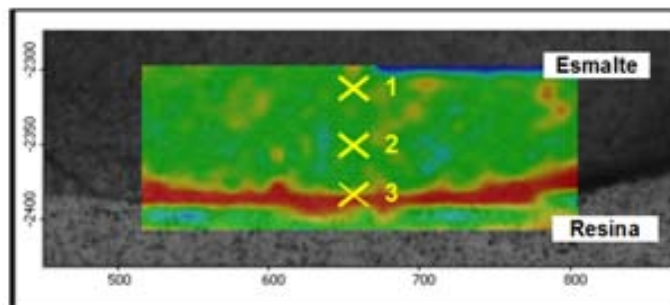
Aparece reportado en la bibliografía que los cambios en la vibración en el área del fosfato están correlacionados con las dimensiones de la celda unitaria. La banda que se estudia aparece en esa región y puede explicarse como una superposición de múltiples bandas correspondientes a los dos *stretchings* antes comentados [7]. En el artículo de Pleshko N et. al., un espectro IR de hidroxiapatita se define como la combinación de 3 componentes principales denominados A, B y C (Figura 3.3.3). El componente B se asigna al “hombro” centrado cerca de  $1090\text{ cm}^{-1}$  que aumenta cuando los cristales tienden a ser más pequeños. El componente B juntamente con el C (centrado en  $1105\text{ cm}^{-1}$ ) representan los dos elementos de  $\nu_3$  cuya forma depende de la simetría local de los cristales de hidroxiapatita que varía cuando se produce la sustitución de los grupos hidroxilos de la hidroxiapatita por los fluoruros para obtener fluorapatita. Esta variación provoca el aumento del pico que se observa a longitudes de onda mayores y que se asigna a la fluorapatita (Figura 3.3.1).

[7] Pleshko N, Boskey A, Mendelsohn R. Novel infrared spectroscopic method for the determination of crystallinity of hydroxyapatite minerals. *Biophys J.* 1991, 60(4): 786-93.



**Figura 3.3.3** Asignación de componentes para el pico de hidroxiapatita en el estudio publicado por Pleshko N et. al. [7].

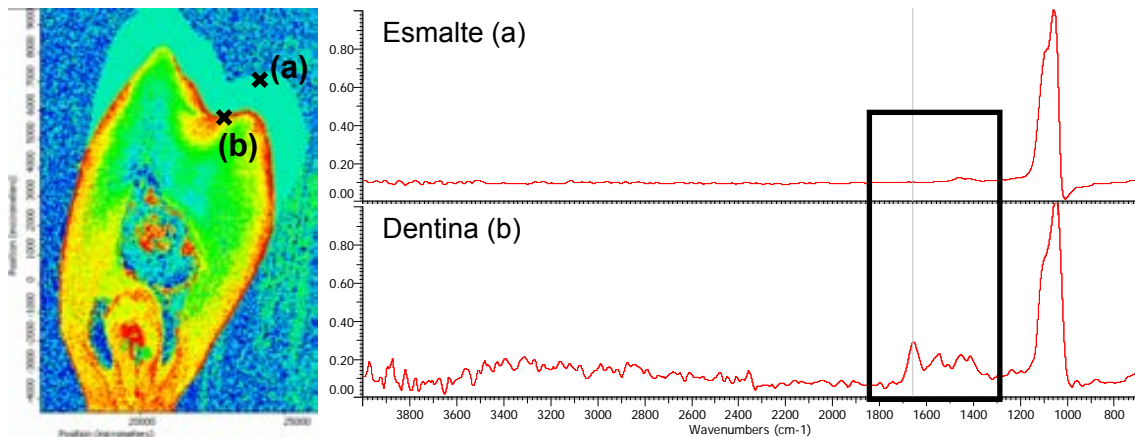
Los resultados obtenidos juntamente con los espectros Raman (apartado 3.4.2) permiten observar que la presencia de fluorapatita es mayor en zonas externas del esmalte. Teniendo en consideración estos resultados, se analizaron tres diferentes profundidades en el esmalte: externo, medio e interno, además de una región de dentina. En la Figura 3.3.4 se muestra un esquema del mapa realizado con radiación sincrotrón que corresponde a un área de  $300 \times 100 \mu\text{m}^2$ . Las áreas seleccionadas distaban entre ellas en unos pocos micrómetros empezando desde una pequeña área próxima a la resina de encaste de la muestra dental y correspondiente a la interfase, para poder seleccionar la capa más externa del esmalte, hasta llegar al límite entre el esmalte y la dentina.



**Figura 3.3.4** Esquema de la situación de los puntos medidos en las ROIs seleccionadas:

- 1) Esmalte interno
- 2) Esmalte intermedio
- 3) Esmalte externo

La Figura 3.3.5 muestra los espectros y el mapa de intensidades para las bandas presentes centradas en  $1660 \text{ cm}^{-1}$  que corresponden a las vibraciones de amidas de las proteínas presentes. La distribución que sigue muestra su presencia mayoritariamente en la región de la dentina, siendo inexistentes en el esmalte. En muestras tratadas con agente remineralizante en presencia de amelogenina no se observa presencia de señales en el esmalte, por tanto, no hay incorporación de proteína durante el tratamiento.



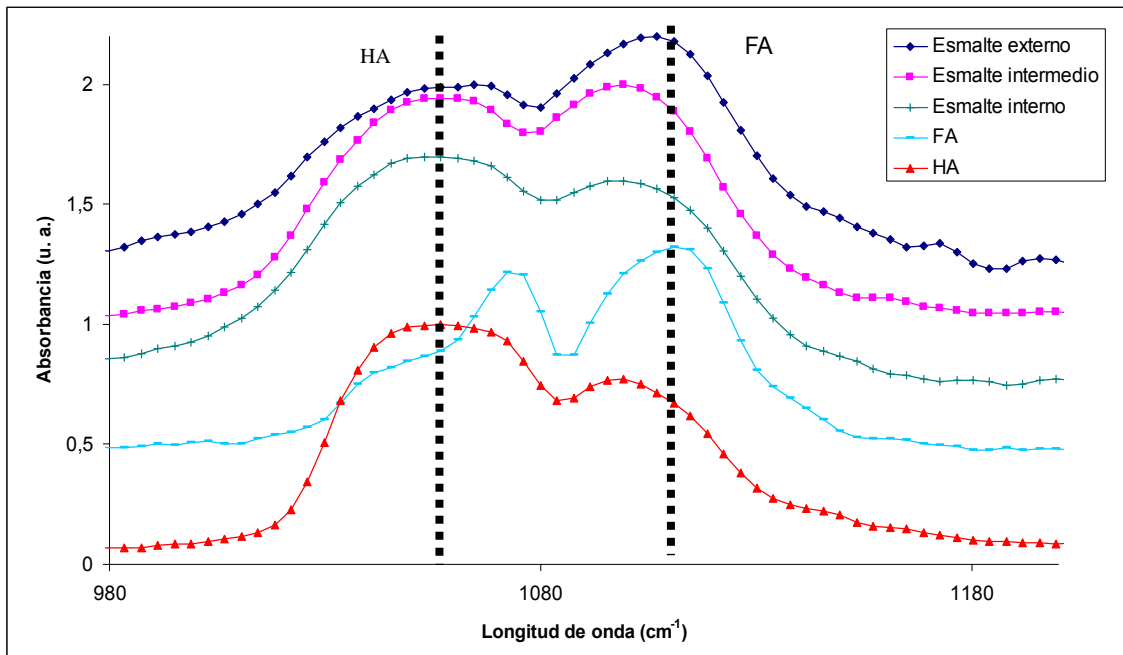
**Figura 3.3.5** Espectros y mapa de intensidad representando el área de los picos de IR a  $1660\text{ cm}^{-1}$  para: a) esmalte y b) dentina.

### 3.3.2 Distribución de hidroxiapatita y fluorapatita en el esmalte

La clara presencia de fluorapatita en el exterior del esmalte revela un buen proceso de remineralización y fluoración producido por el agente NMTD ya que en dientes de referencia no se observa (figura 3.3.6 (a)). La presencia de píxeles de cierta intensidad en la señal de fluorapatita observados en el interior del esmalte cerca de la dentina es el resultado de la difusión de esta especie por los conductos del esmalte [8]. Debido a que la dentina presenta una composición diferente al esmalte, el proceso de difusión no continúa en aquel medio, y por tanto, no se encuentra fluorapatita en la dentina, quedando toda acumulada en la interfase. La inexistencia de fluorapatita en el esmalte intermedio es debido al sellado de los conductos debido a la formación de una nueva capa de fluorapatita en el exterior del esmalte.

En la Figura 3.3.6 se muestran tres espectros IR medidos a diferente profundidad en el esmalte dental y su comparación con los espectros de referencias de fluorapatita e hidroxiapatita. La relación de intensidades entre los dos picos sobrepuestos sobre  $1100\text{ cm}^{-1}$  varía según la concentración de fluorapatita. En ciertas partes del esmalte externo la aparición de un pico alrededor de  $1200\text{ cm}^{-1}$  claramente correlacionado con el espectro de referencia de la fluorapatita permite corroborar las hipótesis. Al contrario que los espectros de la zona interna y media que muestran grandes similitudes con la señal de hidroxiapatita de referencia. Estos resultados forman parte de la evidencia de un proceso de remineralización dependiente del tratamiento aplicado.

[8] Takahashi M, Zheng J, Mori K, et. al. Histological structures and acidic etching sensitivities of the enamels at the occlusal pit parts in the deciduous and permanent teeth. *Mater Sci Eng.* 2006, 26: 703– 706.



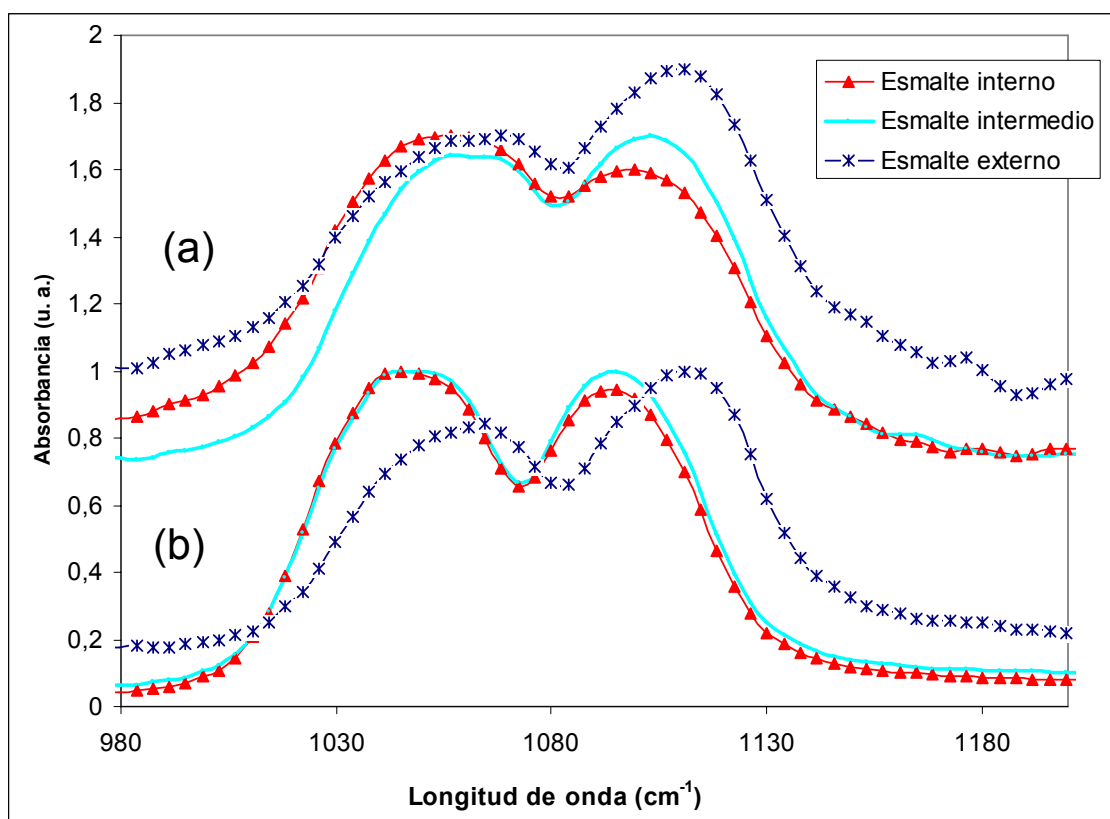
**Figura 3.3.6** Señal IR del grupo fosfato de fluorapatita ( $1094\text{cm}^{-1}$ ) e hidroxiapatita ( $1061\text{cm}^{-1}$ ) del esmalte dental tratado con proteína a diferentes profundidades en el diente.

### 3.4 EFECTO DE LA AMELOGENINA EN EL PROCESO DE REMINERALIZACIÓN

Corresponde esta parte a los resultados obtenidos en el estudio de la presencia de la proteína amelogenina en el proceso de remineralización. De esta forma, los resultados que se describen a continuación corresponden a la aplicación de la espectroscopia vibracional (IR y Raman) a muestras dentales antes y después del tratamiento remineralizante en diferentes condiciones.

#### 3.4.1 Estudios con IR en muestras remineralizadas

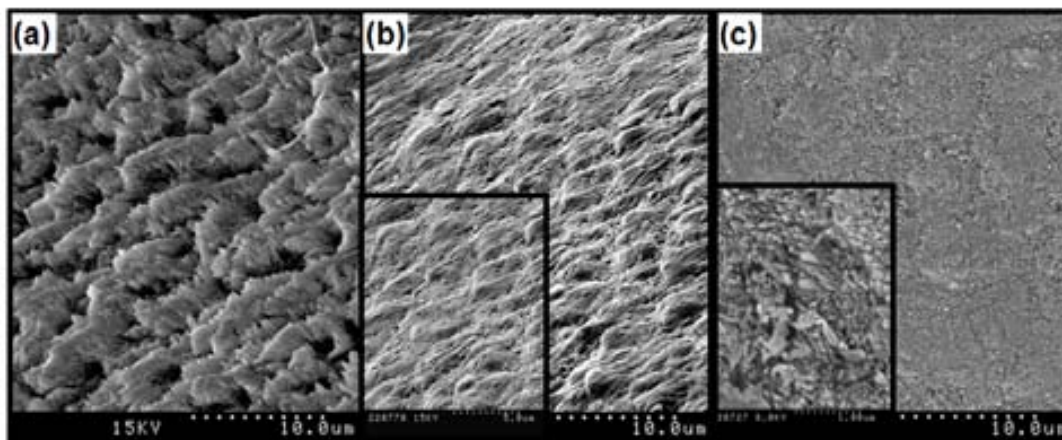
En la Figura 3.4.1 se muestra el espectro IR obtenido con luz de sincrotrón correspondiente al grupo fosfato para una muestra dental tratada con el producto remineralizante NMTD en presencia de amelogenina (Figura 3.4.1 a)) y otra muestra tratada únicamente con dicho producto remineralizante en ausencia de amelogenina (Figura 3.4.1 b)). No se observan diferencias significativas entre los dos dientes, el espectro muestra para ambos casos una señal similar a la obtenida para la referencia de fluorapatita (ver Figura 3.4.1) en la medida correspondiente al esmalte externo y una similitud a la señal de hidroxiapatita en las medidas de esmalte interno e intermedio. En concordancia con estos resultados la presencia de amelogenina en el proceso para obtener la formación de una nueva capa de remineralización en forma de fluorapatita no parece ser necesaria.



**Figura 3.4.1** Comparación de la señal IR de fosfato en espectros de esmalte tratado (a) en presencia y (b) en ausencia de amelogenina.



Sin embargo, la orientación específica del ensamblado molecular es uno de los resultados de la interacción entre la proteína y las nuevas unidades resultantes de la remineralización. Esta orientación específica correspondiente a la cristalización no es posible observarla en el espectro IR, por este motivo se realizó la caracterización de la superficie con microscopía electrónica de barrido (SEM). Las imágenes SEM obtenidas revelan un crecimiento controlado, obteniendo cristales alargados y con una cierta orientación <sup>[9]</sup>. En la Figura 3.4.2 (a) se muestra la superficie resultante después de un tratamiento de grabado ácido. El esmalte presenta los cristales de manera discontinua y poco compactados, este estado es característico de las primeras etapas de las caries. Como se puede apreciar en las imágenes de las Figuras 3.4.2 (b) y (c), una capa de fosfato de calcio, identificada como fluorapatita en los espectros de IR y Raman, se ha formado en la superficie del diente cubriendo las “escamas” que presentaba el esmalte tratado con ácido. La diferencia se observa en la Figura 3.4.2 (c) donde los cristales forman pequeñas agujas debido al mecanismo de cristalización guiado por la proteína. Adicionalmente la densidad de empaquetado de los cristales nuevos es claramente superior si se compara con la imagen 3.4.2 (b). Estas características que produce la presencia de amelogenina son la que dotan al tejido dental de una mayor resistencia frente al ataque ácido por un nuevo proceso de caries <sup>[10]</sup>.



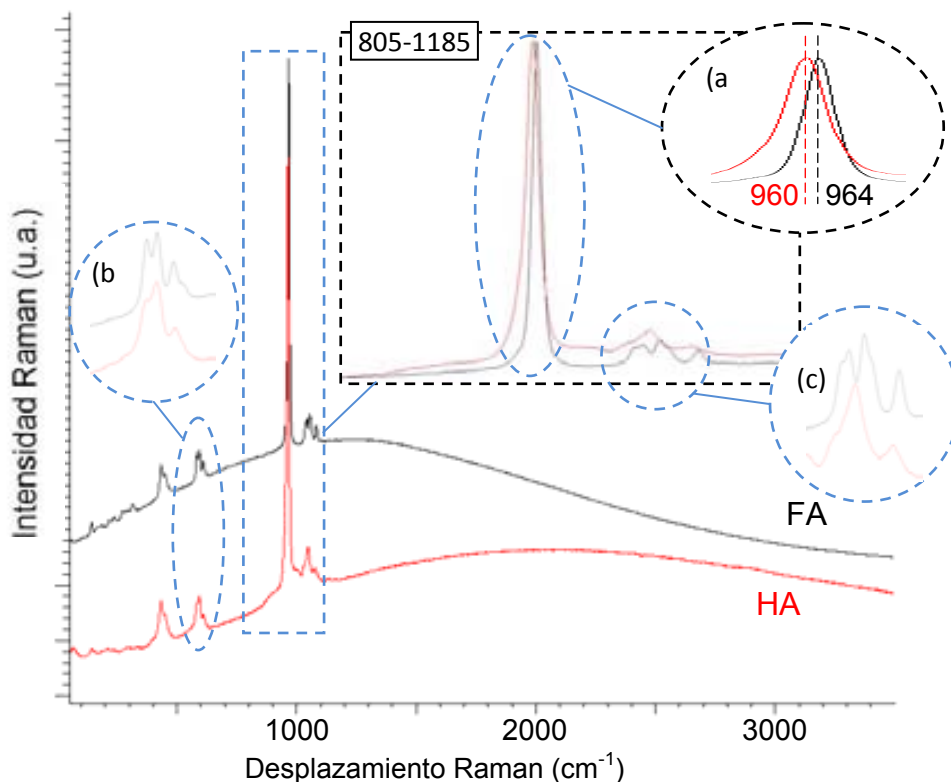
**Figura 3.4.2** Imágenes SEM del esmalte después de (a) un tratamiento ácido, (b) tratamiento remineralizante y (c) tratamiento remineralizante con amelogenina.

<sup>[9]</sup> Fan Y, Sun Z, Moradian-Oldak J. Controlled remineralization of enamel in the presence of amelogenin and fluoride, *Biomaterials*, 2009, 30: 478–483.

<sup>[10]</sup> Tanimoto K, Le T, Zhu L. Effects of Fluoride on the Interactions between Amelogenin and Apatite Crystals. *J Dent Res*. 2008, 87: 39-44.

### 3.4.2 Estudios con Raman en muestras remineralizadas

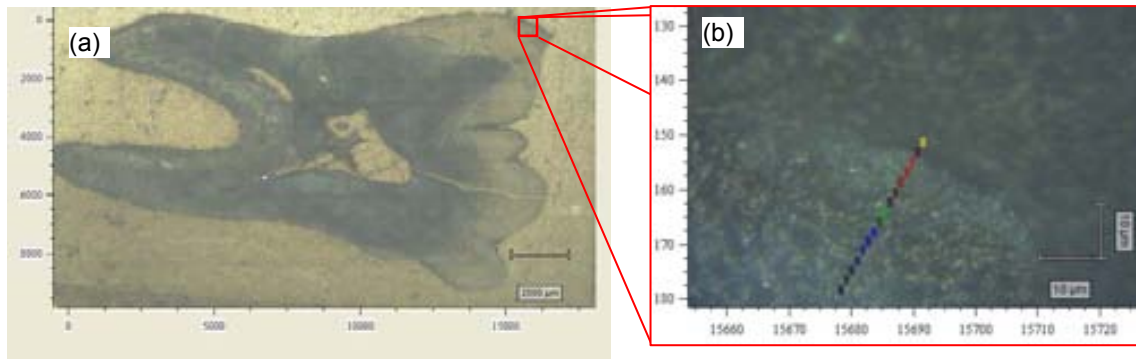
Los resultados anteriores se han completado con medidas de espectroscopia Raman. Para ello, se midieron los espectros Raman de los compuestos de referencia, fluorapatita e hidroxiapatita. En la Figura 3.4.3 se comparan los espectros de muestras de polvo de HA y FA, donde se han señalado regiones espectrales con las diferencias más destacadas. Estas diferencias son debidas a una contracción de la celda unitaria debida a la transformación de hidroxiapatita en fluorapatita la cual produce cambios en las frecuencias de algunos de los modos vibracionales, en particular los correspondientes al grupo fosfato, que dan lugar a las bandas más fuertes en los espectros Raman. Este cambio en el tamaño de la celda produce un desplazamiento de aproximadamente  $4\text{cm}^{-1}$  entre el valor para HA a  $960\text{ cm}^{-1}$  hasta el de FA a  $964\text{ cm}^{-1}$ , Figura 3.4.3(a) que corresponde a la misma variación que ha sido descrita previamente por Campillo M et. al. <sup>[11]</sup>. Esta diferencia en el espectro Raman es debido al cambio en el blue shift (anti-Stokes) de la banda  $\nu_1$  correspondiente al pico característico. Se seleccionó la región entre  $805 - 1185$  para registrar los espectros Raman de las muestras de dientes tratados y no tratados. La relación señal:ruido obtenida no permitió, en las condiciones de medida, obtener datos suficientemente concluyentes de las zonas marcadas (b) y (c) en la Figura 3.4.3.



**Figura 3.4.3** Espectros Raman de hidroxiapatita (HA) y fluorapatita (FA).

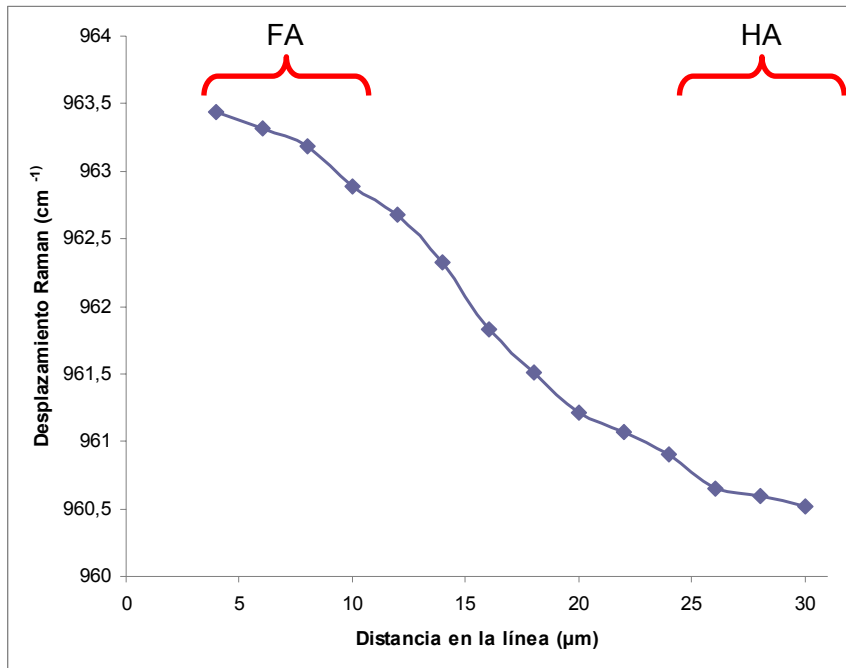
<sup>[11]</sup> Campillo M, Lacharaise P, Torrado A, et. al. Calcium speciation on dental enamel by Raman scattering to assess effective teeth fluoridation. In press.

En la Figura 3.4.4 (a) se presenta un imagen compuesta registrada en el microscopio Raman de una muestra dental tratada donde se señala una de las ROIs seleccionadas previamente (apartado 3.3.1). En la 3.4.4 (b) se muestra una ampliación de la imagen donde tiene representada una línea de píxeles sobre la cual se han adquirido los espectros Raman en intervalos de 2  $\mu\text{m}$ . Como se puede observar, las medidas se realizaron desde la interfase entre la resina y el esmalte (píxel amarillo) hasta el esmalte intermedio (píxel negro).



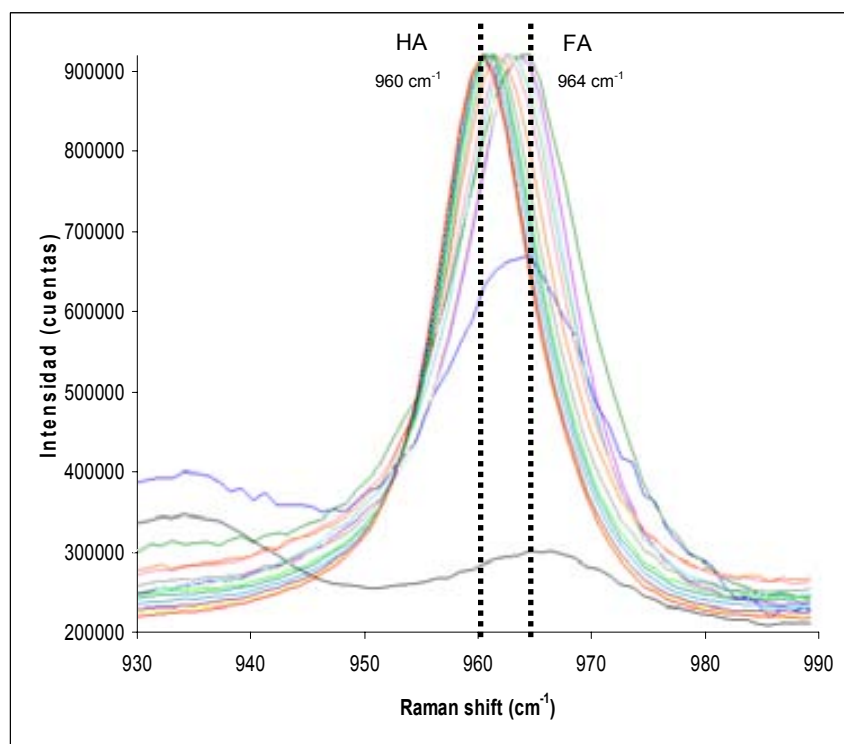
**Figura 3.4.4** Imagen microscópica de: (a) la superficie total del diente y (b) ROI seleccionada para hacer las medidas de Raman.

La representación de la Figura 3.4.5 representa la posición del pico característico según la posición en la línea denotada en la muestra. De manera que en el eje de ordenadas (eje y) se señala la posición del píxel analizado en la muestra según la distancia con el origen. Y en el eje de abscisas (eje x) se muestra el valor del desplazamiento (*Raman shift*) en el que se encuentra la señal Raman característica. De esta manera se puede observar que en la capa externa del diente, el pico corresponde a fluorapatita con un desplazamiento de  $964\text{ cm}^{-1}$ , en cambio a medida que el espectro se adquiere a mayores profundidades del esmalte la señal se desplaza hacia el *shift* de la hidroxiapatita, llegando a aproximar el valor de  $960\text{ cm}^{-1}$  a una profundidad de  $30\text{ }\mu\text{m}$  en el esmalte.



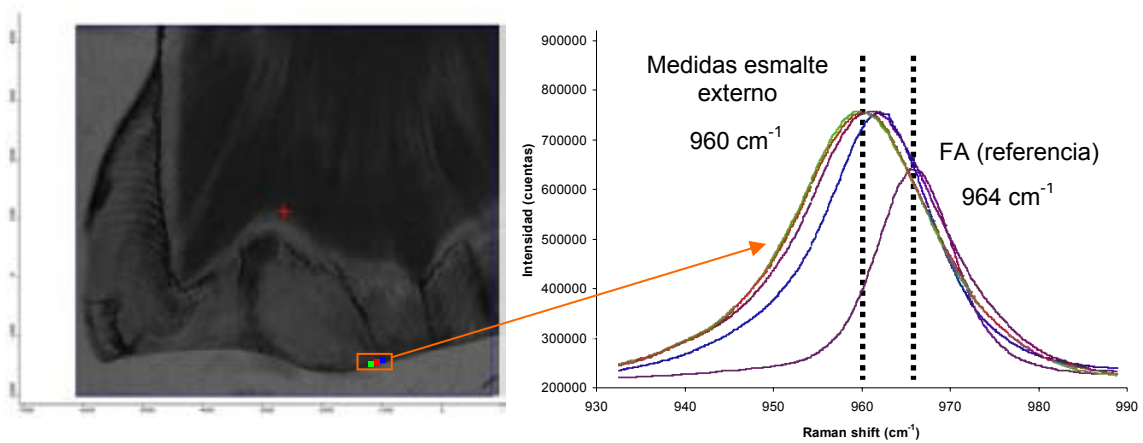
**Figura 3.4.5** Representación de la posición del pico característico según la posición en la línea denotada en la muestra.

La Figura 3.4.6 presenta los espectros registrados en la ROI seleccionada, donde se puede observar un desplazamiento en la frecuencia del modo  $\nu_1$  de 960 a 964  $\text{cm}^{-1}$ , relacionado con la presencia de fluorapatita que se encuentra en las capas del esmalte más externo.



**Figura 3.4.6** Espectros Raman tratados que muestran la presencia de fluorapatita (FA) ( $964 \text{ cm}^{-1}$ ) en ciertas partes del esmalte externo. Señal a  $960 \text{ cm}^{-1}$  correspondiente a hidroxapatita (HA).

El mismo análisis realizado en muestras sin tratamiento con NMTD (ver Figura 3.4.7) confirma que en toda la capa externa del esmalte de dichas muestras no hay presencia de fluorapatita, ya que todos los espectros obtenidos presentan un desplazamiento Raman de aproximadamente  $960\text{ cm}^{-1}$ . Tanto los espectros medidos en diferentes partes del esmalte como en la dentina muestran el desplazamiento Raman correspondiente a hidroxiapatita. Por tanto, la ausencia de señal de fluorapatita en las referencias y la aparición de ésta en la superficie de las muestras sometidas al tratamiento remineralizante corrobora la efectividad del tratamiento aplicado, así como los resultados obtenidos por IR.



**Figura 3.4.7** Imagen y espectros Raman del esmalte externo de una muestra sin tratamiento en comparación con espectro de referencia de fluorapatita (FA) ( $964\text{ cm}^{-1}$ ).

Todos los espectros fueron analizados mediante un ajuste de curvas, utilizando el software Renishaw Wire 3.3 y empleando una sola curva mixta Gaussiana/Lorenziana (aprox. 30%/70%) en el rango entre  $930 - 990\text{ cm}^{-1}$ , para obtener el valor de intensidad máxima del pico.

### 3.5 ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DE CÁLCULOS DENTALES

Para evaluar la acción antisarro de mezclas de los compuestos fitato y pirofosfato se realizaron una serie de experimentos en los que se varió la concentración de los dos inhibidores. Se calculó el % de inhibición obtenida y, paralelamente, se evaluó el efecto que el tratamiento tenía sobre la dureza del esmalte.

#### 3.5.1 Valores de inhibición

Se testaron 3 diferentes concentraciones de fitato y pirofosfato siempre manteniendo la relación de 5 veces mayor la cantidad de pirofosfato en relación a la de fitato. Esta relación corresponde a la relación de concentraciones existente de los dos compuestos en muestras de orina con un alto poder de inhibición <sup>[12][13]</sup>. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.5.1 donde se observa que los valores de inhibición aumentan al aumentar la concentración de inhibidores, llegando a ser máxima y cercana al 100% para 3 ppm de fitato y 15 ppm de pirofosfato. De manera que se puede determinar que los dos compuestos tienen un efecto sinérgico positivo obteniendo valores elevados de inhibición a concentraciones bajas.

Fitato (ppm)	Pirofosfato (ppm)	% Inhibición
0	0	N/A
0,3	1,5	12,0
1,5	7,5	83,3
3	15	96,8

**Tabla 3.5.1** Valores de inhibición obtenidos en presencia de diversas concentraciones.

#### 3.5.2 Efecto sobre el esmalte

Las mismas concentraciones utilizadas en el tratamiento inhibidor del apartado 3.5.1 se aplicaron aquí para estudiar el efecto que esta formulación podían provocar en los tejidos dentales. Las medidas de diferencia de dureza sobre el esmalte entre los valores iniciales y los de después del tratamiento se muestran en la Figura 3.5.2. Las observaciones de variaciones de dureza revelan una disminución de la dureza del esmalte para la formulación con mayor concentración de inhibidores. En cambio, para el resto de formulaciones inferiores se observa que la variación es similar a la que se obtiene con el grupo de control, por tanto, no es significativa. El análisis estadístico t para muestras dependientes revela que solo existen diferencias significativas para el grupo de mayor concentración de inhibidores, que por tanto, si que producen un efecto negativo respecto la dureza del esmalte.

<sup>[12]</sup> Grases F, Conte A. Urolithiasis, inhibitors and promoters. *Urol Res*, 1992, 20: 86-88.

<sup>[13]</sup> Muñoz JA, López-Mesas M, Valiente M. Inhibitors of Oxalocalcic Lithiasis: Effects of Their Interactions on Calcium Oxalate Crystallization. *Urology*. 2012 [Epub ahead of print].

Fitato (ppm)	Pirofosfato (ppm)	$\Delta$ Dureza esmalte	Valor $t_{\text{calculado}}$ ( $t_{\text{crítico n=9}} : 1,833$ )
0	0	-3,470	0,471
0,3	1,5	-4,273	0,474
1,5	7,5	0,783	0,0598
3	15	18,657	2,375

**Figura 3.5.2** Valores de variación de la dureza del esmalte después del tratamiento con diversas concentraciones de inhibidores.

### 3. 6 INCORPORACIÓN DE UN CATALIZADOR HETEROGÉNEO AL BLANQUEAMIENTO DENTAL

En este apartado se resumen los estudios correspondientes a la modificación de un producto blanqueante comercial con un sistema de catálisis heterogénea consistente en zeolita cargada con iones de hierro. El objetivo principal de esta variación es aplicar los principios de la reacción de Fenton a un material con peróxido de carbamida para obtener una mayor eficiencia en el blanqueamiento debido a que la reacción de Fenton provoca una mayor producción de radicales hidroxilo y dotando de un poder oxidante más elevado, como se indicó en la introducción (ver capítulo 1.3.1). La finalidad de utilizar este catalizador heterogéneo es evitar la formación de los típicos hidróxidos de hierro insolubles que se forman en la reacción de Fenton convencional y, al mismo tiempo, evitar la posible formación de manchas que podrían aparecer sobre el diente por la adsorción de las especies hidrolíticas del hierro. De esta forma, el hierro se inmoviliza en una zeolita, lo que permite realizar lo que se denomina un proceso de catálisis heterogénea. Para evaluar la mejora que aporta este sistema se han estudiado diferentes condiciones, tales como, tiempo de aplicación, concentración y estado de oxidación del hierro.

#### *3.6.1 Determinación de la carga de la zeolita*

La capacidad de la zeolita para adsorber iones de hierro es un parámetro básico en el proceso de catálisis. Tal y como se ha descrito en el apartado 2.2.6.1, la evaluación de esta capacidad se lleva a cabo mediante la determinación de la carga de iones de hierro en estas zeolitas. En este caso, esta determinación se realiza a partir de la cuantificación del ion presente en la solución de desorción.

La capacidad se calcula como milimoles de hierro retenido por gramo de zeolita según la ecuación recogida en el capítulo 2.7.1.

Los valores más altos obtenidos para la carga con hierro con la Zeolita USY fueron para Fe (III)  $0,447 \pm 0,006$  meq/g y para Fe (II)  $0,185 \pm 0,005$  meq/g. Mediante el test de tiocianato <sup>[14]</sup>, realizado para todas las muestras, se verificó que los iones inmovilizados en la zeolita no se liberan al contacto con la disolución acuosa. Adicionalmente y utilizando la reacción con permanganato, se demostró que el peróxido de hidrógeno no es absorbido por la zeolita <sup>[14]</sup>, de manera que la concentración permanece constante después de adicionar zeolita al medio.

#### *3.6.2 Efecto blanqueante en presencia de catalizador heterogéneo (zeolita)*

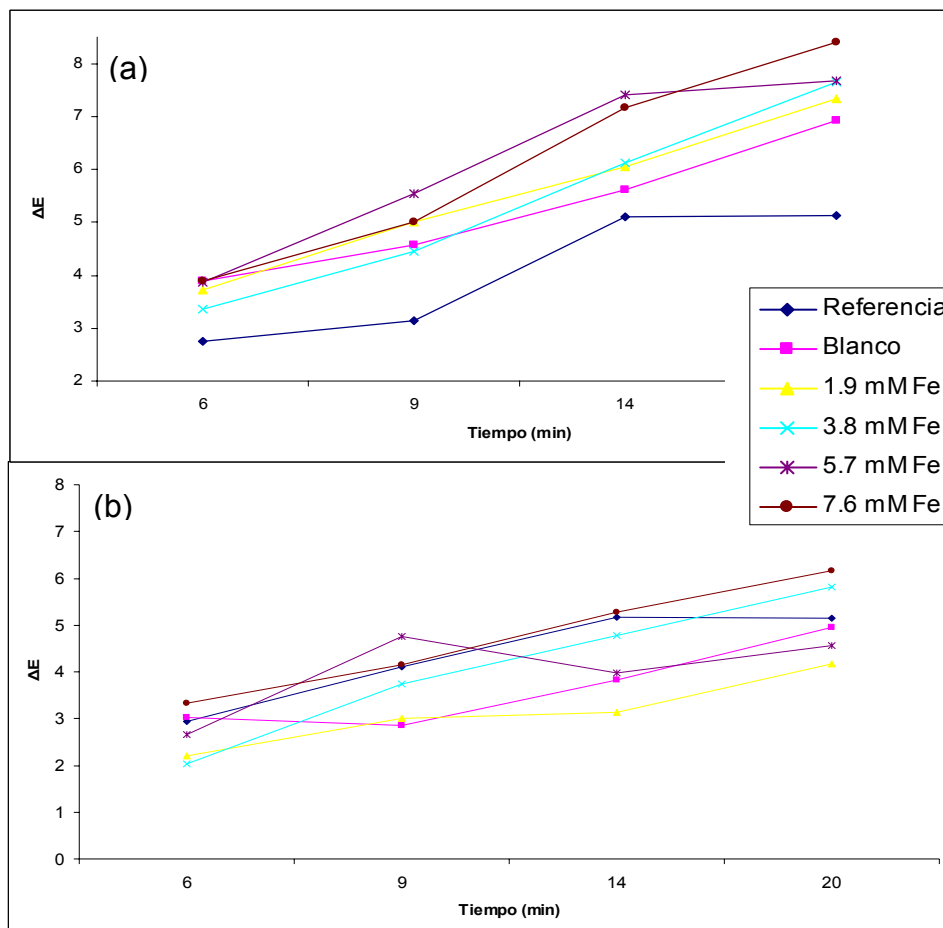
En los datos que recoge la Figura 3.6.1 muestra la variación de color representada por  $\Delta E$  respecto el tiempo para todos los grupos estudiados de ambas especies de hierro. La pendiente de las rectas de blanqueo con zeolita cargada con Fe (III) aumentan con el aumento de la cantidad de zeolita añadida al producto blanqueante (Figura 3.6.1 (a) y Tabla 3.6.1),

---

<sup>[14]</sup> Burriel FM, Lucena CF. Química Analítica Cualitativa. Madrid: Paraninfo, 1992.



indicando el efecto positivo de la presencia de ión hierro en la producción del radical hidroxilo, Figura 3.6.2 ( $P < 0,001$ ). La mayor pendiente ( $1,56 \text{ min}^{-1}$ ) corresponde a la concentración de  $7,6 \text{ mM}$  de  $\text{Fe (III)}$ . Asimismo, los dos grupos sin presencia de hierro (referencia y blanco) presentan las pendientes más bajas  $0,9139$  y  $1,0155 \text{ min}^{-1}$  respectivamente, sin diferencias significativas.



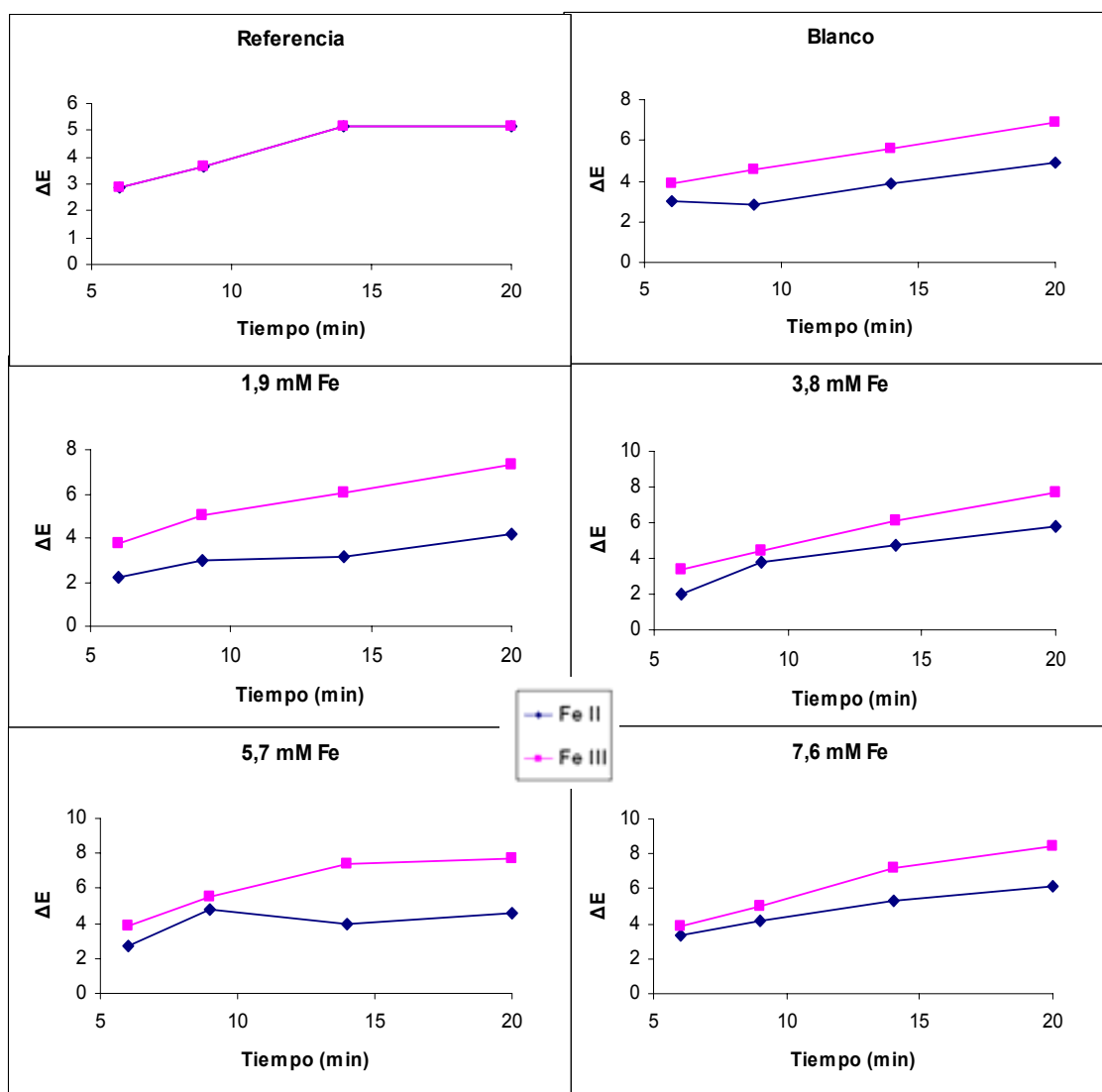
**Figura 3.6.1** Cinética del proceso de catálisis utilizando: (a)  $\text{Fe III}$  y (b)  $\text{Fe II}$  variando la concentración de catalizador.

	<b>Fe (II)</b>	<b>Fe (III)</b>
<i>Referencia</i>	$y = 0,8388x + 2,092$	
<i>Blanco</i>	$y = 0,6753x + 1,971$	$y = 1,016 x + 2,710$
<i>1,9 mM</i>	$y = 0,6082x + 1,610$	$y = 1,194x + 2,539$
<i>3,8 mM</i>	$y = 1,240x + 0,994$	$y = 1,453x + 1,762$
<i>5,7 mM</i>	$y = 0,4922x + 2,760$	$y = 1,337x + 2,779$
<i>7,6 mM</i>	$y = 0,9642x + 2,316$	$y = 1,564x + 2,203$

**Tabla 3.6.1** Comparación del efecto catalítico de  $\text{Fe (III)}$  y  $\text{Fe (II)}$  según la relación  $\Delta E = f(t)$  en las diferentes condiciones estudiadas.

Los resultados obtenidos (Tabla 3.6.1) para los grupos que contienen zeolita cargada con Fe (II) revelan diferencias significativas para  $P < 0.05$ . Como se observa en la Figura 3.6.1 (b), los valores de blanqueo de los grupos de referencia y blanco son inferiores comparados con los grupos que contienen zeolita cargada. La concentración de 3,8mM presenta la pendiente mayor  $1,240 \text{ min}^{-1}$ .

La Figura 3.6.2 ilustra el contraste de cinéticas entre los dos estados de oxidación del hierro estudiados, se muestran diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en todos los grupos excepto en el de referencia. Las muestras tratadas con el blanqueante que contenía Fe (III) muestran mayores valores de blanqueamiento.



**Figura 3.6.2** Comparación de las diferentes concentraciones estudiadas de Fe (III) y Fe (II).

Como se puede observar en la representación del blanco, el material de la zeolita tiene un cierto efecto en el proceso de blanqueamiento. La máxima carga conseguida para la especie de hierro (II) es sustancialmente menor a la conseguida con el ion Fe(III) de manera que la

cantidad de zeolita necesaria para tener la misma concentración de hierro en ambos casos requiere añadir una mayor cantidad para el ion Fe(II). Comparando los valores de la figura 3.3 correspondientes al blanco y a la referencia se puede observar que este material tiene un efecto negativo sobre el proceso de blanqueamiento. Este efecto puede estar relacionado con el secuestro de ciertas especies reactivas, pero no del peróxido como ya se demostró con el test del permanganato [14]. De manera que la disminución del blanqueo puede ser debido a que se produzca una interacción entre la zeolita y la cantidad de radicales OH libres en el medio. La reacción Fenton depende directamente de la liberación de los radicales generados en los poros del interior de la zeolita, por tanto, una baja difusión de éstos y la posible adsorción en el material puede provocar el efecto negativo que se observa [15].

Respecto las diferencias entre los resultados obtenidos para Fe (II) y Fe (III), el proceso que parte de la especie en estado de oxidación III debería ser más lento ya que, de acuerdo con el mecanismo conocido y recogido en el capítulo 1.3.1, la reacción Fenton necesita pasar por la especie Fe (II) [16][17]. Sin embargo, los valores de blanqueo son significativamente inferiores en todos los grupos con el ion Fe (II).

Este comportamiento se puede explicar debido al efecto del material utilizado. La zeolita tiene un efecto negativo sobre el efecto blanqueante. Adicionalmente, la carga de Fe(II) en la zeolita es inferior a la de Fe(III) lo que ocasiona una mayor presencia de zeolita cuando utilizamos Fe(II) para obtener la misma concentración total de ión de Fe. Ciertos estudios han demostrado que la velocidad de un proceso catalítico depende del grado de dispersión de los centros activos en la superficie del catalizador [18], de manera que el reactivo migra por los centros activos e inactivos y el control de la difusión determina la velocidad del proceso catalítico. La baja carga en Fe (II) incrementa las distancias entre los centros catalíticos activos en la zeolita lo que provoca un descenso del número de radicales disponibles para el proceso de blanqueamiento.

Estos resultados se han comparado con otro estudio publicado por el Dr Lee et. al. [19], aunque debido a las diferencias de condiciones en que se han realizado ambos estudios, esta comparación es sólo cualitativa. En el trabajo presente, los tiempos de aplicación no exceden los 20 minutos frente a las 72h máximas empleadas en el trabajo mencionado del Dr. Lee. Además, las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizadas son claramente inferiores en nuestro estudio

---

[15] Chanagá-Quiroz T, Giraldo-Duarte S, Almanza-Pubiano L. Modification of the Zeolite-Matrix Ratio in FCC Catalysts and its Impact on Yields and Quality of Middle Distillates. *Ing Univ*. 2009, 13 (1): 9-26.

[16] Gonzalez-Olmos R, Holzer F, Kopinke FD, et. al. Indications of the reactive species in a heterogeneous Fenton-like reaction using Fe-containing zeolites. *Appl Catal A-Gen*. 2011, 398: 44–53.

[17] Laat J, H Gallard, Ancelin S, et. al. Comparative study of the oxidation of anthrazine and acetone by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV, Fe(III)/UV, Fe(III)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV and Fe(II) or Fe(III)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Chemosphere*. 1999, 39 (15): 2693-2706.

[18] Cwiklik L, Jagoda-Cwiklik B, Frankowicz M. Influence of spatial distribution of active centers on the kinetics of model heterogeneous catalytic processes. *Surf Sci*. 2004, 572: 318–328.

[19] Lee BS, Huang SH, Chiang YC, et. al. Development of in vitro tooth staining model and usage of catalysts to elevate the effectiveness of tooth bleaching. *Dent Mater*. 2008, 24(1): 57-66.

se ha utilizado una concentración de peróxido de carbamida del 15% equivalente a 5.4% de  $H_2O_2$ , inferior al 30% utilizado en el estudio de Lee et. al. <sup>[19]</sup>.

El proceso de manchado utilizado en el estudio de Dr. Lee difiere del utilizado en este trabajo, de manera que las manchas obtenidas en condiciones desiguales pueden provocar diferencias en los resultados del proceso de blanqueamiento. Pese a estas diferencias, se observa una eficiencia de blanqueamiento superior en los resultados del presente trabajo. Así, el valor de  $\Delta E$  obtenido para Lee et. al. en los procesos de blanqueamiento es de aproximadamente 26 utilizando una concentración de peróxido del 30% con hierro y durante un periodo de 72 horas. En cambio, el presente trabajo obtiene un  $\Delta E$  de 5,5 utilizando una concentración del 15% de gel de peróxido de carbamida, que corresponde al 5,4% de  $H_2O_2$  y un periodo de aplicación de 20 minutos.

# 4

## Conclusiones

---

Los resultados expuestos constituyen una nueva contribución al desarrollo de materiales dentales para su aplicación en el área de la salud bucodental. Para ello se han aplicado nuevas metodologías analíticas que han permitido la caracterización tanto de estos materiales como de los procesos en que se aplican. A continuación se detallan las conclusiones más importantes que se pueden extraer de los resultados expuestos.

En relación al desarrollo de sistemas de intercambio iónico basados en nanopartículas de sílice derivatizada y su aplicación en procesos de remineralización dental:

- Las cargas obtenidas para los sistemas estudiados son relativamente bajas respecto a los resultados esperados. Esto se atribuye tanto a un bajo rendimiento de la derivatización como a los procesos de agregación de las nanopartículas que hacen disminuir drásticamente la superficie de contacto.
- El tratamiento con nanopartículas produce una nueva capa sobre la superficie del diente cubriendo casi totalmente la estructura que deja el grabado de los especímenes. Capa que incluye las propias nanopartículas a pesar de la limpieza por cepillado y proceso de sonicado de las muestras tratadas.

Sobre el desarrollo de nuevos métodos analíticos para la caracterización de procesos de remineralización dental:

- La radiación sincrotrón permite obtener una buena resolución de especies químicas (hidroxiapatita frente a fluorapatita), permitiendo adicionalmente realizar mapas precisos del proceso de remineralización de las muestras dentales.
- Los mapas de intensidad de señal IR realizados muestran señal de fluorapatita solamente en la capa más externa del esmalte. En las capas denominadas intermedia e interna, el espectro IR corresponde al compuesto de hidroxiapatita. En el caso de muestras no tratadas (de referencia) las señales de fluorapatita son inexistentes, por tanto, el agente utilizado en el proceso permite la remineralización del esmalte formado el compuesto de fluorapatita.
- La presencia de amelogenina únicamente afecta la forma de cristalización de la fluorapatita, ya que los espectros obtenidos en muestras en presencia y en ausencia de proteína son prácticamente iguales. Atribuimos a la amelogenina la guía del proceso de cristalización para obtener una superficie más compacta formada por pequeños cristales de fluorapatita. Adicionalmente el espectro IR no observa señal de proteína lo que se interpreta como ausencia de incorporación de proteína al esmalte en el tratamiento, la única señal de proteína se localiza en la dentina.
- Los espectros Raman confirman los resultados obtenidos con IR, observando la presencia de fluorapatita en el esmalte externo de las muestras. Asimismo, en el esmalte intermedio e interno de las muestras tratadas sólo se observa señal Raman de

hidroxiapatita. Para las muestras dentales de referencia no se localiza señal de fluorapatita en ningún punto.

En relación a los estudios realizados sobre la inhibición de cálculos dentales mediante inhibidores y sus efectos en los tejidos dentales:

- La mezcla binaria de fitato y pirofosfato produce un efecto inhibitor en la cristalización de cálculos dentales de oxalato cálcico. Dicho efecto aumenta al aumentar la concentración, llegando a ser cercana al 100% para 3 ppm de fitato y 15 ppm de pirofosfato.
- Los inhibidores no afectan a la dureza del esmalte de forma significativa, exceptuando la mayor concentración utilizada, por tanto, podrían ser aplicables a productos comerciales.

Sobre la utilización de zeolitas cargadas con iones  $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{Fe}^{3+}$  como catalizador Fenton para la mejora de las propiedades blanqueantes de un producto comercial:

- La presencia de las zeolitas cargadas con iones de hierro mejora la acción del blanqueador comercial aumentando su velocidad de actuación, por el contrario, la zeolita sin cargar o en grandes cantidades tiene un efecto negativo que disminuye la velocidad de blanqueo.
- En el caso de la zeolita cargada con  $\text{Fe}^{3+}$ , a medida que se aumenta la concentración de hierro presente aumenta también la velocidad de blanqueamiento siendo máxima para la concentración máxima estudiada de 7,6mM Fe (III) lo que se debe al aumento del área de contacto del catalizador.
- Para el ión  $\text{Fe}^{2+}$  alcanza un valor máximo a una concentración de 3,8 mM, dando velocidades inferiores a concentraciones mayores de hierro, y por tanto, mayores cantidades de zeolita. Este hecho explica la contribución negativa del soporte de zeolita en el proceso de blanqueo, contribución que hemos atribuido a la adsorción por la zeolita de radicales hidroxilo.
- La conclusión anterior viene reforzada por el hecho que para la misma concentración de ión hierro, los valores de velocidad de blanqueo son significativamente mayores en el caso del ion  $\text{Fe}^{3+}$  ya que el ión  $\text{Fe}^{2+}$  tiene una considerablemente menor carga en la zeolita, lo que implica una presencia mayor de zeolita para conseguir las mismas concentraciones.

# 5

## **A**nnexos

---

**Annexo I :** Heterogeneous catalyst improves commercial teeth bleaching  
by using Fenton reactions

**Annexo II:** Advanced Remineralization Processes of Human Dental Tissues.  
Spectroscopic Characterization Using Synchrotron-based Fourier-Transform  
Infrared and Raman Microspectroscopy

---



---

---

## **Annexo I:**

Heterogeneous catalyst improves commercial teeth bleaching by using Fenton reactions

---

---

## Heterogeneous catalyst improves commercial teeth bleaching by using Fenton reactions

### INTRODUCTION

Nowadays a white, beautiful smile has become an important issue for a large portion of the society [1, 2]. It is well known that some dietary factors, habits like smoking or some medicines can lead to extrinsic and intrinsic tooth discoloration [3-5]. Consequently, the sales of whitening products are increasing substantially and there is a wide variety of bleaching agents [6-8].

The exact mechanism of action of most marketed bleaching products on the teeth whitening systems is still unclear. However, there is evidence of the ability of hydrogen peroxide to penetrate the tooth structure and generate free radicals, which oxidize the organic compounds responsible for the stains [9, 10]. Currently, most vital teeth whitening systems incorporate carbamide peroxide as the active agent. Carbamide peroxide is chemical adduct of urea and hydrogen peroxide which upon dissolving in water or saliva disassociates back into hydrogen peroxide and urea [11]. Whitening systems based directly or indirectly on the action of hydrogen peroxide have shown good clinical results and great satisfaction of the patients [12].

The increasing number of patients asking for faster whitening treatments has led to the development of different systems based on light sources, addition of chemicals or metal activation to accelerate the action of hydrogen peroxide [13-16].

On the other hand, the Fenton-like processes have been used as a powerful source of hydroxyl radicals obtained from hydrogen peroxide. The presence of transition metal cations allows producing the radicals in mild reaction conditions [17-21]. Previous studies have shown that bleaching treatment can be more efficient when ferrous ion is added and Fenton's reaction can take place [22, 24]. However, the penetration of iron ions to the enamel creates new stains, thus decreasing the efficacy of the overall whitening process [6]. Zeolites loaded with ferrous iron can fix the cations and be efficiently used in combination with hydrogen peroxide in the oxidation process [21, 23]. In fact, the rate of Fenton reactions is higher for heterogeneous catalysts than for homogeneous media [18].

In this concern, previous studies developed zeolite system loaded with ions with the purpose of increasing the bleaching efficacy of  $H_2O_2$  [24]. In this publication, Lee et. al. were able to successfully improve the whitening process and established the feasibility of the concept. However, the whitening conditions used required a long application time and high concentrations of  $H_2O_2$  that can cause gum irritation and more sensitive teeth [9,10,11]. On the other hand, the reported methodology does not consider the hydrogen peroxide degradation that occurs in presence of iron ion [25]. Thus, a considerable decrease of  $H_2O_2$  can be expected for the proposed treatment times leading to results non suitable for reported comparison.

Considering Lee et al study as a proof of concept for the use of Fenton type heterogeneous catalysts in the tooth whitening process, the need to explore the kinetic parameters of the process under conditions that are suitable for *in vivo* applications becomes obvious. Thus, the present work is addressed not only to overcome the limitations of previous studies but specially to provide fundamental support for the new observed findings.

The main purpose of the present paper is to study the catalytic effect when commercial teeth whitening materials are applied in the presence of a cation-loaded zeolites in order to provide basic fundamentals of the results obtained. In this concern, both oxidation states (Fe (II) and Fe (III)) were studied systematically under application times recommended by producers of whitening materials.

## MATERIALS AND METHODS

### Specimen preparation

One hundred and eighty freshly extracted bovine intact incisors were stored in 0.5% (w/w) chloramine T for no more than 1 week. Roots were removed using a diamond blade saw (SBT 865, South Bay Technology Inc., CA, USA). Teeth were embedded in acrylic resin (Probase Cold, Ivoclar Vivadent, Shaan, Liechtenstein) with the labial surface facing the outer side of the specimen. Once the polymer was set, specimens were lightly polished using wet SiC paper P-200 (Abeja Debray, Spain) in order to expose a flat surface of fresh enamel. The surface was then finished by sequentially polishing with P-600 and P-1500 SiC paper (Abeja Debray, Spain) in order to allow precise color measurements.

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

To improve the staining procedure, specimens were sequentially exposed to solutions of HCl 0.12M for 60 seconds, saturated NaCO<sub>3</sub> for 30 seconds and again HCl 0.12M for 60 seconds. This etching process allows colored substances to penetrate deeply in the tooth. After the etching process, teeth were rinsed with deionized water for 1 minute [23].

The staining solution was prepared by dissolving 5.5g of soluble coffee (Natural coffee, Carrefour, Spain) and 4g of gastric mucin (Gastric mucin powder, American Laboratories Inc., USA) in 1600 ml of tea (Classic Tea, Hornimans, Spain). After mixing all the components, the solution was kept at 37 C and stirred by bubbling with N<sub>2</sub>. The staining process was monitored every day during the first week and at the end of the process by determining  $\Delta E$  from measured L\*, a\*, and b\* using a chromameter (Konica Minolta CR-221, Japan). The staining solution was renewed after each measurement. As discussed below,  $\Delta E$  revealed to be most appropriate parameter to observe teeth staining. This staining process was conducted for a total 14 days in order to obtain homogeneous stains. Then, specimens were washed and kept in water until measured.

After the staining process was completed, specimens were randomly divided in twelve groups (six groups for Fe (III) and six for Fe (II)) (n=15). Group size was calculated in order to distinguish variations of 3 units of the L parameter of the color space considering the variability observed in previous studies.

Each group was treated with different amounts of zeolite loaded with iron II or III added to the whitening material:

- Reference. Original commercial whitener. (1 syringe for whitening step)
- Blank. 0mM Fe (III) or Fe (II). (1 syringe + 51,2mg zeolite or 122,6mg zeolite without iron load)
- 1.9 mM Fe (III) or Fe (II). (1 syringe + 13,4mg zeolite Fe (III) or 31,8mg zeolite Fe (II))
- 3.8 mM Fe (III) or Fe (II). (1 syringe + 26,0mg zeolite Fe (III) or 61,5mg zeolite Fe (II))
- 5.7 mM Fe (III) or Fe (II). (1 syringe + 38,6mg zeolite Fe (III) or 92,4mg zeolite Fe (II))
- 7.6 mM Fe (III) or Fe (II). (1 syringe + 51,5mg zeolite Fe (III) or 123,6mg zeolite Fe (II))

### Zeolite loading

The catalyst was prepared starting from commercially available Y zeolite in ammonium form (Zeolyst International, USA). This zeolite is characterized by an 11.5 SiO<sub>2</sub>/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> molar ratio, with 0.05 % wt. of Na<sub>2</sub>O. The unit cell size is 24.35 Å and the total surface area of 730 m<sup>2</sup>/g. The structure of this material is given in Fig. 1[26].

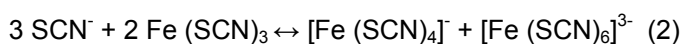
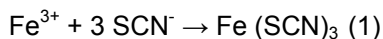
< Fig. 1 >

Three grams of the zeolite were loaded with Fe (III) in a solution with 70 ml of 0.05 M Fe (NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> at pH 1.88 for 1h at room temperature. The pH was strictly controlled using a glass electrode (Crison 52-02, Spain) connected to a potentiometer (EDT Instrument series 3, England) to avoid the formation of iron complexes that could decrease the load of the zeolite. After the conditioning period, the solid was filtered and washed thoroughly with MilliQ water. The zeolite was finally dried in an oven at 80 C for 24 h.

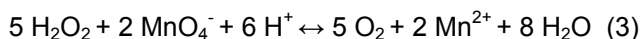
The zeolite loaded with Fe (II) was obtained using the same process except that a FeSO<sub>4</sub> 0.05M solution at pH 4.03 was used and the process was carried out under N<sub>2</sub> atmosphere to avoid the oxidation of Fe (II).

The loading capacity of the zeolite was determined using a stripping process. Fifty milligrams of zeolite were treated with 10 ml HCl 1M for 3 h. The concentration of Fe was determined using ICP-OES (Iris Intrepid II XSP, Thermo Electron).

In order to determine whether the Fe ions loaded in the zeolite were released in water solution, 3ml of whitener mixed with 123.6mg load zeolite was stirred in 10ml of MilliQ water for 2 minutes. The mixture was then filtered and 0.5ml of a saturated sodium tyocyanate solution was added to the filtered solution in order to visually assess the absence of iron. Iron in the medium reacts (reaction 1 and 2) with tyocyanate and red complexes are obtained [27].



The possible absorption of hydrogen peroxide by the zeolite was evaluated by stirring 1g of zeolite in 25ml 0,48% (w/w) peroxide solution. Hydrogen peroxide concentration was quantified before and after the contact with zeolite using a 0.02M potassium permanganate solution. In the presence of hydrogen peroxide, the redox reaction (3) would take place and the characteristic violet color of MnO<sub>4</sub><sup>-</sup> would disappear giving way to a colorless solution of Mn<sup>2+</sup> [27]:



### Measurement of the whitening effect

The color of the specimens after the staining process was measured using a colorimeter (Konica Minolta CR-321, USA). Color coordinates of the L\*a\*b\* color space were recorded in order to calculate Delta E [28, 29]. This parameter was shown to be most appropriate to monitor the bleaching effect (see Fig. 2). Samples were marked in order to perform all the measurements on the same area of the specimen.

< Fig. 2 >

The bleaching agent was prepared by mixing the commercial whitener and a controlled amount of zeolite to obtain the desired iron (II or III) concentration. The whitening system was then extended over the specimen 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 process was followed stepwise in periods of various minutes to study the kinetics at the beginning of the process:

1<sup>st</sup> step: 6 minutes

2<sup>nd</sup> step: 3 minutes (9 minutes of total whitening)

3<sup>rd</sup> step: 5 minutes (14 minutes of total whitening)

4<sup>th</sup> step: 6 minutes (20 minutes of total whitening)

After each step, specimens were washed with water and brushed with a soft toothbrush for 20 seconds to remove the whitener from the surface. Then, the color was measured and a new dose of whitener was applied.

The color change ratio was calculated as (4):

$$\Delta E^*_{ab} = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (4)$$

Data obtained were analyzed using ANOVA one-way to detect the presence of significant differences among the study groups with the same oxidation state of iron. When differences were detected a Student Newman Keuls test was used to identify such differences. All the statistical tests were conducted at the 95% confidence level [30].

## RESULTS

### Load of the zeolite

The values of load were  $0,447 \pm 0,006$  mmol Fe/g zeolite and  $0,185 \pm 0,005$  mmol Fe/g zeolite, for Fe(III) and Fe(II) respectively. All the samples tested negative on the tyocianate test [27], indicating that the iron loaded on the zeolite was not released to the water. No hydrogen peroxide absorbed by the zeolite was detected using the reaction with permanganate [27], peroxide concentration remains constant after the addition of zeolite to the solution.

### Staining process dynamics

Figure 3 shows the staining process variation with time. Most of the staining build-up took place during the first three days (near 90% of total amount). Then, the absorption of chromophore substances dramatically decreased, and after 8 days no significant changes of the  $\Delta E$  parameter were observed.

< Fig. 3 >

### Whitening with zeolite loaded with Fe

Figure 4 shows  $\Delta E$  vs. time for all the studied groups and for both iron species. The slopes of the whitening curves with zeolite loaded with Fe (III) increase with the amount of zeolite added to the whitener product (Fig. 4b), thus indicating the positive effect of iron in the hydroxyl radical production Table 1 ( $P < 0.001$ ). The highest slope ( $1.56 \text{ min}^{-1}$ ) corresponds to the concentration of 7.6mM Fe (III). On the other hand, the two groups considered that did not include iron (reference and blank) presented the slowest whitening slopes of 0.9139 and  $1.0155 \text{ min}^{-1}$  respectively, without significant differences.

< Fig. 4 - Table 1 >

Groups containing different amounts of zeolite loaded with Fe (II) revealed significant differences ( $P < 0.05$ ). As shown in Figure 4b, whitening values for reference and blank groups are lower compared those of the zeolite containing groups. The concentration of 3.8mM presents the highest slope of 1.24.

Figure 5 illustrates the contrast of kinetic plots in the whitening process for the different concentrations of zeolite added of both iron ions. Samples containing Fe (III) showed higher whitening values revealing significant differences ( $P < 0.05$ ).

< Fig. 5 >

## DISCUSSION

In this study, the potential of accelerating a carbamide peroxide whitening material using a zeolite loaded with iron was evaluated.

The monitoring of the staining process showed a remarkable decrease after the second day. Therefore, saturation of external enamel with chromophore compounds seems to take place at the beginning of the process. Once the external enamel is saturated, the slow diffusion rate of the organic compounds through the highly mineralized tissue possibly prevents the absorption of more chromophore substances [31]. It should be pointed out that the staining process performed in this study does not reproduce a clinical situation, in which the exposure to staining substances is not continuous [32]. However, the process was designed to obtain homogeneous, reproducible stains that allow accurate measurements in an *in-vitro* setting.

The observed differences in Figure 2 between  $\Delta E$  and  $\Delta L$  values correspond to variation in the parameters  $a$  and  $b$  from the CIE  $L^*a^*b$ . Such variations are noticed to be in the same direction, except for  $b$  values that are negative for Fe(II) catalyst and are positive for Fe(III). This behavior may be related to the possible release of respective ions from the zeolite support. In any case, the release is negligible and the average contributions of these variations are less than 5% of the  $\Delta E$  variation.

Zeolite material can affect the whitening process as it is observed in the variation of Blank results (Figure 5-b), since, as stated before, higher amount of zeolite is employed when Fe(II) is the target catalyst. This negative effect of the zeolite on the whitening process is assigned to the withdrawal of some reactive species, since it was proved by performing the permanganate test [27] that the interaction between zeolite and hydrogen peroxide does not change its concentration [33]. Thus, the observed decrease of bleaching is attributed to a decrease in available OH radicals during the process. Fenton reaction strongly depends on the delivery of such small size radicals. In this case, OH radicals generated at the internal zeolite porous present a difficult diffusion and a possible adsorption, thus, leading to a less effective bleaching process [34].

Regarding the differences between Fe (II) and Fe (III) groups, the use of Fe (III) needs the Fenton type reaction to obtain Fe (II) and start the Fenton process [35, 36]. Thus, a slower process should be expected for samples containing Fe (III). However, the whitening values obtained with Fe (III) are clearly higher than Fe (II) values. This can be explained by the lower load obtained with Fe(II), which results in higher amounts of zeolite needed to obtain the same concentration of Fe as in Fe (III) samples. Due to the negative effect of the zeolite, the color change is lower. In addition, a decrease of peroxide concentration occurs due to the dilution produced by the larger amount of zeolite added.

Since conditions are dramatically different, in particular application time, only a rough comparison with the previous study [24] can be made. In the present study, application time does not exceed 20 minutes in any case. Moreover,  $H_2O_2$  concentrations used in this paper are normally used in commercial whitening systems. The concentration of carbamide peroxide in the commercial system used is 15%. This is equivalent to 5.4% of  $H_2O_2$ , as compared to 30%



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> used by Lee et al. Furthermore, Lee et al used a staining process that differs from the one used in the present study. The different stains obtained may account for some of the differences observed in the whitening process. Therefore, a direct comparison of the results of the two studies is not possible. However, it shall be pointed out that an improved efficiency of the whitening system is observed in the present study. Thus,  $\Delta E/\% \text{H}_2\text{O}_2$  values of 0.87 correspond to the results reported by Lee et al using 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, while our results show  $\Delta E/\% \text{H}_2\text{O}_2$  values of 1.02 using a carbamide peroxide gel, with a corresponding H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration of 5.4 %.

Furthermore, concerning our results of lower efficiency when using Fe(II) as catalyst, the rate of the catalytic process depends on the dispersion degree of active centers on the catalyst surface, since the reactant can migrate between active and inactive regions, the surface diffusion will control the overall rate of the catalytic process. The lower load of Fe (II) will increase the distance between the active catalytic centers in the zeolite leading to a lower release rate of radicals, thus decreasing the whitening process [37].

## CONCLUSION

In the present *in-vitro* study, zeolite loaded with iron ions has revealed the potential to accelerate the whitening process of a carbamide peroxide commercial gel. Basic foundations for these results are provided.

In addition, Fe(III) loaded ions produce higher decolorization against Fe(II) ions. Loaded zeolite was found stable during the process application, allowing its incorporation in commercial bleaching products.

## REFERENCES

1. Van Der Gelda P, Oosterveldb P, Van Henckc G, Kuijpersjagtmand AM. Smile Attractiveness. *Angle Orthod*, 2007; 77 (5): 759-765.
2. Beall AE. Can a new smile make you look more intelligent and successful?. *Dent Clin N Am*, 2007; 51: 289-297.
3. Azer SS, Hague AN, Johnston WM. Effect of pH on tooth discoloration from food colorant in vitro. *J Dent*, 2010; 38 (2): 106-109.
4. Topcu FT, Sahinkesen G, Yamanel K, Erdemir U, Oktay EA, Ersahan S. Influence of different drinks on the colour stability of dental resin composites. *Eur J Dent Educ*, 2009; 3(1): 50-56.
5. Attin T, Manolakis A, Buchalla W, Hannig C. Influence of tea on intrinsic colour of previously bleached enamel. *J Oral Rehabil*, 2003; 30: 448-494.
6. Joiner A. The bleaching of teeth: A review of the literature. *J Dent*, 2006; 34: 412-419.
7. Sarret DC. Tooth whitening today. *J Am Dent Assoc*, 2002; 133: 1535-1538.
8. Briso AL, Fonseca MS, Almeida LC, Mauro SJ, Dos Santos PH. Color alteration in teeth subjected to different bleaching techniques, *Laser Phys*, 2010; 20 (12): 2066-2069.
9. Joiner A. Review of the effects of peroxide on enamel and dentine properties. *J Dent*, 2007; 35 (12): 889-896.
10. Kawamoto K, Tsujimoto Y. Effects of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching. *J Endodont*, 2004; 30 (1): 45-50.
11. Yixue K. Peroxide penetration into pulp chamber from carbamide peroxide. *J Endodont*, 2010, 30 (8): 464-465.
12. Wiegand A. Efficacy of different whitening modalities on bovine enamel and dentin. *Clin Oral Invest*, 2005; 9 (2): 91-97.
13. Ada Council on Scientific Affairs. Laser assisted bleaching: an update. *J Am Dent Assoc*, 1998; 129(10): 1484-1487.
14. Gaffar A, Fakhir-Smith S. Oral composition having accelerated tooth whitening effect. US patent 5, 648,064. 1997.
15. 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.
16. Viscio D, Gaffar A, Fakhir-Smith S, Xu T. Present and future technologies of tooth whitening. *Comp Cont Educ Dent*, 2000; 28: 36-43.
17. Neamtu M. Fe-exchanged Y zeolite as catalysts for wet peroxide oxidation of reactive azo dye Procion Marine H-EXL. *Appl Catal B-Environ*, 2004; 48 (4): 287-294.
18. Liou RM, Chen SH, Hung MY, Hsu CS, Lai JY. Fe (III) supported on resin as effective catalyst for the heterogeneous oxidation of phenol in aqueous solution. *Chemosphere* 2005; 59 (1): 117-125.
19. Herney-Ramirez J, Vicente MA, Madeira LM. Heterogeneous photo-Fenton oxidation with pillared clay-based catalysts for wastewater treatment: A review. *Appl Catal B-Environ*, 2010; 98: 10-26.

20. Navalon S, Alvaro M, Garcia H. Heterogeneous Fenton catalysts based on clays, silicas and zeolitas. *Appl Catal B-Environ*, 2010; 99: 1-26.
21. Hartmann M, Kullmanna S, Kellerb H. Wastewater treatment with heterogeneous Fenton-type catalysts based on porous materials. *J Mater Chem*, 2010; 20: 9002–9017.
22. Lee BS, Huang LC, Hong CY, Wang SG, Hsu WH, Yamauchi Y, Hsieh CJ, Lai JY, Wu KC. Synthesis of metal ion–histidine complex functionalized mesoporous silica nanocatalysts for enhanced light-free toothbleaching. *Acta Biomater*, 2011, 7 (5): 2276–2284.
23. Mohan N, Westland S, Bruton P, Ellwood R, Pretty LA, Luo W. A clinical study to evaluate the efficacy of a novel tray based tooth whitening system. *J Dent*, 2008; 36: 21-26.
24. Lee BS, Huang SH, Chiang YC, Chien YS, Mou CY, Lin CP. Development of in vitro tooth staining model and usage of catalysts to elevate the effectiveness of tooth bleaching, *Dent Mater*, 2008, 24(1):57-66.
25. Laat J, Gallard H. Catalytic Decomposition of Hydrogen Peroxide by Fe ( III ) in Homogeneous Aqueous Solution : Mechanism and Kinetic Modeling, *Environmental Science & Technology*, 1999, 33 (16): 2726-2732.
26. Mumpton FA. *Mineralogy and Geology of Natural Zeolites*. Washington: Souther Printing Company, 1977.
27. Burriel FM, Lucena CF. *Química Analítica Cualitativa*. Madrid: Paraninfo, 1992.
28. Luo W, Westland S, Bruton P, Ellwood R, Pretty LA, Mohan N. Comparison of the ability of different colour indices to assess changes in tooth whiteness. *J Dent*, 2007; 35: 109-116.
29. Jone AH, Diaz-Arnold AM, Vargas MA, Cobb DS. Colorimetric assessment of laser and home bleaching techniques. *J Mater Chem*, 1999; 11: 87-94.
30. Bulman JS, Osborn JF. *Statistics in dentistry*, London: British Dental Journal Books, 2002.
31. Addy M, Moran J. Mechanisms of stain formation on teeth, in particular associated with metal ions and antiseptics. *Adv Dent Res*, 1995; 9:450–6.
32. Watts A, Addy M. Tooth discolouration and staining: a review of the literature. *Brit Dent J*, 2001; 190:309–16.
33. Jhung SH, Lee JS, Yoon JW, Kim DP, Chang JS. Low-temperature adsorption of hydrogen on ion-exchanged Zeolites. *Int J Hydrogen Energ*, 2007, 32: 4233– 4237.
34. Chanagá-Quiroz T, Giraldo-Duarte S, Almanza-Pubiano L. Modification of the Zeolite-Matrix Ratio in FCC Catalysts and its Impact on Yields and Quality of Middle Distillates. *Ingenieria y Universidad* 2009; 13 (1): 9-26.
35. Gonzalez-Olmos R, Holzer F, Kopinke FD, Georgi A. Indications of the reactive species in a heterogeneous Fenton-like reaction using Fe-containing zeolites. *Appl Catal A-Gen*, 2011; 398: 44–53.
36. Laat J, H Gallard, Ancelin S, Legube B. Comparative study of the oxidation of antrazine and acetone by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV, Fe(III)/UV, Fe(III)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV and Fe(II) or Fe(III)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> . *Chemosphere*, 1999, 39 (15): 2693-2706.
37. Cwiklik L, Jagoda-Cwiklik B, Frankowicz M. Influence of spatial distribution of active centers on the kinetics of model heterogeneous catalytic processes. *Surf Sci*, 2004, 572: 318–328.

## Table Captions

**Table 1.** Comparison of Fe(II) against Fe(III) catalytic effect by the linear relationship  $\Delta E = f(t)$  for the different conditions employed.

## Figure Captions

**Figure 1.** Schematic representation of Y zeolite.

**Figure 2.** Comparison of  $\Delta E$  and  $\Delta L$  values vs time for a whitening experiment.

**Figure 3.** Staining process of bovine teeth vs time for successive applications.

**Figure 4.** Whitening kinetics using catalyst: a) Fe (III) and b) Fe (II) varying catalyst concentration (presented as  $\Delta E$  vs time for the different conditions assayed).

**Figure 5.** Comparisons of Fe(III) against Fe(II) catalyst effect at the different conditions assayed.

Table 1

	Fe (II)	Fe (III)
Reference	$y = 0.7638x + 2.433$	$y = 0.9139x + 1.750$
Blank	$y = 0.6753x + 1.971$	$y = 1.0155x + 2.710$
1.9 mM	$y = 0.6082x + 1.610$	$y = 1.1944x + 2.539$
3.8 mM	$y = 1.2404x + 0.994$	$y = 1.4527x + 1.762$
5.7 mM	$y = 0.4922x + 2.760$	$y = 1.3372x + 2.779$
7.6 mM	$y = 0.9642x + 2.316$	$y = 1.5641x + 2.203$

Figure 1

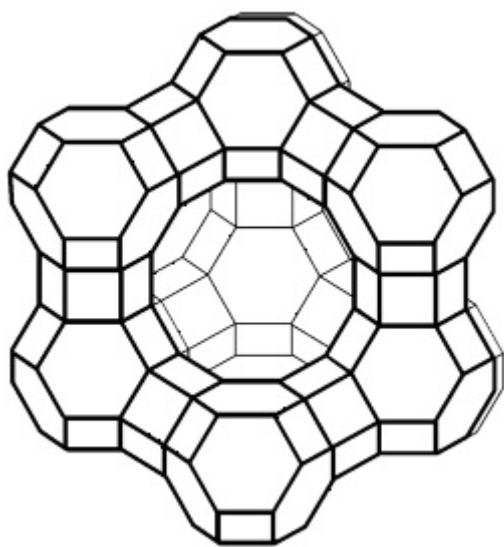


Figure 2

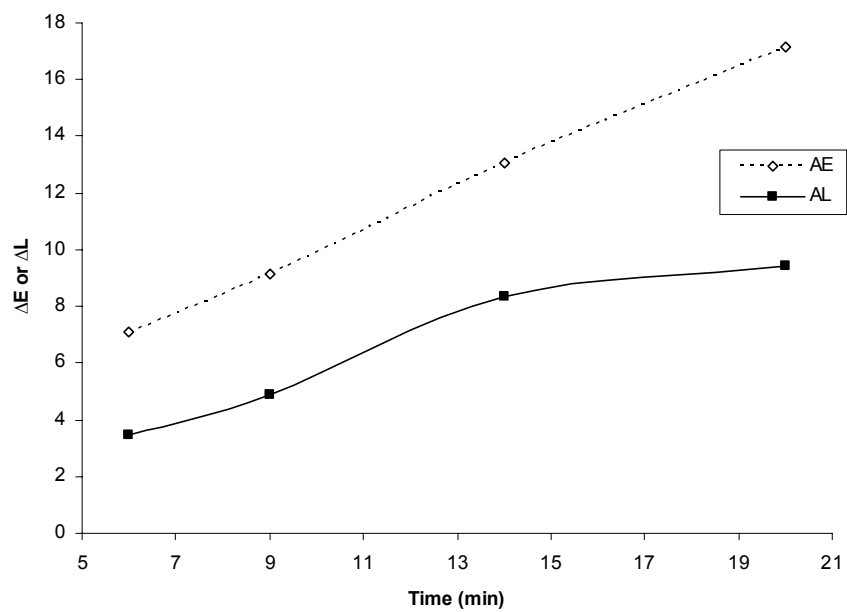


Figure 3

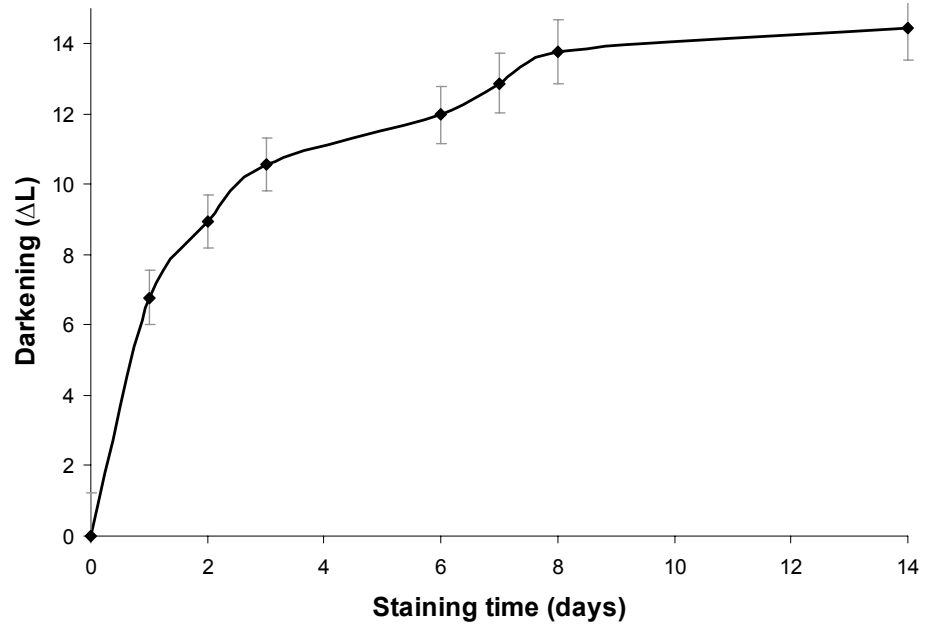


Figure 4

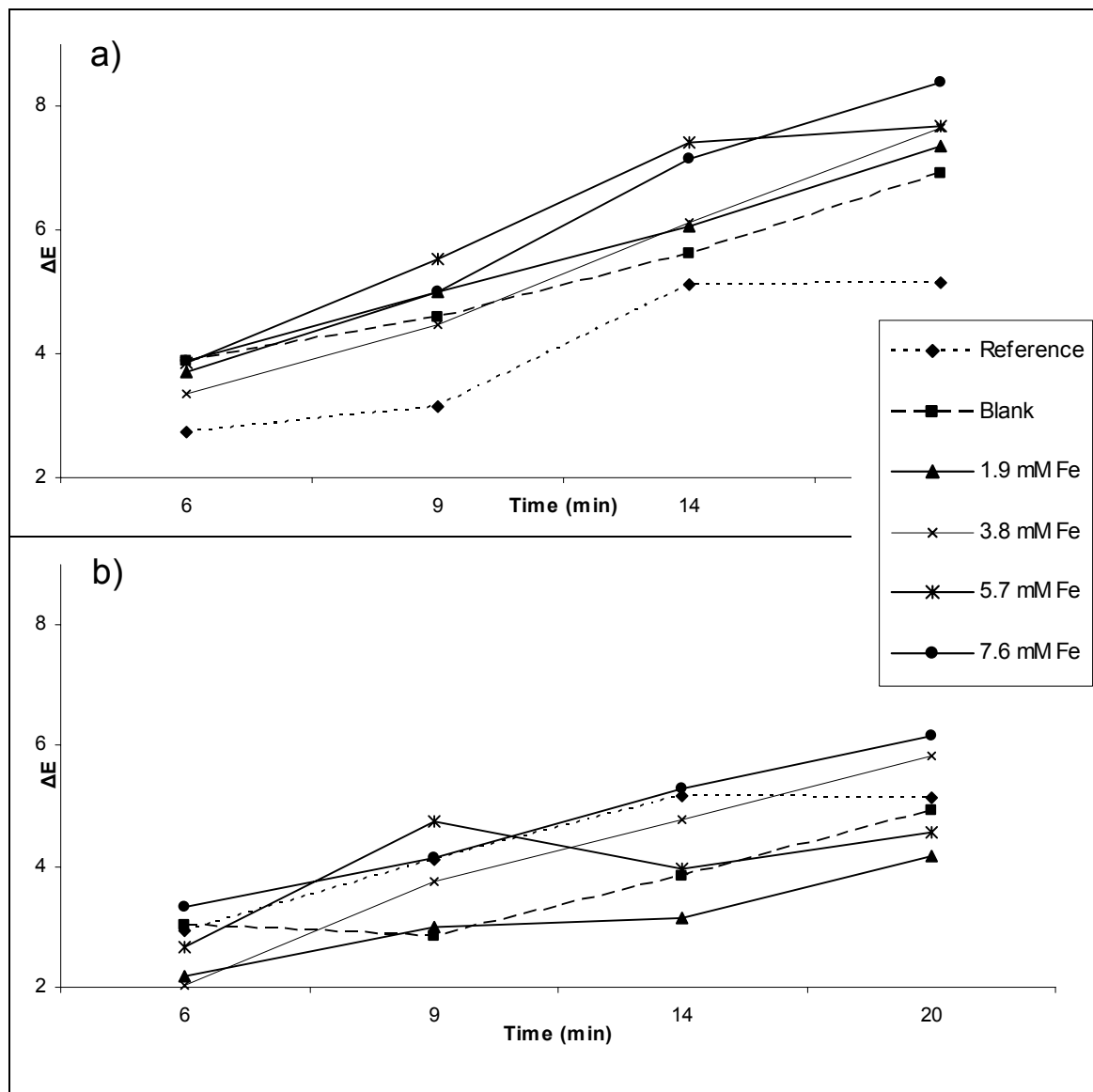
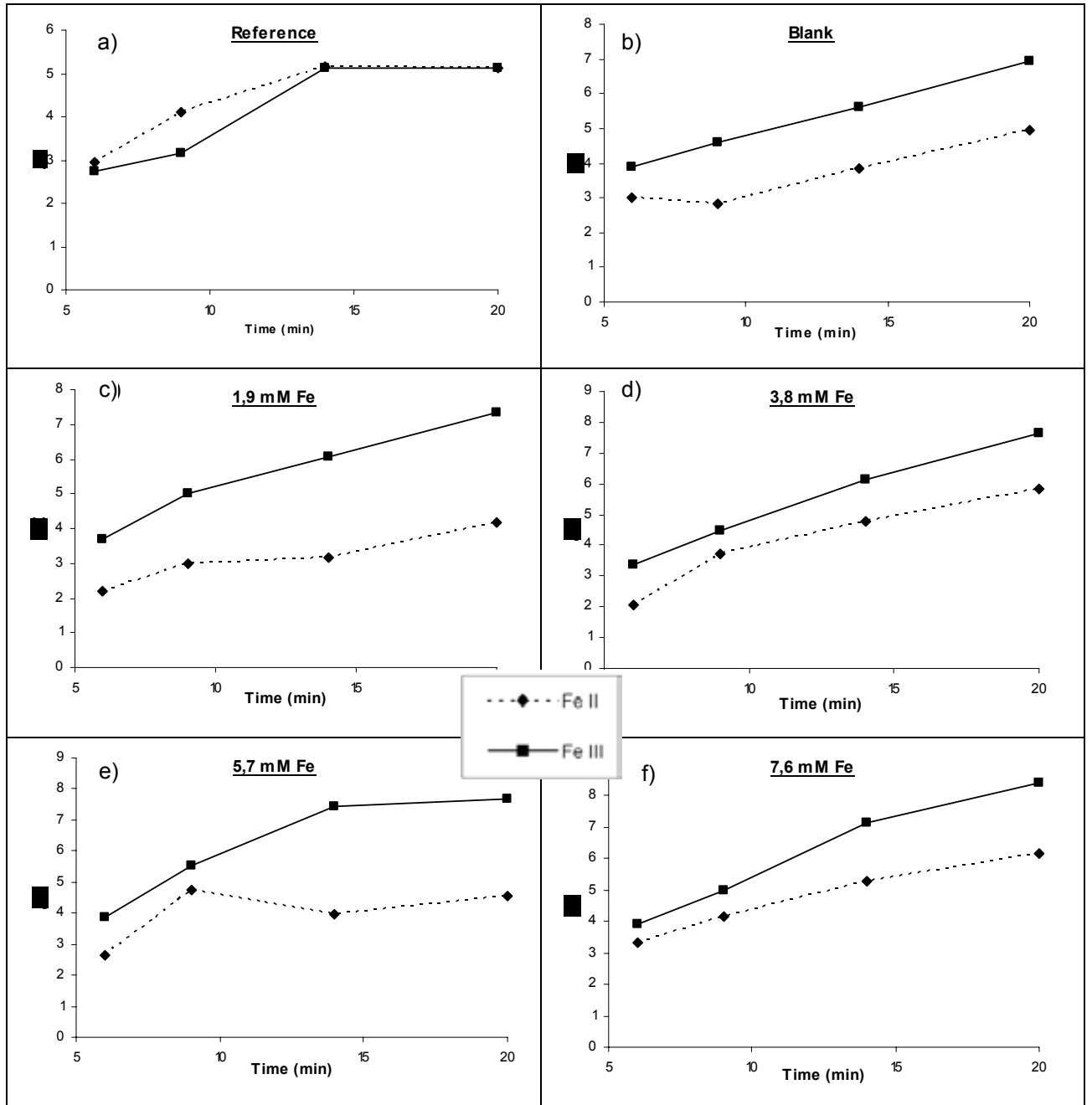


Figure 5





---

## **Annexo II:**

Advanced Remineralization Processes of Human Dental Tissues. Spectroscopic Characterization Using Synchrotron-based Fourier-Transform Infrared and Raman Microspectroscopy

---

**Advanced Remineralization Processes of Human Dental Tissues.  
Spectroscopic Characterization Using Synchrotron-based  
Fourier-Transform Infrared and Raman Microspectroscopy**

Ortiz-Alfás P<sup>1</sup>, Blanco F<sup>1</sup>, Ellis G<sup>2</sup>, Dumas P<sup>3</sup>, Valiente M<sup>1</sup>

1 Universitat Autònoma de Barcelona, Dept. of Chemistry, Centre GTS, Campus de la UAB, Edifici CN. 08193 Bellaterra (Barcelona), Spain

2 Institute of Polymer Science & Technology, ICTP – CSIC, c/ Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain.

3 SOLEIL Synchrotron, L'orme des Merisiers, BP48, F-91191 Gif-sur-Yvette cedex, France.

\* Corresponding author at: Centre Grup de Tecniques de Separació en Química, Edifici CN, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Barcelona), Spain, Tel.: +34 93 581 29 03. Fax.: +34 581 23 79 E-mail address: Manuel.Valiente@uab.cat.

# **Advanced Remineralization Processes of Human Dental Tissues. Spectroscopic Characterization Using Synchrotron-based Fourier-Transform Infrared and Raman Microspectroscopy**

Ortiz-Alfás P<sup>1</sup>, Blanco F<sup>1</sup>, Ellis G<sup>2</sup>, Dumas P<sup>3</sup>, Valiente M<sup>1</sup>

1 Universitat Autònoma de Barcelona, Dept. of Chemistry, Centre GTS, Campus de la UAB, Edifici CN. 08193 Bellaterra (Barcelona), Spain

2 Institute of Polymer Science & Technology, ICTP – CSIC, c/ Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain.

3 SOLEIL Synchrotron, L'orme des Merisiers, BP48, F-91191 Gif-sur-Yvette cedex, France.

## **Abstract**

Newly developed ion exchange resins and mesoporous silica nanoparticles containing a fluoride ion act as novel anti-caries products when they come into contact with the tooth surface, producing new apatite layers. Raman and reflection-mode synchrotron IR microscopy techniques reveal differences in morphology and composition between treated and reference samples. The P-O stretching region between 900 – 1200 cm<sup>-1</sup> presents a doublet in the IR spectrum where clear intensity variations between pure hydroxyapatite (HA) and fluorapatite (FA) spectra can be identified. On the contrary to the internal enamel layers, the external region presents strong similarities with the reference FA spectra. In addition, a characteristic Raman shift for FA was observed in the external layer of treated samples enamel. Furthermore, the presence of amelogenin during the new enamel formation process induces and controls the crystallization of apatite. The use of SEM technique allowed a better assessment of the apatites created in the tooth surface and has enabled the observation of a new HA layer with ribbon-like crystal formation in treated samples.

Keywords: Raman spectroscopy, FTIR spectroscopy, Amelogenin, Hydroxyapatite, Fluorapatite, Synchrotron radiation

## **Introduction**

The most widespread disease affecting teeth is due to dental caries and its consequences. Despite the general use of home care strategies such as fluoride toothpaste, dental caries is still considered as the most common oral disease in developed countries [1]. Because of its high mineral content (~97%; apatite) and low amount of organic matrix (~3%; protein) human dental enamel can be considered as a biogenic ceramic with a high microscopic and nanoscopic architectural organization [2]. Hydroxyapatite (HA), as the main component of tooth enamel, undergoes a continuous cyclic demineralization and remineralization process, and in an acidic environment the demineralization process dominates and the first steps of caries emerge [3]. It

is known that the administration of fluoride ions helps to prevent the cariogenic demineralization to a large extent [4]. In this respect, the formation of fluoroapatite (FA) is the goal, either by the substitution of hydroxyl groups from HA by fluoride ions or by the new formation of FA in the tissue structure, thus providing higher mechanical strength and acid resistance [5]. Most of the fluoride release systems developed thus far are inefficient for this purpose since the release mechanism is not appropriate to generate FA [6]. In this sense, new controlled release formulations based on ion exchange resins loaded with calcium, fluoride and phosphate ions have been developed [7,8,9]. The total amount of caries-inhibiting ions available depends upon the resin capacity and the rate of the discharge. The optimum conditions are provided by a system which achieves a deposition effect with gradual discharge of the ions onto the tooth surface forming the desired fluoride compounds [8].

Biological control over mineral formation through protein recognition is of capital importance for biomineralization processes such as dental remineralization [10]. Many studies on dental proteins demonstrate the key role of proteins in the control of nucleation, orientation, polymorphism and morphology of the mineral phase providing highly organized hierarchical microstructures with high strength and anti-abrasive properties [11,12]. The extracellular matrix of the developing enamel comprises two major classes of protein: the hydrophobic amelogenins and the acidic enamelin. Supramolecular assembly of several units of amelogenin into nanospheres has been recognized as a key factor in controlling the oriented and elongated growth of enamel apatite crystals in matrix-mediated mineralization [13,14,15,16].

A large number of methods based on different techniques have been suggested to evaluate tooth material composition, such as microradiography, microhardness, luminescence [17,18]. Although these techniques are useful for estimating the mineral content, they cannot reveal the spatial position and/or concentration in dental tissues. Due to a very similar atomic structure and the same space symmetry group, the clear identification of FA and HA using spectroscopic techniques is difficult. Since  $F^-$  is smaller than  $OH^-$ , 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 versus hydroxyapatite [19,20]. Moreover, this substitution cause an increase in crystal size by virtue of better packing of the crystal lattice causing a variation in the intensity of phosphate bands. Vibrational spectroscopic methods have been widely used for measuring phosphate and hydroxide vibrations, which are very sensitive to substitution within the apatite lattice [21], and FT-Raman spectra are used to provide evidence for the identity of the apatite. Furthermore, fluoride substitution in HA causes a strong variation in the  $\nu_3$  phosphate modes [22]. FTIR spectra can provide concise information on the fluoride content from dental samples [23, 24, 25, 26]. Synchrotron IR microspectroscopy is emerging as a powerful technique that combines the high brightness of the synchrotron source (that yields a better signal to noise ratio, compared to the traditional globar sources) together with high spatial resolution for even the smallest biological targets [27]. These two unique features allow the

characterization of the structure and morphology of dental tissues and the collection of spectral maps in specific regions of the tooth [28].

The aim of this work is focused on the understanding of the behavior of a new dental remineralization agent and the effect of low protein levels on the formation of new mineral structure using Raman, synchrotron IR microspectroscopy and SEM to evaluate the remineralization results.

## Methods and Materials

The methodology applied has followed a procedure including sample preparation, spectroscopic observations and analysis of the data obtained:

### Sample preparation

#### *1. Tooth preparation and biomimetic coating application*

For dental profile studies, 15 recently extracted human caries-free molars were selected and sectioned in 4 pieces using a diamond saw (Southbay Technology Inc., USA). Each tooth fraction was treated following a different procedure for subsequent comparison: reference, etching and NMTD treatment with and without protein. The specimens prepared were stored in 0.5% chloramine-T (Panreac, Spain). Previous to the remineralization process, the surface was slightly etched with 37% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Panreac, Spain) for 30 seconds to dissolve the first apatite layer, thus obtaining the enamel surface as an early stage caries model. The coating was prepared by application on the tooth surface of a mixing paste of unknown weight NMTD with some drops of artificial saliva with electrolyte capacity with and without amelogenin (4,5M KCl and 2,3M NaCl, 100µg/ml amelogenin) [29]. The treatment was continued for 4 days at room temperature with the addition of artificial saliva every 12 hours and daily NMTD renewal. The NMTD material was removed by rinsing the teeth with MilliQ water. Subsequently, each tooth fragment was sliced using polishing equipment with different weights to obtain a width of 30-35 µm. The support used for the samples was an epoxy resin, serving for both polishing and also for performing the measurements at the synchrotron facility.

#### *2. Amelogenin preparation*

Purified recombinant porcine amelogenin full-length rP172 was prepared as described previously [30]. The rP172 protein consists of 172 amino acids and is an analogue to the full-length native porcine P173, but lacking the N-terminal methionine and a phosphate group Ser16. The proteins were expressed in Escherichia coli strain BL21-codon plus and purified by ammonium sulfate precipitation, and reverse-phase high performance liquid chromatography (Waters Alliance, USA, Grace fenil, 250\*4 mm, 5µm, Vydac C18, 250\*4.6mm, 5µm).

### Spectroscopic Measurements

Spectroscopic measurements were performed on the SMIS beamline at SOLEIL Synchrotron, France, (proposal numbers 20101061 and 20100419).

### *3. Fourier transforms infra-red spectroscopy measurements*

A Thermo Scientific Nicolet iN10 FT-IR Microscope was used to scan the whole surface of the tooth, working at a lower spatial resolution allowing a greater scan speed. Spectra were recorded in the reflection mode at spectral resolution of  $16\text{ cm}^{-1}$  in the range between  $4000\text{--}650\text{ cm}^{-1}$  after recording a background from Au. To examine specific areas of the tooth, synchrotron infrared microscopy was performed at the SMIS beamline (SOLEIL, France). This beamline is equipped with a Continuum IR microscope (Thermo Nicolet, USA) coupled to a NEXUS FTIR spectrometer bench Nicolet 5700 (Thermo Nicolet, USA) and a liquid nitrogen cooled mercury cadmium telluride (MCT-A) detector. The microscope was equipped with a computer-controlled x/y stage allowing acquisition of profiles or maps of the sample. In the present study, spectra were collected in reflection mode, at  $8\text{ cm}^{-1}$  spectral resolution over the range between  $4000\text{--}650\text{ cm}^{-1}$  using AtPlus software (Thermo Nicolet Instruments), and for each spectrum, a minimum of 200 scans was accumulated. The raw data was transformed into absorbance values format. Spectra with synchrotron radiation were collected from the dentine and in three parts of the enamel: external, medium and deep, from  $300 \times 100\text{ }\mu\text{m}^2$  areas of the teeth. The background was defined by combining 500 scans from Au. Data acquisition and processing were performed using Nicolet Omnic software (Version 8.0, Thermo-Nicolet).

### *4. Raman spectroscopy measurements*

Raman spectroscopy was used for ensuring the presence of fluoroapatite in treated samples, and their comparison with references. For this purpose, a Thermo Scientific DXR Raman Microscope (Thermo Scientific, USA) equipped with an excitation laser at  $532\text{ nm}$  was used. The samples were analyzed over the range  $3500\text{--}50\text{ cm}^{-1}$  collecting spectra from  $2 \times 2\text{ }\mu\text{m}^2$  areas on the sample using a  $50\times - 0,75\text{ NA}$  objective with a  $50\text{ }\mu\text{m}$  pinhole.

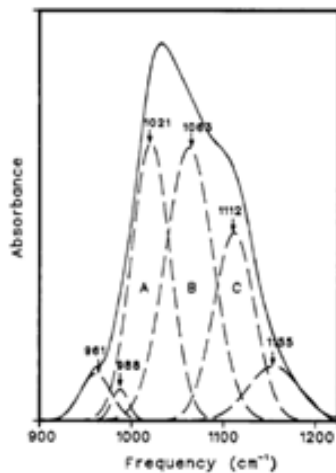
## Results and discussion

The analysis of teeth samples using Raman and synchrotron IR microspectroscopy in reflection mode have shown interesting and promising differences in morphology and composition between treated and reference teeth samples. The results have been expressed in terms of spectral evidences. In this respect, specific spectral regions were considered to be representative of the observed effects, basically those regions depending on phosphate and hydroxide group vibrations.

**Regions of Interest (ROI) selection.** In order to locate the areas of major interest, complete tooth samples were scanned using Thermo Scientific Nicolet iN10 FT-IR Microscope due the greater scan speed. The spectral region from  $900\text{ to }1200\text{ cm}^{-1}$  corresponds to phosphate symmetric and antisymmetric stretching vibrations ( $\nu_1$  and  $\nu_3$  respectively) showing a double band in the IR spectrum [31]. Figure 1a shows the intensity map representing the area under the IR peak at  $1094\text{ cm}^{-1}$  and Figure 1b the area at  $1061\text{ cm}^{-1}$ . A thin red layer of maximum intensity at the  $1094\text{ cm}^{-1}$  (Figure 1b) of the enamel is observed at the external surface. In

contrast, the relative intensity map reveals homogeneous  $1061\text{ cm}^{-1}$  signal distribution throughout both enamel and dentine areas (Figure 1b). The green region inside the tooth corresponds to the pulp and has clearly different spectra.

As reported in bibliography the changes in the spectral region of phosphate stretch are correlated with the size (c unit cell dimension) and the dimension of the crystals [32]. Pleshko N et al explain the  $900\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$  region as a multiple bands arising from both the phosphate vibration  $\nu_1$  and  $\nu_3$  modes. In this paper is resolved into three modes when the degeneracy is lifted. Component B corresponding to the shoulder centered near  $1090\text{ cm}^{-1}$  is largest for the apatite mineral of smallest crystal size, this increase arises from a disordered phosphate not located in the crystalline environment. It is probable that this component, together with component C centered near  $1105\text{ cm}^{-1}$  represent two elements of the  $\nu_3$  mode, whose degeneracy is lifted by the local symmetry of the HA crystal lattice.



External areas where the FA intensity was observed to be higher were further analyzed by means of both Raman and synchrotron IR microscopy. Taking into account these observations, three different depth sites of the enamel, identified as internal, intermediate and external were analyzed as selected ROIs. As shown in Figure 3, the mapping was performed over an area of  $300 \times 100\ \mu\text{m}^2$ . Areas selected were used for depth analysis distant between them by a few micrometers starting in the outer enamel to deep enamel and before reaching dentine.

On the other hand, as shown in Figure 2b IR spectra demonstrated the presence of protein amide I band at  $1660\text{ cm}^{-1}$  and phosphate mineral on the dentine but not in the enamel region [29]. The mapping image in Figure 2 represents the distribution of protein in treated human teeth. As it can be appreciated, the protein is predominantly an important part of the dentine. In addition, no protein band is observed in the external enamel layer in treated samples with amelogenin. As a consequence, it can be assumed that no incorporation of protein in the enamel occurs during the treatment with NMTD containing amelogenin.

**FA and HA distribution in tooth enamel.** The clear presence of FA in the outer region of the enamel reveals a good remineralization and fluoridation processes, due to the remineralization agent NMTD both in presence and in absence of amelogenin (Figure 1a). The high intensity

pixels for FA signal observed at the inner enamel near to dentine area is a result of the FA diffusion process through the enamel ducts [33]. Due to the different composition of the dentine, this flow of FA into dentine medium is stopped, so the FA is accumulated until this interface point. The inexistence of FA in medium enamel is because of the sealing of the external ducts with the new FA layer formed.

Figure 4 shows three IR spectra recorded at different depths of the tooth, recorded using the synchrotron source, for their comparison with pure HA and FA references. The ratio of intensities of the two peaks overlapped around  $1100\text{ cm}^{-1}$  is modified because of the variation in the concentration of FA. Indeed, the external enamel shows a peak around  $1120\text{ cm}^{-1}$ , clearly correlated to the FA reference spectrum. These strong similarities suggest a new remineralization layer might have been formed. Besides, the intermediate and internal dentine regions show similarities amongst themselves and with HA. This evidence appears to confirm that the remineralization process occurs only on the enamel surface and depends directly on the treatment applied.

As already mentioned, the transformation from HA into FA causes a unit cell contraction which can be followed by monitoring the changes in the frequency of the vibrational modes of the phosphate units, which are Raman active. Reference spectra of HA and FA were acquired, as illustrated in Figure 5. The most notable difference in the Raman spectrum is the blueshift of the  $\nu_1$  band corresponding to the main peak, which is associated to the volume reduction of the unit cell, and is approximately  $3\text{ cm}^{-1}$  (HA:  $961\text{ cm}^{-1}$  and FA:  $964\text{ cm}^{-1}$ ), which closely fits the theoretically calculated value of  $4\text{ cm}^{-1}$  [34]. As occurring with IR data, a Raman shift is observed for the FA peak in the external layer of the enamel (Figure 5). Hence, the Raman spectra confirm the same positive results for the expected remineralization process.

**Effect of amelogenin on the remineralization process.** Figure 6 shows the phosphate IR signal of an amelogenin treated tooth (Figure 6a) and a tooth treated only with the remineralization system (Figure 6b). No significant differences were observed between both teeth samples, and the spectra from external enamels are clearly similar to the reference FA signals, and the intermediate and internal enamels show HA band profiles. According to these results, no amelogenin is necessary for the formation of a new FA remineralization layer.

Nonetheless, the oriented supramolecular assembly of the extracellular macromolecules that is only achieved by the interaction with amelogenin is a crucial step, although impossible to observe in the IR spectra. SEM images of the enamel surface may reveal the controlled, oriented and elongated growth of the carbonate-containing fluoridated hydroxyapatite crystals within enamel prisms [29]. The SEM image of the enamel surface following acid etching is presented in Figure 7a. Enamel crystals at the surface were discontinuous and broken resembling early enamel caries. As it can be appreciated in Figure 7b and 7c, a calcium phosphate coating, identified as FA by IR and Raman spectra, was formed on the surface of the tooth. As shown in Figure 7c, the crystals were needle-like fluoridated hydroxyapatite, due to the effect of the protein on the crystallization mechanism. Interestingly, the packing density of



the needle-like crystal coating increased dramatically with the presence of protein, compared with Figure 7b.

## Conclusion

High spatial resolution IR and Raman microspectroscopy has provided clear evidence of the distribution of fluorapatite in teeth after applying a remineralization treatment, showing high FA concentration in a thin layer on the surface of the enamel, and penetration to the dentine interface through the enamel ducts, before these were sealed by remineralization. The spectroscopic evidence did not show any difference in treatments with or without protein, however SEM evidence showed that a coating with the highest mineral packing density was obtained in the presence of amelogenine.

We are grateful to Dr. Christophe Sandt for assistance and to the SOLEIL staff for smoothly running the facility.

## Bibliografia

- [1] Petersen PE. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century. The approach of the WHO Global Oral Health Program. *Community Dent Oral.* 2003, 31: 3-24.
- [2] Robinson C, Connell S, Kirkham J, et. al. Dental enamel- a biological ceramic: regular substructures in enamel hydroxyapatite crystals revealed by atomic force microscopy. *J Mater Chem.* 2004, 14: 2242-2248.
- [3] Caufield, PW, Griffen, AL. Dental caries: An infectious and transmissible disease. *Pediatr Clin N Am*, 2000, 47: 1001–1019.
- [4] Featherstone JDB. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dent Oral.* 1999; 27: 31-40.
- [5] Legeros RZ, Legeros P. An introduction to Bioceramics. In: Hench LL, Wilson J, (ed). Singapore: World Scientific, 1993.
- [6] Fejerskov O, Kidd E, Edwina AM. Dental caries: the disease and its clinical management. New York: Blackwell Munksgaard, 304.
- [7] Urusov KH, Nikitina TV, Pakhomov GN. Periodontitis Stomatological Treatment. US Patent 825074, 1981.
- [8] Naumann G, Pieper G, Rehberg HJ. Dental Composition and appliances containing anti-cariogenic ion exchange resins. US Patent 3978206, 1976.
- [9] Valiente M. Remineralizing Material for Organomineral Tissues. US Patent 6413498, 2002.
- [10] Seeman NC, Belcher AM. Emulating biology: Building nanostructures from the bottom up. *Proc Natl Acad Sci.* 2002, 99: 6452-6455.
- [11] Rachel EG, Yamakoshi Y, Wood EJ, et. al. The effect of the amelogenin fraction of enamel matrix proteins on fibroblast-mediated collagen matrix reorganization, *Biomaterials.* 2006, 27: 2926–2933.

- [12] Boyde A. Microstructure of enamel. In: Chadwick DJ, Cardew G, (ed). Dental enamel: Ciba foundation symposium 205. New York: John Wiley & Sons; 1997: 18–31.
- [13] Moradian-Oldak J, Du C, Falini G. On the formation of amelogenin microribbons. *Eur J Oral Sci.* 2006, 114 (1): 289-382.
- [14] Veis A. In Biomineralization, Reviews in Mineralogy and Geochemistry. In: Dove PM, De Yoreo JJ, Weiner S, (ed). Washington: The Mineralogical Society of America 2003 (54): 249.
- [15] Moradian-Oldak J, Tan J, Fincham AG. Interaction of amelogenin with hydroxyapatite crystals: an adherence effect through amelogenin molecular self-association. *Biopolymers.* 1998, 46: 225-238.
- [16] Aichmayer B, Margolis HC, Rigel R, et. al. The onset of amelogenin nanosphere aggregation studied by small-angle X-ray scattering and dynamic light scattering.. *J Struct Biol.* 2005, 151: 239-249.
- [17] Kielbassa AM, Wrbas KT, Schulte-Monting J, et. al. Correlation of transversal microradiography and microhardness on in situ-induced demineralization in irradiated and non irradiated human dental enamel. *Arch Oral Biol.* 1999, 44(3): 243-251.
- [18] Nyvad B, Cate JM, Fejerskov O. Microradiography of experimental root surface caries in man. *Caries Res.* 1989, 23 (4): 218-224.
- [19] Wei M, Evans JH, Bostrom T, et. al. Synthesis and characterization of hydroxyapatite, fluoride-substituted hydroxyapatite and fluorapatite, *J Mater Sci: Mater Med.* 2003, 14: 311–320.
- [20] Kārlis A., Gross LM. Rodriguez-Lorenzo M. Sintered hydroxyfluorapatites. Part II: Mechanical properties of solid solutions determined by microindentation. *Biomaterials*, 2004, 25 (7): 1385-1394.
- [21] Elliot JC. Studies in Inorganic Chemistry, Amsterdam: Elsevier, 1994.
- [22] Penel G, Leory G, Rey C, et. al. Infrared and Raman microspectrometry study of fluor-fluor-hydroxy and hydroxy-apatite powders. *J Mater Sci Mater M.* 1997, 8: 271-276.
- [23]. Tesch W, Eidelman N, Roschger P, et. al. Graded Microstructure and Mechanical Properties of Human Crown Dentin. *Calcif Tissue Int.* 2001, 69: 147-157.
- [24]. Magne D, Bluteau G, Lopez-Cazaux S, et. al. Development of an odontoblast in vitro model to study dentin mineralization. *J Connect Tissue Res.* 2004, 45 (2): 101-108.
- [25] Freund F, Knobel RM, J. Distribution of fluorine in hydroxy-apatite studied by infrared spectroscopy. *J Chem Soc.* 1977, 12: 1136-1138.
- [26] Baumer A, Ganteaume M, Klee WE. Determination of OH ions in hydroxyfluorapatites by infrared spectroscopy. *Bull Miner.* 1985, 108: 145-152.
- [27] Dumas P, Sockalingum GD, Sulé-Suso J. Adding synchrotron radiation to infrared microspectroscopy: what's new in biomedical applications?. *J TRENDS Biotechnol.* 2007, 25 (1): 40-44.
- [28] Low IM, Duraman N, Mahmood U. Mapping the structure, composition and mechanical properties of human teeth, *Mater Sci Eng*, 2008, 28: 243–247.
- [29] Fan Y, Sun Z, Moradian-Oldak J. Controlled remineralization of enamel in the presence of amelogenin and fluoride. *Biomaterials.* 2009, 30: 478–483.
- [30] Simmer JP, Lau EC, Hu CC, et. al. Isolation and Characterization of a Mouse Amelogenin Expressed in Escherichia coli, *Calcif Tissue.* 1994, 54: 312- 319.

[31] Penel G, Leroy G, Rey C, et. al. Infrared and Raman microspectrometry study of fluor-fluor-hydroxy and hydroxyl-apatite powders. *J Mater Sci Mater M*. 1997, 8: 271-276.

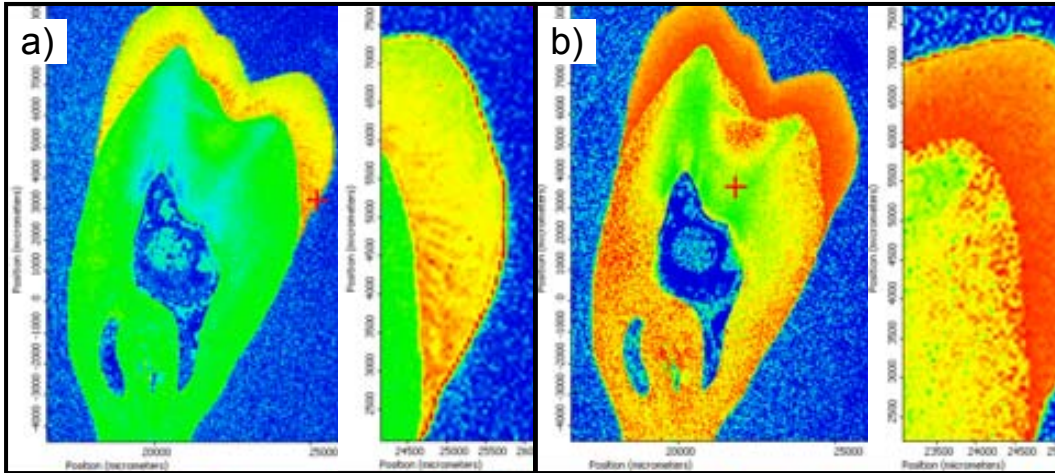
[32] Pleshko N, Boskey A, Mendelsohn R. Novel infrared spectroscopic method for the determination of crystallinity of hydroxyapatite minerals. *Biophys J*. 1991, 60(4):786-93.

[33] Takahashi M, Zheng J, Mori K, et. al. Histological structures and acidic etching sensitivities of the enamels at the occlusal pit parts in the deciduous and permanent teeth. *Mater Sci Eng*, 2006, 26: 703– 706.

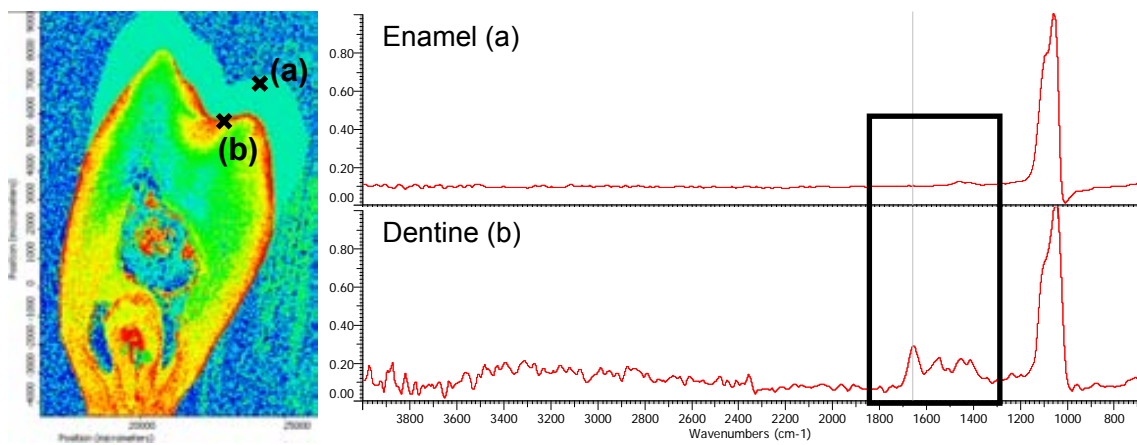
[33] Campillo M, Lacharaise P, Torrado A, et. al. Calcium speciation on dental enamel by Raman scattering to assess effective teeth fluoridation. *In press*.

## Figures

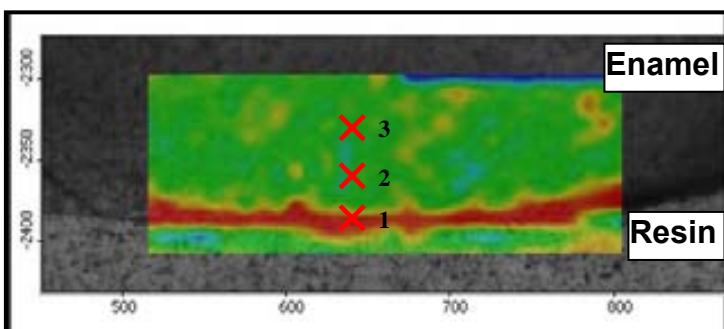
**Fig. 1.** Intensity maps representing the areas under the IR peaks at: a)  $1094\text{ cm}^{-1}$  (FA) and b) at  $1061\text{ cm}^{-1}$  (HA).



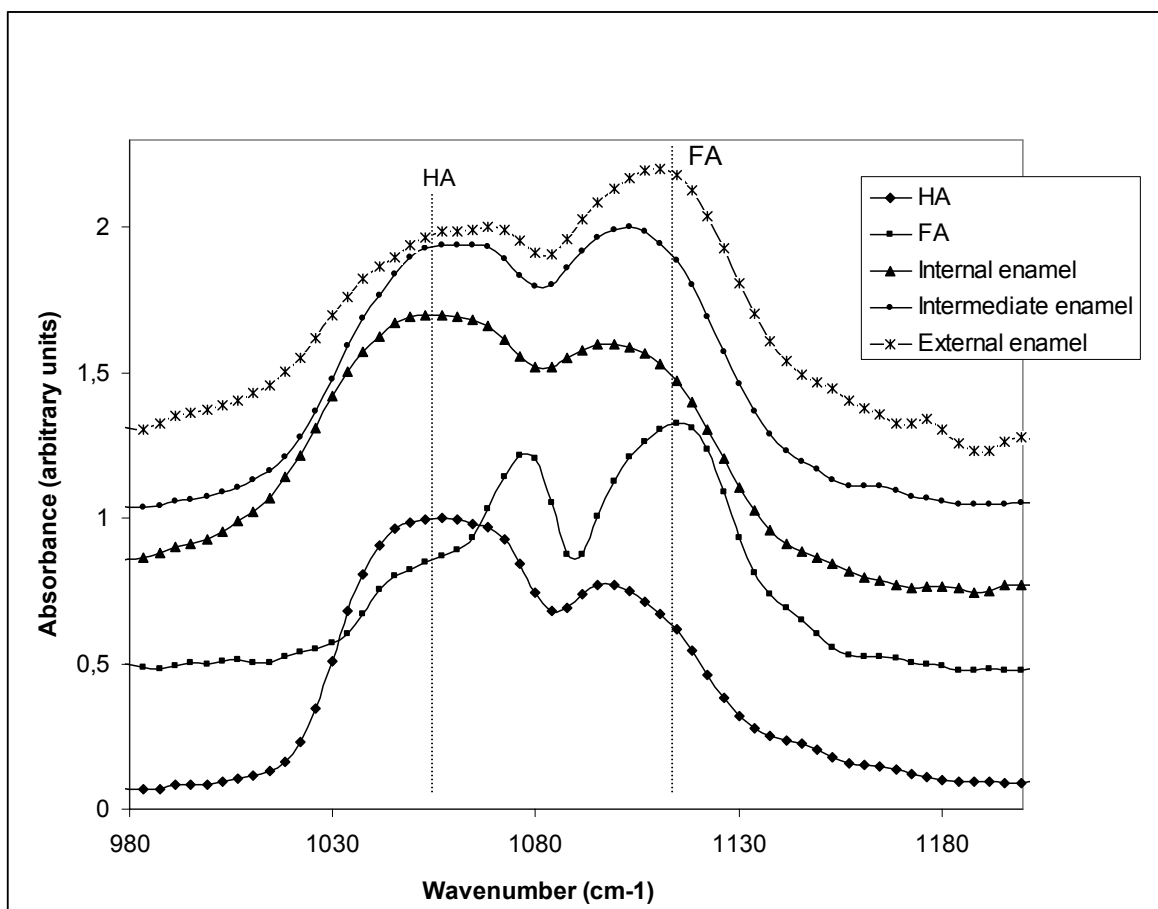
**Fig. 2.** Intensity map representing the area under the IR peaks at  $1660\text{ cm}^{-1}$ , FT-IR for enamel (a) and dentine (b).



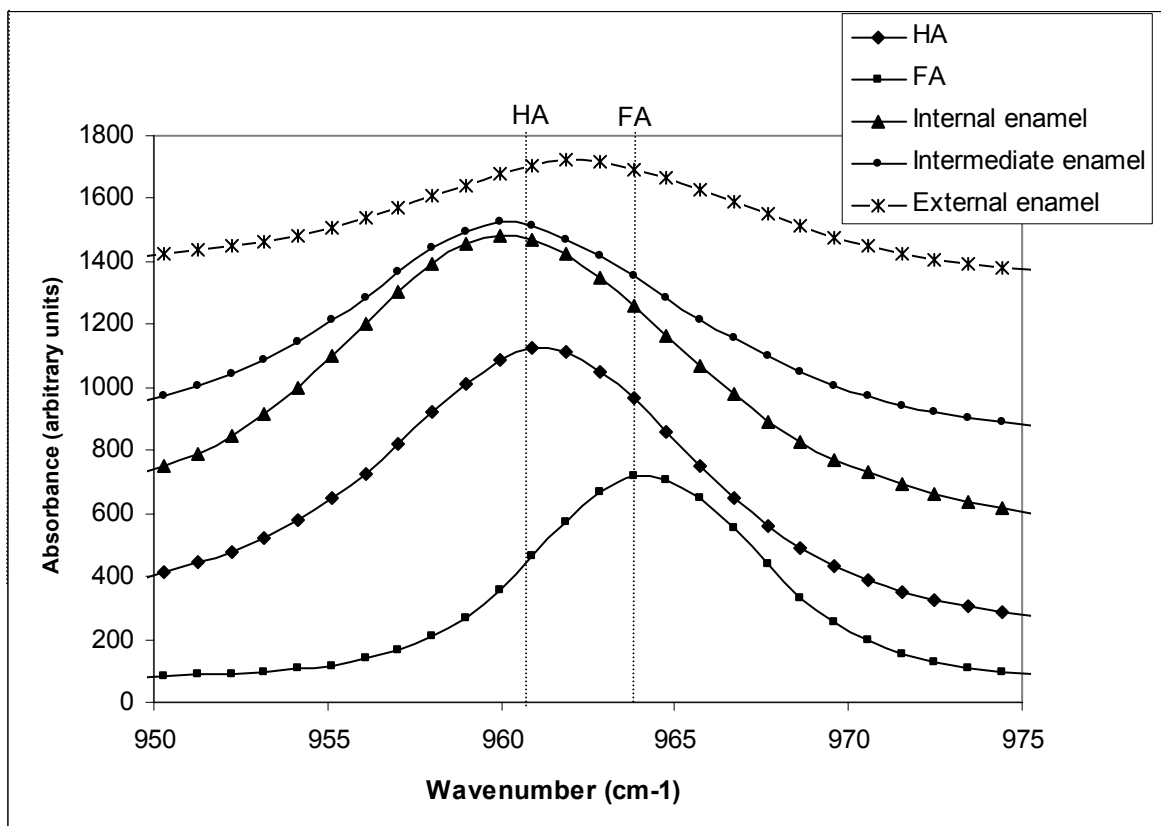
**Fig. 3.** Measured points in a ROI corresponding to 1) External enamel, 2) Intermediate enamel and 3) Internal enamel.



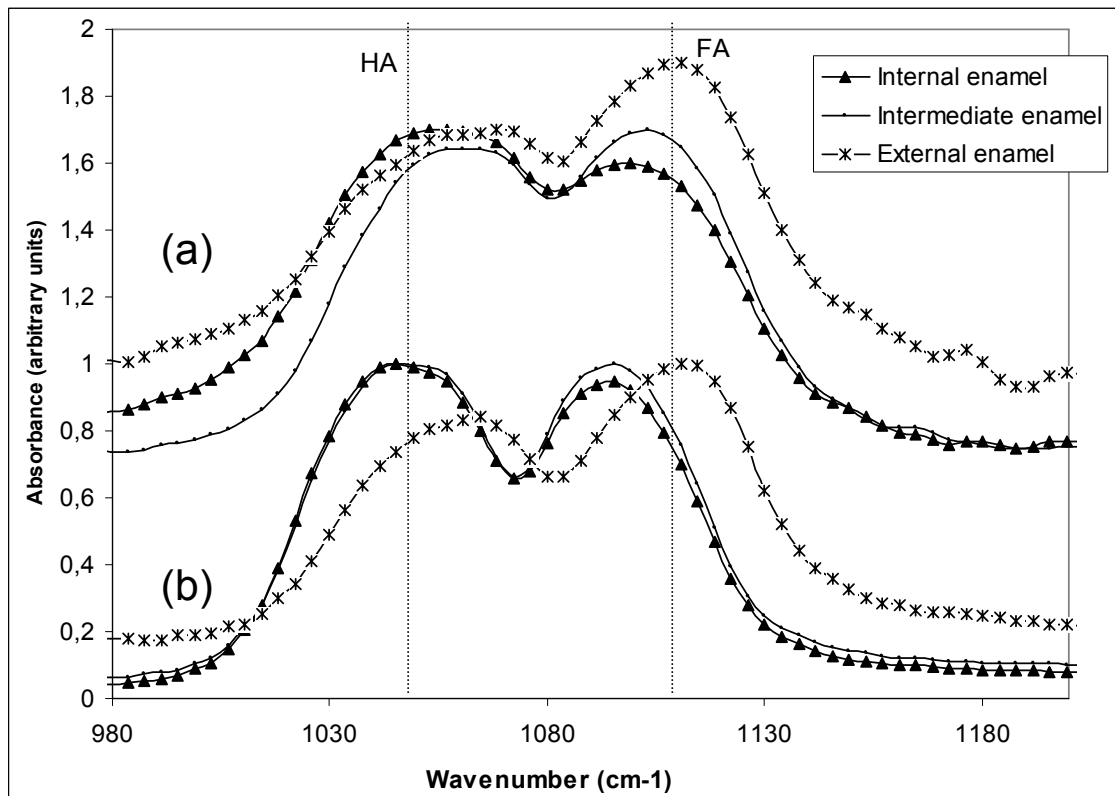
**Fig. 4.** Phosphate IR signal of FA (1094  $\text{cm}^{-1}$ ) and HA (1061 $\text{cm}^{-1}$ ) on enamel treated with protein in different depths of tooth.



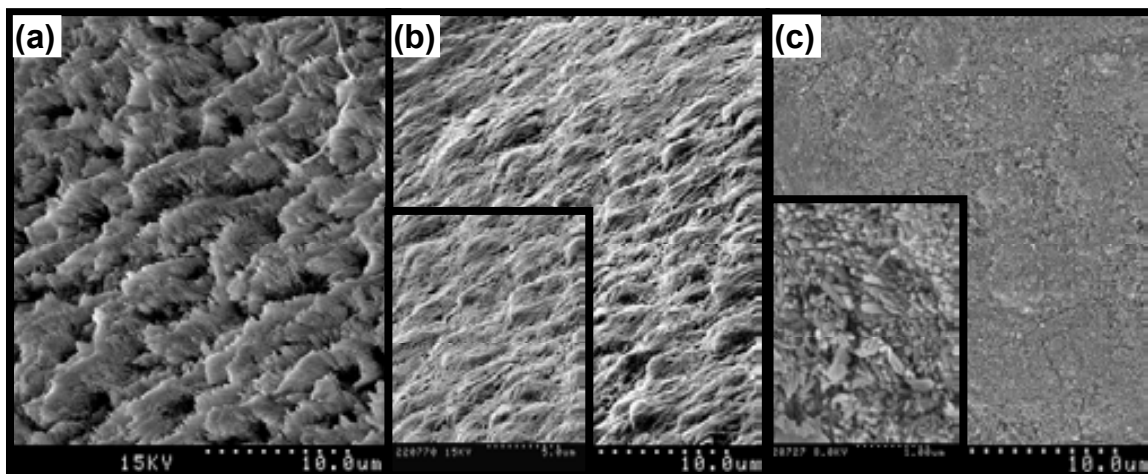
**Fig. 5.** Raman shift spectra of dental sample in different depths of treated tooth.



**Fig. 6.** Phosphate IR signal comparison between enamel treated with (a) and without (b) amelogenin.



**Fig. 7.** SEM images of enamel (a) after acidic etching, (b) after the treatment and (c) treatment with amelogenin.







Los estudios que se presentan en esta Tesis Doctoral se encuentran focalizados en la mejora de las propiedades de materiales dentales y su caracterización mediante técnicas que permitan su evaluación.

La Tesis consta de tres bloques de estudios concretos: blanqueamiento dental, remineralización y efecto antitártar. En el primero de ellos, se modifica un producto blanqueador comercial con un sistema de catálisis heterogénea consistente en zeolita cargada con iones de hierro. En segundo lugar, se ha evaluado los resultados de la aplicación de dos sistemas remineralizantes (resinas y nanopartículas) en esmalte dentales. Para la caracterización de los resultados se han utilizado diversas técnicas que han permitido la distinción entre los compuestos de hidroxiapatita y fluorapatita en muestras dentales, como por ejemplo, espectroscopia Raman, IR con fuente de radiación sincrotrón, microscopía electrónica, entre otras. Y por último, se han cuantificado los resultados de la aplicación de dos compuestos antitártar en la inhibición de formación de cálculos dentales.