

## Caracterización morfológica, química y mecánica del esmalte dental desmineralizado por un agua saborizada.-

## Morphological, chemical and mechanical characterization of dental enamel demineralize by a flavored water.-

*Histología y Embriología. Facultad de Odontología - UNLP  
Calle 50 e/ Av. 1 y 115 La Plata (1900). Bs. As. Argentina.  
atanevitch@gmail.com  
Financiamiento: Universidad Nacional de La Plata*

### Sin conflicto de interés

*Agradecemos la colaboración del Ing. Bernardo Daga (INTEMA-CONICET. UNMdelp) por su asesoramiento técnico, y al Servicio de Microscopía Electrónica y Microanálisis del Laboratorio de Investigaciones en Metalurgia Física (SeMFI-LIMF. FI- UNLP).*

*- Lazo, Gabriel; Abal, Adrián; Belloni, Federico; Merlo, Diego; Ingeniero, María José; Viskovic, Cristina; Felipe, Pablo; Pérez, Patricia; Anselmino, Cristina; Barceló, Andrés; Saldías, Alejandro; Motta, Martín; Barrasa, Emanuel; Gómez Bravo, Francisco; Gigena, Cintia; Guzmán, Pía; Oggas, Cintia; Tanevitch, Andrea .-*

### RESUMEN

El contenido mineral del esmalte dentalle confiere propiedades mecánicas, aunque lo hace susceptible a la desmineralización ante agentes ácidos. El consumo de bebidas comerciales sin alcohol es frecuente en la población, pero incrementan el riesgo de lesiones de erosión. Nuestro propósito fue caracterizar los aspectos morfológicos, químicos y mecánicos del esmalte dental expuesto a un agua saborizada in vitro. Se obtuvieron secciones longitudinales de coronas dentarias que fueron incluidas en polímero, desgastadas y pulidas. Se realizaron observaciones al ESEM, análisis químico mediante EDSy ensayos de nanodureza en el esmalte radial y con bandas, antes y después del tratamiento. La inmersión en agua saborizada fue durante 12 minutos. Para la descripción morfológica se consideraron los patrones de grabado ácido del esmalte. Se estudiaron los elementos químicos sodio, magnesio, cloro y la relación calcio/fósforo. Se registró la dureza, el módulo elástico y la profundidad de contacto del indentador. Al ESEM los prismas presentaron distintos patrones de grabado. El análisis cualitativo fue semejante en ambas zonas pero la composición porcentual varió después del tratamiento. La dureza superficial disminuyó siendo el esmalte con bandas más vulnerable. Concluimos que la bebida produce desmineralización del esmalte compatible con una lesión de erosión.

**Palabras clave:** Esmalte Dental - Desmineralización - Bebidas Sin Alcohol -

### SUMMARY

The mineral content of the dental enamel gives it mechanical properties, although it makes it susceptible to demineralization before acidic agents. The consumption of commercial non-alcoholic beverages is frequent in the population, but they increase the risk of erosion injuries. Our purpose was to characterize the morphological, chemical and mechanical aspects of dental enamel exposed to flavored water in vitro. Longitudinal sections of permanent tooth crowns were included in polymer, worn and polished. Observations were made to the ESEM, chemical analysis by EDS and tests of nanohardness in the radial enamel and with bands, before and after the treatment. The immersion in flavored water was for 12 minutes. For the morphological description, the etching patterns of the enamel were considered. The chemical elements sodium, magnesium, chlorine and the calcium/ phosphorus ratio were studied. The hardness, the elastic modulus and the depth of contact of the indenter were recorded. At the ESEM the prisms presented different patterns of acid etching. The qualitative analysis was similar in both areas but the percentage composition varied after treatment. Surface hardness decreased with enamel with more vulnerable bands. We conclude that the beverage produces demineralization of the enamel compatible with an erosion lesion.

**Key words:** Dental Enamel - Demineralization - Soft Drinks -

## Introducción

El consumo de distintas bebidas comerciales sin alcohol forma parte de los hábitos dietéticos de la población y distintos estudios han demostrado su efecto erosivo sobre la estructura dentaria [1,2]. Yin-Linet al [3] evaluaron el potencial erosivo de distintas bebidas gaseosas encontrando que los valores de pH estaban por debajo del pH crítico de la hidroxiapatita del esmalte. Además determinaron que las bebidas con ácido cítrico y ácido ascórbico en su composición, presentaban la titulación ácida más elevada. Sabelet al [4] señalan que el esmalte responde a la desmineralización con lesiones de diferente profundidad y ello está relacionado con la composición química. Establecieron una correlación entre el contenido de carbono y la profundidad de las lesiones. Cuando el carbono se hallaba en proporción más elevada en el esmalte sano, la profundidad de las lesiones resultó mayor. También determinaron que la lesión fue más profunda cuando el grado de porosidad del esmalte fue más alto. Se conoce, mediante la observación en microscopía electrónica, que la exposición del esmalte a soluciones ácidas produce un patrón de grabado en forma de panal de abeja, donde está más afectado el corazón del prisma (zona central) que su periferia debido a la pérdida selectiva de mineral [5]. En la dentición permanente, el tejido adamantino presenta una organización definida de los prismas según la zona considerada. En los 2/3 más internos del espesor, los prismas exhiben entrecruzamientos, dando origen a las bandas de Hunter-Schreger, mientras que en el tercio externo de su espesor, los prismas se disponen paralelos unos a otros, conformando el esmalte radial [6]. Además, cada zona presenta un comportamiento biomecánico definido [7] y variaciones en la composición química elemental [8]. A pesar de la complejidad en la organización de los cristales del esmalte y el contenido de proteínas, la relación calcio/fósforo resulta bastante constante en su espesor, excepto por la tendencia a valores menores en la superficie, posiblemente por la formación de apatita deficiente en calcio [9]. La capa superficial de esmalte radial, ante las agresiones químicas y mecánicas del medio bucal, responde con pérdida de sustancia. Si por acción de las fuerzas tensionales, el esmalte radial se desgasta, queda expuesto el esmalte con bandas de Hunter-Schreger. No existe suficiente información sobre la respuesta del esmalte con bandas ante los fenómenos de desmineralización producidos por bebidas comerciales de consumo frecuente. Por ello nuestro propósito fue caracterizar la microestructura del esmalte radial y con bandas, después de la acción de un agua natural saborizada. Los objetivos fueron: describir las variaciones morfológicas de los prismas en sección transversal y longitudinal del esmalte desmineralizado al MEB; analizar la composición química elemental del esmalte radial y con bandas de Hunter-Schreger desmineralizado mediante Espectrometría de Energía Dispersiva (EDS) y determinar las variaciones de la dureza superficial del esmalte radial y con bandas de Hunter-Schreger desmineralizado mediante ensayos de nanodureza.

## Metodología

Se utilizaron secciones longitudinales de coronas dentales humanas obtenidas con el debido consentimiento informado del paciente. Después

Se incluyeron en resina acrílica y se desgastaron en un plano. Se pulieron con lijas al agua de granulación progresiva (grano 600, 1200, 1500 y 2000) sucesivamente y finalmente con paño e Instrumental rotatorio para alto brillo. Se lavaron con alcohol, luego ultrasonido 5 minutos y se secaron. Para el tratamiento se utilizaron 100 ml de un agua saborizada de naranja comercialmente disponible. Las muestras se sumergieron durante 12 minutos, se retiraron y se lavaron con agua. Luego fueron metalizadas con oro para la observación y análisis químico mediante un ESEM FEI QUANTA 200 con sonda EDS perteneciente al Servicio de de Microscopía Electrónica y Microanálisis del Laboratorio de Investigaciones en Metalurgia Física (SeMFI-LIMF. FI- UNLP). Las condiciones de trabajo fueron alto vacío a 20 kV en un área de 100  $\mu$ m<sup>2</sup>.

Para la descripción morfológica del esmalte por la acción de la bebida se consideraron los patrones de grabado ácido [10]. Para el análisis químico elemental se consideraron los siguientes elementos: calcio (Ca), fósforo (P), sodio (Na), magnesio (Mg), cloro (Cl) y la relación Ca/P. Se realizaron registros en el esmalte radial y con bandas de Hunter-Schreger antes y después de la acción de la bebida. Se realizaron ensayos de nanodureza con un equipo TRIBOINDENTER HYSITRON con indentador Berkovich perteneciente al Laboratorio de Superficies del INTEMA-CONICET (Facultad de Ingeniería Universidad Nacional de Mar del Plata). La función de carga es un trapecioide básico de 4  $\mu$ N de carga máxima, holding time de 2 seg, con tasas de carga y descarga de 800  $\mu$ N/seg. Por cada posición/zona de ensayo, se aplicó una grilla de 4x4 indentaciones separadas 25  $\mu$ m. Los resultados de H (dureza), Er (módulo reducido) y hc (profundidad de contacto) se obtuvieron por la metodología Oliver-Phar [11].

El porcentaje de reducción de la dureza después del tratamiento se obtuvo mediante la fórmula:

$$\Delta H = \frac{H_i - H_f}{H_i} \times 100$$

Donde:  
H<sub>i</sub>: es dureza inicial  
H<sub>f</sub>: dureza final

Se utilizó el test ANOVA con comparaciones múltiples de Bonferroni. El error  $\alpha$  aceptado fue de 0,05.

## Resultados

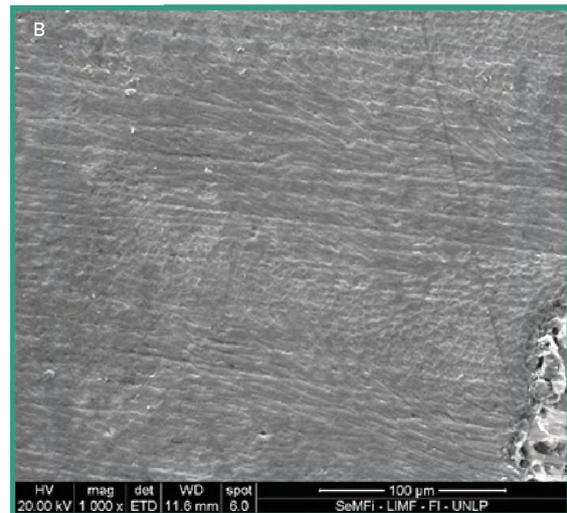
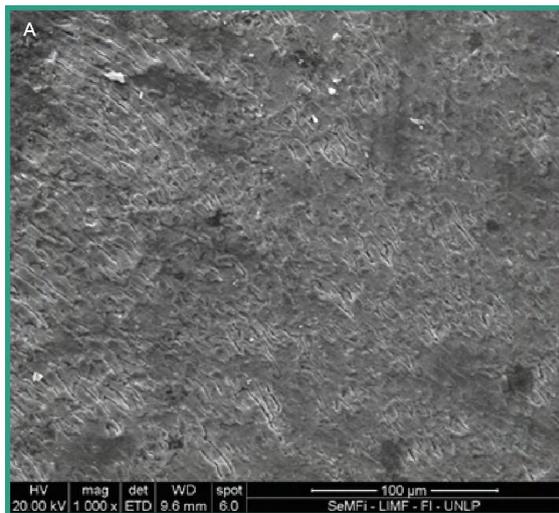
### ASPECTOS MORFOLÓGICOS

Las micrográficas del esmalte sano, muestran una la disposición característica de los prismas en cada zona, encontrándose paralelos entre sí en el esmalte radial y presentando entrecruzamientos en haces en el esmalte BHS (Figs. 1A y B). En este último pueden distinguirse prismas en sección transversal y longitudinal dispuestos en forma alternada.

Después de la acción de la bebida, en el esmalte radial, se observan numerosas porosidades pequeñas mientras que los contornos de los prismas aparecieron desdibujados (Fig. 2A). En las secciones longitudinales de los prismas, el espacio interprismático adquiere aspecto irregular (Figs. 2A y B). En secciones transversales, los prismas presentaron dos patrones: en varias muestras se observó una depresión del centro del prisma conservando contornos elevados (Fig. 3A), mientras que en otras,

el patrón resultó inverso, es decir, los centros permanecieron elevados y los contornos deprimidos (Fig. 3B). Estas alteraciones se corresponden

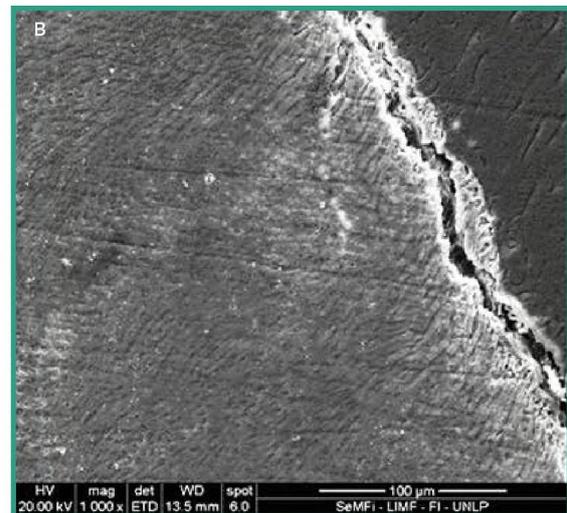
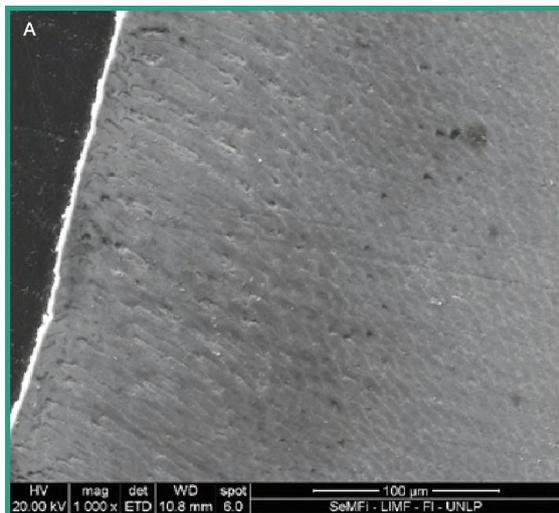
con los patrones de tipo I y II del grabado ácido del esmalte respectivamente.



**Figura 1.** Micrografía del esmalte sano.

A: esmalte radial. Se distingue la disposición paralela de los prismas.

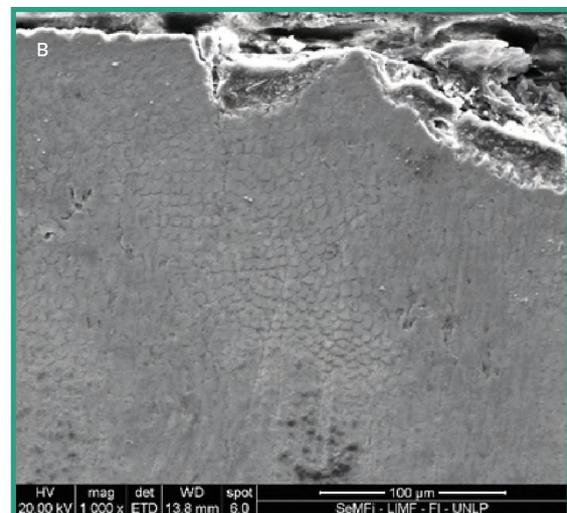
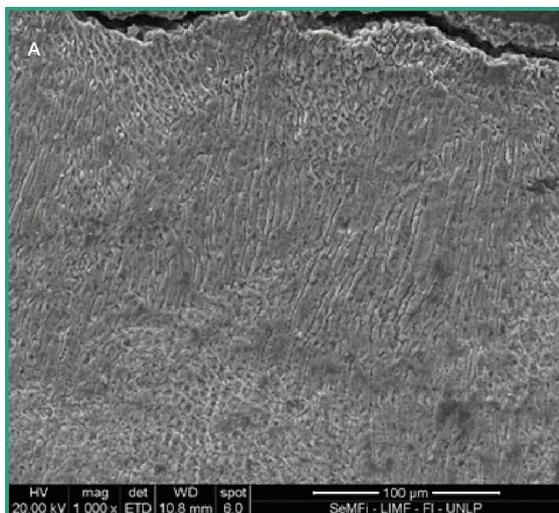
B: esmalte BHS. Aparecen zonas alternadas de prismas seccionados transversalmente y longitudinalmente. MEB x 1000.



**Figura 2.** Micrografía del esmalte tratado con la bebida sin alcohol.

A: esmalte radial. Se evidencia aumento de la porosidad.

B: esmalte BHS. Los prismas en sección longitudinal presentan un aumento del espacio interprismático. MEB x 1000.



**Figura 3.** Micrografía del esmalte tratado con la bebida.

A y B: esmalte BHS. Se observan prismas en sección transversal con los centros afectados (A) y con los contornos afectados (B). MEB x 1000.

COMPOSICIÓN QUÍMICA ELEMENTAL (EDS)

Se obtuvieron espectros por energía dispersiva (EDS) del esmalte sano y tratado, donde se observan picos pronunciados para el calcio y el fósforo y se detectaron otros elementos como sodio, magnesio y cloro (Fig. 4). Los valores relativos (peso%) del análisis cuali y semicuantitativo del tejido sano y tratado se muestran en la Tabla I.

En el esmalte sano, el sodio se encontró en mayor porcentaje en el esmalte BHS. Después del tratamiento con la bebida, aumentó en el esmalte BHS (Na: 0,88%) en relación al sano (Na: 0,70%). La diferencia fue significativa. No se encontró diferencia significativa en el porcentaje de sodio entre el esmalte radial sano y tratado. Con relación al magnesio no se encontró diferencia significativa en el esmalte sano radial y BHS, sin embargo, después de la inmersión en la bebida, el porcentaje fue más elevado en el esmalte con bandas (Mg: 0,29%) que en el sano (Mg: 0,23). El cloro se encontró en mayor proporción tanto en el esmalte radial sano como en el tratado con la bebida siendo la diferencia significativa (Fig. 5). La relación Ca/P no presentó diferencia significativa entre en esmalte sano radial y BHS, como así tampoco en el tratado radial y BHS. No obstante, después de la inmersión en la bebida, la relación Ca/P disminuyó en el esmalte radial y en el BHS (Ca/P: 2,0) tratado con relación al sano (Ca/P: 2,1) (Fig.5). La diferencia fue significativa. En síntesis, si bien los elementos estudiados se encontraron presentes en el esmalte sano, tanto en el radial como en las bandas de Hunter Schreger, los valores porcentuales resultaron diferentes. El sodio y el magnesio se encontraron en mayor proporción en el esmalte con bandas, mientras que la proporción de cloro resultó mayor en el radial. Después de la acción del agua saborizada, en el esmalte con bandas, el sodio y el magnesio aumentaron aún más y el cloro descendió notablemente. La relación calcio/fósforo descendió en ambas zonas después del tratamiento.

		Na	Mg	P	Cl	Ca	Ca/P
ESMALTE SANO	Radial	0,54 <sup>a</sup> ±0,09	0,19 ±0,07	18,14 ±0,51	0,38 <sup>bc</sup> ±0,09	38,36 ±1,15	2,11 <sup>a</sup> ±0,03
	BHS	0,70 <sup>ab</sup> ±0,07	0,23 <sup>b</sup> ±0,05	18,05 ±0,50	0,14 <sup>a</sup> ±0,13	38,14 ±1,17	2,11 <sup>b</sup> ±0,02
ESMALTE TRATADO	Radial	0,62 ±0,17	0,21 <sup>a</sup> ±0,06	20,35 ±4,51	0,52 <sup>bc</sup> ±0,13	40,70 ±8,69	2,00 <sup>a</sup> ±0,06
	BHS	0,88 <sup>b</sup> ±0,19	0,29 <sup>ab</sup> ±0,06	19,56 ±4,22	0,07 <sup>b</sup> ±0,07	39,39 ±8,16	2,02 <sup>b</sup> ±0,04

<sup>a,b,c</sup> Las letras iguales indican diferencia significativa (ANOVA- Bonferroni, p<0,05)

Tabla I. Análisis químico elemental del esmalte dental. Valores expresados en peso%.

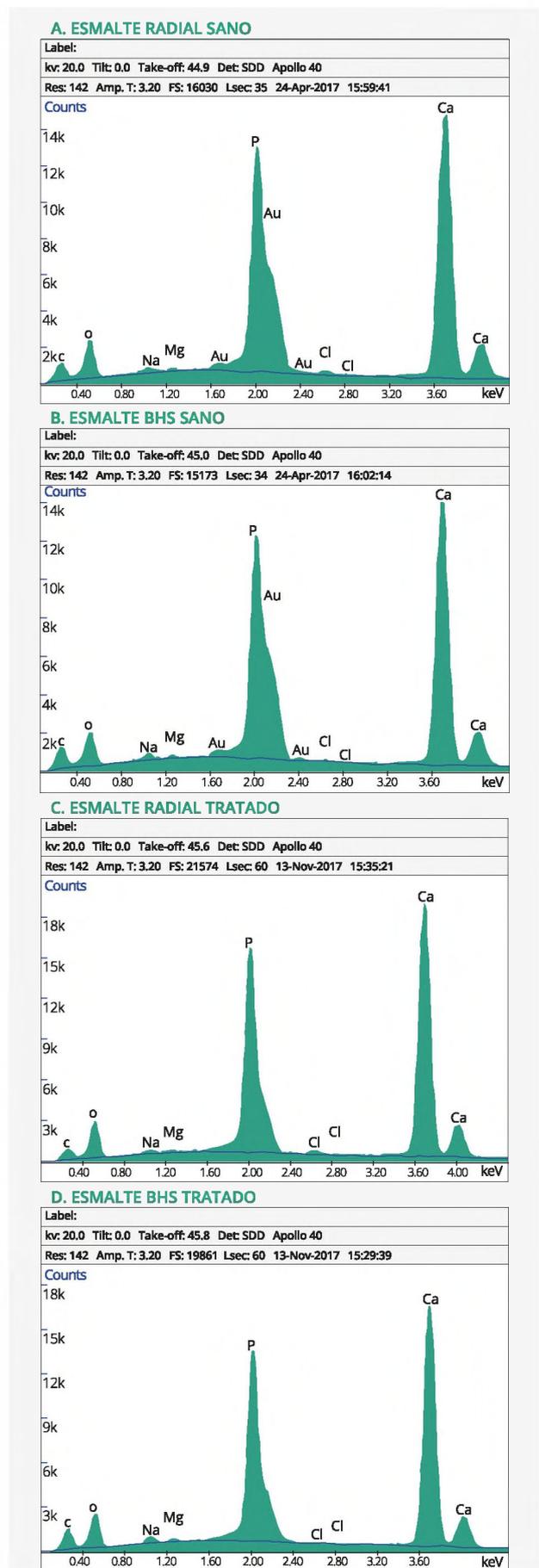


Figura 4. Espectros por energía dispersiva (EDS) del esmalte sano y tratado con la bebida. A y B: esmalte sano. C y D: esmalte tratado con la bebida.

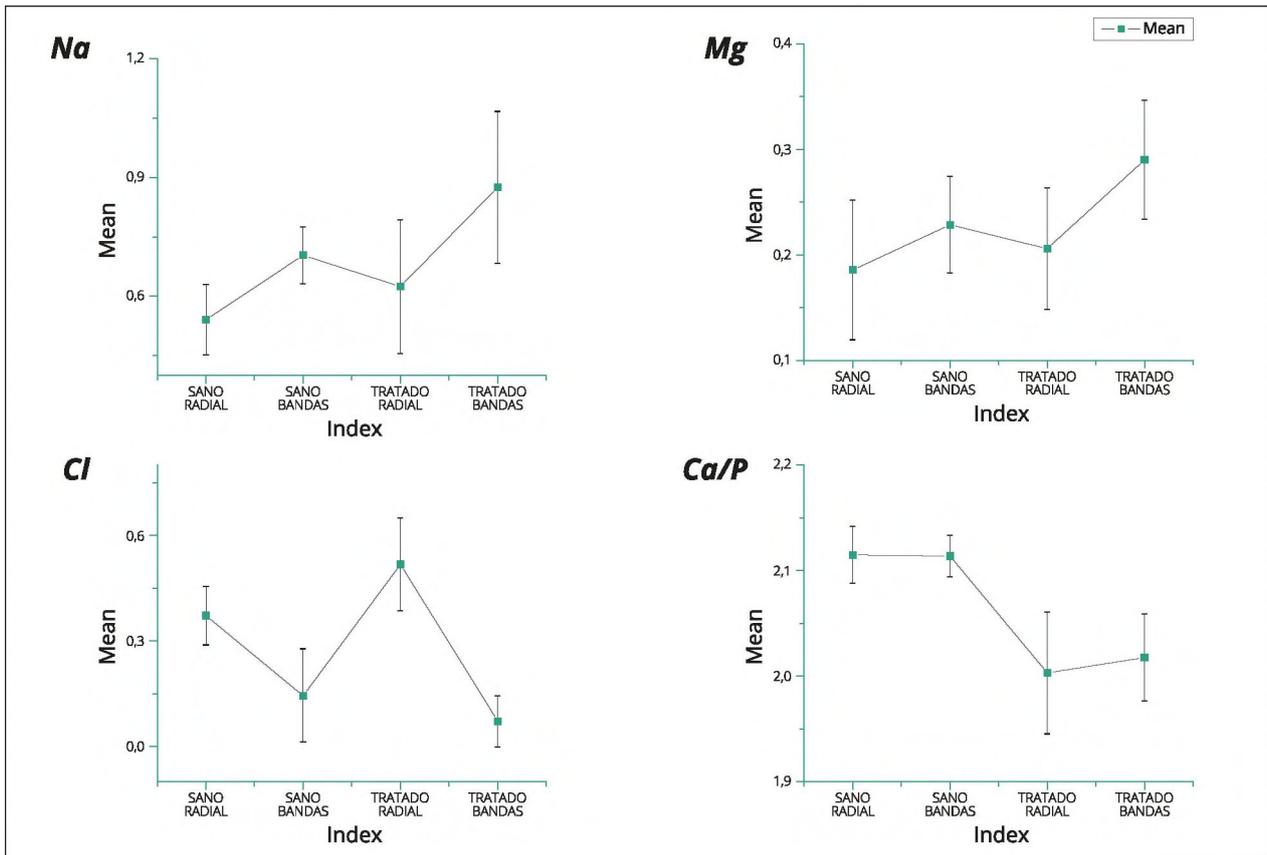


Figura 5. Valores medios porcentuales, desviación y error del sodio (Na), magnesio (Mg), cloro (Cl) y la relación calcio/fósforo (Ca/P). Se representan en orden el esmalte sano radial, el sano BHS, tratado radial y tratado BHS.

#### DUREZA SUPERFICIAL

Los ensayos con nanodureza determinaron diferencias entre la dureza del esmalte radial y BHS tanto en el tejido sano, como en el tratado con la bebida. El esmalte radial sano presentó valores de dureza mayores que el BHS. Esta tendencia se conservó después de la acción de la bebida. Los valores de Hb (dureza), Er (módulo reducido) y hc (profundidad de contacto) de las muestras sanas y tratadas se detallan en la Tabla II. Se encontró diferencia significativa en los valores de dureza del esmalte sano y tratado tanto en el esmalte radial como en BHS ( $p < 0,05$ ). (Fig. 6).

Después de la acción de la bebida los valores de dureza del esmalte radial y BHS disminuyeron y se mantuvo la tendencia observada en el esmalte sano, donde los valores mayores correspondían al esmalte radial. En el gráfico comparativo (Fig. 7) se observa una disminución de los valores de H y Er tanto en el esmalte radial como BHS. El porcentaje de reducción de H en el esmalte radial fue del 59,48% y en el esmalte BHS resultó de 63,67%. En cambio, la profundidad de contacto aumentó alrededor de un 50%.

	H	Er	Hc	
<b>ESMALTE SANO</b>	Radial	5,48±0,23 <sup>ac</sup>	86,97±8,11	149,73±4,25
	BHS	4,24±0,43 <sup>ad</sup>	75,24±7,09	176,36±11,29
<b>ESMALTE TRATADO</b>	Radial	2,22±0,31 <sup>bc</sup>	58,73±10,79	270,29±21,22
	BHS	1,54±0,42 <sup>bd</sup>	48,11±6,54	350,10±63,33

Las letras iguales indican diferencia significativa (ANOVA,  $p < 0,05$ )

Tabla II. Valores medios y desviación de Dureza (H), Módulo de elasticidad (Er) y profundidad de contacto (hc) del esmalte sano y tratado con la bebida.

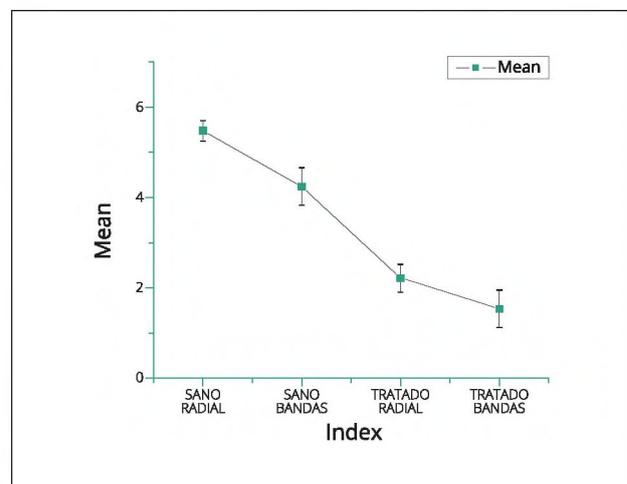


Figura 6. Valores medios de dureza H (desviación y error) del esmalte sano y tratado, radial y BHS. El esmalte sano radial presentó valores medios mayores que las bandas, tanto en el esmalte sano como después de la acción de la bebida.

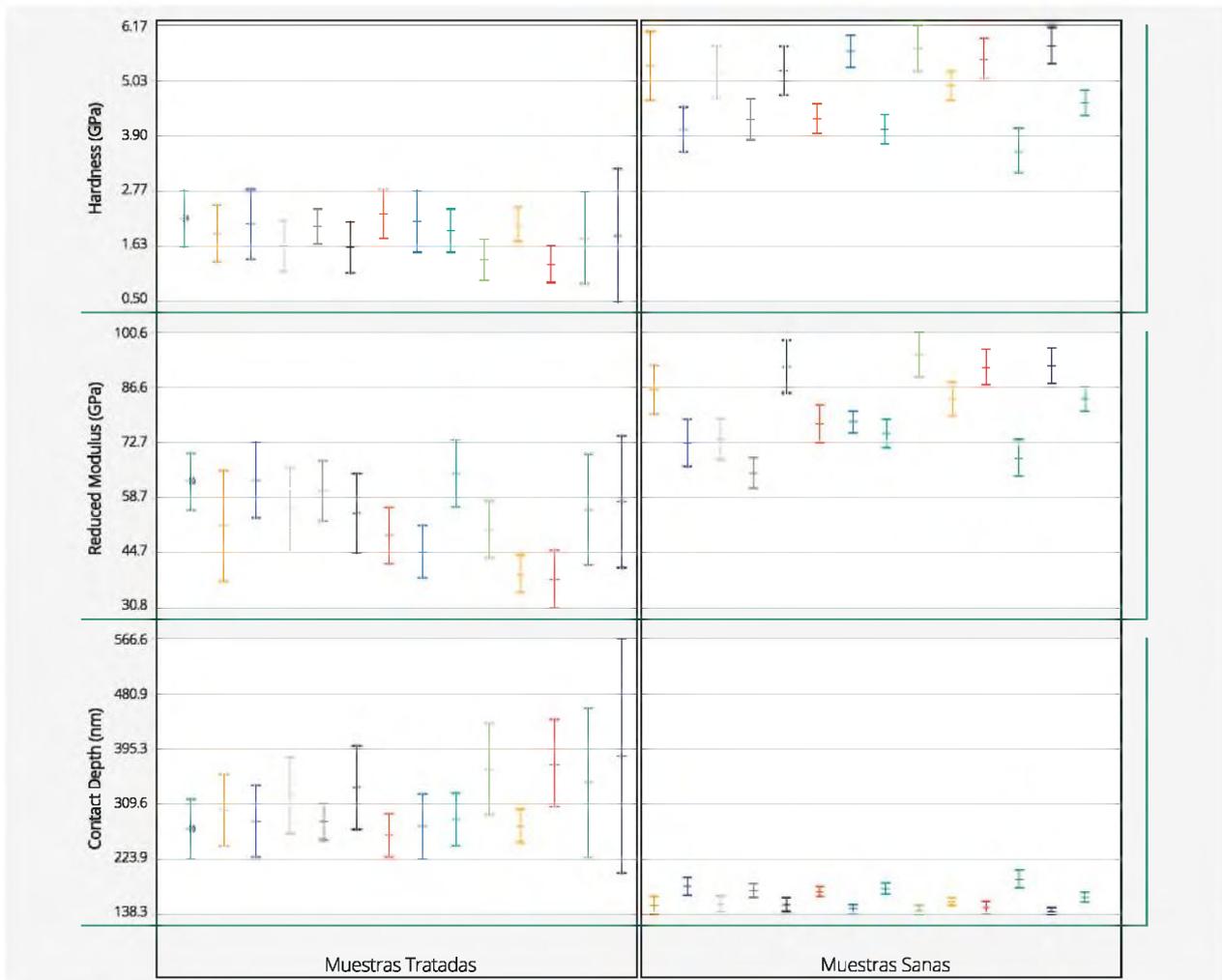


Figura 7. Comparación de los registros de nanodureza de las muestras tratadas/sanas. El grupo sano presentó valores de dureza y módulo elástico más elevados que el esmalte tratado. Asimismo, la dureza fue mayor en el esmalte radial. La profundidad de contacto registró valores más bajos en el esmalte sano y en el radial fue menor que en las bandas.

## Discusión y Conclusiones

En este trabajo analizamos la acción de un agua natural saborizada sobre la microestructura del esmalte dental in vitro. Consideramos dos zonas del espesor del tejido adamantino diferenciadas por la organización de los haces de prismas: la zona más externa donde los prismas se disponen paralelos entre sí (esmalte radial) y la zona interna, donde se organizan en haces que se entrecruzan en capas regulares (esmalte BHS). Caracterizamos los aspectos morfológicos, químicos y mecánicos de cada zona.

El tiempo de acción de la bebida (12 minutos) resultó suficiente para producir alteraciones en la morfología de los prismas. Al MEB se observó un aumento de la porosidad y alteraciones en los contornos de los prismas compatibles con los patrones de grabado de esmalte de tipo I y II [10]. Esto indica la pérdida de minerales después de la inmersión en la bebida.

El agua saborizada utilizada en este experimento, contiene, además de agua mineral natural, ácido cítrico y EDTA. El ácido cítrico es un ácido orgánico débil tricarbóxico que está presente en la mayoría de las frutas, sobre todo en cítricos. Su fórmula molecular es  $C_6H_8O_7$ . La acidez del ácido cítrico es debida a los tres grupos carboxilos  $-COOH$  que pueden perder los protones, formando derivados como el citrato. Los citratos son

unos buenos controladores del pH de soluciones ácidas[12]. Los iones citrato forman sales con muchos iones metálicos, entre ellos el calcio. La quelación es el proceso de unión entre una o más moléculas de ácido cítrico y los iones del metal, separándolos de una forma compleja y dejándolos inactivos. El EDTA o ácido etilen-diamino-tetra-acético también tiene acción quelante y forma compuestos estables con el calcio[13]. Estos componentes son los responsables de la desmineralización del tejido adamantino.

El análisis por EDS determinó la variación en la composición química elemental antes y después de la exposición a la bebida. En el esmalte sano, Mariel Cárdenas et al.[9] demostró que algunos elementos varían en su concentración (g%) desde la superficie externa hacia el límite amelodentinario. Uno de ellos es el sodio, donde la mayor concentración se observó en la superficie interna del esmalte, tal como fue demostrado en este trabajo. Esta relación se mantuvo después de la acción de la bebida. Estos autores [9] informaron que el magnesio, al igual que el sodio, se encontraba en mayor proporción en la zona interna aunque no fue demostrado en nuestros registros. No obstante, el esmalte BHS presentó una mayor proporción de magnesio después del tratamiento. Además, el cloro se encontró en mayor proporción en la zona superficial (esmalte radial), tanto en el esmalte sano como el tratado por la bebida.

Por lo tanto, la desmineralización, no afectó la relación de estos elementos en el esmalte radial y BHS, aunque la pérdida de calcio produjo un aumento de los porcentajes relativos del sodio y el magnesio y un descenso del cloro posiblemente atribuido a su salida junto con el calcio (Tabla I). La pérdida de minerales se evidenció además, mediante los ensayos de nanodureza. En nuestro estudio se verificó la mayor resistencia al desgaste del esmalte radial respecto del esmalte BHS[7, 14], aunque la relación calcio/fósforo no mostró diferencia significativa entre ambas zonas. La disminución de la dureza después de la inmersión en la bebida, fue más pronunciada en el esmalte BHS. En esta zona, los cristales se encuentran en ángulos agudos con sus vecinos en la periferia del prisma por lo que el contenido de material orgánico es mayor[15]. Los valores más bajos en el módulo reducido Er indican la formación de una capa reblandecida superficial, siendo más vulnerable el esmalte con BHS.

Concluimos que los componentes ácidos contenidos en el agua saborizada producen alteraciones morfológicas, químicas y mecánicas compatibles con fenómenos de erosión del esmalte dental.

## Bibliografía

1. Nirmala S, Subba Reddy VVA comparative study of pH modulation and trace elements of various fruit juice on enamel erosion: An in vitro study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2011, 29: 205-15
2. Cochrane NJ, Yuan Y, Walker GD, Shen P, Chang CH, Reynolds C, Reynolds EC. Erosive potential of sports beverages. *Australian Dental Journal.* 2012;(57): p. 359-364
3. Yin-Lin Wang, Chia-Chieh Chang, Chih-Wen Chi, Hao-Hueng Chang, Yu-Chih Chiang, Yueh-Chiao Chuang, Hsiao-Hua Chang, Guay-Fen Huang, Yunn-Shiuan Liao, Chun-Pin Lin. Erosive potential of soft drinks on human enamel: An in vitro study. *Journal of Formosan Medical Association.* 2014, 113: 850-856
4. Sabel N, Robertson A, Nietzsche S, Norén JG. Demineralization of enamel in primary second molars related to properties of the enamel. *The Scientific World Journal.* 2012; 2012(587254).
5. Tyler J. A Scanning Electron Microscope Study of Factors Influencing Etch Patterns of Human Enamel. *Arch Oral Biol.* 1976; 21: p. 765-179.
6. Koenigswald W, Sander P. *Tooth enamel microstructure.* Rotterdam: Balkema, 1997
7. Rensberger, J. *Mechanicals adaptation in enamel.* En: *Tooth enamel microstructure, de W Koenigswald y P Sander, editado por W Koenigswald y P Sander, Rotterdam: Balkema. 1997, p. 237-257.*
8. Mariel Cárdenas J, Mariel Murga H, Villagrán Rueda S, Mariel Cárdenas G, Gutierrez Cantú F, Guerrero Barrera A. Distribución de elementos químicos en el esmalte dental. *Revista de Ciencias Basicas UJAT.* 2010, Junio; 9(1): 3-116.
9. Weatherell JA, Robinson C, Hallsworth AS. Variations in the Chemical Composition of Human Enamel. *Journal of Dental Research,* 53(issue 2): 180-192. March 1, 1974
10. Silverstone LM, Saxton CA, Dogon IL, Fejerskov O. Variation in the pattern of acid etching of human dental enamel examined by scanning electron microscopy. *Caries Res.* 1975, 9(5):373-87.
11. Oliver WC, Pharr GM. An Improved Technique for Determining Hardness and Elastic-Modulus Using Load and Displacement Sensing Indentation Experiments. *Journal of Materials Research.* 1992, p. 1564-1583.
12. Muñoz Villa A, Sáenz Galindo A, López-López L, Cantú Sifuentes L, Barajas Bermúdez L. Ácido cítrico: compuesto interesante. *Rev. Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila.* 2014, 6(12): 18-23
13. Segura Egea JJ, Jiménez Rubio Manzanares A, Llamas Cadaval R, Jimenez Planas A. El ácido etilén diamino tetraacético (EDTA) y su uso en endodoncia. *Endodoncia.* 1997, 15(2): 90-97
14. Bajaj D, Arola D. Role of prism decussation on fatigue crack growth and fracture of human enamel. *Acta Biomater.* 2009, oct.; 5(8): 3045-56
15. Nanci A. *Ten Cate's Oral Histology. Development, Structure, and Function.* 7th ed. St. Louis: Mosby; 2008 .

