

## WPLYWU ŻELU WYBIELAJĄCEGO Z NADTLENKIEM MOCZNIKA NA POWIERZCHNIĘ SZKLIWA - BADANIA ZA POMOCĄ MIKROSKOPU SIŁ ATOMOWYCH (AFM)

DOROTA KOŚCIELNIAK<sup>1</sup>, ELŻBIETA PAMUŁA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI, COLLEGIUM MEDICUM, PRACOWNIA STOMATOLOGII DZIECIĘCEJ IS CMUJ UL. MONTELUPICH 4, 31-155 KRAKÓW

<sup>2</sup> AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI, KATEDRA BIOMATERIAŁÓW, AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW

### Streszczenie

*W pracy oceniono wpływ żelu wybielającego zawierającego 20% nadtlenek mocznika na powierzchnię szkliwa zęba ludzkiego. Przy użyciu mikroskopu sił atomowych (AFM) zarejestrowano obrazy topograficzne szkliwa z powierzchni policzkowej zęba bez kontaktu jak i po kontakcie z żelem wybielającym. Badania wykazały, że 48-godzinne wybielanie nie wpływa w istotny sposób na topografię szkliwa i jego chropowatość. Parametry topograficzne takie jak: średnia chropowatość powierzchni, chropowatość skuteczna i średnia wysokość elementów topograficznych szkliwa po procesie wybielania były podobne do parametrów próbki kontrolnej.*

[INŻYNIERIA BIOMATERIAŁÓW, 63-64, (2007), 24-27]

### Wstęp

Wybielanie zębów metodą domową, nakładkową przy użyciu nadtlenku mocznika zostało wprowadzone po raz pierwszy w 1989 roku [1] i jest ono obecnie jedną z najpopularniejszych metod przyżyciowego wybielania zębów. Efekt wybielający zależy bezpośrednio od czasu zabiegu i stężenia środka wybielającego. W większości dotychczasowych badań opisywano brak uszkodzeń szkliwa po zastosowaniu preparatów wybielających [2, 3]. Wyniki uzyskane w naszych poprzednich badaniach in vitro wykazały, że zastosowanie żeli wybielających z 10% i 20% nadtlenkiem mocznika przez 12 dni, 4 godziny dziennie, nie wpływa znacząco na mikrostrukturę szkliwa [4], jego skład chemiczny [5] i mikrostrukturę [6]. Istnieją jednak również doniesienia wskazujące, iż wysokie stężenia nadtlenku wodoru lub kwasów powodują wyraźne uszkodzenie struktury szkliwa. Hegedus i wsp. na podstawie badań AFM stwierdzili występowanie zmian na powierzchni szkliwa po 28 h wybielania 10% nadtlenkiem mocznika i 30% nadtlenkiem wodoru [7].

Mikroskop sił atomowych (AFM) jest skutecznym narzędziem zaprojektowanym do bezpośredniej obserwacji powierzchni różnych materiałów z rozdzielczością rzędu nanometrów. W przeciwieństwie do mikroskopu skaningowego elektronowego (SEM), nie wymaga on specjalnego przygotowania próbek, a więc pokrywania ich powierzchni przewodzącą warstwą złota lub węgla. Zatem obrazy otrzymane za pomocą AFM są bliższe rzeczywistości, gdyż są pozbawione artefaktów związanych z procedurami przygotowania próbek.

## AN ATOMIC FORCE MICROSCOPY STUDY ON THE EFFECT OF CARBAMIDE PEROXIDE BLEACHING GEL ON ENAMEL SURFACE

DOROTA KOŚCIELNIAK<sup>1</sup>, ELŻBIETA PAMUŁA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> DEPARTMENT OF PEDODONTICS, INSTITUTE OF STOMATOLOGY, COLLEGIUM MEDICUM, JAGIELLONIAN UNIVERSITY, UL. MONTELUPICH 4, 31-155 KRAKÓW, POLAND

<sup>2</sup> AGH - UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW

### Abstract

*The effect of bleaching gel containing 20% carbamide peroxide on human enamel surface was evaluated. Topography images of the control and test samples located on the buccal surface of the same tooth were recorded with the use of an atomic force microscope (AFM). AFM evaluation demonstrated that 48-hour bleaching did not significantly affect topography and roughness of the enamel. Topographical parameters such as average roughness, root mean square roughness and average height were similar for both control and test surfaces of the enamel.*

[ENGINEERING OF BIOMATERIALS, 63-64, (2007), 24-27]

### Introduction

Teeth nightguard vital bleaching technique using hydrogen peroxide have been introduced in 1989 [1], and it has become more and more popular in dentistry. In this technique the effect of whitening is directly related to the time of exposure and concentration of the chemical used as a bleaching agent. Most studies have reported insignificant alterations of the enamel structure following exposure to bleaching chemicals [2,3]. Our previous in vitro studies demonstrated, that application of gels containing 10% and 20% carbamide peroxide for 12 days, 4 hours daily, did not have unfavourable effects on enamel microhardness [4], chemical structure [5] and microstructure [6]. Even though, there are reports claiming that high level of hydrogen peroxide or acids cause enamel structural alteration. Hegedus et al. described surface changes using atomic force microscopy after 28h of bleaching with 10% carbamide peroxide and 30% hydrogen peroxide [7].

Atomic force microscopy (AFM) is a powerful tool designed for direct observation of the surface with nanometer resolution. Contrary to scanning electron microscopy (SEM), it requires minimal sample preparation, without necessity to coat the surface with a conductive layer of gold or carbon. Therefore, AFM images are more likely to represent natural surfaces, without any alterations connected with sample preparation.

The aim of this study was to get a further insight into the microstructure and topography of the enamel after application of gel containing 20% carbamide peroxide. To this end, atomic force microscopy was used to evaluate topography and measure topographical parameters, e.g. surface roughness.

Celem niniejszej pracy było uzyskanie dalszych informacji na temat mikrostruktury i topografii szkliwa zęba wybielonego przy pomocy żelu zawierającego 20% nadtlenu moczniaka. Do oceny topografii i chropowatości zastosowano mikroskop sił atomowych.

## Materiał i metoda

Do wybielania zastosowano preparat Opalescence 20% PF (Ultradent Products Inc., USA), o składzie: 20% nadtlenu moczniaka, karbopol, woda, azotan potasu, 0,11% związku fluoru (pH=6,5). Powierzchnię policzkową zęba (nieuszkodzony procesem próchnicowym, ludzki ząb przedtrzonowy, usunięty ze wskazań periodontologicznych u pacjenta w wieku lat 60-ciu) przecięto na dwie części (próbka kontrolna i próbka badana) przy użyciu obrotowej tarczy diamentowej. Obie części przemyto wodą destylowaną. Wybielaniu poddawano połowę powierzchni wargowej, a druga część tej powierzchni stanowiła kontrolę. Po osuszeniu nakładano na powierzchnię szkliwa 0,2 ml żelu wybielającego. Próbkę badaną wybielano 4h dziennie przez 12 dni (łącznie 48h). Pomiędzy zabiegami, próbkę przetrzymywano w 0,9% soli fizjologicznej w temperaturze 37°C. Próbkę kontrolną zęba przetrzymywano przez cały czas trwania doświadczenia w soli fizjologicznej, w temperaturze 37°C.

Po 12 dniach wybielania określono kolor próbki kontrolnej i badanej przy użyciu kolornika Esthet X (Dentsply DeTrey), zgodnie z metodą opisaną poprzednio [4,5] oraz wykonano zdjęcia aparatem cyfrowym (Nikon Coolpix 995).

Po wysuszeniu próbek dokonano obserwacji powierzchni szkliwa przy użyciu mikroskopu sił atomowych (Explorer, ThermoMicroscopes, Veeco, USA). Obrazy topograficzne zarejestrowano w trybie kontaktowym za pomocą sondy z  $\text{Si}_3\text{N}_4$  o stałej sprężystości 0,05 N/m i średnim promieniu krzywizny 20 nm (Veeco NanoProbe™ Tips, model MLCT-EXMT-A). Obrazy zarejestrowano dla trzech przypadkowo wybranych miejsc i dwóch obszarów skanowania:  $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$  i  $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ , przy rozdzielczości  $300 \times 300$  pikseli i przy szybkości skanowania 3 linie/s. Za pomocą oprogramowania SPMLab602 wyznaczono chropowatość średnią ( $R_a$ ), chropowatość skuteczną ( $R_{RMS}$ ), średnią wysokość elementów topograficznych ( $H_{av}$ ) i maksymalny zakres zmian wysokości elementów topograficznych (MaxR). Obliczono wartości średnie, odchylenia standardowe i przeprowadzono analizę statystyczną wyników z wykorzystaniem t-testu.

## Wyniki i dyskusja

Na RYS.1 przedstawiono dwie części zęba: kontrolną i po wybielaniu przez 48 godzin. Po zabiegu kolor badanej próbki uległ znacznemu rozjaśnieniu. Zgodnie z 18-stopniową skalą wg. kolornika Esthet X (Dentsply DeTrey) [4,5] kolor badanej próbki uległ zmianie ze stopnia 17 na stopień 4. Osiągnięto zatem poprawę koloru aż o 13 stopni.

Obrazy topograficzne powierzchni szkliwa próbki kontrolnej i po kontakcie z żelem wybielającym zostały przedstawione odpowiednio na RYS.2 i RYS.3. Na obrazach szkliwa zarejestrowanych dla większych obszarów skanowania ( $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ ) (RYS.2a,3a) widoczne są jego pofalowania noszące nazwę perikymatów. Struktury te można obserwować także za pomocą mikroskopów optycznych i mikroskopów skaningowych elektronowych, które jednak nie stwarzają możliwości pomiaru ich głębokości [6]. Perikymaty są to poprzeczne prążki, będące zakończeniami linii wzrostowych szkliwa, tzw. linii Retziusa i odzwierciedlają tygodniowe cykle mineralizacji szkliwa [8]. Głębokość perikymatów mierzona za pomocą AFM dla próbek kontrolnych i badanych mieściła się w zakresie od 2 do 4  $\mu\text{m}$ . Odległość pomiędzy perikymatami wynosiła 30 $\mu\text{m}$ .

## Materials and methods

Tooth bleaching gel (Opalescence 20% PF, Ultradent Products Inc., USA) containing: 20% carbamide peroxide, carbopol, water, potassium nitride, fluoride compound 0.11% of pH= 6.5, was used in this study. The buccal surface of the tooth (non-cariou human premolar, extracted for periodontic reason, patient age 60 years) was divided in two parts (control and test) with the use of a high-speed diamond rotary. Both parts were rinsed with distilled water and placed in separate tubes containing 0.9% physiological saline at 37°C until use. Subsequently, 0.2 mL drop of Opalescence was deposited on the enamel surface. The test sample was treated with the bleaching agent applied 4 hours daily for 12 days (48h in total). During time intervals between gel applications, the sample was kept in physiological saline at 37°C. The control sample was incubated in physiological saline at 37°C for the whole experimental period.

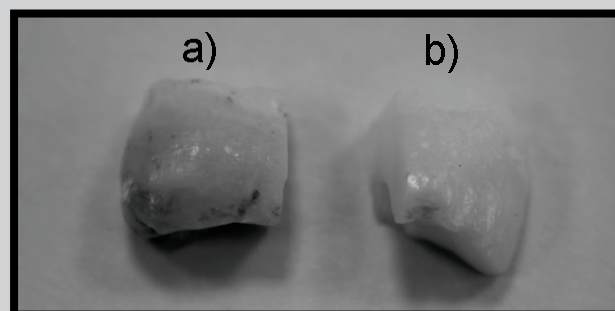
12 days after bleaching the colour of the test and control samples was compared to the Colour Standard Esthet X (Dentsply DeTrey), according to the method described previously [4,5], and both samples were photographed by a digital camera (Nikon Coolpix 995).

The samples were air dried and the enamel was analysed with the use of an atomic force microscope (Explorer, ThermoMicroscopes, Veeco, USA). Contact mode topographic images were recorded using  $\text{Si}_3\text{N}_4$  probes with a spring constant of 0.05 N/m and a nominal radius of curvature of 20 nm (Veeco NanoProbe™ Tips, model MLCT-EXMT-A). The images were recorded for scan areas of  $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$  and  $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$  for three randomly chosen places ( $300 \times 300$  data points), and with scan rate of 3 lines/s. Based on the software SPMLab602, topographical parameters for each scan were measured: average roughness ( $R_a$ ), root-mean square roughness ( $R_{RMS}$ ), average height ( $H_{av}$ ) and maximum range in z-direction (MaxR). The average and standard deviation were calculated, and the statistical analysis (a paired t-test) was made.

## Results and discussion

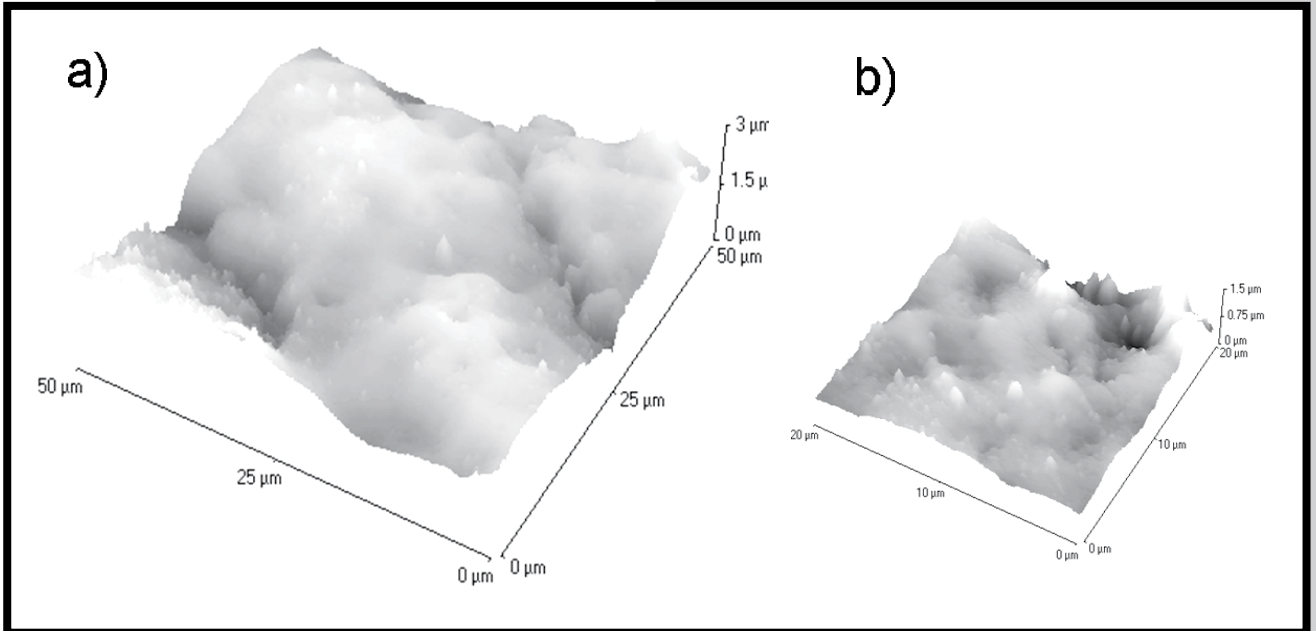
FIGURE 1 presents two parts of the tooth: control and after bleaching for 48h. After treatment a colour of the tooth considerably improved. According to the Colour Standard Esthet X (Dentsply DeTrey) and the assignment described in our previous papers [4,5], a degree of colour for control sample was 17, while after bleaching it dropped to 4. Thus, an excellent improvement in 13 degree was achieved.

Topographical images of the enamel without and after bleaching are presented in FIGURES 2 and 3, respectively. At larger scan areas (e.g.  $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ ) (FIG.2a,3a)



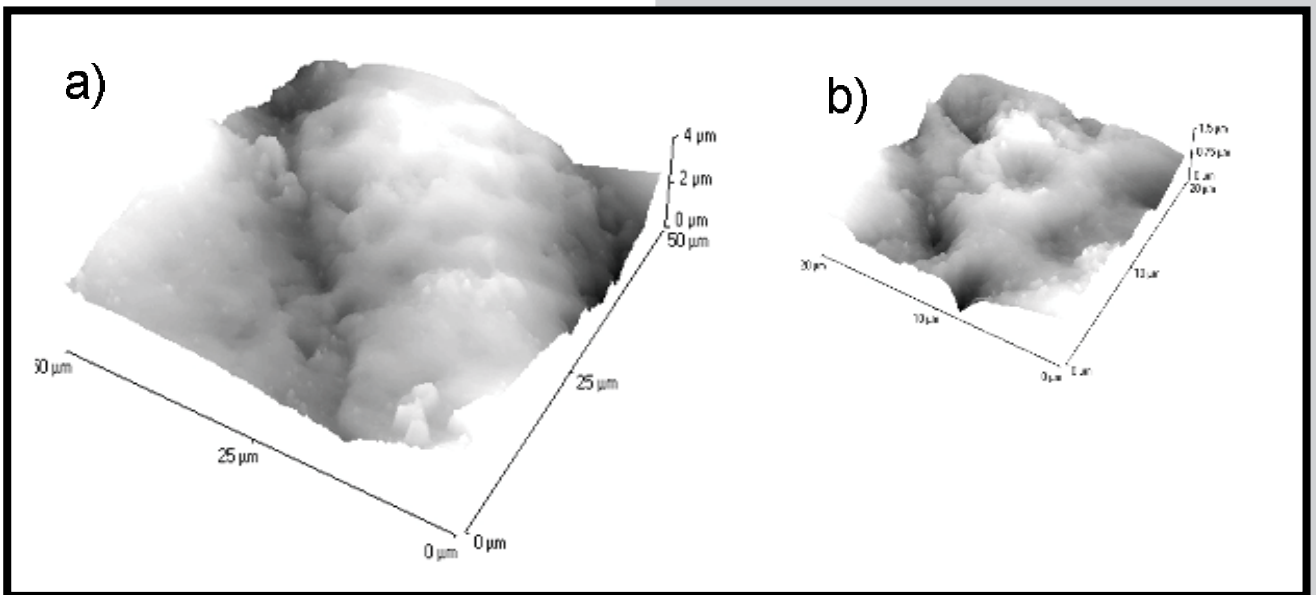
**RYS.1. Zdjęcie zęba wykonane aparatem cyfrowym: a) część kontrolna, b) część wybielana przez 48 godz.**

**FIG.1. Digital camera picture of the tooth: a) control part, b) after bleaching for 48h.**



RYS.2. Obrazy topograficzne kontrolnej powierzchni szkliwa zarejestrowane za pomocą AFM dla różnych obszarów skanowania: a) 50 μm x 50 μm, b) 20 μm x 20 μm. Wysokość w kierunku z wynosi odpowiednio 3 μm (a) i 1.5 μm (b).

FIG. 2. AFM topographical images of the control enamel for different scan areas: a) 50 μm x 50 μm, b) 20 μm x 20 μm. Note that z-range is equal to 3 μm (a) and 1.5 μm (b).



RYS.3. Obrazy topograficzne powierzchni szkliwa po wybieleniu zarejestrowane za pomocą AFM dla różnych obszarów skanowania: a) 50 μm x 50 μm, b) 20 μm x 20 μm. Wysokość w kierunku z wynosi odpowiednio 4 μm (a) i 1.5 μm (b).

FIG.3. AFM topographical images of the enamel after bleaching for different scan areas: a) 50 μm x 50 μm, b) 20 μm x 20 μm. Note that z-range is equal to 4 μm (a) and 1.5 μm (b).

Sample / Próbką	$R_a$ (nm)	$R_{RMS}$ (nm)	$H_{av}$ (μm)	MaxR (μm)
Control / Kontrola	390 (120)	430 (90)	1.6 (0.6)	3.5 (1.3)
After bleaching / po wybieleniu	350 (80)	480 (110)	1.8 (0.6)	3.7 (2.1)

$R_a$  - average roughness / średnia chropowatość,  $R_{RMS}$  - root-mean square roughness / chropowatość skuteczna,  $H_{av}$  - average height / średnia wysokość, MaxR - maximum range in z-direction / maksymalny zakres wysokości w kierunku z.

TABELA 1. Parametry topograficzne szkliwa bez i po kontakcie z żelą wybielającym. Wartości średnie i odchylenia standardowe dla 3 losowo wybranych miejsc.

TABLE 1. Topographical parameters of the enamel without and after contact with bleaching gel. Averages and standard deviations in parentheses from 3 randomly selected places.

W obrazach AFM przy mniejszych obszarach skanowania ( $20\mu\text{m}\times 20\mu\text{m}$ ) (RYS. 2b, 3b) widoczne są wyraźnie pryzmaty szklivne o średnicy od 4 do  $6\mu\text{m}$  średnicy i głębokości około  $1,5\mu\text{m}$ . Pryzmaty zbudowane są z kryształów hydroksyapatytów o średnicy  $70\text{nm}$  [8]. Zarówno w grupie kontrolnej, jak i po wybielaniu pryzmaty miały podobne wymiary.

Dla każdego zarejestrowanego obrazu wyznaczono parametry charakteryzujące topografię powierzchni szkliva takie jak: chropowatość średnia, chropowatość skuteczna, średnia wysokość elementów topograficznych i maksymalna wysokość elementów topograficznych w kierunku z. W TABELI 1 przedstawiono wartości średnie i odchylenia standardowe wyliczone dla 3 losowo wybranych obszarów ( $50\mu\text{m}\times 50\mu\text{m}$ ) na kontrolnej powierzchni szkliva i powierzchni szkliva po wybielaniu. Na podkreślenie zasługuje wysoka wartość odchylenia standardowego, co świadczy o wysokiej niejednorodności powierzchni szkliva.

Badanie szkliva zęba za pomocą AFM nie wykazało istotnych różnic pomiędzy parametrami topografii powierzchni szkliva przed i po jego wybielaniu. Hegedus i wsp. opisali zmiany powierzchni szkliva widoczne w obrazie AFM po 28h wybielania 10% nadtlaniem mocznika i 30% nadtlaniem wodoru. Wyciągnęli oni wnioski, że struktura szkliva po wybielaniu staje się mniej regularna, a bruzdy na powierzchni bardziej nierówne i głębsze [7]. Trzeba jednak zaznaczyć, że powyższe wnioski zostały wyciągnięte na podstawie obrazów topograficznych zarejestrowanych dla bardzo małych obszarów skanowania, tj.  $10\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$ . Wniosków nie poparto głębszą analizą chropowatości i innych parametrów topograficznych. Nasze obrazy (RYS. 2a, 3a) dowodzą, że na powierzchni szkliva można rozróżnić obszary o większej chropowatości, jak i powierzchnie bardziej gładkie, co pozwala na stwierdzenie, że wnioskowanie o zmianach topografii na podstawie niereprezentatywnych obrazów o wymiarach kilku mikrometrów, porównywalnych z pojedynczymi pryzmatami i znacznie mniejszych od perikymata, wydaje się być wysoce niewiarygodne.

## Wnioski

Badanie potwierdziło bardzo wysoką skuteczność żelu zawierającego 20% nadtlenu mocznika w wybielaniu szkliva zęba ludzkiego. Pomiary dokonane za pomocą mikroskopu sił atomowych wykazują, że 48-godzinny zabieg wybielania nie wpływa znacząco na topografię i chropowatość powierzchni szkliva.

grooves called perikymata are clearly seen. They can be easily observed under optical or scanning electron microscopy, as previously reported, but their depth cannot be measured with the use of those methods [6]. Perikymata are concentric lines being the end of incremental growth lines (striae of Retzius) marking the position of the developing enamel at approximately weekly intervals [8]. The depth of the perikymata measured from AFM images for both control and bleached samples was in the range of  $2-4\mu\text{m}$ . The distance between the grooves was  $30\mu\text{m}$ .

As follows from FIGURES 2b and 3b at lower scan areas (e.g.  $20\mu\text{m}\times 20\mu\text{m}$ ) enamel prisms ( $4-6\mu\text{m}$  in diameter and  $1.5\mu\text{m}$  in depth) are clearly distinguished. The prisms are build of apatite crystallites with a diameter of  $70\text{nm}$  [8]. The prisms in both control and bleached samples were of similar depth and size.

Topographical parameters including roughness, average height of the topographical features, and maximal range in z-direction were evaluated for all scanned areas. Data obtained for 3 randomly chosen places ( $50\mu\text{m}\times 50\mu\text{m}$  in size) for enamel without and after bleaching are gathered in TABLE 1. It is interesting to note that standard deviation value is quite large, indicating that the enamel surface is not homogenous. The statistical analyse (a paired t-test) showed no significant differences between bleached and control samples.

The AFM topography results of human enamel show that there is not statistically significant difference between topographical parameters of the enamel without and after bleaching. Hegedus et al. described surface changes using atomic force microscopy after 28h of bleaching with 10% carbamide peroxide and 30% hydrogen peroxide. It was concluded, that the enamel structure became more irregular and surface grooves became rougher and deeper after bleaching [7]. However it must be pointed out, that such conclusions was drawn only on topography pictures recorded for very small scan areas of  $10\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$  in size. The findings were not supported by deeper analysis of roughness and other topographical parameters. Our pictures [FIG. 2a, 3a] prove that on the surface of the enamel one can find the regions which are more rough, and also those which are more smooth. Thus, it seems to be inaccurate to draw conclusions on non-representative pictures having the x-y size of few micrometres, comparable to the size of individual prisms and much lower than perikymata.

## Conclusions

The study confirmed a very good efficiency of gel containing 20% of carbamide peroxide in whitening of the human tooth. Atomic force microscopy evaluation demonstrated that 48-hour bleaching did not significantly affect topography and roughness of the enamel.

## Piśmiennictwo

- [1] V.B. Haywood, H.O. Heymann. Nightguard vital bleaching. *Quintessence Int* 1989;20:173-6.
- [2] D.F. Murchison, D.G. Charlton, B.K. More. Carbamide peroxide bleaching: effects on enamel surface hardness and bonding, *Operative Dentistry* 1992;17:181-185.
- [3] A. Joiner. The bleaching of teeth: A review of the literature. *J Dentistry* 2006;34:412-419.
- [4] D. Koscielniak, M. Chomyszyn-Gajewska, E. Pamula. In vitro effect of carbamide peroxide gel bleaching agents on the microhardness of human enamel, *Eng Biomaterials* 2004;38-42:47-50.

## References

- [5] D. Kościelniak, E. Pamula, Cz. Paluszkiewicz, M.C homyszyn-Gajewska. Badania za pomocą spektroskopii w podczerwieni FTIR szkliva i zębiny po procesie wybielania. *Ceramika*. 2005;91(1):585-592.
- [6] D. Kościelniak, M. Chomyszyn-Gajewska, E. Pamula. Ocena bezpośredniego efektu wybielania zębów 10% i 20% żelem z nadtlaniem mocznika – badania in vitro, *Czas Stomatol* 2007;LX(4):231-239.
- [7] C. Hegedus, T. Bitstey, E. Flora-Nagy, G. Keszthelyi, A. Jenei. An atomic force microscopy study on the effect of bleaching agents on enamel surface, *J Dentistry* 1999;27: 509-515.