UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Igiene Dentale
Presidente: ***Prof. A. Putignano***

Studi sulla morfologia e le caratteristiche meccaniche di superficie dello smalto dentale dopo trattamento con diversi agenti sbiancanti: analisi al SEM e prove di durezza

Relatore: Chiar.ma

Prof.ssa **Giovanna Orsini**

Correlatore:

Dott. **Riccardo Monterubbianesi**

Tesi di Laurea di:

Greta Aurini

A.A. 2019/2020

“ Scegli un lavoro che ami e non dovrai lavorare

neppure un giorno in vita tua.”

Confucio

Alla mia famiglia che mi è stata accanto in tutti questi anni.

A mia madre Virginia, sempre vicina in ogni traguardo, mi hai insegnato a lottare e non arrendermi mai di fronte agli imprevisti della vita.

A mio padre Luciano, per avermi permesso di intraprendere questo percorso ed essermi stato sempre accanto, incoraggiandomi a non mollare mai.

A Davide, il mio amore, per avermi supportato ed incoraggiato in ogni momento. Per aver affrontato insieme a me questo cammino giorno dopo giorno, per avermi aiutato a superare tutti i momenti difficili e per aver festeggiato insieme ogni vittoria.

Alle mie amiche più care, per esserci state sempre e per aver condiviso insieme le gioie e i dolori in tutti questi anni, vi porto nel cuore dall'infanzia e sarete sempre il mio punto di riferimento.

A Laura, la mia coinquilina e compagna di studi, più di tutti è stata capace di capirmi e sostenermi in questo percorso.

A tutti voi dedico l'immensa gioia che provo nel tagliare questo traguardo.

SOMMARIO

INTRODUZIONE …… 1

1. SMALTO …….. 3

1.1 STRUTTURA DELLO SMALTO…….……. 3

2. DISCROMIE ……...…… 6

2.1 DISCROMIE DOVUTE A FATTORI ESTRINSECI……. 7

2.2 DISCROMIE DOVUTE A FATTORI INTRINSECI…….……. 8

2.2.1 PATOLOGIE CHE INDUCONO DISCROMIE……..…… 9

3. AGENTI SBIANCANTI …… 13

3.1 STORIA DEGLI AGENTI SBIANCANTI…….…… 14

3.2 CLASSIFICAZIONE …….…… 16

3.2.1 SBIANCAMENTO DOMICILIARE……..……. 16

3.2.2 SBIANCAMENTO PROFESSIONALE……..…… 20

3.3 TIPI DI AGENTI SBIANCANTI……..……..….. 21

3.4 MECCANISMO D'AZIONE …….. 23

3.5 METODI PER ACCELERARE IL PROCESSO DI SBIANCAMENTO….……. 24

3.6 EFFETTI INDESIDERATI E COLLATERALI …….….. 26

4. EFFETTI DEGLI AGENTI SBIANCANTI SULLA SUPERFICIE E SULLA STRUTTURA DELLO SMALTO …… 29

5. NANOIDROSSIAPATITE ……..... 32

5.1 UTILIZZO NELL'IMPLANTOLOGIA …….…….... 33

5.2 UTILIZZO NELL'IPERSENSIBILITÀ DENTINALE…….…….... 35

5.3 UTILIZZO NELLO SBIANCAMENTO……...…..... 35

5.4 UTILIZZO NELLA PREVENZIONE DELLA CARIE……..……..… 36

6. MICROSCOPI ELETTRONICI…….……... 37

7. DUREZZA…….……. 39

8. PARTE SPERIMENTALE……..…….. 43

8.1 OBIETTIVO ……..…….. 43

8.2 MATERIALI E METODI…… 43

8.2.1 PREPARAZIONE DEL CAMPIONE…….……. 43

8.2.2 PROCEDURE DI SBIANCAMENTO……...… 44

8.2.3 APPARECCHIATURE UTILIZZATE ……..…….. 45

9. RISULTATI…… 48

9.1 RISULTATI AL TEST DI VICKERS……... 48

9.2 RISULTATI AL SEM …… 48

10. DISCUSSIONE…….…... 54

11. CONCLUSIONE…….…. 56

BIBLIOGRAFIA

INTRODUZIONE

Secondo W. Pasini (Pasini e Haynal, 1992) "La bocca è una zona a forte valenza sensoriale ed emotiva; essa rappresenta un contenitore, attraverso il quale passano i primi legami affettivi e simbolici; è dunque un importante mezzo per rapportarci con il mondo che ci circonda".

Infatti nella società di oggi una bocca sana con denti ben allineati, di forma regolare e di colore bianco brillante, esprime in generale, condizioni di benessere fisico, oltre che utile ad incrementare rapporti interpersonali e suscita simpatia. Al contrario, denti macchiati, ingialliti e mal posti, colpiscono negativamente l'interlocutore.

L'odontoiatra e l'igienista esercitano le loro professioni in un ambito di notevole rilevanza relazionale, che va oltre il ruolo di tutela e miglioramento degli aspetti morfologici e funzionali dell'organo dentale. Grazie allo sviluppo di nuove tecnologie e di nuovi trattamenti le figure dell'odontoiatra e dell'igienista sono in grado di ridare un "sorriso" armonioso, aumentando così l'autostima del paziente, aiutandolo spesso a ritrovare un equilibrio psicologico che magari aveva smarrito. In questi ultimi anni, proprio a causa della maggiore sensibilizzazione del paziente sull'importanza del sorriso, molte industrie cosmetiche in generale e quelle dentali in particolare, stanno sempre più sviluppando nuovi e numerosi prodotti innovativi in questo fiorente settore.

Sempre più persone oggi giungono ai nostri studi odontoiatrici e ci chiedono di migliorare l'estetica del loro sorriso e di rendere i loro denti più "bianchi". Oltre agli effetti sul colore dei denti, l'applicazione di sostanze sbiancanti può avere effetti negativi specialmente se

si superano i tempi di contatto previsti dai protocolli applicativi consigliati dalle ricerche della letteratura scientifica internazionale.

Studi hanno mostrato cambiamenti morfologici della superficie dello smalto dopo lo sbiancamento dei denti, con maggiore rugosità superficiale (Bitter e Sanders, 1993) e una ridotta durezza superficiale con alterazioni negative del modulo elastico dello smalto, (Cvikl et al. 2016) frammentazione casuale della matrice proteica dello smalto (Elfallah et al. 2015), fessure più profonde (Ernst et al. 1996), e un aumento della corrosività superficiale dopo lo sbiancamento con perossido di carbammide al 10% (Spalding et al. 2003).

Lo scopo di questa ricerca è quello di valutare il cambiamento della durezza ed alterazioni morfologiche superficiali dello smalto con i diversi agenti sbiancanti contenenti o meno nanoidrossiapatite.

1. SMALTO

Lo smalto è un tessuto molto particolare: né riparabile né rimpiazzabile. Infatti, gli ameloblasti, cellule che secernono lo smalto, hanno un ciclo vitale legato al periodo di formazione del tessuto; una volta esaurita la funzione di produzione del rivestimento della corona, degenerano e pertanto il tessuto definitivo è acellulare. Lo smalto è il tessuto più duro che si trova nell'organismo, ma al contrario di quanto si credeva un tempo, esso può presentare un certo grado di irregolarità superficiale, evidenziabili con l'analisi al microscopio elettronico. Esso è costituito, per la maggior parte, da sali minerali cristallizzati, fosfato di calcio (idrossiapatite) per il 96% e da una esigua quota organica proteica e acqua per il 4%. Il 90% delle proteine è rappresentato da un gruppo eterogeneo di amelogenine a basso peso molecolare. Il restante 10% consiste in ameloblastine ed enameline. Queste proteine non collageniche, si pensa che possano avere un ruolo importante nel processo di mineralizzazione della matrice extracellulare. Può resistere al carico masticatorio, e, grazie all'elasticità della dentina sottostante, non si frattura facilmente. È solubile agli acidi, come dimostrato dalla demineralizzazione promossa dagli acidi del metabolismo dei batteri alla base della carie.

Il colore dei denti non è dovuto allo smalto, ma alla sottostante dentina: infatti lo smalto è un tessuto traslucido il cui colore varia dal giallo luminoso al grigio chiaro.

1.1. STRUTTURA DELLO SMALTO

I cristalli di idrossiapatite costituiscono l'unità fondamentale dello smalto e si trovano sotto forma di prismi (da 4 a 13 milioni secondo i denti). Questi prismi occupano in lunghezza l'intero spessore dello smalto, raggiungendo il massimo sviluppo nelle cuspidi

e nei bordi incisivi (1-2 mm). Gli ameloblasti sono cellule di origine epiteliale, polarizzate, deputate alla formazione dello smalto dentale organizzato in prismi, e possiedono lunghe propaggini cellulari (processi del Tomes) che potrebbero essere responsabili dell'orientamento dei prismi. Quest'ultimi sono costituiti da ammassi di cristalli di idrossiapatite, strettamente stipati, ma ordinatamente organizzati, che si estendono quasi perpendicolarmente dalla giunzione smalto-dentinale fino alla superficie del dente, mantenendo un decorso fra loro parallelo ma ondulato. La loro forma oggi viene considerata non proprio prismatica, bensì cilindrica (in inglese si definiscono "rod"), tuttavia la denominazione di prismi è ancora in uso. Ogni singolo cilindro poggia su due cilindri sottostanti come a formare una sorta di struttura ad incastro. I cristalli di idrossiapatite sono pressocché esagonali e sono larghi 60-70 nm e spessi 25-30 nm. La loro disposizione risulta parallela all'asse longitudinale del prisma stesso nel suo corpo centrale mentre nelle zone più periferiche si dispongono formando angoli di ampiezza sempre maggiore, esibendo quindi un aspetto diverso nelle varie sezioni esaminate per lo studio della loro posizione (*Figura 1*). Tra i prismi si trova lo smalto interprismatico, in inglese "inter-rod" (*Figura 2*), che differisce dallo smalto prismatico per il diverso orientamento dei cristalli, rivolti in tutt'altra direzione. Esso è caratterizzato da cristalli con una minore densità, disposti con una maggiore organizzazione rispetto alla guaina del prisma: essi sono posizionati formando un angolo di 80 gradi rispetto all'asse dello stesso. Nello spazio interprismatico viene deposta ulteriore idrossiapatatite. In alcune zone lo smalto non è perfettamente compatto, bensì presenta fessure di materiale organico che giocano un ruolo importante nella cariogenesi.

Le cuspidi presentano una maggiore mineralizzazione rispetto allo smalto cervicale e, a livello dei solchi, lo spessore che separa la dentina dall'ambiente esterno può affievolirsi fino ad esporre direttamente la dentina.

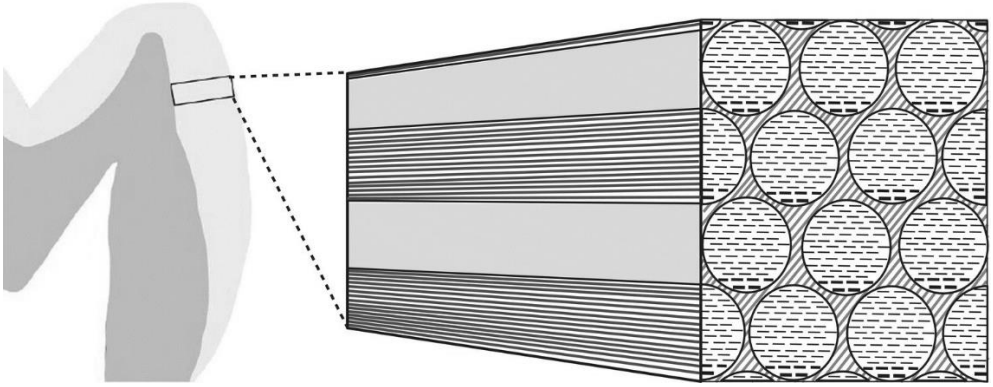


Figura 1: prismi e smalto interprismatico

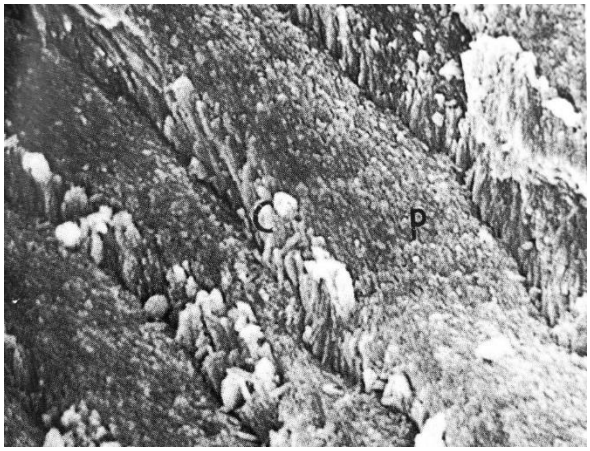


Figura 2: osservazione al SEM dello smalto interprismatico (C) e dei prismi dello smalto(P)

2. DISCROMIE

Il colore di un dente è influenzato dalla colorazione intrinseca del dente stesso e dalla presenza di macchie estrinseche che si possono formare sulla superficie dei denti. La diffusione e l'assorbimento della luce all'interno dello smalto e della dentina danno luogo al colore intrinseco dei denti poiché lo smalto è relativamente traslucido, le proprietà della dentina possono svolgere un ruolo importante nel determinarne il colore

Il colore dei denti dipende dalla quantità e dalla qualità della luce riflessa quando "colpisce" lo smalto dei denti e principalmente dal suo spessore e dalla presenza o meno di sostanze cromofore all'interno della dentina. Le sostanze cromofore e/o cromogene possono essere depositate nella struttura della dentina nei vari periodi della sua formazione o attraverso vie ematiche o attraverso vie esterne. Le discromie esterne, come i depositi coloranti da cibi e bevande o da materiali, possono essere trattati e rimossi con tecniche di spazzolamento e di trattamento chimico a domicilio o nello studio odontoiatrico con tecniche di sbiancamento professionali, le discromie intrinseche richiedono interventi professionali a volte combinati tra l'uso di mezzi ablativi, restaurativi ed ossidativi, come lo sbiancamento.

I depositi di cromogeno producono macchie estrinseche sulla superficie dello smalto e sulla pellicola acquisita (Minoux e Serfaty, 2008). I cambiamenti di colore su una superficie sono dovuti all'accumulo di molecole organiche costituite da catene coniugate con legami singoli o doppi (Falegname 2004; Addy e Moran, 1995). Gli agenti sbiancanti scindono queste catene per ossidazione e distruggono i doppi legami nella catena coniugata (Kirk-Othmer, 2004).

Per discromie dentali si intendono tutte le alterazioni del colore del dente che possono presentarsi come macchie o su tutta la superficie esposta dei denti. Inoltre possono variare dal colore giallo al marrone oppure presentarsi come zone chiare rispetto allo smalto circostante. Possono essere causate da fattori estrinseci o intrinseci.

2.1 DISCROMIE DOVUTE A FATTORI ESTRINSECI

Le macchie estrinseche tendono a formarsi in aree del dente che sono meno accessibili agli spazzolini e all'azione abrasiva dei dentifrici e sono spesso causate dal fumo, dall'assunzione di alimenti ricchi di tannino e dall'uso di agenti cationici quali clorexidina o da sali di metalli come stagno e ferro.

I fattori estrinseci sono responsabili della colorazione esogena dell'elemento dentario, essi sono: la pellicola acquisita, i cibi, le bevande, il fumo, la placca, il tartaro e i prodotti farmacologici topici, la Clorexidina. La pellicola acquisita presente nello strato più superficiale del dente, contiene alcune sostanze proteiche che possono interagire, mediante le loro cariche positive, con le sostanze cromofore cariche negativamente, presenti nei cibi e nelle bevande; è questo uno dei meccanismi di discolorazione degli elementi dentali, misconosciuto nella sua eziologia, ma che rappresenta il primo fattore di mutamento cromatico in senso temporale.

Secondo un articolo di Nathoo pubblicato nel 1997 è possibile classificare le classificazioni del dente in estrinseche ed intrinseche.

Le discromie estrinseche sono causate da pigmentazioni depositate sulla superficie del dente e vengono a loro volta suddivise in tre sottogruppi:

- Tipo-N1 in cui il cromogeno si lega alla superficie del dente favorendo la formazione di una pigmentazione con la stessa colorazione del cromogeno stesso (cibi e bevande come caffè, vino rosso, liquirizia, tè, carote ecc..);
- Tipo-N2 in cui il cromogeno cambia il colore dopo essersi depositato sull'elemento e ciò può essere causato da una modificazione di tipo chimico (macchie giallastre in aree interprossimali dei denti);
- Tipo-N3 sono quelle che si formano a causa di reazioni chimiche che determinano la discolorazione di sostanze inizialmente incolori e depositate sulla superficie del dente (clorexidina, cibi ad elevato contenuto di carboidrati, floruro stannoso).

2.2 DISCROMIE DOVUTE A FATTORI INTRINSECI

I fattori intrinseci sono responsabili della pigmentazione endogena, e sono dunque presenti all'interno del dente. Possono essere dovuti ad assunzione di antibiotici e composti fluorati, causati da traumi, emorragie pulpari (l'emoglobina si trasforma in meta emoglobina colorando di nero il dente), incompleta otturazione della camera pulpare durante un trattamento endodontico, attribuiti a normali processi di senescenza del nervo o del flusso sanguigno (recessione, calcificazione).

La fisiologica colorazione dei denti dipende prevalentemente dallo spessore dello smalto: smalto spesso = denti più bianchi; smalto meno spesso = denti più gialli.

È necessario valutare la reale natura della discromia, con un'accurata anamnesi al fine di mettere in atto il trattamento estetico più idoneo a risolvere il problema. Le discromie di natura esogena sono più facilmente trattabili mediante tecniche di detersione superficiale, rispetto a quelle di natura endogena, che risultano essere più complesse e richiedono procedimenti più laboriosi. Inoltre è altresì molto importante considerare l'età del

soggetto: i denti giovani si sbiancano più facilmente di quelli dell'adulto, forse grazie alla maggiore accessibilità degli spazi interprismatici. Inoltre le pigmentazioni neoformate sono più facilmente eliminabili rispetto a quelle di lunga durata (Rodriguez, 1998; Pinborg, 1970) .

La classificazione delle discromie intrinseche secondo l'articolo di Nathoo del 1997 è la seguente: le discromie intrinseche sono causate dalla presenza di pigmentazioni all'interno dello smalto e/o della dentina e possono essere suddivise a seconda del periodo di azione della noxa patogena in pre e post eruttive.

- Tetracicline, fluorosi, disordini ematologici e anomalie di struttura quali amelogenesi e dentinogenesi imperfetta sono tutti agenti che possono causare discromie intrinseche pre eruttive;
- Traumi, terapie endodontiche incongrue e invecchiamento possono causare discromie intrinseche post eruttive.

2.2.1 PATOLOGIE CHE INDUCONO DISCROMIE

Le patologie che causano alterazioni cromatiche dentali possono essere classificate in base alla loro localizzazione e alla tipologia strutturale di discolorazione durante la formazione dello smalto (Amengual , 2002):

Fluorosi: può comparire quando vengono assunte quantità di fluoro maggiori di 1 ppm (una parte per milione) durante la formazione dello smalto sia dei denti decidui che dei permanenti. La colorazione, in questi casi, varia da piccole aree bianche fino a pigmentazioni marroni e nerastre;

Amelogenesi imperfetta: anomalia ereditaria che presenta diverse manifestazioni cliniche, classificabili in quattro gruppi principali: ipomaturativo, ipoplasico (Reid e MC Brief, 2000), ipocalcificato, misto, associato a taurodontismo. La colorazione amelogenetica varia dal bianco al giallo -marrone;

Difetti dello sviluppo dello smalto: denominazione con la quale la FDI ha individuato una serie di alte razioni cromatiche e/o morfo-strutturali congenite. Le cause possono essere distinte in sistemiche e locali:

sistemiche: alterazioni cromosomiche, infezioni, malattie ereditarie come l'epidermiolisi bollosa, mucopolisaccaridosi, malnutrizione, alterazioni metaboliche, alterazioni neurologiche, malattie esantematiche;

locali: traumatismo degli elementi decidui con compromissione del dente permanente, infezioni locali, alterazioni durante lo sviluppo del germe (per es. dente di Turner, caratterizzato da un isolotto cementoide che si pigmenta facilmente); idiopatici

Discolorazione nella fase pre-eruttiva

La causa principale della discolorazione in fase pre-eruttiva è data da:

- somministrazione di tetracicline (discromie dal giallo brillante fino al marrone scuro), odontodisplasia regionale, porfiria eritropoietica congenita (colorazione marrone scuro/rossastra). Discromia da tetraciclina può essere pre-eruttiva, quando è causata da consumo di questo antibiotico durante il secondo o terzo mese di gravidanza, o post-eruttiva durante i primi anni (6-8 anni) e l'entità e la qualità dell'alterazione (grigio-marrone/giallo) dipende dalla dose ingerita (Olivi G. e Olivi M., 2015). Queste pigmentazioni sono le più difficili da trattare.

Discolorazione durante la formazione della dentina

- Dentinogenesi imperfetta: alterazione dello sviluppo dentario, che si trasmette come carattere autosomico dominante, si manifesta con dentina opalescente, demineralizzata, di colore blu cupo o marrone. Porta ad una rapida usura degli elementi dentari.
- Displasia dentinale: alterazione apparentemente ereditaria, caratterizzata da obliterazione pulpare, anomalia di sviluppo delle radici e tendenza a lesioni periferiche. Precoce perdita degli elementi dentari forse a causa delle patologie periapicali. Il dente appare più opaco, di colorazione giallastra. Iperbiluribinemia: provocata da eccessiva concentra zione di bilirubina nel sangue. I denti appaiono di colorazione giallo/verde.
- Malattie ematiche: anemia ferropenica (colorazione blu/bianca), anemia depranocitica (colorazione marrone), talassemia (colorazione marrone), porfiria eritropoietica congenita (colorazione marrone scuro/ rossastra).
- Malattie endocrine: ipotiroidismo (colorazione marrone), ipertiroidismo (colorazione bianco/blu), ipoadrenalismo (colorazione verdastra), iperadrenalismo (giallo chiaro), alcaptonuria (colorazione marrone).

Discolorazione dopo l'eruzione del dente

Le cause di discolorazione in fase post eruttiva del dente possono essere le seguenti:

- Discolorazione esogena.
- Placca dentale: causata da sedimenti di diversa natura.
- Microbica: batteri e funghi che possono portare a diverse pigmentazioni.
- Alimentare: spinaci, rape, ciliegie, carote, ecc..

- Tabagismo.
- Occupazione lavorativa: lavorazione di metalli.
- Carie superficiali e cavità.
- Invecchiamento.
- Discolorazione endogena.
- Necrosi pulpare.
- Emorragia pulpare.
- Calcificazione pulpare periferica.
- Applicazione intracoronale di fluoruro di stagno.
- Deterioramento del materiale otturante.
- Otturazione provvisoria con cemento provvisorio a base di rame.
- Calcificazione pulpare periferica.

3. AGENTI SBIANCANTI

Per risolvere le discromie dentali (estrinseche ed intrinseche) si possono usare vari sistemi di sbiancamento professionale che possono essere raggruppati in due categorie principali: sbiancamento meccanico e sbiancamento chimico.

Con le tecniche di sbiancamento di tipo meccanico è possibile prevenire l'accumulo di pigmentazioni e rimuovere le macchie discromiche estrinseche che sono presenti sulla superficie dentale(tartaro, placca, nicotina ecc.), vengono utilizzate la strumentazione ultrasonica e manuale insieme a varie sostanze abrasive che, in forma di polveri microfini, vengono inglobate all'interno di paste dentifrice, o altri materiali (gomma siliconata) ad uso professionale. Tra le sostanze abrasive sono annoverate: carbonato di calcio ($CaCO_3$), idrogenocarbonato (HCO_3), fosfato di calcio bibasico (USP), biossido di silice (SiO_2), allumina (Al_2O_3), allumina idrata, metafosfato di sodio ($NaPO_3$). La seconda categoria, sbiancamento chimico sfrutta le proprietà di particolari principi attivi. Normalmente viene eseguita utilizzando agenti sbiancanti con concentrazioni elevate per disgregare i gruppi cromogeni responsabili della pigmentazione dentaria, rendendo la superficie dei denti più bianca. Con lo sbiancamento professionale i denti possono essere sbiancati con successo utilizzando agenti sbiancanti in grado di disgregare i gruppi cromofori responsabili della pigmentazione dentaria, rendendo la superficie esterna dei denti più bianca (perossido di idrogeno, perossido di carbamide, acido borico, solfato di sodio, perborato di sodio) altamente concentrati (30-35%). Le procedure alla poltrona sembrano rappresentare una valida alternativa alle applicazioni domiciliari soprattutto nel caso di macchie molto intense, denti singoli decolorati, mancanza di compliance del paziente o se viene richiesta, per una soluzione rapida del problema.

3.1 STORIA DEGLI AGENTI SBIANCANTI

Al fine di aumentare l'estetica del sorriso già gli antichi Egizi e i Fenici inventarono lo sbiancamento dentale combinando un trattamento con carbonato di potassio e luce solare. Gli antichi romani aumentavano la lucentezza dei denti bianchi utilizzando materiali compositi naturali basati su cera (Olivi G. e Olivi M., 2015).

Durante il secolo XIV fili metallici e acido nitrico sono stati usati insieme, fino al XVIII secolo, quando la luce solare è stata usata ancora una volta combinando carbonato di potassio e acido lattico (Olivi G. e Olivi M., 2015).

Alla fine del XIX secolo, grazie agli sviluppi nella chimica, è stato prodotto un nuovo composto: l'acido ipocloroso, il quale in forma di sale, ha rappresentato un efficiente sistema di sbiancamento industriale per oltre un secolo (Olivi G. e Olivi M., 2015).

Nel 1884, per la prima volta, A.W. Halan ha utilizzato una concentrazione di perossido di idrogeno (H_2O_2) come un sistema di sbiancamento e l'elettricità, creando pyrozone. Questa soluzione, avendo una bassa tensione superficiale, era in grado di penetrare i tubuli dentinali, ma con notevoli rischi e controindicazioni (infiammabilità e cattivo odore).

Nel 1919 C.H. Abbot creò il Superoxol , una soluzione con perossido di idrogeno 30% e acqua distillata ed attivata da una fonte di calore.

Nel 1924 l'uso di una soluzione satura di perborato di sodio e perossido di idrogeno è stato proposto per l'idratazione dei denti prima del trattamento con il Superoxol e la fonte di calore (Addy e Moran, 1995). Altri autori hanno proposto l'utilizzo di una fonte luminosa per accelerare la reazione di sbiancamento attivando l'agente sbiancante.

Nel 1961 una miscela di perborato di sodio ed acqua sono stati utilizzati nei denti devitalizzati; nel 1963 Nuttling e Poe hanno sostituito l'acqua nella miscela con il Superoxol (*Walking bleaching technique*) senza l'utilizzo di luce o riscaldamento (Olivi G. e Olivi M., 2015).

Nel 1983 la dissociazione dell'acqua ossigenata in ambiente alcalino è stata realizzata in presenza di un catalizzatore, generando radicale perossido. Nel 1989 è stata proposta una tecnica di sbiancamento domiciliare, basata sul perossido di carbamide (Nightguard bleaching), ed è ancora in uso (Haywood e Heymann, 1989; Haywood 1992).

Nella Figura 3 è possibile osservare l'evoluzione nel tempo degli agenti sbiancanti.

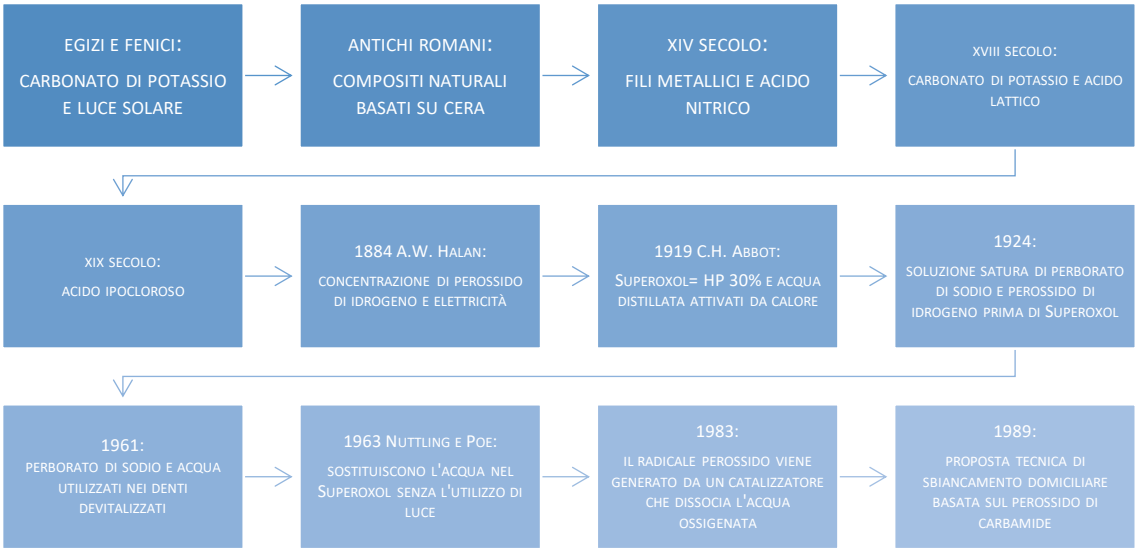


Figura 3: Evoluzione temporale degli agenti sbiancanti

3.2 CLASSIFICAZIONE

I metodi per la rimozione delle discromie dentarie sono molteplici. Gli approcci possono diversificarsi a seconda della natura della discromia, dal suo grado e dalle condizioni dell'elemento dentario (sano, vitale, non vitale, cariato, ricostruito): possiamo distinguere gli approcci domiciliari da quelli professionali.

Per il trattamento domiciliare sul mercato sono disponibili una notevole quantità di agenti sbiancanti da usare nelle pratiche di igiene orale quotidiane quali: dentifrici, collutori, fili interdentali e spazzolini sbiancanti, gomme da masticare e specifici prodotti per lo sbiancamento domiciliare di denti vitali mentre per il trattamento professionale gli approcci sono distinti in detersione professionale della superficie dentale, sbiancamento professionale dei denti vitali e non vitali, ricopertura degli elementi dentali con dispositivi conservativi o protesici.

3.2.1 SBIANCAMENTO DOMICILIARE

Con lo sbiancamento domiciliare si intendono tutte le tecniche che prevedono l'utilizzo da parte del paziente di sostanze che abbiano proprietà sbiancanti. I prodotti più utilizzati per queste procedure sono i gel a base di perossido di carbamide a basse concentrazioni (10%, 15% o 20%). La concentrazione 10% è quella più utilizzata perché produce minori effetti collaterali infatti diminuisce al minimo gli l'ipersensibilità dentinale. Questi prodotti forniti in pasta o in gel contenuto dentro una siringa vengono consegnati al paziente insieme ad una mascherina personalizzata dove verranno applicati, tale mascherina dovrà essere utilizzata dal paziente a seconda le indicazioni del produttore in base al tipo di agente sbiancante consigliato.

Altri trattamenti consigliati per la prevenzione a macchie estrinseche sono:

Dentifrici sbiancanti

I dentifrici che sostengono di avere proprietà sbiancati rappresentano il 40-50% dei prodotti presenti sul mercato e raramente contengono perossido di idrogeno o di carbamide o qualsiasi altro tipo di agente sbiancante. La loro capacità di rimuovere le macchie è legata esclusivamente alla quantità di abrasivi contenuti nella loro formulazione, che è maggiore di quella presente nelle normali paste dentifricie. Sono prodotti che rimuovono solo le pigmentazioni superficiali estrinseche. Ovviamente, l'abrasività di questo tipo di dentifrici, che sono oggi formulati per un uso quotidiano deve essere sempre tale da evitare un'usura eccessiva dello smalto e della dentina.
Anche se i dentifrici sbiancanti possono prevenire la formazione di macchie estrinseche sulla superficie dentale, l'effetto sbiancante ottenuto con questi prodotti non sembra essere clinicamente significativo se paragonati con gli agenti sbiancanti professionali o domiciliari a base di perossido di idrogeno o di carbamide. Inoltre nei dentifrici sbiancanti esiste il rischio di rigare o abradere eccessivamente lo smalto e la dentina, aumentando il rischio di fenomeni cariogenici e di sensibilità dentale, specie in caso di colletti scoperti.
Il potere abrasivo del dentifricio è collegato agli ingredienti, ma soprattutto alla grandezza delle particelle ed alla forma dei microgranuli.
Secondo l'American Dental Association (ADA), per non arrecare danni allo smalto, l'indice di abrasività di un dentifricio deve variare, nella scala RDA (acronimo di Relative Dentin Abrasivity), da 50 a 200.

In funzione dell'abrasività i dentifrici sono divisi in quattro fasce:

- Dentifrici a bassa abrasività (da 60 a 70)

- Dentifrici a media abrasività (da 70 a 100)
- Dentifrici a moderata abrasività (da 100 a 120).
- Dentifrici ad alta abrasività (da 120 a 200)

Un valore di RDA troppo elevato (superiore a 200) può causare, nel tempo, danni a livello dello smalto. L'American Dental Association consiglia di non utilizzare dentifrici con abrasività superiore a 30 RDA in caso di dentina esposta sensibile; in presenza di denti e gengive sane, il coefficiente di abrasività ideale non dovrebbe comunque essere superiore a 75 RDA.

Collutori sbiancanti

I collutori sbiancanti sono apparsi recentemente sul mercato e i produttori pubblicizzano la loro capacità di combattere la placca e la formazione di macchie sulle superfici dentarie. Generalmente, è presente una bassa concentrazione di perossido di idrogeno (1,5%) e l'esametafosfato di sodio può essere incluso nella formula-zione per proteggere la superficie dei denti dal deposi-to di nuove macchie.

Fili interdentali, spazzolini e gomme da masticare

Recentemente, i produttori di prodotti per l'igiene orale hanno sviluppato altri metodi con presunte proprietà sbiancanti. Il filo interdentale sbiancante è stato introdotto per promuovere la riduzione delle macchie intorno alle aree interprossimali e subgengivali. La capacità di rimuovere le macchie è associata alla presenza di silice nella composizione, che promuove una abrasione superficiale durante l'applicazione nella regione interdentale. Tuttavia, nessuna relazione clinica è attualmente disponibile per confrontare

l'efficacia di questi dispositivi con quelli non sbiancanti. Gli spazzolini manuali o elettrici, oltre ad essere utilizzati per le manovre di igiene orale domiciliare, possono essere utilizzati anche per mantenere l'effetto sbiancante o prevenire le macchie estrinseche dopo trattamenti di sbiancamento. Una capacità migliore di mantenimento dell'effetto sbiancante è stata riportata per gli spazzolini elettrici rispetto a quelli manuali. Le gomme da masticare con esametafosfato di sodio (4,0-7,5%) sono state introdotte come prodotti sbiancanti per uso domestico con la pretesa di impedire la formazione di macchie estrinseche sui denti. Uno studio del 2006 ha evidenziato come l'uso di una gomma da masticare contenente esametafosfato può determinare una riduzione della formazione di macchie rispetto ad una gomma normale.

Strisce sbiancanti (whitening strips)

Le whitening strips sono state create per evitare l'uso di mascherine preformate sulla bocca del paziente. Le strisce contenenti agenti sbiancanti aderiscono ai denti anteriori e rilasciano il principio attivo durante periodi di tempo relativamente brevi (da 5 a 60 minuti), e possono essere applicate una volta o due volte al giorno. Il principio attivo è il perossido di idrogeno in basse concentrazioni (da 5 a 14%). Studi hanno dimostrato che vi è un aumento dell'effetto sbiancante quando le strisce sono utilizzate per 28 giorni rispetto ai 14 giorni, e che l'effetto sbiancante può essere mantenuto per circa 2 anni. Nonostante l'effetto sbiancante sia ottimale, la sensibilità dei denti è più pronunciata di quella osservata quando vengono utilizzate le mascherine preformate. L'apparente vantaggio di questi prodotti è soprattutto nel costo, ovviamente più basso rispetto alle tecniche professionali, e la maggiore facilità nel reperirli, infatti si possono trovare nei supermercati, nelle farmacie e su internet. Nonostante questi vantaggi, sono prodotti che vengono utilizzati da parte del paziente senza alcun controllo da parte dell'odontoiatra o

dell'igienista e quindi rischiano di non essere adeguati alle loro esigenze. Il paziente infatti può non essere a conoscenza di determinate patologie presenti nel suo cavo orale (recessioni, abrasioni, carie, ricostruzioni in composito) che possono compromettere sia la salute dei suoi denti sia il risultato estetico finale. Talvolta si assiste ad uno sbiancamento parziale di taluni elementi proprio a causa di una patologia sopra elencata.

3.2.2 SBIANCAMENTO PROFESSIONALE

Le sedute di igiene professionale sono delle tecniche di sbiancamento di tipo meccanico infatti grazie all'utilizzo di sostanze abrasive contenute nelle paste profilattiche e l'utilizzo di strumentazione ultrasonica e manuale è possibile prevenire l'accumulo di pigmentazioni e rimuovere le macchie discromiche estrinseche che sono presenti sulla superficie dentale(tartaro, placca, nicotina ecc.). Lo sbiancamento professionale è una procedura di tipo chimico che sfrutta le proprietà di particolari principi attivi. Normalmente viene eseguita utilizzando agenti sbiancanti con concentrazioni elevate per disgregare i gruppi cromogeni responsabili della pigmentazione dentaria, rendendo la superficie dei denti più bianca. Con lo sbiancamento professionale i denti possono essere sbiancati con successo utilizzando agenti sbiancanti (perossido di idrogeno, perossido di carbamide, acido borico, solfato di sodio) altamente concentrati (30-35%). Le procedure alla poltrona sembrano rappresentare una valida alternativa alle applicazioni domiciliari soprattutto nel caso di macchie molto intense, denti singoli decolorati, mancanza di compliance del paziente o se viene richiesta, per una soluzione rapida del problema. Il trattamento professionale può essere applicato anche come una sorta di terapia di attacco,

in modo da avviare il processo di sbiancamento che può essere proseguito dal paziente con le tecniche domiciliari.

3.3 TIPI DI AGENTI SBIANCANTI

Le formulazioni più recentemente utilizzate sono a base di perossido di carbamide, perossido di idrogeno e perossido di calcio. Queste metodiche impiegano un agente sbiancante che, attraverso una reazione chimica, è in grado di disgregare i gruppi cromofori responsabili della pigmentazione dentaria, rendendo la superficie esterna dei denti più bianca. Le tecniche utilizzate sono dunque basate su processi ossidativi; questi sono in grado di spezzare i doppi legami dei composti organici posti all'interno della matrice dello smalto, impedendo così l'emissione del colore.

Perossido di idrogeno

I perossidi sono un gruppo di composti inorganici che contengono un doppio legame o=o; il più impiegato in odontoiatria è il perossido di idrogeno. In soluzione è un composto instabile e si decompone liberando ossigeno gassoso secondo la seguente reazione:

$$H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$$

La sua forma più stabile risulta essere quella indissociata, che viene resa stabile mediante introduzione di agenti chelanti capaci di legare gli ioni metallici liberi. La maggior efficacia del perossido di idrogeno si ha intorno ad un pH di 9,5 -10,8; in quanto durante la ionizzazione del perossido di idrogeno, tamponato a questi valori di pH, viene prodotto un maggiore numero di radicali liberi HO_2 del peridrossile, che aumentano l'effetto sbiancante rispetto ad altri livelli di pH. Il processo di sbiancamento con questo agente,

viene accelerato in presenza di luce e calore. Poiché smalto e denti sono permeabili ai perossidi grazie al fatto che lo smalto presenta sulla sua superficie dei micropori, che si prolungano negli spazi interprismatici, si ottiene una rapida penetrazione di queste sostanze capaci di favorire le varie reazioni di ossidoriduzione, e dunque di sbiancamento.

Meccanismo d'azione: il perossido di idrogeno rilascia ossigeno, questo si insinua nella struttura porosa dello smalto fino a giungere a livello della giunzione amelo-dentinale, decomponendo le molecole di pigmento li presenti in particelle più semplici e incolori. La progressione del processo di sbiancamento porta ad un punto di saturazione, nel quale persistono solo le strutture idrofile incolori, per cui il meccanismo di sbiancamento viene a cessare.

Perossido di carbamide

II perossido di carbamide (NH_2-CO-NH_2) o perossido di urea è un perossido di tipo organico. Esso risulta essere composto da perossido di idrogeno e di urea in proporzioni equimolecolari; si presenta come una polvere biancastra solubile in acqua, con notevoli proprietà sbiancanti e antisettiche. II perossido di carbamide al 10%, viene degradato per una quota del 3% in perossido di idrogeno e del 7% in perossido di urea; il perossido di idrogeno rappresenta la componente attiva mentre l'urea si degrada in biossido di carbonio e ammonio secondo la reazione:

$$CO(NH_2)_2 + H_2O \rightarrow CO_2 + 2NH_3$$

mantenendo il pH della preparazione intorno al 6,5 -6,8, diminuendo così il rischio di dissoluzione dello smalto e la formazione di placca. Il perossido di carbamide, a differenza del perossido di idrogeno, risulta essere un sistema molto stabile nel tempo ed

è in grado di rilasciare urea. Esso risulta essere efficace anche nel trattamento dei denti devitalizzati.

Meccanismo di azione: il perossido di carbamide possiede la medesima modalità d'azione del perossido di idrogeno, mentre l'urea è direttamente responsabile dell'effetto antiplacca: scindendosi in anidride carbonica e ammoniaca, provoca un aumento del pH che ostacola la formazione della placca stessa. Alcuni prodotti sbiancanti, contengono Carbopol, ovvero acido poliacrilico che ha lo scopo di aumentare la viscosità del gel (rallenta il rilascio di ossigeno); aumentando l'adesività del prodotto alle superfici dentarie, inibendo in tal modo l'azione delle perossidasi salivari, antagoniste del meccanismo sbiancante del perossido di idrogeno (Akal et al. 2001; Cracken e Haywood, 1996).

3.4 MECCANISMO DI AZIONE

Le sostanze che provocano le discromie contengono dei gruppi cromofori che sono residui organici di lunghe catene di carbonio (-C-C- oppure - C=C-), che a loro volta compongono anelli fenolici o carbolici. Il colore di una simile molecola è dovuto dalla sua lunghezza e dalla sua forma, mentre la sua solubilità dalla polarità. L'azione degli agenti sbiancanti viene attribuita alla modifica della forma, della lunghezza e della polarità di tale molecola agendo mediante la rottura e/o la ossidazione dei loro legami insaturi. Tutto questo meccanismo viene influenzato da una serie di reazioni chimiche che a loro volta dipendono da vari fattori come può essere la temperatura, la luce ultravioletta, il pH e la presenza di alcuni ioni. In un microambiente alcalino il H_2O_2 subisce un frazionamento ionico e la conseguente formazione di un anione HO_2^- , che è un forte ossidante dei cromofori, ed un H^+. Inoltre l'anione HO_2^- può funzionare come

donatore di elettroni ed attivare la formazione di radicali liberi cosa che comporta un diverso assorbimento della luce. E' stato osservato che quando si usa come agente sbiancante il carbamide perossido al 10% dentro la mascherina e con la presenza della saliva si ha un aumento del pH dopo 15minuti. Questo aumento è dovuto alla formazione di ammoniaca dopo il frazionamento dell' urea contenuta nel perossido di carbamide e così si ha in seguito il frazionamento ionico del perossido di idrogeno con la conseguente azione sbiancante. Queste molecole determinano uno sbiancamento dei cromogeni all'interno della dentina, riducendo così il colore del corpo dentale e sono spesso usati in combinazione con un agente attivante come il calore, la luce o il laser.

3.5 METODI PER ACCELERARE IL PROCESSO DI SBIANCAMENTO

Per accelerare il processo di sbiancamento l'agente sbiancante può essere attivato attraverso l'aumento di temperatura. Principalmente, l'applicazione di una fonte di calore, o di una luce o del laser è usata per aumentare la temperatura dell'agente sbiancante applicato alla superficie del dente. Da un punto di vista scientifico, i dati relativi ai meccanismi di azione e all'efficacia del laser, della luce e del calore sull'attivazione dei sistemi sbiancanti per uso dentale sono ancora limitati.

La termocatalisi

Il rilascio di radicali ossidrile del perossido viene accelerato da un aumento della temperatura secondo la seguente equazione:

$$H_2O_2 + 211\ kJ / mol \rightarrow 2HO^-$$

Ciò significa che per ogni aumento di temperatura di 10°C la velocità di scissione del perossido di idrogeno in ioni ossidrile aumenta di un fattore di 2,2, determinando l'efficacia del trattamento sbiancante. Tuttavia, l'intervallo utile per un aumento di temperatura è limitato a causa delle possibilità di danneggiare la polpa dentaria. Se la luce viene applicata su un prodotto sbiancante, come un gel sbiancante, una piccola frazione viene assorbita e la sua energia viene convertita in calore. Molto probabilmente, questo è il principale meccanismo di azione di tutte le procedure di sbiancamento fotoattivabili. Al fine di aumentare l'assorbimento della luce e, di conseguenza, la conversione in calore, alcuni prodotti sbiancanti vengono mescolati con coloranti specifici, ad esempio carotene. Il colore rosso-arancio del carotene aumenta l'assorbimento della luce blu. Al fine di aumentare l'assorbimento di luce rossa e infrarossa, possono essere aggiunte piccole particelle di silice in scala nanometrica, che conferiscono a questi prodotti un aspetto bluastro.

La fotolisi

Il rilascio di radicali idrossili può essere aumentato anche attraverso l'eccitazione diretta della luce (fotolisi). L'energia necessaria può essere fornita da una luce ad alta frequenza, corrispondente ad una lunghezza d'onda di circa 248 nm. Per una migliore sicurezza delle procedure di sbiancamento fotoattivabile, la sorgente luminosa utilizzata è un fattore importante. Sul mercato sono attualmente disponibili una notevole varietà di lampade per la fotoattivazione dei prodotti sbiancanti che differiscono notevolmente:

- Alogena (600 mW);
- Plasma-Arc-Xeno (1500-1930 mW);
- Alogena ad alta intensità (1000 mW);

- LED (300-400 mW);
- LED + Alogena (40-450 mW).

La maggior parte delle lampade commercializzate per l'uso con i sistemi di sbiancamento fotoattivabili sono lampade per la fotopolimerizzazione della resina che in alcuni casi hanno una impostazione supplementare per sbiancare (modalità sbiancamento). I sistemi luminosi che sono specificamente progettati per le procedure di sbiancamento sono costruite in modo tale che il fascio di emissione di luce possa colpire e illuminare più denti, ad esempio l'intero arco dentale. Il meccanismo d'azione dei sistemi laser offerti per scopi di sbiancamento dipende dalla lunghezza d'onda, dalla potenza della radiazione e dalla modalità di impulso, se prevista. I sistemi laser per lo sbiancamento di solito prevedono un manipolo che espande il raggio laser in modo tale che il fascio laser non viene utilizzato a focalizzato su un unico punto. Con l'espansione del raggio laser, la luce laser si diffonde sulla superficie di più denti. Di conseguenza, alcune proprietà tipiche di questo sofisticato strumento vengono perse, ma il rischio di danneggiamento dei tessuti è ridotto. Il potenziale aumento dell'efficacia del gel sbiancante mediante l'attivazione con la luce non è ancora ben documentato. Tuttavia, le pubblicazioni più recenti indicano che il beneficio dell'uso aggiuntivo di lampade, sistemi laser e fonti di calore è limitato. Inoltre è stato dimostrato che l'utilizzo di questi coadiuvanti per le procedure di sbiancamento porta ad un aumento della temperatura all'interno della camera pulpare con possibili formazioni di danni irreversibili e conseguente perdita della vitalità del dente.

3.6 EFFETTI INDESIDERATI E COLLATERALI

Alcuni effetti indesiderati dall'azione degli agenti sbiancanti si hanno anche nei tessuti duri del dente. Secondo alcuni ricercatori il perossido di idrogeno, con il frazionamento

che subisce quando viene attivato, libera radicali OH^- che rompono le catene delle molecole dei cromofori ma contemporaneamente agiscono anche sulla superficie dello smalto creando microfratture, cambiamenti della struttura dei cristalli di apatite, liberazione di alcuni prismi di smalto con la conseguente porosità della superficie smaltea dovuta anche alla dissoluzione della componente organica provocando così una diminuzione della durezza di superficie dello smalto (Davies et al. 1985; Hegedus et al. 1999; Leonard et al. 2001).

Gli effetti indesiderati causati da agenti di sbiancamento dentale possono essere:

- l'ipersensibilità dentinale post-trattamento, solitamente transitoria
- riduzione temporanea dell'adesione delle resine composite, per cui si consiglia di rinviare a successivi restauri per almeno un paio di settimane;
- corrosione dello strato superficiale delle otturazioni in amalgama di argento con possibile rilascio di ioni d'argento e mercurio, se l'agente sbiancante entra in contatto con una otturazione realizzata con tale materiale; (Cyiki et al. 2016)
- irritazione gengivale a causa dell'infiltrazione e azione caustica del perossido di idrogeno sotto la barriera protettiva gengivale , che può essere rapidamente risolto (2-3 giorni) e aiutato dall'uso di una crema a base di vitamina E (Haywood e Haymann, 1989; Haywood, 1992; Buchalla e Attin, 2007)
- ATM, sindrome algico disfunzionale a causa della lunga apertura della bocca durante la seduta di sbiancamento.

I principali effetti collaterali sono:

- la possibilità di tossicità acuta sistematica, solo in caso di ingestione accidentale di grandi quantità di perossido di idrogeno. L'ingestione può provocare crampi addominali e anche disorientamento sensoriale;
- possibile tossicità sistematica cronica non è stata clinicamente dimostrata, anche con un lungo uso di collutori contenenti perossidi o perborato (fino a 3 anni);
- over-sbiancamento.

Lo sbiancamento dei denti avviene attraverso il processo chimico di rompere i legami doppi carbonio-carbonio dei cromofori. Se il tempo di esposizione del dente per gel di sbiancamento è più lungo più di 20 minuti, è possibile che si verifichi una condizione patologica chiamata over-sbiancamento, che coinvolge la formazione dei prodotti finali di ossidazione (H_2O e CO_2). A livello strutturale e clinico questo fenomeno di sovra-sbiancamento dimostra una maggiore porosità dello smalto, fino all'arrivo alla perdita di sostanza dura, aumento della sensibilità dentinale e la necessità di devitalizzazione del dente (McEvoy, 1989; Pinheiro et al. 1996; Abe et al. 2016). Il tempo della procedura deve perciò essere mantenuto meno di 20 minuti (Scientific Committee on Consumer Products, 2005).

4. EFFETTI DEGLI AGENTI SBIANCANTI SULLA SUPERFICIE E SULLA STRUTTURA DELLO SMALTO

Nonostante il successo diffuso dei prodotti sbiancanti per quanto riguarda la loro efficacia nello sbiancamento dei denti, non esiste un consenso generale sui possibili effetti negativi sullo smalto (Cvikl et al. 2016). Al contrario, è controverso in letteratura se i gel sbiancanti influiscano negativamente sullo smalto (Cvikl et al. 2016). Le discrepanze in letteratura possono essere dovute a diversi modelli di studio, ad esempio differenze nelle concentrazioni di perossido, tempo di contatto e dente (Cvikl et al. 2016). Sebbene lo sbiancamento sia efficace, diversi autori hanno riportato cambiamenti strutturali, inclusi aumento della rugosità, diminuzione della microdurezza e riduzione della resistenza dello smalto, diminuzione del contenuto di minerali (calcio, fosfato e fluoruro); così come la comparsa di sintomi clinici come irritazione gengivale e ipersensibilità dentinale. I diversi tipi di perossidi con o senza desensibilizzanti o depositi minerali sono responsabili dell'alterazione dell'equilibrio chimico dello smalto. Questi cambiamenti possono provocare alterazioni strutturali sulla superficie dello smalto quando sottoposto a diverse concentrazioni di perossido di idrogeno (Carey, 2014; Cura et al. 2014; Silva et al. 2018; Mushashe et al. 2018).

Con l' applicazione degli agenti sbiancanti sullo smalto dentale si provoca la rottura dei gruppi cromofori presenti nei componenti organici e inorganici del dente a causa di una reazione redox. I radicali dell'ossigeno sono liberati da perossidi contenuti nei prodotti sbiancanti e si diffondono attraverso il tessuto duro del dente fino alla giunzione amelo-dentinale. Questo processo chimico specifico redox decompone i composti di chinoni e

di legami aromatici distruggendo i legami doppi e produce materiali con composizione simile alla dentina naturali.

L'ossidazione o la scissione di molecole organiche che si verificano durante lo sbiancamento favoriscono possibili cambiamenti morfologici dello smalto (Kawamoto e Tsuijimoto, 2004).

I principali agenti di sbiancamento in odontoiatria sono il perossido di idrogeno (H_2O_2) e il perossido di carbamide, che, in presenza di un catalizzatore, si divide in perossido di idrogeno e urea (Buchalla e Attin, 2007; McEvoy 1989); ma i radicali dell'ossigeno sono quelli che determinano il processo di sbiancamento. La reazione chimica, in presenza di attivatori e foto-attivatori, può essere accelerata tramite l'applicazione di calore e/o di luce (sia naturale che luce laser) che sono in grado di velocizzare e per aumentare l'intensità della reazione chimica, contribuendo alla dissociazione del perossido e aumentando la formazione di ossigeno e ioni perossido (Barone et al. 2008).

La tecnica di sbiancamento aumenta la permeabilità della dentina e può anche intensificare la sensibilità dentinale, soprattutto con il trattamento più lungo e un innalzamento della temperatura .

Alcuni effetti indesiderati dall'azione degli agenti sbiancanti si hanno anche dai tessuti duri del dente. Secondo alcuni ricercatori il perossido di idrogeno, con il frazionamento che subisce quando viene attivato, libera radicali OH^- che rompono le catene delle molecole dei cromofori ma contemporaneamente agiscono anche sulla superficie dello smalto creando microfratture , cambio della struttura dei cristalli di apatite, liberazione di alcuni prismi di smalto con la conseguente porosità della superficie smaltea dovuta anche alla dissoluzione della componente organica provocando così una diminuzione della

durezza di superficie della smalto (Davies et al. 1985; Hegedus et al. 1999; Leonard 2001).

Diversi studi che utilizzano il perossido di carbamide con concentrazioni dal 10% al 35% hanno mostrato una diminuzione della durezza superficiale(Da Costa e Mazur, 2007; Attin et al. 2005), demineralizzazione dello smalto (Efeoglu et al. 2007), alterazioni della rugosità superficiale (Azrak et al. 2018; Cavalli et al. 2004) e persino danni alla superficie dello smalto(Grobler et al. 2010). Altri studi che utilizzavano le stesse concentrazioni di perossido di carbamide e perossido di idrogeno, tuttavia, non hanno mostrato alcun impatto sullo smalto (Wang et al.2009) rispetto alla microdurezza (Polydorou et al. 2008), ruvidezza della superficie(Ozkan et al. 2013; Mielczarek et al. 2008), o altri effetti deleteri sullo smalto(Sulieman et al.2004). Le discrepanze in letteratura possono essere dovute a diversi modelli di studio, ad esempio differenze nelle concentrazioni di perossido, tempo di contatto e dente(Cvikl et al. 2016).

Concentrazioni alte e basse di HP possono sostenere effetti negativi sulla composizione e la struttura dello smalto (Berger et al. 2010; Cavalli et al. 2004). Tra queste alterazioni, la diminuzione del contenuto inorganico dello smalto e della forza coesiva dello smalto (Silva et al. 2005) è stato osservato. Inoltre, in vitro studi hanno dimostrato un aumento della rugosità superficiale dopo lo sbiancamento (Santos et al. 2015; Cavalli et al. 2004). Alte concentrazioni di HP possono modificare il rapporto calcio / fosfato (Ca / P) (Cavalli et al. 2010) e la perdita di contenuto minerale diminuisce la microdurezza, che potrebbe aumentare la suscettibilità dello smalto alla demineralizzazione. (Salomão et al. 2014) Tali considerazioni sono preoccupanti poiché lo sbiancamento potrebbe interferire nello sviluppo di lesioni cariose precoci che non vengono adeguatamente rilevate (Briso et al. 2015; Bollineni et al. 2014; Pinto et al. 2009).

5. NANOIDROSSIAPATITE

La componente organica fondamentale della struttura dentale è l'idrossiapatite, questo minerale che fa parte della dentina nel 68% e nel 97% dello smalto. A differenza dell'idrossiapatite, la nano-idrossiapatite è la mini versione modificata della stessa, che si attacca naturalmente ai denti e all'idrossiapatite esistente. Penetra nei tubuli dentali riducendo la sensibilità, remineralizza e ripara qualsiasi difetto dello smalto. L'idrossiapatite è un composto di fosfato di calcio con la formula molecolare $Ca_{10}(PO_4)(OH)_2$ e un rapporto calcio-fosforo di 1:67. Esistono altre forme di fosfato di calcio in natura, ma l'idrossiapatite è il più stabile e il meno solubile di essi. L'idrossiapatite è un materiale con una buona biocompatibilità e bioattività. La biocompatibilità è la compatibilità tra un materiale o una sostanza di derivazione non biologica e i fluidi e i tessuti dell'organismo ricevente, mentre la bioattività è l'effetto di un dato agente su un organismo vivente o un tessuto biologico. Tuttavia, gli svantaggi di questo materiale derivano dalla sua struttura porosa e dalle scarse proprietà meccaniche (Crisan et al. 2015). La nanoscala varia da 1 a 100 nm. Da queste dimensioni deriva una distinta attività delle particelle. La loro ampia superficie di reazione e le ridotte dimensioni migliorano l'idratazione del materiale, acquisendo così migliori caratteristiche fisiche e chimiche (Ramesh 2018)

La sintesi della nano-idrossiapatite (nano-HA) è impegnativa dal punto di vista tecnico e richiede vari metodi quali: sintesi sol-gel; reazione allo stato solido; co-precipitazione; precipitazione chimica umida reazione idrotermica. Utilizzando precipitanti come citrati, amminoacidi acidi o EDTA (acido etilendiamminotetraacetico) è possibile ottenere la mediazione e il controllo della nucleazione, crescita e stabilità dei cristalli. Inoltre, le

nanofibre di nano-HA possono essere ottenute tramite elettrofilatura (Ramesh 2018). A causa della sua composizione che imita la sostanza inorganica dell'osso, l'HA è usata frequentemente in ortopedia, ma anche il suo uso in odontoiatria è in continuo aumento (Şuhani et al. 2018).

5.1 UTILIZZO NELL'IMPLANTOLOGIA

Una migliore osteointegrazione e longevità funzionale sono state ottenute in implantologia rivestendo l'impianto in titanio con un materiale a base di fosfato di calcio. Esistono vari metodi per rivestire un impianto, come la procedura di rivestimento per immersione, i metodi di trattamento sol-gel o idrotermico, i processi di deposizione elettrochimica o elettroforetica, nonché i processi di deposizione biomimetica e con fascio di ioni. Una quantificazione dell'efficacia dei rivestimenti si ottiene valutando la biocompatibilità e il momento di rimozione, nonché valutando la citotossicità del materiale. L'analisi istomorfometrica è stata eseguita in un file in vivo studio (Bral e Mommaerts 2016). Nano-HA è il materiale più utilizzato per il rivestimento di impianti in titanio e acciaio inossidabile con vantaggi come un migliore legame osseo e una nuova genesi ossea, grazie a questi che si ottiene un migliore contatto osso-impianto. La risposta dell'ospite è determinata dalla chimica e dalla rugosità superficiale dell'impianto, nonché dalla dimensione delle particelle e dalla morfologia del rivestimento, l'adesione cellulare e la capacità di formazione ossea degli osteoblasti (Besinis et al. 2015). Un altro vantaggio dell'utilizzo del nano-HA come materiale di rivestimento per impianti dentali deriva chiaramente dalla sua capacità di inibire la crescita dei batteri; sono inclusi sia i batteri Gram-positivi che quelli negativi (Abdulkareem et al. 2015). Inoltre, gli impianti con un sottile rivestimento di nano-HA beneficiano di una ridotta reazione infiammatoria, essendo l'HA il modulatore per monociti e macrofagi, responsabili della risposta

infiammatoria precoce (Ryden et al. 2017). I materiali Alloplast contenenti nano-HA vengono utilizzati come materiali di innesto. Avendo un'elevata porosità, migliorano l'angiogenesi e quindi incoraggiano la guarigione delle ossa. A causa della formazione ossea precoce, è consentito un posizionamento precoce dell'impianto, questi materiali hanno un periodo di guarigione di 4 mesi. Nano-HA può essere utilizzato anche per trattare i difetti ossei derivanti da traumi o interventi chirurgici. Sebbene l'idrossiapatite sia stata ampiamente utilizzata per il trattamento dei difetti ossei come particelle o blocchi macroscala, le sue particelle su nanoscala sono state introdotte clinicamente solo di recente come forma iniettabile (Ryabenkova et al. 2017). Combinata con cellule staminali o fattori di crescita e incorata, la nano-HA può essere utilizzato con successo nell'ingegneria dei tessuti e nella rigenerazione di ossa o cemento. Può essere utile negli interventi chirurgici nella sfera orale come la riparazione del labbro leporino e del palato o interventi parodontali (Al-Ahmady et al. 2018). Le impalcature sono generalmente polimeri naturali o sintetici e devono possedere una serie considerevole di caratteristiche. Un'impalcatura deve essere porosa per fornire un flusso d'acqua attraverso di esso e quindi per migliorare la liberazione degli ioni, la proliferazione cellulare e la crescita vascolare. Devono inoltre possedere biocompatibilità e biodegradabilità nonché resistenza meccanica. Gli scaffold ceramici sono utilizzati principalmente nella rigenerazione ossea a causa delle elevate prestazioni meccaniche, mentre i materiali biologici, come la fibrina ricca di piastrine (PRF) o i polimeri vengono utilizzati quando sono richieste adesione e crescita cellulare. Compositi di scaffold e bioceramica possono essere ottenuti incorporando il composto all'interno della matrice o rivestendo la ceramica sulla superficie dello scaffold, ottenendo così uno strato mineralizzato della matrice (Lee et al. 2016). Questi compositi replicano la struttura ossea e l'ambiente, avendo sia la

flessibilità che la resistenza dell'osso, avendo effetto nello studio dentistico. La conservazione dell'osso alveolare post-estrattivo è fondamentale per il posizionamento dell'impianto. Pertanto, i compositi contenenti nano-HA vengono utilizzati immediatamente dopo l'estrazione per riempire l'alveolo alveolare e per limitare la perdita di osso alveolare (Canullo et al. 2016).

5.2 UTILIZZO NELL'IPERSENSIBILITÀ DENTINALE

Grazie alle sue proprietà bioattive e alla sua capacità di indurre il processo di mineralizzazione, la nano-HA viene utilizzata per contrastare l'ipersensibilità dentinale. Si ritiene che la circolazione del fluido all'interno dei tubuli possa produrre un'eccitazione delle cellule recettrici nella polpa quando i tubuli dentinali sono esposti e ciò può determinare ipersensibilità. Questo di solito appare a stimoli freddi, caldi, dolci o tattili. La nano-HA può facilmente penetrare nei tubuli dentinali e reagire come un agente mineralizzante, occludendo così il tubulo e interrompendo la circolazione del fluido all'interno. Inoltre, mediante reazioni chimiche con la struttura del dente, è assicurato un effetto terapeutico efficace e duraturo con resistenza a fattori meccanici o chimici. La nano-Ha preferibile nel contrastare l'ipersensibilità rispetto agli agenti desentibilizzanti basati sulla sua proprietà di rimineralizzazione superficiale aggiungendo un rivestimento di apatite sulla superficie del dente (Baglar et al. 2018; Orsini et al. 2010).

5.3 UTILIZZO NELLO SBIANCAMENTO

Gli agenti sbiancanti rilasciano specie reattive dell'ossigeno, che rompono le molecole organiche penetrando nello smalto e raggiungendo la dentina, elaborando così composti più chiari e chiari (Bordea et al. 2016). Il perossido di idrogeno è l'agente sbiancante più utilizzato e ha una concentrazione del 30-35% in un prodotto in gel. Per prevenire

l'ipersensibilità dopo lo sbiancamento, che può verificarsi in un 70% dei pazienti trattati con agenti sbiancanti, il gel viene arricchito con agenti rimineralizzanti come il fluoruro di calcio e anche l'idrossiapatite nella sua forma nano (Kutuk et al.2018). I difetti microscopici della superficie e i pori del sottosuolo nello smalto consentono all'agente sbiancante di penetrare e produrre sensibilità. La pasta Nano-HA può riparare questi piccoli difetti nello smalto, prevenendo così la reazione di sensibilità (Vano et al. 2015).

5.4 UTILIZZO NELLA PREVENZIONE DELLA CARIE

Un'altra area in cui la nanotecnologia sta guadagnando interesse è la cariologia e la prevenzione, dove il nano-HA viene utilizzato per rimineralizzare la dentina e lo smalto colpiti da attacchi cariogeni. Nella carie allo stadio iniziale il tessuto duro perde ioni minerali per attacco acido proveniente dal metabolismo batterico, ma la rete del collagene rimane inalterata. Il tentativo di rimineralizzare questa impalcatura organica viene materializzato utilizzando nanoparticelle (nanoHA, vetro bioattivo) che agiscono come una sostituzione diretta dei minerali o come un vettore per gli ioni persi nell'attacco cariato (Besinis et al. 2014). Nella prevenzione della carie la nano-HA è incorporata nelle paste dentali per fornire ioni che riducono la demineralizzazione e migliorano la remineralizzazione. Le nanoparticelle possono penetrare nelle porosità dei denti e tuttavia possono produrre uno strato protettivo sulla superficie del dente (Souza et al. 2015). La nano-HA è stata persino inclusa nelle bevande sportive per ridurre al minimo il suo effetto sui denti. Le bevande acide aggravano le erosioni sulla superficie dei denti (Min et al. 2015).

6. MICROSCOPI ELETTRONICI

I microscopi elettronici permettono di studiare l'ultrastruttura delle cellule. Essi hanno infatti un potere di risoluzione molto maggiore (0.1-0.2 nm) rispetto a quello dei microscopi ottici in quanto la sorgente luminosa è costituita da un fascio di elettroni (*Figura 5*)

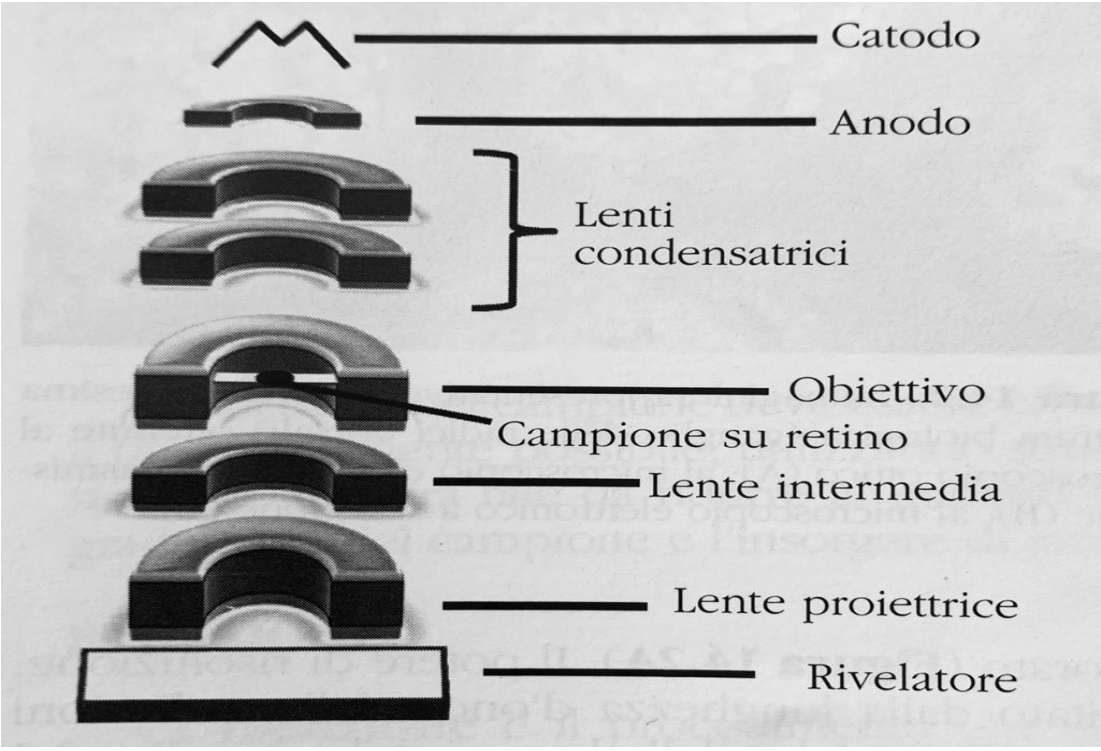


Figura 5: Rappresentazione schematica dei componenti principali del microscopio elettronico

- **MICROSCOPIO ELETTRONICO A TRASMISSIONE (TEM)**

Il fascio di elettroni è prodotto da un filamento di tungsteno incandescente (catodo) accelerato da una differenza di potenziale in una colonna in cui si è creato il vuoto, verso l'anodo. Gli elettroni, raggiunto l'anodo, sono concentrati da lenti elettromagnetiche (condensatori e lente obiettiva) che focalizzano gli elettroni sul campione e che successivamente ne ingrandiscono l'immagine (proiettori e lenti intermedie). L'immagine

(costituita da zone chiare e zone scure), visibile su di uno schermo al fosforo, è il risultato dell'interazione degli elettroni con le strutture biologiche. Le zone chiare corrispondono a zone meno “opache" agli elettroni, in cui questi ultimi passano più facilmente; le zone scure corrispondono invece a zone più “opache" agli elettroni, in cui il campione ha interagito (ha rallentato) maggiormente con gli elettroni. Il TEM, proprio per la natura dell'interazione tra elettroni e materiale biologico necessita di sezioni più sottili (40-90 nm) (rinominate appunto "ultrasottili") di quelle utilizzate in microscopia ottica e permette di raggiungere una risoluzione pari a 0.1 nm.

- **MICROSCOPIO ELETTRONICO A SCANSIONE (SEM)**

Il microscopio elettronico a scansione, pur condividendo la sorgente di elettroni e la colonna sotto vuoto del TEM, permette di ottenere delle informazioni differenti, in particolare sulla disposizione tridimensionale della superficie esterna delle strutture biologiche osservate. L'immagine tridimensionale che si ottiene sullo schermo è infatti il risultato dell'eccitazione da parte degli elettroni retrodiffusi o secondari dalla superficie del campione. Il campione biologico, che in questo caso non viene attraversato dal fascio di elettroni, prima di essere osservato deve essere ricoperto da atomi di metalli pesanti (oro o grafite) e la risoluzione che si riesce ad ottenere è pari a 1nm.

7. DUREZZA

Il concetto di durezza è caratterizzato dalla resistenza di un solido alla deformazione locale. La durezza è il risultato di specifiche procedure di misurazione e non è una proprietà intrinseca del materiale.

Il metodo tradizionale per eseguire il test di durezza prevede l'utilizzo di un apparecchio detto "durometro" e consiste nel premere un penetratore duro di una forma specifica sulla superficie del materiale da sottoporre a prova con un carico specifico per un intervallo di tempo determinato e effettuare una misurazione della dimensione o della profondità dell'impronta dopo la rimozione della forza. La durezza viene calcolata come carico massimo applicato suddiviso per area di contatto proiettata (Ilie et al. 2017).

I principali test utilizzati sono quelli di *Vickers, Knoop, Rockwell e Brinell (Figura 6)*.

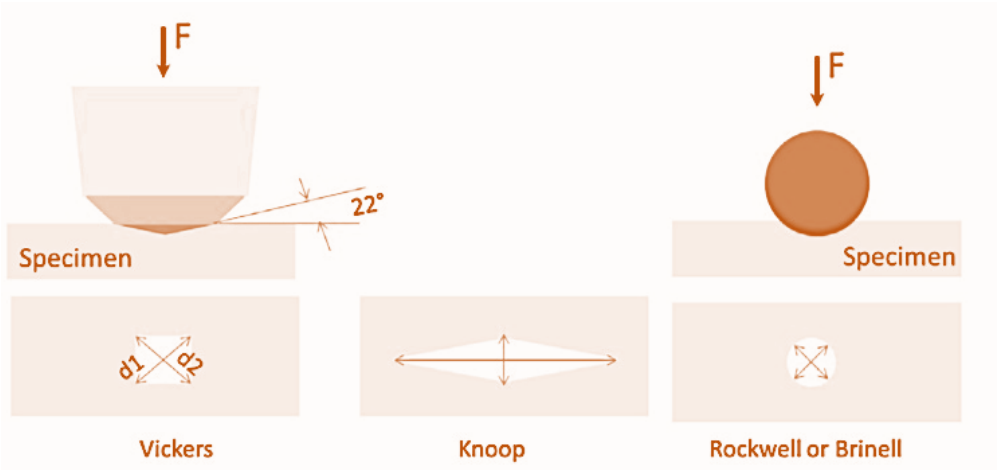


Figura 6: Schematizzazione dei test per la misurazione della durezza

Essi si differenziano per:

- tipo di penetratore usato,
- entità di carico applicato,
- tempo di permanenza del penetratore sul provino,

- metodo di rilevazione dell'impronta lasciata dallo stesso penetratore.

Il metodo di prova di durezza di *Vickers (HV)* consiste nel penetrare il materiale di prova con un penetratore di diamante, di forma piramidale con base quadrata e angolo di 136◦ tra le facce opposte. La forza di prova è compresa fra 1 gf e 100 kgf e applicando forze comprese tra 0,01 Kg e 0,2 Kg si possono effettuare prove di micro-durezza. Il carico totale viene normalmente applicato per 10-15 secondi. Le due diagonali dell'impronta rimasta nella superficie del materiale dopo la rimozione del carico vengono misurate usando un microscopio: si utilizza una griglia che può essere spostata da un'estremità all'altra della diagonale da misurare, conferendo nel contempo il valore della sua lunghezza in micron. Le misurazioni delle due diagonali debbono essere simili, in quanto il penetratore è costituito da una punta piramidale a base quadrata.
Tanto più il materiale è duro quanto più piccola è l'impronta che si produce poiché maggiore è la resistenza che esso pone all'avanzamento del penetratore. Dai valori della lunghezza delle due diagonali si ottiene poi un unico dato che è la media aritmetica delle due lunghezze. Si utilizza quindi una tabella specifica che permette di sapere qual è la lunghezza Vickers del materiale che corrisponde alla relativa lunghezza dell'impronta.
La durezza di Vickers è il quoziente ottenuto dividendo il carico per area dell'impronta.

Nel test di durezza *Knoop (HK)* viene applicata una forza di prova predeterminata con un penetratore di diamante a forma di piramide a base romboidale (con angoli di 172.5◦ e 130◦ tra i bordi opposti al vertice) per un tempo iniziale che non deve superare i 10 secondi, e la forza di prova è mantenuta per 10 - 15 secondi. Il valore di durezza Knoop è proporzionale alla forza di prova divisa per area proiettata di penetrazione.

Rispetto alla prova Vickers, il penetratore utilizzato su un test Knoop ha una forma più allungata quindi l'impronta lasciata è più visibile ed e più semplice calcolare la lunghezza dell'asse lungo dell'impronta. Questa misura è successivamente convertita in un numero di durezza Knoop utilizzando un grafico. (ISO4545-1, 2005).

Il metodo *Rockwell (HR)* misura la profondità della penetrazione prodotta dal penetratore (un cono di diamante 120◦ con punta sferica da 0,2 mm o una palla di diametro 1,587mm o 3,175 mm). In primo luogo, viene applicata una forza preliminare (comunemente indicata come precarico o carico minore) mantenuta al massimo per 3 secondi, e viene registrata una lettura della profondità di penetrazione. Questo carico rappresenta la posizione di riferimento che attraversa la superficie.
Dopo il precarico, viene applicato un carico aggiuntivo (carico maggiore) per raggiungere il carico totale di prova richiesto. Questa forza è tenuta per un tempo predeterminato (tempo di sosta) per consentire il recupero elastico. Quando viene rilasciato il carico maggiore, viene misurata la posizione finale e confrontata con la posizione derivata dal precarico (Varianza di profondità di penetrazione tra il valore di precarico e valore di carico maggiore). Questa distanza viene convertita in un valore di durezza (ISO2039-1, 2010).

Il metodo *Brinell (HB)* applica un carico di prova predeterminato (da 500 a 3000 Kgf) ad una palla di carburo di tungsteno di diametro fisso (2,5, 5 o 10 mm) che è tenuta per un tempo predeterminato (da 10 a 30 secondi) e quindi rimosso. Viene poi misurata la larghezza dell'impronta su almeno due diametri, solitamente perpendicolari l'uno all'altro e calcolato il valor medio.

Il valore di durezza di Brinell è proporzionale alla forza di prova divisa per la superficie dell'impronta.

La più grande fonte di errore nel test di Brinell è, come per gli altri metodi di penetrazione, la misura dell'intensità. Il metodo è soggettivo e operatore-dipendente.

Analisi ultrastrutturale della superficie dello smalto Per l'analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM), i campioni (n = 15) per ciascun gruppo sono stati assemblati in un portacampioni e metallizzati per la microscopia elettronica a scansione (LEO-1430; Carl Zeiss, BW, Oberkochen, Germania). La metallizzazione consisteva nella precipitazione sotto vuoto di un film micrometrico di una lega di platino sulla superficie dello smalto dentale. Le micrografie elettroniche dello smalto sono state ottenute con un ingrandimento di 1500x e sono state valutate descrittivamente.

8. PARTE SPERIMENTALE

8.1 OBIETTIVO

Lo scopo di questa ricerca è stato quello di valutare la morfologia di superficie dello smalto dopo il trattamento con diversi agenti sbiancanti. Sono stati utilizzati il test di durezza Vickers e la Microscopia Elettronica a Scansione (SEM).

8.2 MATERIALI E METODI

Sono stati studiati 2 diversi agenti sbiancanti: il primo contenente il 6% di perossido di idrogeno al quale è stata aggiunta la nanoidrossiapatite (nHA) in rapporto 1:3 (BioWhiten, Biodent Ltd., Istanbul, Turkey); il secondo contenente solamente il 6% di perossido di idrogeno (White Dental Beauty, Novon, Optident, Ilkley, West Yorkshire).

La durezza superficiale (misurata come numero di durezza Vickers [VH]), e la microstruttura superficiale dello smalto sono state registrate prima del trattamento (t0) e al termine dei trattamenti per tutti i gel sbiancanti (Post).

8.2.1 PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Sono stati selezionati quindici denti estratti per ragioni parodontali o ortodontiche, ogni elemento doveva rispettare le seguenti caratteristiche:

- Privo di carie
- Privo di difetti ipoplasici

- Privo di crepe
- Privo di restauri
- Corona intatta

Prima dell'inizio del trattamento con gli agenti sbiancanti, i residui biologici (placca, tartaro e tessuti molli) sono stati rimossi da tutti gli elementi dentali mediante strumentazione ultrasonica e manuale. Successivamente i campioni sono stati preservati in una soluzione di Clorammina (NH_2Cl) allo 0,5% e conservati a temperatura ambiente.

Successivamente i 15 campioni sono stati suddivisi in 3 gruppi con N=5 per ogni gruppo:

- Gruppo controllo: i campioni non sono stati trattati.
- Gruppo nHA+HP 6%: i campioni sono stati trattati con perossido di idrogeno al 6% insieme alla nHA in rapporto 1:3.
- Gruppo HP 6%: i campioni sono stati trattati con perossido di idrogeno al 6%.

8.2.2 PROCEDURE DI SBIANCAMENTO

I campioni di smalto sono stati sbiancati secondo le istruzioni del produttore. Prima dei trattamenti di sbiancamento, i campioni sono stati asciugati accuratamente con una garza sterile. Lo sbiancamento è stato applicato 5 volte al giorno per 7 giorni. Ogni applicazione giornaliera sbiancante è durata 100 minuti ed era costituita da: 10 minuti di applicazione alternati a 10 minuti di asciugatura mediante una garza sterile e lavaggio, il tutto per cinque volte. In ogni applicazione i campioni di smalto sono stati ricoperti con uno strato di 1 mm di gel sbiancante per entrambi i gruppi. Dopo ogni trattamento di sbiancamento, il gel sbiancante è stato rimosso con una garza sterile. Tutti i gruppi, durante il periodo in cui i campioni non venivano trattati, sono stati conservati in soluzione con fisiologica e saliva artificiale in gel (Biotène Oral balance, Laclede, Inc. Rancho Dominguez, CA,

USA) composta da: acqua depurata, amido idrogenato idrolizzato, xilitolo, idrossietilcellulosa, polimetracrilato, beta-d-glucosio, lattoperossidasi (12,000 unità), lisozima (12mg), lattoferrina (12mg), glucosio ossidasi (12,000 unità), tiocianato di potassio, aloe vera.

8.2.3 APPARECCHIATURE UTILIZZATE

- MISURAZIONE DELLA DUREZZA

La determinazione della durezza dei campioni è stata effettuata tramite il *Micro-hardness Tester HX – 1000 Remet* (*Figura 7*) presso il Dipartimento SIMAU della Facoltà di Ingegneria dell'Università Politecnica delle Marche (UNIVPM). Lo strumento effettua una scanalatura sulla superficie del materiale da testare tramite una punta piramidale in diamante applicata con una forza di 200 g per 15 secondi. Dopo la rimozione del peso, attraverso l'uso di un microscopio ottico, vengono osservate e poi misurate le diagonali dell'impronta (*Figura 8*). I risultati sono espressi in *Vickers Hardness Number* (*VHN*).

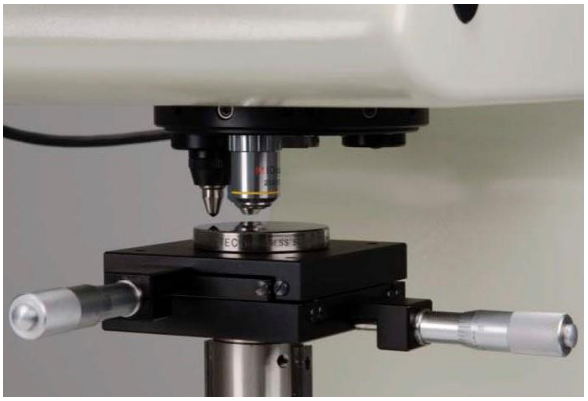


Figura 7 Micro-Hardness Tester

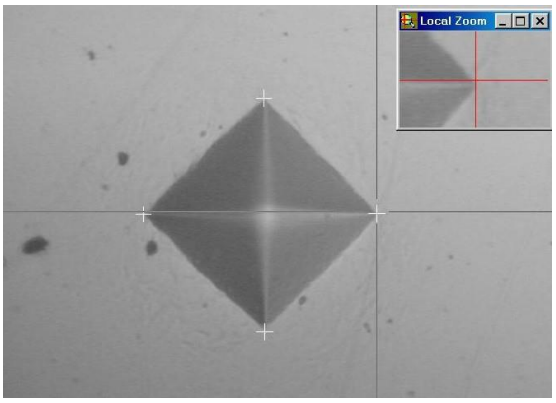


Figura 8 Misura delle diagonali della marcatura sulla superficie del materiale

- ANALISI DELLA MORFOLOGIA SUPERFICIALE

La morfologia di superficie è un aspetto qualitativo che viene osservato tramite analisi dei campioni per mezzo di un microscopio a scansione elettronica (S.E.M.). Per questo studio è stato utilizzato un microscopio elettronico *Carl Zeiss SUPRA*^{TM} *40* gentilmente concesso del Dipartimento SIMAU, Facoltà di Ingegneria, UNIVPM) (*Figura 9*). Il microscopio elettronico a scansione è stato un valido aiuto per comprendere i micromeccanismi che generano le modificazioni della superficie dello smalto. I campioni sono stati lavati in vasca ultrasonica per cinque minuti per rimuovere le impurità del materiale dopodiché sono stati rivestiti da uno strato di particelle d'oro per renderli elettroconduttivi. Sono state catturate immagini a diverso ingrandimento per un campione rappresentativo di ogni gruppo in modo da poter esaminare la morfologia della superficie dello smalto prima e dopo il trattamento con agenti sbiancanti.

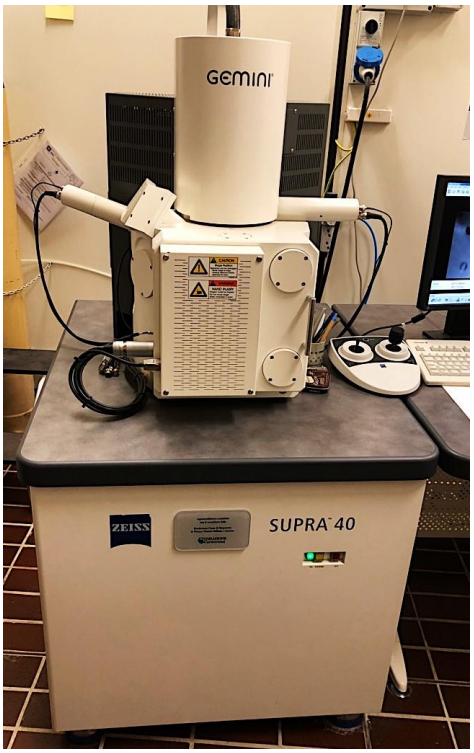


Figura 9: microscopio elettronico Zeiss SUPRA^{TM} 40.

9. RISULTATI

9.1 RISULTATI AL TEST DI VICKERS

Sono state realizzate prove non distruttive di micro-durezza (valutate con scala Vickers) con micro-durometro con punta diamantata di forma piramidale che eserciti una pressione di 200 grammi per 15 secondi. Rimossa la punta, è stata osservata la superficie al microscopio per misurare la lunghezza dalla diagonale del solco quadrangolare impresso e, consultando un'apposita tabella si è ricavato il valore di micro-durezza corrispondente secondo la scala Vickers. Nella *Figura 10* è possibile osservare che in tutti e tre i gruppi non si sono riscontrate differenze statisticamente significative seppur le medie diminuiscano nei gruppi nHA+HP 6% e HP 6%.

CTR		nHA-HP 6%		HP 6%	
t0	POST	t0	POST	t0	POST
317,91 ± 61,38 [a]	314,09 ± 21,54 [a]	346,63 ± 17,4 [b]	283,34 ± 63,40 [b]	314,49 ± 39,34 [c]	288,33 ± 46,59 [c]

Figura 10: confronto del test di Vickers nei tre gruppi.

9.2 RISULTATI AL SEM

La microscopia elettronica a scansione permette di osservare la morfologia del campione ad elevati ingrandimenti e di determinare la composizione chimica di piccolissime aree del campione stesso. L'analisi microscopica è stata condotta su un campione rappresentativo di ogni gruppo con diversi tipi di ingrandimenti (400-2000-8000). In particolare è stata osservata l'area vestibolare del dente con le stesse caratteristiche

morfologiche e strutturali. Nello specifico, per molari e premolari l'osservazione ha interessato la zona dell'equatore, per gli incisivi l'area mediana del la faccia vestibolare.

Dall'analisi al microscopio elettronico a scansione è possibile osservare i cambiamenti morfostrutturali nel gruppo controllo (*Figura 11*), gruppo nHA+HP 6% (*Figura 12*) e nel Gruppo HP 6% (*Figura 16*). Più specificatamente è possibile osservare che per il Gruppo nHA-HP 6% c'è stato un mantenimento della microstruttura dello smalto mentre per il Gruppo HP 6% si sono riscontrati cambiamenti morfologici sulla superficie dello smalto.

Nella *Figura 14* è possibile osservare i cambiamenti morfologici della superficie dello smalto tra i diversi gruppi.

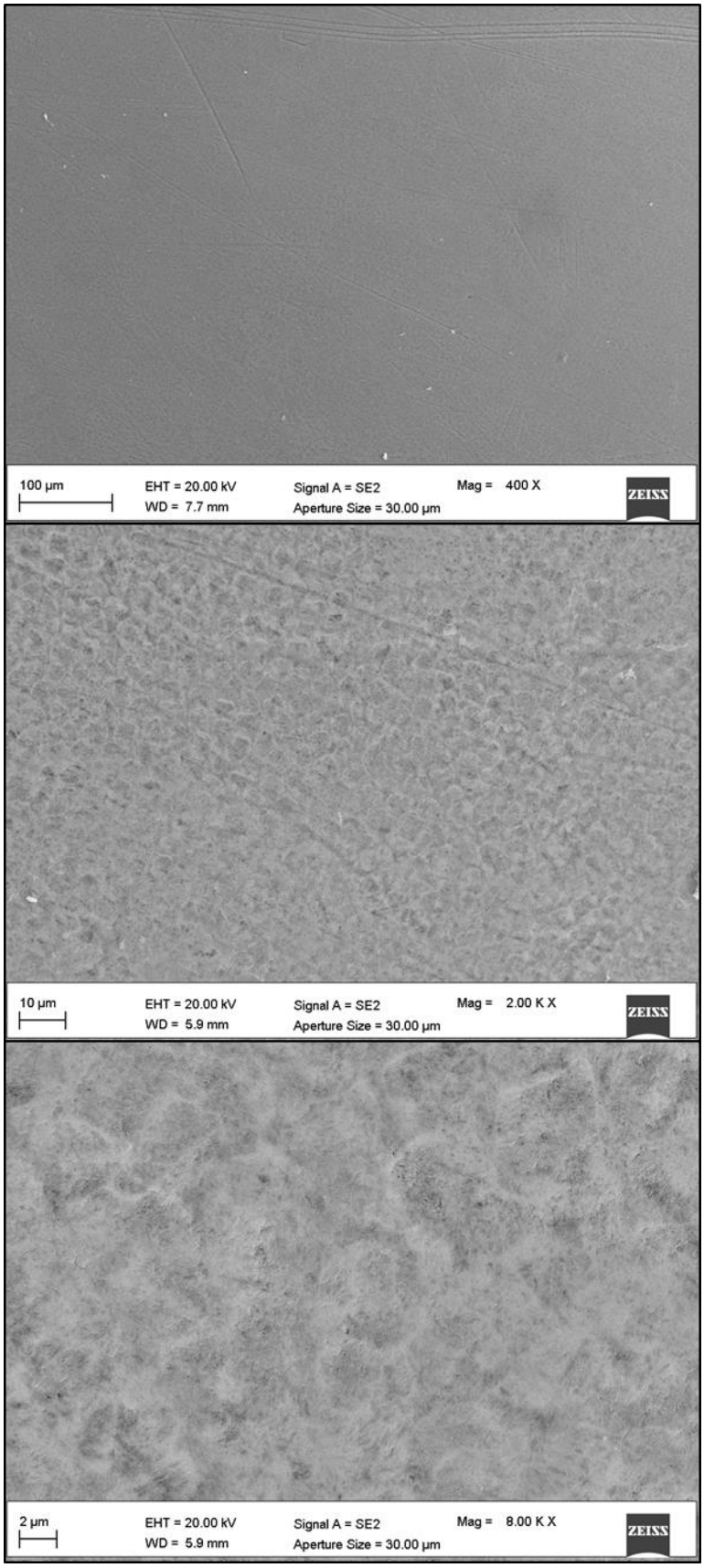


Figura 11: Gruppo controllo ingrandimenti 400-2000-8000

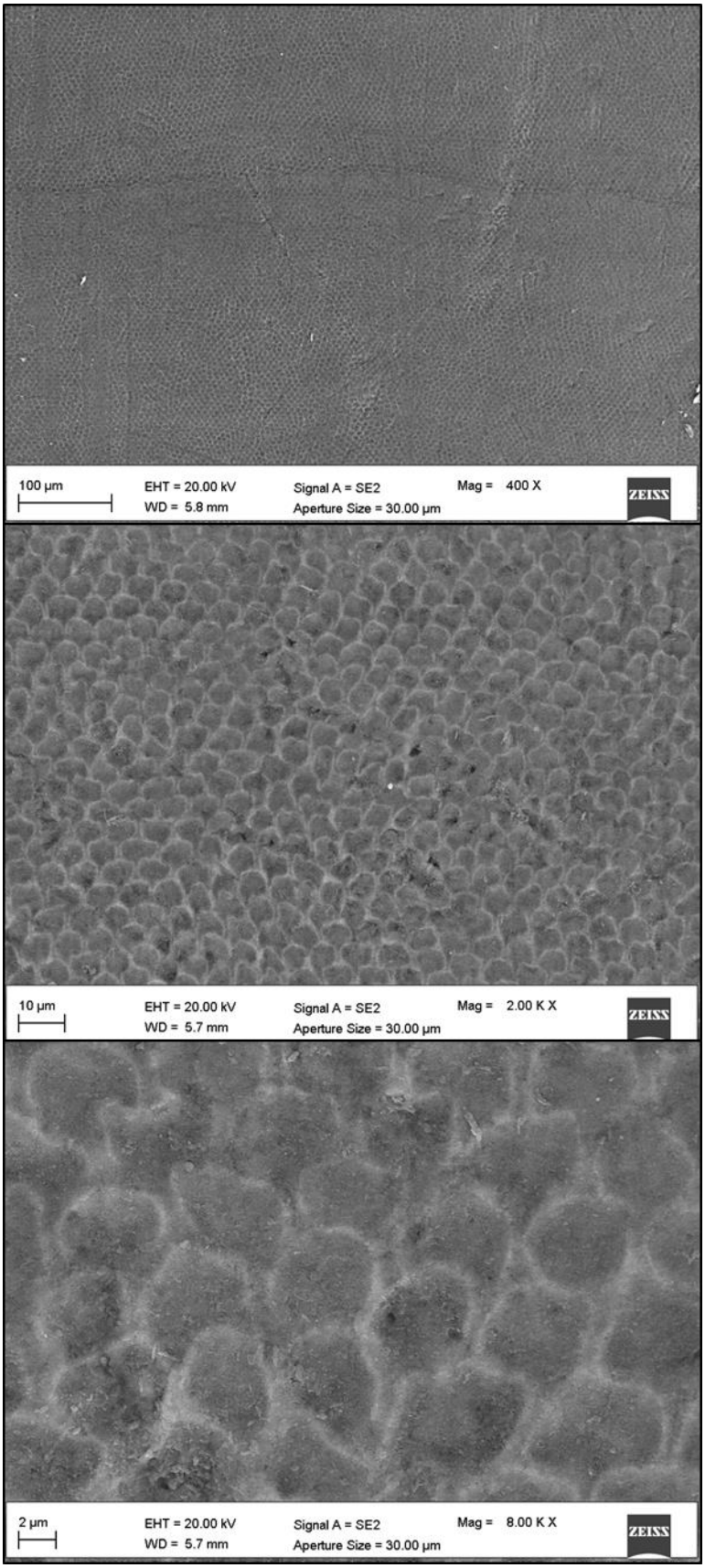


Figura 12: Gruppo nHA+ HP 6% , ingrandimenti 400-2000-8000

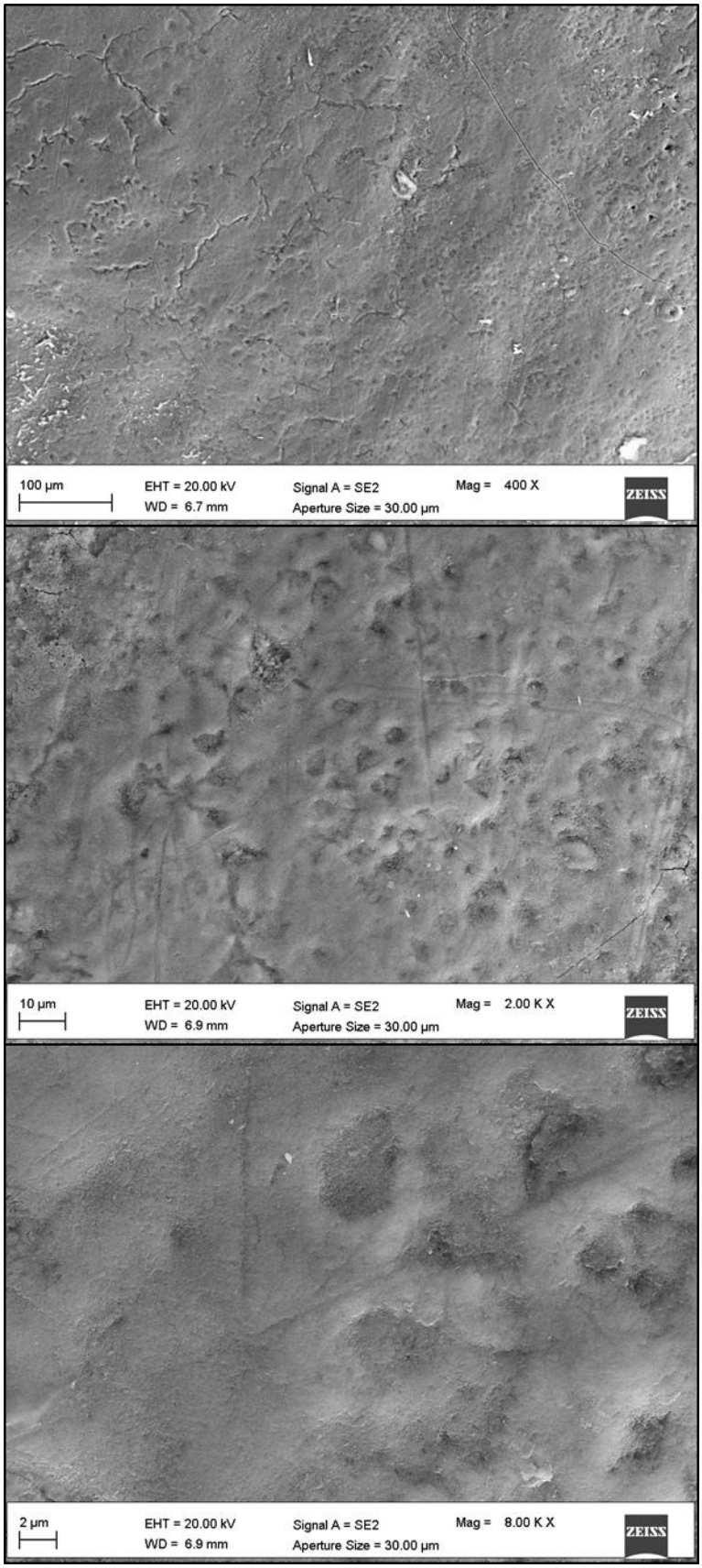
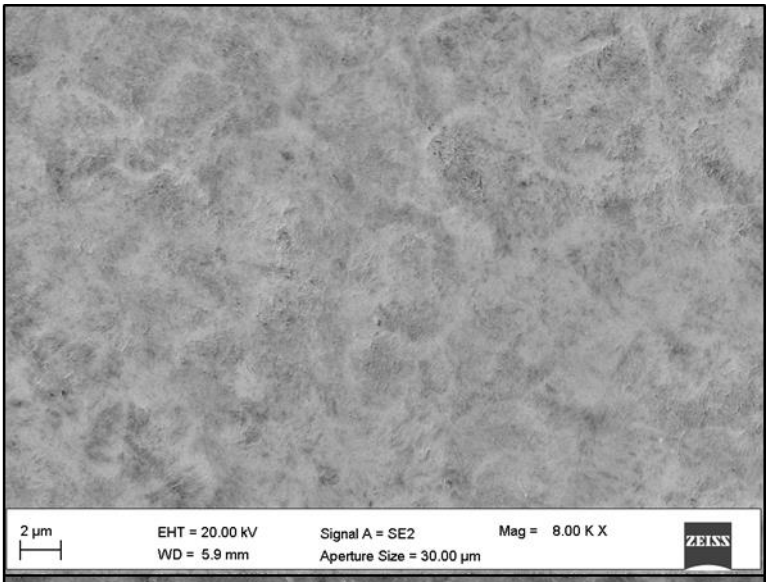
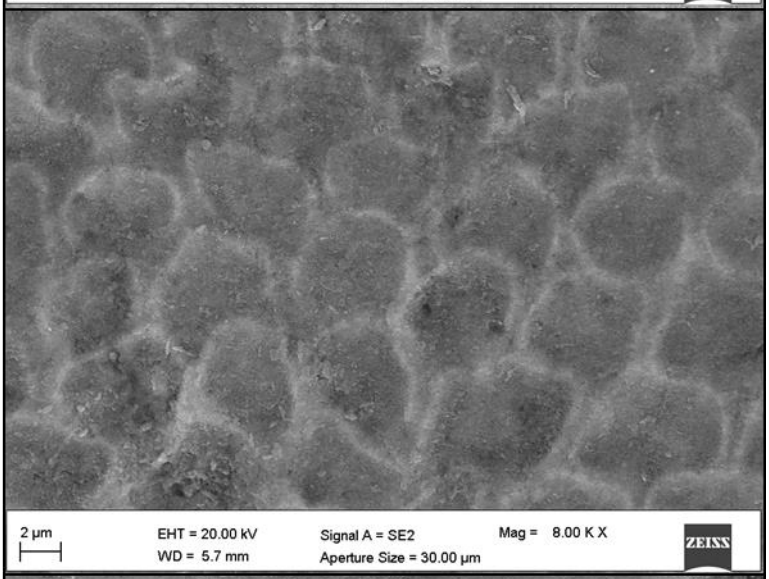


Figura 13: Gruppo HP 6% , ingrandimenti 400-2000-8000

GRUPPO CONTROLLO



GRUPPO Nha-HP 6%



GRUPPO HP 6%

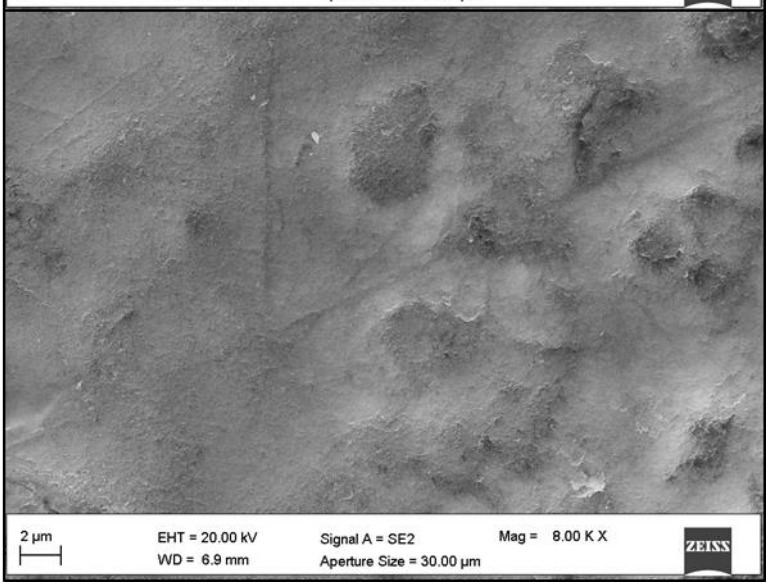


Figura 14: confronto della superficie dello smalto tra i tre gruppi ad un ingrandimento di 8000

10. DISCUSSIONE

In studi precedenti è stato osservato che l'utilizzo di alte concentrazioni di perossido di idrogeno provoca alterazioni morfologiche della superficie smaltea (Cavalli et al. 2004; Kwon et al. 2002; Zalkind et al. 1996; Ernst et al. 1996; Lee et al. 1995; Mcguckin e Babin, 1992; Pinto et al. 2004), modificazioni nella distribuzione dei cristalli di smalto (Oltu e Gurgan, 2000), aumento delle porosità della struttura smaltea superficiale (Mcguckin e Babin, 1992) e una maggiore adesione di *Streptococcus mutans* sulla superficie dello smalto (Hosoya et al. 2003) . Inoltre, l'analisi chimica di superficie ha evidenziato sia modificazioni del rapporto calcio/fosfato (Rotstein et al. 1996), sia perdita di calcio (Lee et al. 2006), supportando l'ipotesi che gli agenti sbiancanti siano componenti chimicamente attivi, capaci di indurre importanti alterazioni strutturali nello smalto. Le alterazioni della superficie dello smalto sono state confermate indirettamente da studi che hanno osservato una riduzione delle proprietà fisiche dello smalto, in particolare la microdurezza, ampiamente analizzata (Hairul et al. 2005; Attin at al., 2005; Park et al. 2004; Lewinstein et al. 2004; Attin et al. 2004; Pinto et al. 2004; Rodrigues et al. 2005). Grazie a questo studio, si è potuto osservare come un protocollo di 5 sedute con perossido di idrogeno al 6% sia andato a modificare la microstruttura dello smalto a differenza del perossido di idrogeno al 6% + nHA che non ha avuto effetti significativi sulla microstruttura dello smalto. Sembra perciò evidente che la nanoidrossiapatite abbia svolto un ruolo chiave per il mantenimento dell'integrità della struttura dello smalto. Tuttavia, studi precedenti hanno ipotizzato che potrebbero essere presenti delle alterazioni al di sotto della superficie dello smalto sbiancato (Attin at al., 2005; Kwon et al. 2002; Mcguckin et al. 1992), a causa della penetrazione nello smalto dei composti a base di perossido. Quindi, si può suggerire di eseguire ulteriori ricerche al fine di

confermare le osservazioni di questo studio ed estrapolare un potenziale significato clinico che dovrà essere evidenziato sia per i prodotti professionali sia per quelli domiciliari, che, anche se a più bassa concentrazione, vengono mantenuti in contatto con lo smalto per periodi piuttosto lunghi.

11. CONCLUSIONE

La ricerca eseguita ha evidenziato che, per quanto riguarda il test di Vickers, non ci cono state differenze significative tra tutti i gruppi, seppure i valori medi nel Gruppo nHA-HP6% e HP6% siano diminuiti. In base alle osservazioni al SEM, nel Gruppo nHA-HP 6% non sono state rilevate alterazioni morfologiche della superficie dello smalto, mentre per il Gruppo HP 6% sono state rilevate alterazioni morfologiche della superficie dello smalto. Sebbene siano necessari ulteriori analisi, questo studio ha dimostrato che lo sbiancamento professionale con basse concentrazioni di perossido di idrogeno miscelato alla nHA è una procedura sicura e affidabile, che non induce alterazioni strutturali della superficie di smalto dopo sette applicazioni per un totale di 350 minuti, a differenza del trattamento con perossido di idrogeno al 6% che, per un tempo prolungato di 350 minuti totali, ha causato diverse modificazioni strutturali sulla superficie dello smalto.

BIBLIOGRAFIA

Abdulkareem EH, Memarzadeh K, Allaker RP, Huang J, Pratten J, Spratt D. 2015. Anti-biofilm activity of zinc oxide and hydroxyapatite nanoparticles as dental implant coating materials. J Dent; 43:1462–1469.

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.

Akal N, Over H, Olmez A, Bodur H. Effects of carbamide peroxide containing bleaching agents on the morphology and subsurface hardness of enamel 2001;25:293-6

Al-Ahmady HH, Elazeem AFA, Ahmed N, Shawkat WM, Elmasry M, Abdelrahman MA, Abderazik MA. 2018. Combining autologous bone marrow mononuclear cells seeded on collagen sponge with Nano Hydroxyapatite, and platelet-rich fibrin: Reporting a novel strategy for alveolar cleft bone regeneration. J Cranio-Maxillofac Surg. 46:1593–1600.

Amengual j, Forner l, Navarro l, MaC liena P. Manual pràctico de blanquiamento dental. Valencia, Spagna: Prer molibro, 2002:33 -38.

AT. Abe, MN.Youssef, ML.Turbino. Effect of bleaching agentson nanohardness of tooth enamel, composite resin, and the tooth-restoration interface. Operative Dentistry, 2016, 41-1, 44-52.

Attin T, Muller T, Patyk A, Lennon AM. Influence of different bleaching systems on fracture toughness and hardness of enamel. Operative Dentistry 2004;29:188-195.

Attin T, Vollmer D, Wiegand A, Attin R, Betke H. Subsurface microhardness of enamel and dentin after different external bleaching procedures. American Journal of Dentistry 2005;18:8-12.

Azrak B, Callaway A, Kurth P, & Willershausen B (2010) Influence of bleaching agents on surface roughness of sound or eroded dental enamel specimens Journal of Esthetic and Restorative Dentistry 22 391-399.

B.Cviki, A.Lussi, A.Moritz, S.Flury. Enamel surface changes after exposure to bleaching gels containing carbamide peroxide or hydrogen peroxide. Operative Dentistry, 2016, 41-1 E39-E47.

Baglar S, Erdem U, Dogan M, Turkoz M. 2018. Dentinal tubule occluding capability of nano-hydroxyapatite; The in-vitro evaluation. Microsc Res Tech. 81843–854.

Barone M, Crippa R, Benedicenti S. Laser a diodi in odontoiatria. Milano: EdiErmes; 2008. p. 159-61.

Berger SB, Cavalli V, Ambrosano GM, Giannini M. Changes in surface morphology and mineralization level of human enamel following inoffice bleaching with 35% hydrogen peroxide and light irradiation. Gen Dent. 2010;58:e74-9.

Besinis A, De Peralta T, Tredwin CJ, Handy RD. 2015. A review of nanomaterials in dentistry: Interactions with the oral microenvironment, clinical applications, hazards and bene- fits. ACS Nano. 9:2255–2289.

Besinis A, van Noort R, Martin N. 2014. Remineralization potential of fully demineralized dentin infiltrated with silica and hydroxyapatite nanoparticles. Dent Mater. 30: 249–262.

Bitter NC, Sanders JL. The effect of four bleaching agents on the enamel surface: a scanning electron microscopic study. Quintessence Int. 1993; 24:817–24.

Bollineni S, Janga RK, Venugopal L, Reddy IR, Babu PR, Kumar SS. Role of fluoridated carbamide peroxide whitening gel in the remineralization of demineralized enamel: an in vitro study. J Int Soc Prev Community Dent. 2014;4:117-21.

Bordea IR, Lucaciu PO, Cris, an B, M^ırza C, Popa D, Mesaros, AS, , Pelekanos S, Campian RS. 2016. The influence of chromophore presence in an experimental bleaching gel on laser assisted tooth whitening efficiency. Stud Univ Babes-Bolyai Chem. 61:215–223.

Bral A, Mommaerts MY. 2016. In vivo biofunctionalization of titanium patient-specific implants with nano hydroxyapatite and other nano calcium phosphate coatings: A systematic review. J Cranio-Maxillofac Surg. 44: 400–412.

Briso AL, Gonçalves RS, Costa FB, Gallinari MO, Cintra LT, Santos PH. Demineralization and hydrogen peroxide penetration in teeth with incipient lesions. Braz Dent J. 2015;26:135-40.

Buchalla W, Attin T. External bleaching therapy with activation by heat, light or laser a systematic review. Dent Mater. 2007;23:586-96.

Canullo L, Wiel Marin G, Tallarico M, Canciani E, Musto F, Dellavia C. 2016. Histological and histomorphometrical evaluation of postextractive sites grafted with M genriched nano-hydroxyapatite: a randomized controlled trial comparing 4 versus 12 months of healing. Clin Implant Dent Related Res. 18:973–983.

Carey CM. Tooth whitening: what we now know. J Evid Based Dent Pract. 2014; 14:70–6.

Cavalli V, Arrais CA, Giannini M, Ambrosano GM. High-concentrated carbamide peroxide bleaching agents effects on enamel surface. Journal of Oral Rehabilitation 2004;31:155-9.

Cavalli V, Giannini M, Carvalho RM. Effect of carbamide peroxide bleaching agents on tensile strength of human enamel. Dent Mater. 2004;20:733-9.

Cavalli V, Rodrigues LK, Paes-Leme AF, Brancalion ML, Arruda MA, Berger SB, et al. Effects of bleaching agents containing fluoride and calcium on human enamel. Quintessence Int. 2010;41:e157-65.

Cracken MS, Haywood VB. Demineralization effects of IO percent carbamide peroxide. J Dent 1996;24:395-398.

Crisan L, Crisan B, Soritau O, Baciut M, Biris AR, Baciut G, Lucaciu O. 2015. In vitro study of biocompatibility of a gra- phene composite with gold nanoparticles and hydroxy- apatite on human osteoblasts. J Appl Toxicol. 35: 1200–1210.

Cura M, Fuentes MV, Ceballos L. Effect of low-concentration bleaching products on enamel bond strength at different elapsed times after bleaching treatment. Dent Mater J.2015; 34:203–210.

Current perspectives regarding the application and incorporation of silver nanoparticles into dental biomaterials. Clujul Med. 91:274–279.

Cvikl B, Lussi A, Moritz A, Flury S. Enamel surface changes after exposure to bleaching gels containing carbamide peroxide or hydrogen peroxide. Oper Dent. 2016; 41:E39–47.

Davies AK, Cundall RB, Dandiker Y, Sifkin MA. Photooxidation of tetracycline adsorbed onto hydroxyapatite in relation to the light-induced staining of teeth. J Dent Res. 1985;64:936-9.

Da Costa JB, & Mazur RF (2007) Effects of new formulas of bleaching gel and fluoride application on enamel microhardness: An in vitro study Operative Dentistry 32 589-594.

Efeoglu N, Wood DJ, & Efeoglu C (2007) Thirty-five percent carbamide peroxide application causes in vitro demineralization of enamel Dental Materials 23 900-904.

Elfallah HM, Bertassoni LE, Charadram N, Rathsam C, Swain MV. Effect of tooth bleaching agents on protein content and mechanical properties of dental enamel. Acta Biomater. 2015; 20.

Ernst CP, Marroquin BB, Willershausen-Zonnchen B. Effects of hydrogen peroxide-containing bleaching agents on the morphology of human enamel. Quintessence International 1996;27:53-56.

Falegname A. Tooth color: a review of the literature. J Dent. 2004; 32: 3–12.

Grobler SR, Hayward R, Wiese S, Moola MH, & van W Kotze TJ (2010) Spectrophotometric assessment of the effectiveness of Opalescence PF 10%: A 14-month clinical study Journal of Dentistry 38 113-117.

Hairul Nizam BR, Lim CT, Chng HK, Yap AU. Nanoindentation study of human premolars subjected to bleaching agent. Journal of Biomechanics 2005;38:2204-2211.

Haywood VB, Heymann HO. Nightguard vital bleaching. Quintessence Mt 1989;20:173-6.

Haywood VB. History, safety and effectiveness of current bleaching techniques and applications of the nightguard vital bleaching technique. Quintessence Int. 1992;23:471-88.

Hegedus C, Bistey T, Flora-Nagy E, Keszthelyi G, Jenei A. An atom-ic force microscopy study on the effect of bleaching agents on enamel surface. J Dent 1999; 27:509-515.

Hosoya N, Honda K, Iino F, Arai T. Changes in enamel surface roughness and adhesion of Streptococcus mutans to enamel after vital bleaching. Journal of Dentistry 2003;31:543-8.

Ilie, N., Hilton, T. J., Heintze, S. D., Hickel, R., Watts, D. C., Silikas, N., et al. (2017). Academy of Dental Materials guidance - Resin composites: Part I -Mechanical properties. Dental Materials 33, 880–894. doi:10.1016/j.dental.2017.04.013.

ISO2039-1 (2010). ISO2039-1. Plastics - determination of hardness - part 2: Rockwell hardness.

ISO4545-1 (2005). ISO4545-1. Metallic materials - Knoop hardness test - part 1: test method.

Kawamoto K, Tsujimoto Y. Effects of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching. J Endod. 2004;30:45-50.

Kirk-Othmer, editorEnciclopedia di tecnologia chimica. 5. Hoboken, NJ: Wiley and Sons; 2004. 43–80.

Kutuk ZB, Ergin E, Cakir FY, Gurgan S. 2018. Effects of inoffice bleaching agent combined with different desensitizing agents on enamel. J Appl Oral Sci. 27:e20180233. 2018;0233.

Kwon YH, Huo MS, Kim KH, Kim SK, Kim YJ. Effects of hydrogen peroxide on the light reflectance and morphology of bovine enamel. Journal of Oral Rehabilitation 2002;29:473-477.

Lee CQ, Cobb CM, Zargartalebi F, Hu N. Effect of bleaching on microhardness, morphology, and color of enamel. General Dentistry 1995;43:158-162.

Lee JB, Kim JE, Balikov DA, Bae MS, Heo DN, Lee D, Rim HJ, Lee DW, Sung HJ, Kwon IK. 2016. Poly (l-lactic acid)/gelatin fibrous scaffold loaded with simvastatin/beta-cyclodextrin- modified hydroxyapatite inclusion complex for bone tissue regeneration. Macromol Biosci. 16:1027–1038.

Lee KH, Kim Hi, Kim KH, Kwon YH. Mineral loss from bovine enamel by a 30% hydrogen peroxide solution. Journal of Oral Rehabilitation 2006;33: 229-233.

Leonard RH Jr, Eagle JC, Garland GE, Matthews KP, Rudd Al, Phil-lips C. Nightguard vital bleaching and its effect on enamel surface morphology. J Esthet Restor Dent 2001;13: 132-139.

Lewinstein I, Fuhrer N, Churaru N, Cardash H. Effect of different peroxide bleaching regimens and subsequent fluoridation on the hardness of human enamel and dentin. Journal of Prosthetic Dentistry 2004;92:337-342.

McEvoy S. Chemical agents for removing intrinsic stains from vital teeth. II. Current techniques and their clinical application, vol. 20. Chicago Quintessence Int; 1989. p. 379-84.

McGuckin RS, Babin JF, Meyer BJ. Alterations in human enamel surface morphology following vital bleaching. Journal of Prosthetic Dentistry 1992;68:754-60.

Mielczarek A, Klukowska M, Ganowicz M, Kwiatkowska A, & Kwasny M (2008) The effect of strip, tray and office peroxide bleaching systems on enamel surfaces in vitro Dental Materials 24 1495-1500.

Min J, Kwon HK, Kim BI. 2015. Prevention of dental erosion of a sports drink by nano-sized hydroxyapatite in situ study. Int J Paediatr Dent. 25:61–69.

Minoux M, Serfaty R. Sbiancamento dei denti vitali: effetti collaterali biologici: una revisione. Quintessence Int. 2008; 39: 645–59.

Mushashe AM, Coelho BS, Garcia PP, Rechia BC do N, da Cunha LF, Correr GM, et al. Effect of differ- ent bleaching protocols on whitening efficiency and enamel superficial microhardness. Journal of Clini- cal and Experimental Dentistry. 2018; 10: e772–e775. https://doi.org/10.4317/jced.54967 PMID: 30305875.

Olivi G . and Olivi M. Lasers in Restorative Dentistry: a practical guide 2015 Springer, Berlin (in english).

Oltu U, Gurgan S. Effects of three concentrations of carbamide peroxide on the structure of enamel. Journal of Oral Rehabilitation 2000;27:332-340.

Orsini G, Procaccini M, Manzoli L, Giuliodori F, Lorenzini A, Putignano A. A double-blind randomized-controlled trial comparing the desensitizing efficacy of a new dentifrice containing carbonate/hydroxyapatite nanocrystals and a sodium fluoride/potassium nitrate dentifrice. J Clin Periodontol 2010; 37: 510–517.

Ozkan P, Kansu G, Ozak ST, Kurtulmus-Yilmaz S, & Kansu P (2013) Effect of bleaching agents and whitening dentifrices on the surface roughness of human teeth enamel Acta Odontologica Scandinavica 71 488-497.

Park HJ, Kwon TY, Nam SH, Kim HJ, Kim KH, Kim YJ. Changes in bovine enamel after treatment with a 30% hydrogen peroxide bleaching agent. Dental Material Journal 2004;23:517-521.

Pasini W, Haynal A. Psicologia Odontoiatrica. Masson, 1992:8-12,26-30.

PinborglJ. Discolorations in Patology cf the dental hard tis sues. Copenaghen: Munksggaard, 1970.

Pinheiro JE, Fidel R, da Cruz Filho AM, et al. In vitro action of various carbamide peroxide gel bleaching agents on the microhardness of human enamel. Braz Dent J. 1996;7:75-9.

Pinto CF, Oliveira R, Cavalli V, Giannini M. Peroxide bleaching agent effects on enamel surface microhardness, roughness and morphology. Pesquisa Odontológica Brasileira (Brazilian Oral Research) 2004;18:306-311.

Pinto CF, Paes Leme AF, Cavalli V, Giannini M. Effect of 10% carbamide peroxide bleaching on sound and artificial enamel carious lesions. Braz Dent J. 2009;20:48-53.

Polydorou O, Hellwig E, & Hahn P (2008) The efficacy of three different in-office bleaching systems and their effect on enamel microhardness Operative Dentistry 33

579-586.

Ramesh SC. 2018. Dental applications of nanotechnology. Switzerland: Springer Nature.

Reid Dj, Dean MC Brief communication: the timing of linear hypoplasias on human anterior teeth. AmJ Phys Anth ropol. 2000;113:135 -139.

Rodrigues JA, Marchi GM, Ambrosano GM, Heymann HO, Pimenta LA. Microhardness evaluation of in situ vital bleaching on human dental enamel using a novel study design. Dental Materials 2005;21:1059-1067.

Rodrìguez A. Chromatic alterations of teeth in treatment of odontology. Madrid: Avanced Mèdico dentales S.L., 1998:2495 -2504.

Rotstein I, Dankner E, Goldman A, Heling I, Stabholz A, Zalkind M. Histochemical analysis of dental hard tissues following bleaching. Journal of Endodontics 1996;22:23-25.

Ryabenkova Y, Pinnock A, Quadros PA, Goodchild RL, Mobus G, Crawford A, Hatton PV, Miller CA. 2017. The relationship between particle morphology and rheological properties in injectable nano-hydroxyapatite bone graft substitutes. Mater Sci Eng. 75:1083–1090.

Ryd´en L, Omar O, Johansson A, Jimbo R, Palmquist A, Thomsen P. 2017. Inflammatory cell response to ultra-thin amorphous and crystalline hydroxyapatite surfaces. J Mater Sci. 28:9.

Salomão D, Santos D, Nogueira R, Palma-Dibb R, Geraldo-Martins V. Acid demineralization susceptibility of dental enamel submitted to different bleaching techniques and fluoridation regimens. Oper Dent. 2014;39:E178-85.

Santos L, Torres C, Caneppele T, Magalhães A, Borges A. Effect of home-bleaching gels modified by calcium and/or fluoride and the application of nano-hydroxyapatite paste on in vitro enamel erosion susceptibility. Acta Odontol Scand. 2015;74(2):121-6.

Scientific Committee on Consumer Products (European Commission). Opinion on hydrogen peroxide in tooth whitening products. SCCP/0844/04, 15 Mar 2005.

Silva AP, Oliveira R, Cavalli V, Arrais CA, Giannini M, Carvalho RM. Effect of peroxide-based bleaching agents on enamel ultimate tensile strength. Oper Dent. 2005;30:318-24.

Silva BG, Gouveia THN, MDAP Da Silva, GMB Ambrosano, FHB Aguiar, DANL Lima. Evaluation of home bleaching gel modified by different thickeners on the physical properties of enamel: An in situ study. European Journal of Dentistry. Medknow Publications and Media Pvt. Ltd.;2018;12:523–527.

Souza BM, Comar LP, Vertuan M, Fernandes Neto C, Buzalaf MAR, Magalh~aes AC. 2015. Effect of an experimental paste with hydroxyapatite nanoparticles and fluoride on dental demineralisation and remineralisation in situ. Caries Res. 49:499–507.

Spalding M, Taveira LA, de Assis GF. Scanning electron microscopy study of dental enamel surface exposed to 35% hydrogen peroxide: alone, with saliva, and with 10% carbamide peroxide. J Esthet Restor Dent. 2003; 15:154–65.

Suhani MF, B˘aciut¸ G, B˘aciut¸ M, S¸uhani R, Bran S. 2018. Current perspectives regarding the application and incorporation of silver nanoparticles into dental biomaterials. Clujul Med. 91:274–279.

Sulieman M, Addy M, Macdonald E, & Rees JS (2004) A safety study in vitro for the effects of an in-office bleaching system on the integrity of enamel and dentine Journal of Dentistry 32: 581-590.

Vano M, Derchi G, Barone A, Genovesi A, Covani U. 2015. Tooth bleaching with hydrogen peroxide and nanohydroxyapatite: a 9-month follow-up randomized clinical trial. Int J Dent Hygiene. 13:301–307.

Wang X, Mihailova B, Klocke A, Fittschen UE, Heidrich S, Hill M, Stosch R, Guttle B, Broekaert JA, & Bismayer U (2009) Side effects of a non-peroxide-based home bleaching agent on dental enamel Journal of Biomedical Materials Research. Part A 88 195-204.

Zalkind M, Arwaz JR, Goldman A, Rotstein I. Surface morphology changes in human enamel, dentin and cementum following bleaching: a scanning electron microscopy study. Endodontics and Dental Traumatology 1996;12:82-8.