

# Sicurezza ed efficacia dei prodotti commerciali convenzionali per lo sbiancamento dentale professionale: studio comparativo ex vivo con l'utilizzo di microscopia AFM e nanoindentazione

Claudio Pasquale <sup>1,2,\*</sup>, Nicola De Angelis <sup>1,2</sup>, Fabrizio Barberis <sup>2</sup>, Alberto Lagazzo <sup>2</sup>, Elena Dellacasa <sup>3</sup>, Davide Biggio <sup>2</sup>, Matteo Schiaffino <sup>2</sup>, Roberto Raiteri <sup>3</sup>, Luca Ceseracciu <sup>4</sup>, Stefano Benedicenti <sup>1</sup> and Andrea Amaroli <sup>5,6</sup>

- <sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Chirurgiche e Diagnostiche Integrate (DISC), Università di Genova, 16132 Genova, Italia; n.deangelis74@gmail.com (N.D.A.); benedicenti@unige.it (S.B.)
  - <sup>2</sup> Dipartimento di Ingegneria Civile, Chimica e Ambientale (DICCA), Università di Genova, 16100 Genova, Italia; fabrizio.barberis@unige.it (F.B.); alberto.lagazzo@unige.it (A.L.); biggiodavide91@gmail.com (D.B.); matteo.schiaffino@gmail.com (M.S.)
  - <sup>3</sup> Dipartimento di Informatica, Bioingegneria, Robotica e Ingegneria dei Sistemi, Università di Genova, 16132 Genova, Italia; elena.dellacasa@edu.unige.it (E.D.); roberto.raiteri@unige.it (R.R.)
  - <sup>4</sup> Materials Characterization Facility, Istituto italiano di tecnologia (IIT), 16163 Genova, Italia; luca.ceseracciu@iit.it
  - <sup>5</sup> Dipartimento di Scienze della Terra, dell'Ambiente e della Vita (DISTAV), Università di Genova, 16132 Genova, Italia; andrea.amaroli@unige.it
  - <sup>6</sup> Dipartimento di Odontoiatria Ortopedica, Facoltà di Odontoiatria, First Moscow State Medical University (Università di Sechenov), 119991 Mosca, Russia
- \* Contatti: [claudio.pasquale@edu.unige.it](mailto:claudio.pasquale@edu.unige.it)



**Citazione:** Pasquale, C.; De Angelis, N.; Barberis, F.; Lagazzo, A.; Dellacasa, E.; Biggio, D.; Schiaffino, M.; Raiteri, R.; Ceseracciu, L.;

Benedicenti, S.; et al. Sicurezza ed efficacia dei prodotti commerciali convenzionali per lo sbiancamento dentale professionale: studio comparativo ex vivo con l'utilizzo di microscopia AFM e nanoindentazione. *Appl. Sci.* **2023**, *13*, 9371. <https://doi.org/10.3390/app13169371>

Curatore Accademico: Maciej Dobrzyn'ski

Ricevuto: 27 giugno 2023

Revisionato: 7 agosto 2023

Accettato: 15 agosto 2023

Publicato: 18 agosto 2023



**Copyright:** © 2023 degli autori.

Licenziario MDPI, Basilea, Svizzera. Il presente è un articolo ad accesso libero distribuito secondo i termini e le condizioni stabilite dalla licenza di Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Sintesi:** Al giorno d'oggi, i pazienti non si preoccupano esclusivamente della propria salute orale ma desiderano anche un sorriso perfetto. Nonostante i progressi fatti nell'odontoiatria estetica, ci troviamo di fronte a situazioni nelle quali risultati insoddisfacenti di sbiancamento dentale sono in netto contrasto con l'elevato costo dei trattamenti professionali. Un eventuale disagio del paziente e potenziali danni dentali vanno ad aggravare ulteriormente tali situazioni. In questo studio abbiamo realizzato un'analisi comparativa split-mouth ex vivo al fine di valutare l'innovativo prodotto BlancOne ULTRA<sup>+</sup> (IDS SpA) rispetto a prodotti professionali già noti: Opalescence Extraboost (ULTRADENT), Zoom WhiteSpeed (Philips Research Eindhoven High Tech), e Pola Office (SDI Limited). Inizialmente abbiamo focalizzato la nostra attenzione sull'efficacia sbiancante di ogni prodotto, misurata per mezzo di uno spettrofotometro. Successivamente, abbiamo esaminato gli eventuali cambiamenti strutturali post-trattamento dello smalto utilizzando un microscopio a forza atomica (AFM) ed una procedura di nanoindentazione. Tutti gli agenti per sbiancamento analizzati hanno dimostrato un'efficacia nell'effetto di brillantezza dei denti. BlancOne ULTRA<sup>+</sup>, Zoom WhiteSpeed, e Pola Office causando alterazioni minime nella consistenza della superficie dello smalto entro limiti nanometrici, mentre Opalescence Extraboost ha prodotto cambiamenti più pronunciati, con una significativa alterazione nella rugosità superficiale e potenziale riduzione della durezza del materiale a causa di consequenziali cambiamenti nelle proprietà meccaniche. BlancOne ULTRA<sup>+</sup> sembra offrire il risultato migliore in termini di costi-benefici.

**Parole chiave:** microscopia a forza atomica; nanoindentatore; cavità orale; odontoiatria estetica; sbiancamento; foto sbiancamento; perossido di idrogeno; sbiancamento di denti vitali.

## 1. Introduzione

L'estetica ha da sempre un ruolo importante nella società e civiltà umana. Al giorno d'oggi, mantenere un aspetto piacevole è essenziale, e la brillantezza dei denti, in particolare, può influenzare la qualità della vita prima e dopo il trattamento sbiancante [1]. Laddove le macchie intrinseche sono il risultato di un processo patologico, anche abitudini comuni quali il consumo di vino, caffè e tè; il fumo, il consumo di cibi colorati e l'abuso di antibiotici possono causare macchie. Tannini, forfurolo, carotenoidi, colori artificiali e tetraciclina possono avere un impatto sulla struttura della dentina

o dello smalto e causare la pigmentazione dei denti [2]. Lo sbiancamento dentale, però, può provocare sensibilità dentinale ed irritazione gengivale a causa di trattamenti impropri, con conseguenti effetti negativi sulla vita delle persone. [3]. Gli agenti sbiancanti possono anche avere effetti antibatterici e causare potenziali squilibri nel microbioma orale. Si può affermare quindi, che l'impatto positivo di un sorriso più brillante sulla qualità della vita e quello negativo della sensibilità dentinale sono interconnessi [3,4]. Lo sbiancamento dentale può essere effettuato dai pazienti stessi o da professionisti in studi odontoiatrici tramite l'utilizzo di prodotti che contengono perossido di idrogeno o perossido di carbammide [2]. Ciononostante, i denti costituiscono un biocomposito organico-inorganico altamente complesso [5], e sbiancamenti aggressivi effettuati con perossido di idrogeno potrebbero danneggiare la matrice organica del dente. Inoltre, le alterazioni ed i danni alla struttura superficiale del dente [6], con la presenza di pori microscopici ed imperfezioni superficiali, possono creare problemi quali pulpiti reversibile e condizioni simili [7].

Una verifica degli effetti dello sbiancamento di denti vitali sulle proprietà meccaniche dello smalto dentale ha messo in evidenza potenziali alterazioni nella durezza del dente connesse allo sbiancamento dentale, probabilmente derivanti dalla degradazione o denaturazione delle proteine della matrice dello smalto per via dell'ossidazione del perossido [8]. Tuttavia, una recente meta-analisi volta a stabilire prove scientifiche degli effetti di sbiancamenti domestici di denti vitali con gel di perossido di carbammide al 10% sulla microdurezza dello smalto dentale umano, ha stabilito che non vi sono alterazioni significative nella microdurezza dello smalto quando si utilizzano gel al 10% di perossido di carbammide per periodi di 7, 14, e 21 giorni [9].

Inoltre, in uno studio, gli autori hanno sollevato perplessità nelle conclusioni rispetto al rilascio di perossido di idrogeno nella cavità orale e la conseguente ingestione dello stesso, focalizzando la propria attenzione sulla sua tossicità e potenziale cancerogenicità [10].

Al fine di mitigare alcuni di questi problemi secondari post-trattamento, sul mercato globale cominciano ad essere offerti prodotti che contengono nanomateriali quali la nano-idrossiapatite, in grado di prevenire fenomeni di ipersensibilità, preservando ulteriormente la delicata struttura minerale del dente [11].

In questo studio abbiamo effettuato numerose analisi comparative su quattro tra i prodotti maggiormente commercializzati a livello globale: BlancOne ULTRA<sup>+</sup> (IDS SpA), Opalescence Extrabooost (ULTRADENT), Zoom WhiteSpeed (Philips Research Eindhoven High Tech), e Pola Office (SDI Limited). Abbiamo scelto, come approccio preliminare, di lavorare su di un modello animale di bovino ex vivo, per una maggiore attenzione verso i pazienti. Inoltre, il materiale animale selezionato e le condizioni prese in considerazione permettono un alto livello di affidabilità e traducibilità, come indicato anche dalla relativa letteratura [12,13].

La variabile predittiva è costituita dall'innovativa formula brevettata di coloranti fotosensibili combinati a fotoni e particolari catalizzatori di energia nel trattamento BlancOne ULTRA<sup>+</sup> con l'uso di una soluzione al 35% di perossido di idrogeno (HP), come meglio specificato sul sito [www.blancone.eu](http://www.blancone.eu) visitato in data 14 ottobre 2022. L'obiettivo primario dello studio era quello di valutare l'efficacia dello sbiancamento dentale tramite prodotti di sbiancamento e foto sbiancamento, verificando il potenziale miglioramento dei relativi risultati, nello specifico riguardo a BlancOne ULTRA<sup>+</sup>. Il secondo punto di interesse dello studio era quello di verificare la presenza di eventuali effetti negativi che i processi di sbiancamento e foto sbiancamento potrebbero avere sullo smalto.

Abbiamo inizialmente analizzato l'efficacia sbiancante di ogni prodotto tramite l'utilizzo di uno spettrofotometro prima e dopo il trattamento, sottolineando le differenze statistiche tra gli stessi. L'uso di uno spettrofotometro in grado di misurare la brillantezza, ovvero l'ammontare di luce riflessa dalla superficie del dente, ci ha permesso di ottenere valori completamente obiettivi evitando quindi di essere influenzati dalla percezione umana del cambiamento di colore. Questo strumento, inoltre, mostra l'alterazione della brillantezza in termini numerici, permettendo quindi calcoli statistici immediati ed affidabili [14].

In secondo luogo, abbiamo completato accurati studi ingegneristici sui potenziali danni strutturali allo smalto dopo il trattamento. Tramite l'utilizzo di un microscopio a forza atomica (AFM), abbiamo esaminato e comparato le stesse superfici trattate prima e dopo lo sbiancamento al fine di quantificare gli effetti del trattamento in termini di topografia su scala nanometrica e rugosità della superficie. Infine, tramite un processo di nanoindentazione, abbiamo verificato se vi fossero anche alterazioni nelle proprietà meccaniche della struttura dello smalto dentale e conseguentemente nella resistenza dei tessuti.

## 2. Materiali e metodi

### 2.1. Gli agenti sbiancanti

Gli agenti sbiancanti utilizzati nel nostro studio comparativo sono costituiti da quattro prodotti classici presenti sul mercato e destinati all'uso professionale, ovvero (Tabella 1):

**Tabella 1.** Breve descrizione dei prodotti per sbiancamento (a) e foto sbiancamento (b), modalità di utilizzo e numero e tempi di applicazione.

Nome del prodotto	% Perossido di idrogeno	Modalità di azione	Foto attivazione	N° trattamenti e tempi di applicazione
Opalescence Extraboost (a)	40%	chimica	/	3 applicazioni × 20 min
Zoom WhiteSpeed (b)	25%	luce	405–500 nm	4 applicazioni × 15 min
Pola Office (a)	35%	chimica	/	4 applicazioni × 8 min
BlancOne ULTRA+ (b)	35%	luce	430–490 nm	3 applicazioni × 8 min

Opalescence Extraboost con perossido di idrogeno al 40% (ULTRADENT 505 West Ultradent Drive, South Jordan, UT 84095, USA);

Zoom WhiteSpeed con perossido di idrogeno al 25% (Philips Research Eindhoven High Tech, Campus 34, 5656 AE, Eindhoven, Olanda), che richiede foto attivazione tramite lampada Philips Led blue-white speed 400–505 nm (Philips Research Eindhoven High Tech);

Pola Office con perossido di idrogeno al 35% (SDI Limited, 3-15 Brunsdon Street, Bayswater, Victoria 3153, Australia);

BlancOne ULTRA+ con perossido di idrogeno al 35% (IDS SpA, Via Valletta San Cristoforo, 28/10, 17100 Savona, Italy), che richiede foto attivazione tramite lampada BlancOne Led Arcus (430–490 nm) (IDS SpA).

### 2.2. Analisi del pH degli agenti sbiancanti

Con riferimento ai prodotti per sbiancamento selezionati e menzionati sopra, abbiamo analizzato il pH dinamico comparando il valore del pH all'inizio del trattamento (tempo zero) al valore del pH al termine del tempo di trattamento indicato nella Tabella 2. Per misurare il pH è stato utilizzato il piaccametro Five Easy Plus FP20-Std-Kit (Mettler Toledo, Columbus, OH, USA).

**Tabella 2.** pH dinamico degli agenti sbiancanti

Nome del prodotto	pH Tzero	pH T1	Tempo a T1
Opalescence Extraboost	7.21	6.20	20 min
Zoom WhiteSpeed	8.05	7.9	15 min
Pola Office	6.91	7.10	8 min
BlancOne ULTRA+	5.80	5.50	8 min

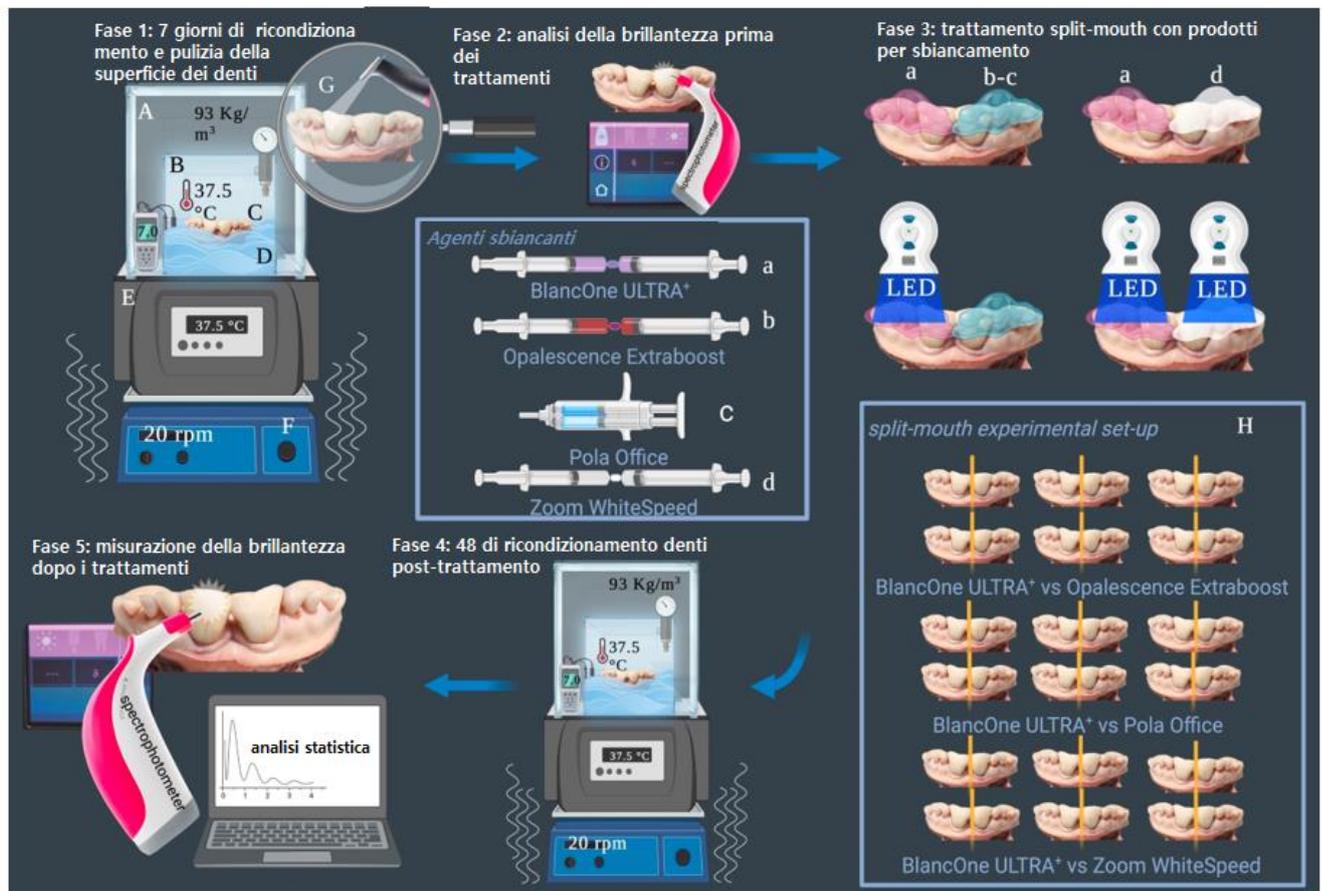
pH Tzero = valore prima del trattamento; pH T1 = valore dopo il trattamento

### 2.3. Raccolta e preparazione campioni

Ai fini della nostra analisi, abbiamo selezionato campioni di denti bovini, che costituiscono campioni affidabili e rappresentano un ideale modello ex vivo dei denti umani, come dimostrato da Kury et al. [12] e Soares et al. [13]. Abbiamo ottenuto 18 mandibole bovine, ed utilizzato 6 mandibole per ognuno degli esperimenti comparativi, per un totale di 144 incisivi trattati. [15].

Tali campioni sono stati ottenuti presso il macello dell'Azienda Agricola BIOBIO, Vobarno, Brescia, Italia, e provenivano da animali di 18 mesi allevati per il consumo umano secondo le direttive del Ministero italiano per le politiche agricole, alimentari e forestali. Dato che gli animali non sono stati allevati o macellati presso l'Università di Genova, non si è resa necessaria l'approvazione del comitato etico. Al fine di minimizzare potenziali differenze nella dentatura, abbiamo selezionato campioni nati ed allevati nella stessa fattoria organica, alimentati con gli stessi mangimi e mai soggetti a trattamenti antibiotici fino alla macellazione.

I campioni sono stati raccolti immediatamente dopo la macellazione e processati secondo quanto previsto dai regolamenti di sicurezza. Gli incisivi non sono stati estratti dalle mandibole ma preservati con le relative sezioni scheletriche. Per ogni sezione della mandibola, otto incisivi (quattro sul lato sinistro e quattro sul lato destro) sono stati utilizzati e puliti utilizzando procedure tradizionali di profilassi dentali tramite AirFlow prophylaxis master e polvere di eritritolo 14  $\mu\text{m}$  (E.M.S. Electro Medical Systems S.A., Chem. de la Vuarpillière 31, 1260 Nyon, Svizzera) (rif. Figura 1G) [16].



**Figura 1** Rappresentazione dell'esperimento. Le mandibole bovine sono state pre-incubate nel bioreattore per i 7 giorni precedenti all'esperimento (Fase 1). La brillantezza è stata analizzata tramite l'utilizzo di uno speciale spettrofotometro prima del trattamento (Fase 2). La dentatura è stata sottoposta a trattamento di sbiancamento utilizzando (A) BlancOne ULTRA\* con perossido di idrogeno al 35%, foto attivato tramite lampada BlancOne Led Arcus (430–490 nm), (B) Opalescence Extraboost con perossido di idrogeno al 40%, (C) Pola Office con perossido di idrogeno al 35%, o (D) Zoom WhiteSpeed con perossido di idrogeno al 25%, foto attivato tramite lampada Philips Led blue-white speed 400–505 nm (Fase 3). I test sono stati eseguiti utilizzando un impianto sperimentale split-mouth, nel quale sono state analizzate 18 mandibole, 6 mandibole per ogni esperimento comparativo (H). Le mandibole bovine sono state in seguito incubate all'interno del bioreattore per 48 ore (Fase 4). La brillantezza è stata misurata utilizzando lo spettrofotometro 48 ore dopo il trattamento (Fase 5), e sono state eseguite analisi statistiche.

#### 2.4. Simulazione delle condizioni del cavo orale tramite bioreattore

Al fine di simulare le condizioni del cavo orale umano, abbiamo utilizzato un bioreattore costruito appositamente in grado di replicare le interazioni tra fluidi salivari e superficie dentale tramite un preciso controllo dei fluidi. La struttura e le funzioni del bioreattore sono state precedentemente descritte in Pasquale et al. [17]. In breve, la cavità orale è stata riprodotta utilizzando una particolare miscela di saliva artificiale a pH neutro, monitorata dal piaccametro Five Easy Plus FP20-Std-Kit (Mettler Toledo, Columbus, OH, USA), ed un modello di bagno termostatico (Modello Grant ST 12; Grant Instruments Cambridge, SG8 6GB, Cambridgeshire, UK) (rif. Figura 1E) al fine di mantenere temperatura ed umidità a valori simili rispetto a quelli presenti nella cavità orale umana. Per mantenere la temperatura costante di 37.5 °C, è stata impostata nella vasca termostatica una temperatura continuamente monitorata con un termometro digitale HI 935002 a termocoppia di tipo K (HANNA INSTRUMENTS Italia srl, Viale Delle Industrie, 11, 35010 Ronchi di Villafranca Padovana, Italy). L'indice di umidità è stato mantenuto al valore di 93 Kg/m<sup>3</sup> e misurato grazie ad un termogigrometro digitale HI9564 (HANNA INSTRUMENTS Italia srl), come descritto in Dabbagh et al. [18].

Infine, l'intero assetto era supportato da un agitatore orbitale (SLA-OS-200. Scitech LabApp Ltd., Micklefield, Leeds, LS25 9BP, UK) (rif. Figura 1F), con un'oscillazione di 20 giri a minuto al fine di replicare l'umettazione della superficie dentale da parte della saliva nella cavità orale umana [17], come descritto in Pasquale et al.

#### 2.5. Trattamento dei campioni ai fini della valutazione dell'efficacia degli agenti sbiancanti

Le mandibole a supporto della dentatura sono state conservate nel bioreattore per la settimana precedente al trattamento sbiancante in modo da garantire che i denti fossero adeguatamente condizionati. In seguito, è stata una disposizione split-mouth al fine di utilizzare i prodotti sbiancanti secondo le istruzioni fornite dai produttori (rif. Tabella 1). Al fine di soddisfare gli scopi dell'esperimento comparativo e minimizzare l'influenza di eventuali eterogeneità dei campioni sperimentali riguardo agli effetti del trattamento, un lato è stato trattato con il prodotto BlancOne ULTRA+ con perossido di idrogeno al 35% mentre l'altro lato è stato trattato con un prodotto classico disponibile sul mercato, come illustrato nella Figura 1. Il numero di trattamenti, il tempo ed il metodo di foto attivazione per ogni agente sbiancante sono indicati nella Tabella 1. Inoltre, la struttura del bioreattore, che, come mostrato precedentemente, replica la cavità orale [17], e l'uso di uno spettrofotometro ai fini della misurazione dell'effetto sbiancante, supportano l'affidabilità dei nostri dati.

La brillantezza è stata analizzata grazie all'uso dello spettrofotometro, VITA easy-shade (VITA Zahnfabrik (VITA Zahnfabrik H. Rauter GmbH & Co. KG Postfach 1338 D-79704, Bad Säckingen, Germania), prima e 48 ore dopo il trattamento di sbiancamento. I valori sono stati espressi in densità ottica (OD) [19]. La misurazione è stata effettuata 48 ore dopo il trattamento, come previsto dalla relativa letteratura, a conferma del risultato finale e della stabilità del trattamento [20]. I test sono stati eseguiti utilizzando un lato della mandibola per volta.

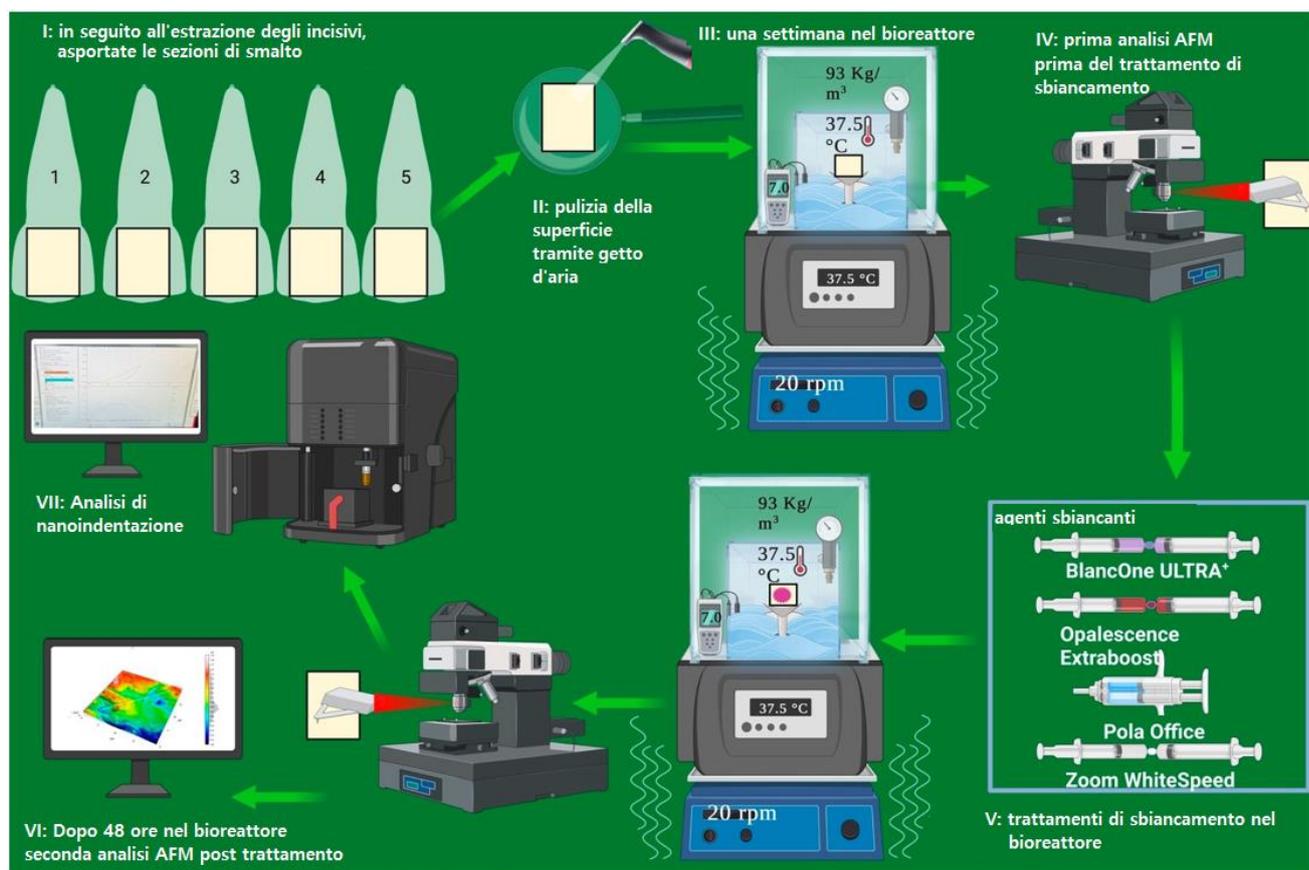
#### 2.6. Trattamento dei campioni per analisi strutturali e meccaniche

Al fine di condurre analisi strutturali e meccaniche sono state selezionate sezioni (8 mm × 8 mm) di smalto degli incisivi centrali inferiori delle mandibole bovine sopra descritte. Queste sono stati fissate alla parte inferiore di una piastra di Petri tramite adesivo e conservate per una settimana nel bioreattore prima che venissero effettuate ulteriori misurazioni.

Al fine di permettere un'analisi strutturale comparativa su scala nanometrica, tenendo in considerazione l'eterogeneità della struttura della superficie osservata in differenti parti dello stesso campione, si è stabilito di comparare le stesse aree di 20 × 20 μm<sup>2</sup> prima e dopo il trattamento sbiancante.

A questo fine, sono state inserite manualmente quattro piccole incisioni su di ogni campione, utilizzando un trapano odontoiatrico, incisioni identificabili tramite ispezione ottica, in modo da facilitare il riposizionamento della sonda del microscopio atomico nella stessa area di scansione.

Questo ha permesso di catturare immagini da diverse aree, sottoporre il campione alla procedura di sbiancamento nel bioreattore, ricollocare il campione al di sotto del microscopio a forza atomica, e catturare nuove immagini delle stesse aree. La rappresentazione dell'esperimento è illustrata nella Figura 2.



**Figura 2.** Rappresentazione dell'esperimento: I: In seguito all'estrazione dei 5 incisivi centrali inferiori, vengono asportate sezioni di smalto di dimensione 8 × 8 mm, compatibili con la piastra di analisi del microscopio a forza atomica. Una sezione viene esclusivamente utilizzata come campione di verifica per la nanoindentazione mentre le altre vengono utilizzate per il trattamento con gli agenti sbiancanti. II: Si esegue la pulizia della superficie tramite l'utilizzo di getto d'aria e polvere di eritritolo 14 μm (EMS). III: I campioni vengono posizionati nel bioreattore, dove vengono ricondizionati nell'ambiente orale per una settimana. IV: Prima dei trattamenti sbiancanti, le superfici vengono analizzate tramite microscopia a forza atomica (AFM). V: Le superfici dello smalto vengono sottoposte a trattamento sbiancante, secondo i tempi e protocolli suggeriti dai produttori ed indicati nella Tabella 1. VI: La seconda fase dell'analisi AFM viene eseguita sugli stessi punti precedentemente analizzati, ed i risultati vengono comparati in modo da ottenere le misurazioni necessarie ad una statistica di riferimento rispetto ad ogni alterazione della superficie. VII: Infine, gli stessi campioni sono sottoposti a nanoindentazione in modo da valutare possibili alterazioni meccaniche nel materiale dello smalto prima e dopo il trattamento di sbiancamento.

### 2.7. Misurazioni tramite microscopia a forza atomica (AFM)

Al fine di ottenere corrette misurazioni rispetto all'altezza della topografia superficiale dello smalto prima e dopo il trattamento sbiancante, è stata utilizzata la microscopia correlativa ottica-atomica con un microscopio AFM commerciale (NanoWizard 4 XP BioScience, Bruker, Billerica, MA, USA) dotato di un supporto motorizzato per un preciso riposizionamento del campione (HybridStageTM, Bruker), e affiancato da un microscopio ottico verticale (AxioZomm v.16, Zeiss, Jena, Germany).

Sono state ottenute immagini topografiche grazie alla "modalità di contatto" in acqua deionizzata su aree di scansione pari a 20 × 20 μm<sup>2</sup>. Al fine di garantire risultati affidabili, abbiamo utilizzato la stessa sonda (HQ:CSC17/Hard/AI BS, MikroMasch, Tallinn, Estonia) con un rivestimento resistente all'usura al fine di mantenere una costante geometria/dimensione della punta su misurazioni multiple, con conseguenti caratteristiche topografiche comparabili.

I dati AFM sono stati processati grazie al software Mountains<sup>®</sup> da Digital Surf, Besançon, Francia. Al fine di esprimere numericamente e comparare le alterazioni nella rugosità superficiale, è stato

calcolato il parametro della “Rapporto dell'area interfacciale sviluppata” (Sdr) secondo quanto previsto dallo standard ISO 25178-2:2012. Il parametro Sdr esprime la percentuale di superficie aggiuntiva apportata dalla topografia della superficie rispetto a un piano ideale delle dimensioni della regione di misurazione. Con riferimento ad una superficie piana, Sdr equivale a 0%, mentre aumenta con l'aumentare della complessità della topografia della superficie [21].

### 2.8. Nanoindentazione

Al fine di valutare le alterazioni nelle proprietà meccaniche dello smalto in seguito al trattamento sbiancante, sono state eseguite misurazioni di nanoindentazione con nanoindentatore di Anton Paar Italia srl Rivoli 10098 Italia, con testina UNHT, dotato di punta in diamante Berkovich. Il carico massimo è stato impostato a 5 mN, il valore di carico e scarico a 10 mN/min, e tempo di permanenza al carico massimo a 10 s. Sono state effettuate almeno 16 misurazioni per ogni campione, i cui risultati sono presentati come media  $\pm$  deviazione standard.

Nello specifico, è stato calcolato il modulo di Young  $E$  (1), che descrive l'elasticità o rigidità del materiale, e la durezza  $H$  (2), che descrive la resistenza alla deformazione plastica, utilizzando il metodo ampiamente accettato di Oliver e Pharr [22,23].

$$E = \frac{1}{\beta} \frac{\sqrt{dP}}{\sqrt{dh}} \frac{\pi}{2A} \quad (1)$$

$$H = \frac{P_{max}}{A} \quad (2)$$

dove  $P_{max}$  costituisce il carico massimo,  $\frac{dP}{dh}$  costituisce la rigidità di scarico,  $\beta = 1.034$  rappresenta un coefficiente geometrico, ed  $A$  l'area di contatto, calcolata geometricamente, dalla profondità di contatto, definita come:

$$hc = h_{max} - \epsilon \frac{P_{max}}{dP/dh}$$

dove  $\epsilon = 0.75$  rappresenta una funzione dell'indentatore.

### 2.9. Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata tramite l'utilizzo del software MATLAB (The Math-Works, Inc. MathWorks 1 Apple Hill Drive, Natick, MA 01760, USA). Sono state comparate le medie  $\pm$  deviazioni standard o le differenze tra le medie (media prima – media dopo il trattamento)  $\pm$  deviazione standard di ogni test, con esperimenti ripetuti almeno tre volte. Secondo quanto indicato da Rosner, è stata calcolata la dimensione del campione in modo da stabilire il numero minimo necessario di soggetti al fine di ottenere una sufficiente potenza di studio utilizzando il calcolatore ClinCalc Sample Size [24]. Considerando i dati preliminari sull'endpoint primario ed una media di efficacia di  $\Delta OD$  (differenza tra le misurazioni dello spettrofotometro prima e dopo il trattamento) 7.1 con una deviazione standard del 30% nel gruppo 1 (BlancOne ULTRA<sup>+</sup>), ed una differenza pari al 15% rispetto al gruppo 2 (prodotti commerciali standard), si considera una dimensione del campione che rientra tra 118 e 194 come adeguata ad ottenere una potenza che va da 0.8 a 0.95, con un livello alfa di 0.5 e beta di 0.2. La potenza statistica è stata calcolata utilizzando un rapporto di ripartizione di 1 e un alfa pari al 5% tramite il programma online Simple Interactive Statistical Analysis al sito (<https://www.quantitativeskills.com/sisa/index.htm>) visitato il 20 gennaio 2023.

## 3. Risultati

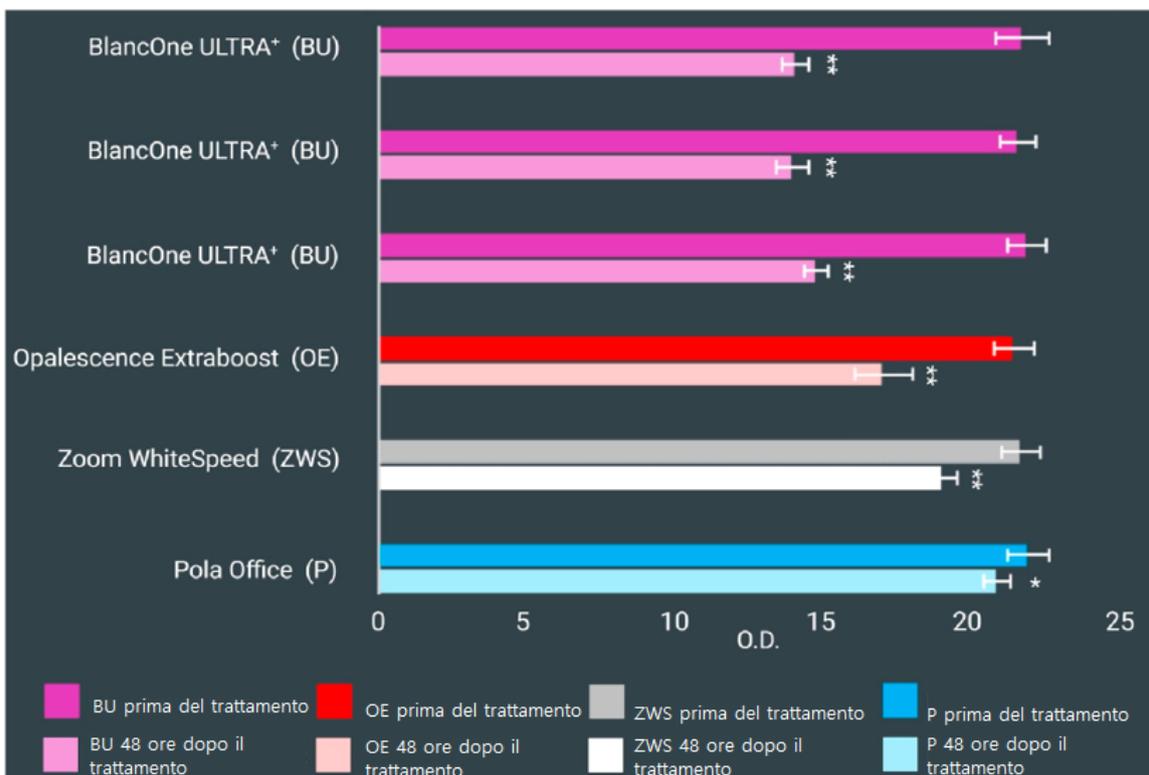
### 3.1. pH degli agenti sbiancanti

Come illustrato nella Tabella 2, i valori del pH dinamico delle sostanze analizzate variano l'uno dall'altro. Per natura, il perossido di idrogeno ad alto volume ha un pH acido di circa 4 ed è potenzialmente più stabile chimicamente. Al fine di ottimizzare tali sostanze e renderle compatibili ai tessuti dentali, vengono aggiunte sostanze tampone [25].

Ciononostante, è importante tenere in considerazione che i problemi che un pH leggermente acido può causare alla superficie dentale sono sempre direttamente proporzionali ai tempi di contatto tra gel e denti [26].

### 3.2. Misurazioni tramite spettrofotometro ed analisi dei dati di sbiancamento per ogni trattamento

In questo studio, abbiamo utilizzato uno spettrofotometro al fine di valutare la brillantezza dei denti prima e dopo i diversi trattamenti. Le misurazioni riguardanti la brillantezza sono state espresse in termini di densità ottica (OD) ed analizzate statisticamente utilizzando il test t di Student. I risultati sono mostrati visivamente nella Figura 3.



**Figura 3.** Effetto dei trattamenti sbiancanti professionali. Gli istogrammi mostrano la media  $\pm$  deviazione standard della misurazione di brillantezza spettrofotometrica (O.D.) effettuata prima e 48 ore dopo il trattamento. I simboli \* e \*\* indicano rispettivamente una differenza statisticamente significativa ed estremamente significativa (test t di Student) nella comparazione della brillantezza dei denti prima e 48 ore dopo il trattamento sbiancante.

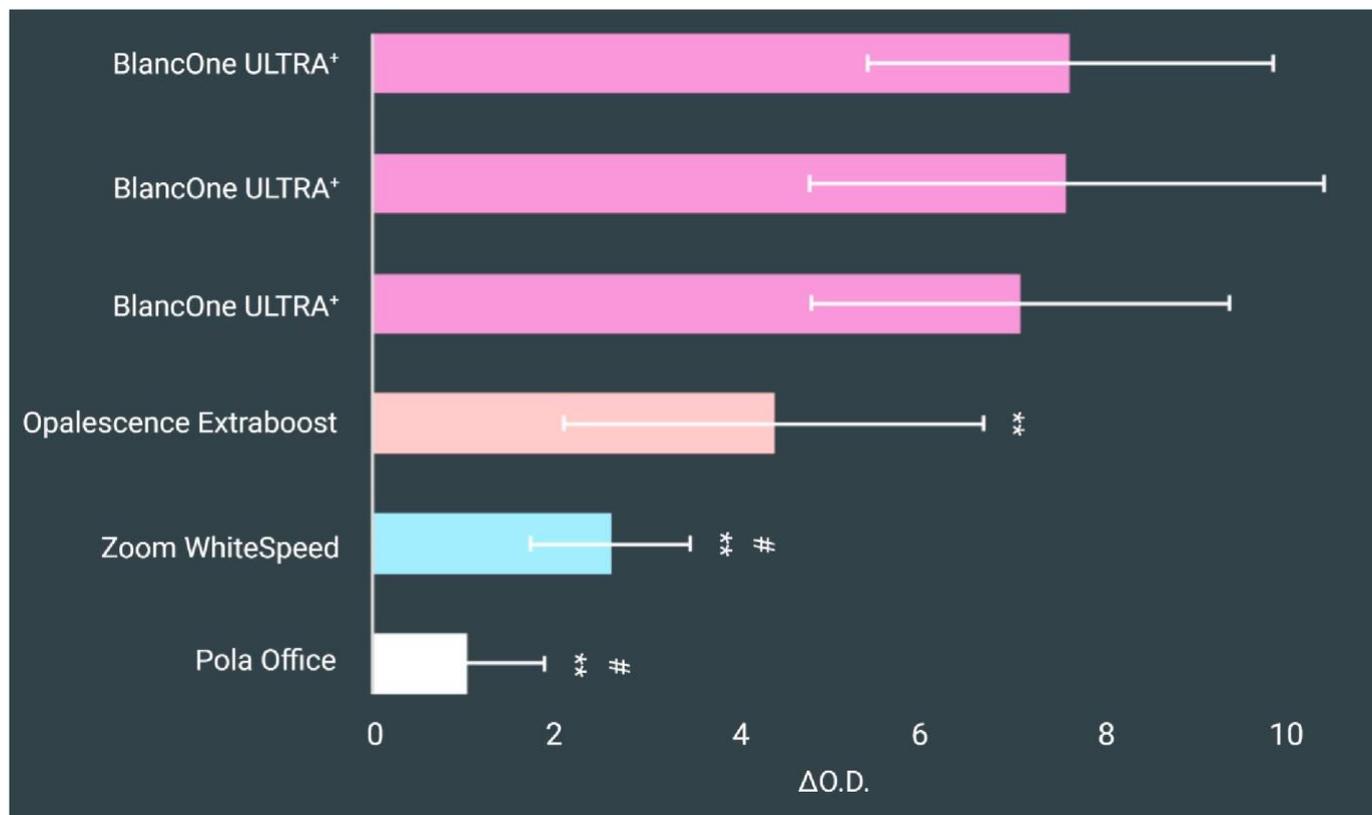
I dati hanno rilevato che BlancOne ULTRA<sup>+</sup> ha migliorato la brillantezza dei denti in maniera significativa in tutti e tre gli esperimenti, ovvero con sei mandibole per ogni esperimento, con una differenza statisticamente estremamente significativa ( $p < 0.0001$ ) osservata prima e dopo del trattamento. I valori della media  $\pm$  deviazione standard prima e dopo il trattamento sono pari a  $21.75 \pm 0.91$  e  $14.08 \pm 0.46$ ,  $21.61 \pm 0.60$  e  $13.99 \pm 0.56$ , e  $21.91 \pm 0.65$  e  $14.79 \pm 0.40$ , rispettivamente.

Allo stesso modo, Opalescence Extraboost ( $21.46 \pm 0.68$  prima e  $17.06 \pm 0.99$  dopo il trattamento) e Zoom WhiteSpeed ( $21.69 \pm 0.66$  prima e  $19.07 \pm 0.49$  dopo il trattamento) hanno avuto un effetto positivo sulla brillantezza dentale, con una differenza statisticamente estremamente significativa ( $p < 0.0001$ ) osservata in entrambi i casi.

Di contro, la differenza tra prima ( $21.95 \pm 0.69$ ) e dopo ( $20.91 \pm 0.54$ ) del trattamento Pola Office è stata la meno evidente, nonostante vi sia un dato statisticamente significativo con un valore- $p$  inferiore a 0.05.

### 3.3. Analisi dei dati sbiancamento tra esperimenti e trattamenti

Al fine di identificare eventuali differenze tra gli esperimenti ed i trattamenti, è stato eseguito un test sull'analisi della varianza (ANOVA), seguito dal test HSD di Tukey. Il confronto è stato fatto utilizzando la differenza delle medie (media prima del trattamento meno media dopo il trattamento)  $\pm$  deviazione standard di ogni test. I risultati sono illustrati nella Figura 4.



**Figura 4.** Effetti dei trattamenti sbiancanti professionali. Gli istogrammi mostrano la media  $\pm$  deviazione standard della misurazione di brillantezza spettrofotometrica (O.D.) eseguita prima e 48 ore dopo il trattamento. Il simbolo \*\* indica una differenza statisticamente estremamente significativa (test ANOVA a una via seguito dal test HSD di Tukey), comparando gli effetti sulla brillantezza dentale con riferimento al prodotto BlancOne ULTRA+. Il simbolo # indica una differenza statisticamente significativa (test ANOVA a una via seguito dal test HSD di Tukey), comparando gli effetti della brillantezza dentale con riferimento al prodotto Opalescence Extraboost.

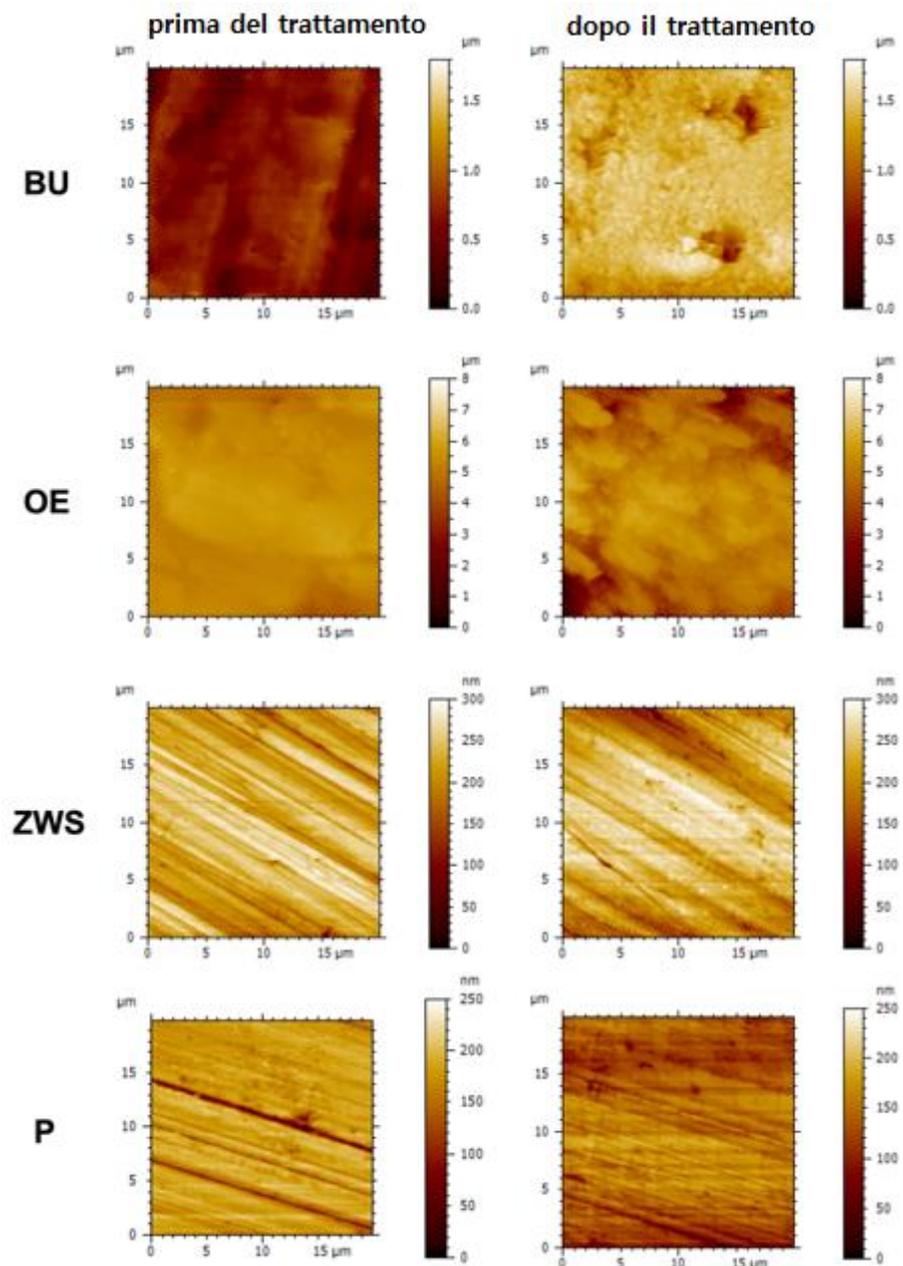
Occorre notare che le medie  $\pm$  deviazione standard della misurazione di brillantezza rilevate prima dei trattamenti non hanno evidenziato differenze statisticamente significative ( $p = 0.1531$ ).

Il confronto delle differenze nella media  $\pm$  deviazione standard per ogni trattamento ha rilevato che la differenza tra gli effetti di BlancOne ULTRA+ ed i prodotti tradizionali presenti sul mercato intesi per uso professionale è statisticamente estremamente significativa ( $p < 0.0001$ ).

Inoltre, una differenza statisticamente significativa è stata osservata tra Opalescence Extraboost e Pola Office ( $p < 0.0001$ ), così come una differenza nella comparazione tra Opalescence Extraboost e Zoom WhiteSpeed. Ciononostante, non si è riscontrata alcuna differenza statisticamente significativa tra gli effetti di Pola Office e Zoom WhiteSpeed ( $p = 0.1060$ ).

### 3.4. Risultati AFM

Le immagini topografiche ad alta risoluzione AFM rivelano l'eterogeneità della superficie dello smalto attraverso diverse aree e campioni. Al fine di valutare l'impatto di diversi trattamenti sbiancanti sulla topografia della superficie, la stessa area è stata scansionata prima e dopo del trattamento come illustrato nella Figura 5.



**Figura 5.** Immagini topografiche AFM ad alta risoluzione ottenute in modalità di contatto in acqua deionizzata prima e dopo ogni trattamento: BU = BlancOne Ultra<sup>+</sup>; OE = Opalescence Extrablast; ZWS = Zoom WhiteSpeed; P = Pola Office.

La Tabella 3 mostra i valori (media  $\pm$  errore standard) per il “rapporto dell'area interfacciale sviluppata” (Sdr), che viene utilizzato come parametro affidabile per la caratterizzazione della rugosità superficiale in caso di consistenze complesse e variabili.

**Tabella 3.** Rapporto dell'area interfacciale sviluppata (Sdr) calcolato su immagini topografiche AFM ottenute su diverse aree pari a  $20 \times 20 \mu\text{m}^2$  prima ed in seguito ai diversi trattamenti sbiancanti. L'ultima colonna riporta la differenza, ovvero, l'alterazione nella rugosità superficiale e consistenza causata dal trattamento. Il simbolo \*\* indica un valore di differenza statisticamente significativo (test ANOVA a una via seguito dal test HSD di Tukey).

Trattamento	Sdr prima del trattamento [%]	Sdr dopo il trattamento [%]	Differenza
OE (n = 3)	3.52 ± 0.01	61.22 ± 0.12	57.7 ± 0.1 **
BU (n = 3)	7.48 ± 0.02	15.87 ± 0.02	8.39 ± 0.03 **
ZWS (n = 3)	1.446 ± 0.002	1.302 ± 0.002	-0.144 ± 0.003
P (n = 10)	1.013 ± 0.002	2.387 ± 0.003	1.373 ± 0.003 **

La Tabella 3 riporta i valori (media ± errore standard) del “rapporto dell’area interfacciale sviluppata” (Sdr) come parametro affidabile rappresentativo della rugosità superficiale quando è presente una superficie complessa e variabile. I risultati della Tabella 3 evidenziano come non vi siano differenze statisticamente significative tra la rugosità del campione trattato con ZWS ( $p = 0.554$ ), mentre la differenza maggiore è evidenziata nel campione trattato con OE.

### 3.5. Risultati della nanoindentazione

La Figura 6 illustra la profondità di penetrazione totale alla massima forza di carico. I campioni trattati con Zoom e Boost mostrano una profondità di penetrazione tre volte maggiore, allo stesso carico applicato pari a 5 mN, rispetto al campione non trattato (di controllo) e gli altri trattamenti. Ciò suggerisce un indebolimento dello strato di smalto, come evidenziato dai valori inferiori di elasticità e durezza indicati nella Figura 7. Il test ANOVA eseguito, seguito dal test HSD di Tukey, ha evidenziato una differenza statisticamente significativa ( $p < 0.01$ ) nel modulo di Young dei campioni trattati con Zoom (ZWS)-, Boost (OE)-, e Pola (P) dove il trattamento ZWS ha causato l’alterazione maggiore, mentre il campione trattato con ULTRA+ (BU) non ha mostrato differenze statisticamente significative ( $p = 0.899$ ).

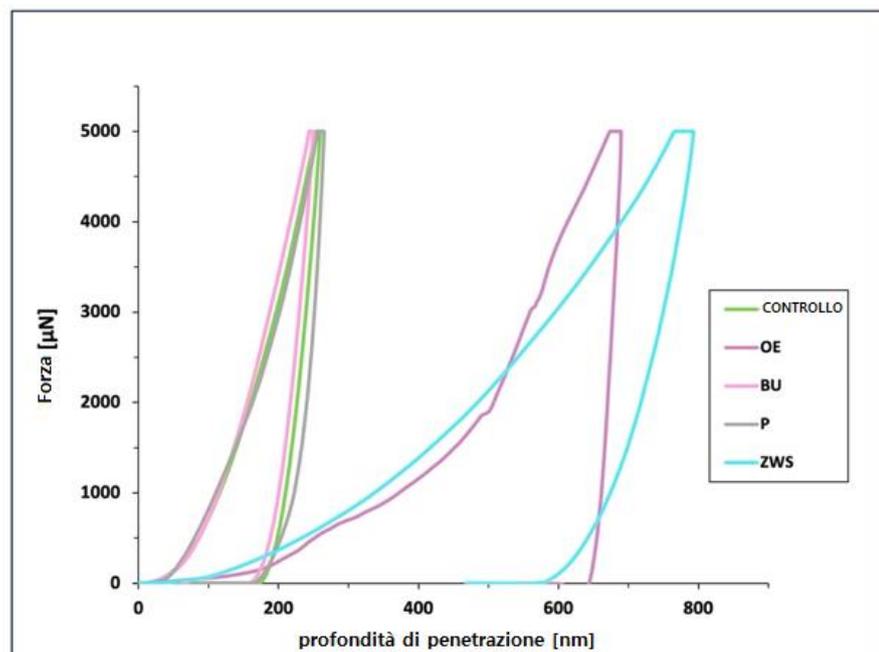


Figura 6. Curve di indentazione tipiche per ognuno dei trattamenti testati.



**Figura 7.** Alterazioni nella durezza (A) e nel modulo di Young (B) in seguito ad ogni trattamento di sbiancamento, rispetto al campione di riferimento non trattato. Il simbolo \*\* indica una differenza statisticamente estremamente significativa (test ANOVA a una via seguito dal test HSD di Tukey) rispetto al campione di riferimento; BlancOne Ultra+ e Pola Office.

Inoltre, è stata osservata una differenza statisticamente significativa ( $p < 0.01$ ) nella durezza dei campioni trattati con ZWSand ed OE, rispetto al campione di riferimento. Al contrario non sono state evidenziate differenze statisticamente significative tra gli effetti dei trattamenti eseguiti con P ( $p = 0.02$ ) e BU ( $p = 0.436$ ).

#### 4. Discussione

La pigmentazione dentale si rivela essere un problema comune evidenziato da coloro che ricercano un miglioramento a livello estetico. Le alterazioni nelle sfumature di colore dei denti sono causate da un insieme di influenze interne ed esterne e fattori che variano dall'assimilazione di sostanze al consumo di cibi colorati, con conseguente pigmentazione [27]. Il mercato offre una vasta gamma di prodotti che possono essere utilizzati direttamente dai pazienti o tramite trattamenti in studio, e tutti affermano di poter riuscire a fornire un sorriso più bianco e attraente [28]. Il raggiungimento del risultato finale consiste nella percezione umana della brillantezza del sorriso dopo il trattamento. Ciononostante, tale scala visiva personale non è semplice da replicare e "tradurre" in valori numerici reali. L'analisi spettrofotometrica a densità ottica prima e dopo del trattamento sbiancante è stata descritta come un metodo adeguato ad ottenere un valore affidabile riguardo

all'efficacia del trattamento sbiancante [29]. Saluja et al. [30] hanno mostrato che l'analisi spettrofotometrica è più accurata e riproducibile rispetto alla valutazione umana. Gomez-Polo et al. [31] hanno dimostrato che i colorimetri sono decisamente meno affidabili di spettrofotometri e fotocamere digitali. Horn et al. [32], inoltre, hanno concluso che uno spettrometro raggiunge una percentuale pari all'80% di riproducibilità della tonalità dentale laddove l'occhio umano invece raggiunge solamente una riproducibilità pari al 65%. Ne nostro lavoro, i dati valutati tramite spettrofotometro descrivono differenze statisticamente significative per ogni trattamento sbiancante analizzato. I trattamenti, quindi, appaiono efficaci nel migliorare la brillantezza dei denti, benché vi siano differenze nella qualità ed intensità del risultato finale. Infatti, la comparazione dei singoli agenti sbiancanti con BlancOne ULTRA<sup>+</sup> evidenzia una maggiore performance di questo prodotto. Le analisi statistiche suggeriscono una classifica di efficacia dei prodotti con Opalescence Extraboost dopo BlancOne ULTRA<sup>+</sup>, e Pola Office e Zoom WhiteSpeed come meno affidabili. Ragion per cui la classifica relativa all'efficacia vede BlancOne ULTRA<sup>+</sup> > Opalescence Extraboost > Zoom WhiteSpeed = Pola Office.

Da notare è il prodotto BlancOne ULTRA<sup>+</sup>, che fornisce i risultati migliori con una percentuale di perossido di idrogeno inferiore rispetto a Opalescence Extraboost, e simile a quella di Pola Office. Inoltre, BlancOne ULTRA<sup>+</sup> richiede i tempi di applicazione più brevi sulla superficie dentale rispetto agli altri tre prodotti analizzati ed un ridotto numero di trattamenti. ULTRA<sup>+</sup> di BlancOne funziona tramite un processo di foto attivazione chimica del gel utilizzando specifiche lunghezza d'onda della luce, che, a loro volta, possono accelerare il rilascio di radicali liberi e ossigeno singoletto [27]. Ciononostante, come suggerito dalla minore efficacia sbiancante di Zoom WhiteSpeed, la foto attivazione in sé non è sufficiente, ed un buon risultato estetico si ottiene grazie ad un'efficiente sinergia tra una specifica lunghezza d'onda di energia luminosa e la capacità del foto-attivatore di assorbirla. In considerazione di ciò, nonostante la necessità di condurre ulteriori analisi, la formulazione di BlancOne ULTRA<sup>+</sup> che contiene tre foto attivatori naturali in sinergia con lunghezze d'onda di gamma 430–490 nm potrebbe causare un rilascio più efficiente di radicali liberi e ossigeno singoletto al fine di ottenere risultati sbiancanti più veloci ed efficaci. Zoom WhiteSpeed, invece, si basa sulla foto attivazione di Photo-Fenton [33].

I prodotti per lo sbiancamento a base di perossido di idrogeno sono piuttosto comuni nello sbiancamento dentale cosmetico, ma l'uso di tali sostanze in prodotti cosmetici da utilizzare a casa è relativamente limitato [34]. Al contrario, nei trattamenti professionali vengono utilizzate alte concentrazioni di perossido di idrogeno, con possibili conseguenze negative sui tessuti duri e molli [35]. Infatti, un aspetto fondamentale è costituito dall'effetto dell'agente sbiancante sulla struttura dello smalto. Nel 2017 uno studio approfondito [9] ha evidenziato i risultati di una gamma di studi clinici randomizzati volti a valutare l'impatto dell'uso di gel al 10% di perossido di carbammide per lo sbiancamento domestico. L'attenzione è stata focalizzata sulla valutazione di potenziali variazioni nella microdurezza dello smalto, un fattore che influenza la resilienza del cavo orale rispetto alle pressioni di masticazione. L'analisi ha indicato alterazioni limitate nella microdurezza dello smalto quando si utilizzano gel sbiancanti al 10% di perossido di carbammide in un arco di 7-, 14-, e 21-giorni. Inoltre, de Souza Costa et al. [36] hanno dimostrato che il trattamento sbiancante con perossido di idrogeno al 38% per 45 minuti causa danni irreversibili alla polpa dentale negli incisivi inferiori ma non nei premolari. La correlazione tra maggiore sensibilità dentinale, alterazione nella topografia superficiale dello smalto ed il tempo ed il numero di trattamenti suggerisce che con concentrazioni di perossido di idrogeno superiori al 10% è necessario evitare usi prolungati ed a lungo termine degli agenti sbiancanti [37]. Rilevante è il fatto che, riducendo i tempi di contatto dei prodotti con una percentuale di perossido di idrogeno del 35% a circa 5 minuti, si riduce la citotossicità trans-smalto e trans-dentale alle cellule della polpa [38]. Infine, Cintra et al. [39] hanno dimostrato che il numero di sessioni di sbiancamento influisce sui danni ai tessuti della polpa nei denti dei ratti. In pratica, dopo 5 sessioni con prodotti al 35% di perossido di idrogeno, si sono evidenziate aree necrotiche nei tessuti della polpa (il secondo terzo della polpa radicolare) ed intensa infiammazione nel terzo apicale degli animali trattati [39]. Tutti i nostri prodotti analizzati mostrano una percentuale di perossido di idrogeno superiore al 10%. Ciononostante, tra i quattro agenti sbiancanti testati in questo studio, BlancOne ULTRA<sup>+</sup> è l'unico che richiede un massimo di tre cicli di 8 minuti per il rilascio di radicali liberi ed ossigeno singoletto con i migliori risultati sbiancanti. In realtà, si possono evidenziare alcune criticità nel nostro lavoro. Infatti, nonostante l'adeguatezza dei campioni dentali bovini scelti, come dettagliatamente descritto recentemente [40], potrebbero evidenziarsi differenze nei denti umani vitali, particolarmente per quanto riguarda gli effetti a lungo termine ed un ritorno, in tempi piuttosto brevi, a tonalità più scure dei denti. Il lavoro mostra comunque diversi punti di forza. La scelta di campioni di animali provenienti dallo stesso allevamento e della stessa età, allevati in maniera simile e biologicamente, senza l'utilizzo di antibiotici, ci ha permesso, come dimostrato dalle analisi statistiche, di ottenere un livello di brillantezza uniforme prima del trattamento, per poter comparare in maniera più adeguata i risultati ottenuti dopo lo stesso. Una potenza statistica pari al 99% sui risultati della variabile primaria va a supporto di quanto sopra enunciato. In aggiunta, il progetto di un bioreattore che, come dimostrato prima, ha replicato la cavità

orale [17], e l'uso di uno spettrofotometro per misurare l'effetto di sbiancamento, supporta l'affidabilità dei nostri dati.

Come mostrato nella Tabella 2, solo il prodotto ULTRA<sup>+</sup> dispone di un pH leggermente inferiore alla soglia neutrale.

Ciò potrebbe indurre a pensare che, trattandosi di un agente maggiormente acido rispetto agli altri, potrebbe causare danni superficiali alla superficie dello smalto. Ciononostante, i test eseguiti hanno prodotto una risposta diversa. I prodotti con un pH neutrale o superiori alla soglia neutra vengono bilanciati grazie a sostanze tampone in grado di aumentare il pH e mantenerlo stabile per il tempo di applicazione [25].

Come descritto da H. Betke et al. [26], però, gli additivi tampone utilizzati gli agenti sbiancanti possono aumentare in maniera sostanziale la deidratazione dei tessuti dentali quali smalto e dentina, in particolare nei trattamenti di sbiancamento che coinvolgono tempi di contatto tra i denti ed il gel molto lunghi.

Occorre inoltre tenere in considerazione la descrizione fatta da Ramos et al. [41], che evidenziano il fatto che i gel utilizzati per lo sbiancamento con un'alta concentrazione di perossido di idrogeno sono sottoposti ad un cambio di stato prima di rilasciare le specie reattive dell'ossigeno, passando quindi dallo stato di gel a quello liquido. Questa fase liquida può determinare la facilità di penetrazione all'interno dei tessuti duri del dente, aumentando quindi il rischio di sensibilità percepita dai pazienti.

Dalle immagini topografiche AFM, si può osservare che tutti i trattamenti sbiancanti, con l'eccezione di ZOOM, tendono a modificare la consistenza della superficie, aumentandone la rugosità, la quale generalmente aiuta la produzione del biofilm fornendo una maggiore area di adesione, ed al contempo proteggendo i batteri da forze di taglio e flusso di saliva [42–45]. In particolare, BOOST produce un incremento decisamente maggiore nella rugosità superficiale quando comparato agli altri.

Le misurazioni della nanoindentazione hanno evidenziato un indebolimento dello strato superficiale dello smalto con i trattamenti ZOOM e BOOST, indicato da valori significativamente inferiori di durezza e modulo di Young se confrontati ai denti non trattati, come illustrato nella Figura 7, mentre i campioni trattati con POLA- ed UTRA<sup>+</sup>-hanno mantenuto valori simili ai campioni di riferimento non trattati.

## 5. Conclusioni

In conclusione, si può affermare che, dai risultati ottenuti, tutti i prodotti per lo sbiancamento dentale testati possono aumentare la brillantezza dei denti dopo il trattamento, anche in caso di differenti pH, tempi di applicazione e metodi di attivazione. BlancOne, Zoom, e Pola possono provocare alterazioni della rugosità superficiale dello smalto dentale dopo il trattamento, pur rimanendo entro un indice di modifica in scala nanometrica [46]. BOOST è l'unico prodotto che presenta alterazioni strutturali della rugosità della superficie molto più invasive, che possono essere connesse ad una riduzione della durezza della superficie a causa delle conseguenti alterazioni delle proprietà meccaniche del materiale. Nonostante siano necessari studi clinici controllati randomizzati a conferma di quanto stabilito, i dati preliminari su di un modello animale ex vivo supportano un migliore rapporto prestazione-sicurezza di BlancOne ULTRA<sup>+</sup>.

**Contributi degli autori:** Concettualizzazione, C.P., A.L. e A.A.; metodologia, C.P.; software, A.A., M.S., E.D., R.R., D.B., L.C. e F.B.; convalida, A.L. e A.A.; analisi formale, A.A.; indagini, C.P.; risorse, F.B.; integrità dei dati, A.A. e D.B.; composizione—preparazione bozza originale, C.P., A.A. e N.D.A.; composizione—revisione ed editing, A.A.; supervisione, A.L., E.D., R.R., L.C. e F.B.; acquisizione finanziamenti, C.P. e S.B. Tutti gli autori hanno letto e confermato la versione pubblicata del manoscritto.

**Sovvenzioni:** La presente ricerca non ha ricevuto sovvenzioni esterne

**Dichiarazione Commissione Istituzionale di Revisione:** Non applicabile.

**Dichiarazione consenso informato:** Non applicabile.

**Dichiarazione disponibilità dati:** Non applicabile.

**Conflitto di interessi:** Gli autori dichiarano l'assenza di conflitti di interessi

## Bibliografia

1. Kwon, S.-R.; Ko, S.-H.; Greenwall, L. *Tooth Whitening in Esthetic Dentistry*; Quintessence Publishing Company Limited: Berlin, Germany, 2009.
2. Epple, M.; Meyer, F.; Enax, J. A Critical Review of Modern Concepts for Teeth Whitening. *Dent. J.* **2019**, *7*, 79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Meireles, S.S.; Goettems, M.L.; Dantas, R.V.F.; Della Bona, Á.; Santos, I.S.; Demarco, F.F. Changes in oral health related quality of life after dental bleaching in a double-blind randomized clinical trial. *J. Dent.* **2014**, *42*, 114–121. [[CrossRef](#)]
4. Pavicic, D.; Kolceg, M.; Lajnert, V.; Pavlic, A.; Brumini, M.; Spalj, S. Changes in Quality of Life Induced by Tooth Whitening are Moderated by Perfectionism: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Int. J. Prosthodont.* **2018**, *31*, 394–396. [[CrossRef](#)]
5. Marshall, G.W., Jr.; Marshall, S.J.; Kinney, J.H.; Balooch, M. The dentin substrate: Structure and properties related to bonding. *J. Dent.* **1997**, *25*, 441–458. [[CrossRef](#)]
6. Gillam, D.G. *Dentine Hypersensitivity: Advances in Diagnosis, Management, and Treatment*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2015.
7. Schulte, J.R.; Morrissette, D.B.; Gasior, E.J.; Czajewski, M.V. The Effects of Bleaching Application Time on the Dental Pulp. *J. Am. Dent. Assoc.* **1994**, *125*, 1330–1335. [[CrossRef](#)]
8. Elfallah, H.M.; Swain, M.V. A review of the effect of vital teeth bleaching on the mechanical properties of tooth enamel. *N. Z. Dent. J.* **2013**, *109*, 87–96.
9. Zanolta, J.; Marques, A.; da Costa, D.C.; de Souza, A.S.; Coutinho, M. Influence of tooth bleaching on dental enamel microhardness: A systematic review and meta-analysis. *Aust. Dent. J.* **2017**, *62*, 276–282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Minoux, M.; Serfaty, R. Vital tooth bleaching: Biologic adverse effects—a review. *Quintessence Int.* **2008**, *39*, 645–659.
11. Dias, S.; Mata, A.; Silveira, J.; Pereira, R.; Putignano, A.; Orsini, G.; Monterubbianesi, R.; Marques, D. Hydrogen Peroxide Release Kinetics of Four Tooth Whitening Products—In Vitro Study. *Materials* **2021**, *14*, 7597. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Kury, M.; Antonialli, F.M.; Soares, L.E.S.; Tabchoury, C.P.M.; Giannini, M.; Florez, F.L.E.; Cavalli, V. Effects of violet radiation and nonthermal atmospheric plasma on the mineral contents of enamel during in-office dental bleaching. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2020**, *31*, 101848. [[CrossRef](#)]
13. Soares, F.Z.M.; Follak, A.; da Rosa, L.S.; Montagner, A.F.; Lenzi, T.L.; Rocha, R.O. Bovine tooth is a substitute for human tooth on bond strength studies: A systematic review and meta-analysis of in vitro studies. *Dent. Mater.* **2016**, *32*, 1385–1393. [[CrossRef](#)]
14. Monterubbianesi, R.; Tosco, V.; Bellezze, T.; Giuliani, G.; Özcan, M.; Putignano, A.; Orsini, G. A Comparative Evaluation of Nanohydroxyapatite-Enriched Hydrogen Peroxide Home Bleaching System on Color, Hardness and Microstructure of Dental Enamel. *Materials* **2021**, *14*, 3072. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Soares, C.J.; Pizi, E.C.G.; Fonseca, R.B.; Martins, L.R.M. Influence of root embedment material and periodontal ligament simulation on fracture resistance tests. *Braz. Oral Res.* **2005**, *19*, 11–16. [[CrossRef](#)]
16. Gallie, A. An introduction to air polishing and its benefits. *Dent. Nurs.* **2014**, *10*, 384–388. [[CrossRef](#)]
17. Pasquale, C.; De Angelis, N.; Dellacasa, E.; Raiteri, R.; Barberis, F.; Lagazzo, A.; Benedicenti, S.; Amaroli, A. A Comparative Study on the Effect of Peri-Implant Infection Management Lasers (1064-nm Q-Switch Nd:YAG, 1064-nm Nd:YAG and 980-nm Diode) on Titanium Grade 4 Surface. *Appl. Sci.* **2022**, *13*, 125. [[CrossRef](#)]
18. Dabbagh, S.; Hardan, L.; Kassis, C.; Bourgi, R.; Devoto, W.; Zarow, M.; Jakubowicz, N.; Ghaleb, M.; Kharouf, N.; Dabbagh, M.; et al. Effect of Intraoral Humidity on Dentin Bond Strength of Two Universal Adhesives: An In Vitro Preliminary Study. *Coatings* **2022**, *12*, 712. [[CrossRef](#)]
19. Oliveira Tavares, N.R.N.; da Mata Galvão, A.; Dietrich, L.; Carvalho, R.F.; Silva, R.S.; Faria e Silva, A.L.; da Silva, G.R. Can ozone or violet light improve the color change or physicochemical properties of hydrogen peroxide-bleached tooth? *Braz. Dent. J.* **2021**, *32*, 19–29. [[CrossRef](#)]
20. Dietrich, L.; de Assis Costa, M.D.M.; Blumenberg, C.; Nascimento, G.G.; Paranhos, L.R.; da Silva, G.R. A meta-analysis of ozone effect on tooth bleaching. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 13177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Stout, K.J.; Blunt, L.; Dong, W.P.; Mainsah, E.; Luo, N.; Mathia, T.; Sullivan, P.J.; Zahouani, H. *The Development of Methods for the Characterisation of Roughness in Three Dimensions*; European Report EUR 15178 EN; Publications of the European Communities: Luxembourg, 1993; ISBN 0 7044 1313 2.
22. Oliver, W.C.; Pharr, G.M. An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *J. Mater. Res.* **1992**, *7*, 1564–1583. [[CrossRef](#)]
23. Kan, Q.; Yan, W.; Kang, G.; Sun, Q. Oliver–Pharr indentation method in determining elastic moduli of shape memory alloys—A phase transformable material. *J. Mech. Phys. Solids* **2013**, *61*, 2015–2033. [[CrossRef](#)]
24. Rosner, B. *Fundamentals of Biostatistics*, 8th ed.; Cengage Learning: Boston, MA, USA, 2015; p. 927, ISBN 978-1305268920.
25. Alkahtani, R.; Stone, S.; German, M.; Waterhouse, P. A review on dental whitening. *J. Dent.* **2020**, *100*, 103423. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Betke, H.; Kahler, E.; Reitz, A.; Hartmann, G.; Lennon, Á.; Attin, T. Influence of Bleaching Agents and Desensitizing Varnishes on the Water Content of Dentin. *Oper. Dent.* **2006**, *31*, 536–542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Li, Z.; Wu, Z.; Wang, J.; Huang, M.; Lin, M. Expanding the applications of photodynamic therapy—Tooth bleaching. *Clin. Oral Investig.* **2022**, *26*, 2175–2186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Schlafer, S.; Poulsen, P.N.; Johansen, J.; Trap, L.; Leite, F.R.M. The whitening effect of single brushing with blue-covarine containing toothpaste—A randomized controlled trial. *J. Dent.* **2021**, *105*, 103559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Ishikawa-Nagai, S.; Yoshida, A.; da Silva, J.D.; Miller, L. Spectrophotometric Analysis of Tooth Color Reproduction on Anterior All-Ceramic Crowns: Part 1: Analysis and Interpretation of Tooth Color. *J. Esthet. Restor. Dent.* **2010**, *22*, 42–52. [[CrossRef](#)]
30. Shetty, N.; Saluja, I.; Shenoy, R.; Pangal, S.N. Evaluation of the efficacy of diode laser in bleaching of the tooth at different time intervals using spectrophotometer: An in vitro study. *J. Conserv. Dent.* **2022**, *25*, 166–172. [[CrossRef](#)]
31. Gómez-Polo, C.; Gómez-Polo, M.; Celemin-Viñuela, A.; De Parga, J.A.M.V. Differences between the human eye and the spectrophotometer in the shade matching of tooth colour. *J. Dent.* **2014**, *42*, 742–745. [[CrossRef](#)]
32. Horn, D.J.; Bulan-Brady, J.; Hicks, M.L. Sphere spectrophotometer versus human evaluation of tooth shade. *J. Endod.* **1998**, *24*, 786–790. [[CrossRef](#)]
33. Gamarra, V.S.; Zelada, G.C. Efecto del peróxido de hidrógeno al 25% sobre la microdureza del esmalte dental. *Odontol. Sanmarquina* **2013**, *16*, 25–28. [[CrossRef](#)]

34. Horn, B.A.; Bittencourt, B.F.; Gomes, O.M.M.; Farhat, P.A. Clinical evaluation of the whitening effect of over-the-counter dentifrices on vital teeth. *Braz. Dent. J.* **2014**, *25*, 203–206. [[CrossRef](#)]
35. Joiner, A. Whitening toothpastes: A review of the literature. *J. Dent.* **2010**, *38* (Suppl. S2), e17–e24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. de Souza Costa, C.A.; Riehl, H.; Kina, J.F.; Sacono, N.T.; Hebling, J. Human pulp responses to in-office tooth bleaching. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endo.* **2010**, *109*, e59–e64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Tredwin, C.J.; Naik, S.; Lewis, N.J.; Scully, C. Hydrogen peroxide tooth-whitening (bleaching) products: Review of adverse effects and safety issues. *Br. Dent. J.* **2006**, *200*, 371–376. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Soares, D.G.; Basso, F.G.; Hebling, J.; de Souza Costa, C.A. Concentrations of and application protocols for hydrogen peroxide bleaching gels: Effects on pulp cell viability and whitening efficacy. *J. Dent.* **2014**, *42*, 185–198. [[CrossRef](#)]
39. Cintra, L.T.A.; Benetti, F.; de Souza Facundo, A.C.; Ferreira, L.L.; Gomes-Filho, J.E.; Ervolino, E.; Rahal, V.; Briso, A.L.F. The Number of Bleaching Sessions Influences Pulp Tissue Damage in Rat Teeth. *J. Endod.* **2013**, *39*, 1576–1580. [[CrossRef](#)]
40. Ribeiro, J.S.; da Silva Barboza, A.; Cuevas-Suárez, C.E.; da Silva, A.F.; Piva, E.; Lund, R.G. Novel in-office peroxide-free tooth-whitening gels: Bleaching effectiveness, enamel surface alterations, and cell viability. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 10016. [[CrossRef](#)]
41. Ramos, E.; Calatrava, S.F.; Jiménez, L. Bleaching with hydrogen peroxide. A review. *Afinidad* **2008**, *65*, 537.
42. Quirynen, M.; Dierickx, K.; van Steenberghe, D. Effects of surface roughness and free energy on oral bacterial adhesion. In *Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods and Applications*; An, Y.H., Friedman, R.J., Eds.; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2000; pp. 91–102.
43. Murariu, A.; Vasluianu, R.; Matricala, L.; Stoica, I.; Forna, N.C. In vitro Evaluation of Morphological Integrity of Dental Enamel Exposed to Carbamide Peroxide-based Bleaching Agent. *Rev. Chim.* **2016**, *67*, 2103–2105.
44. Koldehoff, J.; Swain, M.V.; Schneider, G.A. Influence of water and protein content on the creep behavior in dental enamel. *Acta Biomater.* **2023**, *158*, 393–411. [[CrossRef](#)]
45. Seghi, R.R.; Denry, I. Effects of External Bleaching on Indentation and Abrasion Characteristics of Human Enamel in vitro. *J. Dent. Res.* **1992**, *71*, 1340–1344. [[CrossRef](#)]
46. Polydorou, O.; Scheitza, S.; Spraul, M.; Vach, K.; Hellwig, E. The effect of long-term use of tooth bleaching products on the human enamel surface. *Odontology* **2018**, *106*, 64–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Manleva/Nota editoriale:** Le affermazioni, opinioni ed i dati contenuti in tutte le pubblicazioni provengono esclusivamente dall'autore (i) individuale (i) e contributore (i) e non da MDPI e/o l'editore (i). MDPI e/o l'editore (i) non saranno da ritenersi responsabili per eventuali infortuni a persone o danni a proprietà derivanti da eventuali idee, metodi, istruzioni o prodotti ai quali si possa fare riferimento nel contenuto.