



Efeito *in situ* de agentes bioativos no esmalte

In situ effect of bioactive agents on enamel

Allin Lima Nahum¹

Yasmin do Socorro Batista de Lima Gomes¹

Danielle da Silva Pompeu²

Mariângela Ivette Guanipa Ortiz³

Danielle Tupinambá Emmi⁴

Cecy Martins Silva⁴

RESUMO

Este estudo avaliou *in situ* os efeitos dos agentes bioativos sobre o esmalte clareado com peróxido de hidrogênio a 37,5%, através de microdureza Knoop (KHN) e cromatografia de íons (IC). Foram selecionados 25 terceiros molares humanos inclusos e fragmentados (3x3x3mm). Cinco voluntários foram selecionados e tiveram cinco espécimes fixados na superfície vestibular dos seus molares superiores e inferiores. Cada voluntário representou um grupo (n=5): Controle: sem tratamento, Pola: Pola Office 37,5% (Controle Positivo), Nano: Pola Office 37,5% + Nanohidroxiapatita, CPP-ACP: Pola Office 37,5% + CPP-ACP (CPP-ACP) e Nova: Pola Office 37,5% + NovaMin. A análise de KHN (n=5) foi realizada antes e após os tratamentos. Foram realizadas cinco endentações, utilizando a carga de 25gf durante 15 segundos. Para a análise química (n=3), as amostras foram trituradas, autoclavadas e submetidas à digestão ácida pela radiação de micro-ondas. Em seguida, foram diluídas em 303x com água destilada/deionizada. Para a quantificação dos elementos químicos cálcio (Ca), flúor (F) e fósforo(P), foi utilizada uma técnica de cromatografia iônica. ANOVA seguida de Tukey (p<0,05) demonstraram que os grupos CPP-ACP e NOVA mostraram médias de KHN superiores em relação aos demais grupos; o grupo Nano foi semelhante estatisticamente ao grupo Controle; o Pola apresentou a menor média de KHN quando comparado aos outros grupos. O percentual de KHN em ordem decrescente foi: CPP-ACP; Nova; Nano; Controle e Pola. A utilização de agentes bioativos no tratamento clareador promoveu o aumento do percentual dos íons cálcio, flúor e fósforo e da dureza do esmalte humano.

Palavras-chave: Clareamento Dental, Esmalte Dentário, Testes de dureza, Cromatografia.

ABSTRACT

This study evaluated *in situ* the effects of bioactive agents on enamel whitened with hydrogen peroxide at 37.5%, using Knoop microhardness (KHN) and ion chromatography (IC). We selected 25 third human molars included were fragmented (3x3x3mm). Five volunteers were selected and had five specimens attached to the buccal surface of their upper and lower molars. Each volunteer represented a group (n=5): Control: no treatment, Pola: Pola Office 37.5% (Positive Control), Nano: Pola Office 37.5% + Nanohydroxyapatite, CPP- + CPP-ACP (CPP-ACP) and Nova: Pola Office 37.5% + NovaMin. KHN analysis (n=5) was performed before and after treatments. Five indentations were performed, using the 25gf load for 15 seconds. For the chemical analysis (n=3), the samples were ground, autoclaved and subjected to acid digestion by microwave radiation. They were then diluted in 303x with distilled / deionized water. To quantify the chemical elements calcium (Ca), fluorine (F) and phosphorus (P), an ion chromatography technique was used. ANOVA followed by Tukey (p <0.05) showed that the CPP-ACP and Nova groups showed higher KHN means in relation to the other groups; the NANO group was statistically similar to the Control group; the Pola presented the lowest KHN mean when compared to the other groups. The percentage of KHN in descending order was: CPP-ACP, Nova, Nano, Controle and Pola. The use of bioactive agents in the bleaching treatment promoted an increase in the percentage of calcium, fluorine and phosphorus ions and the hardness of human enamel.

Keyword: Dental Whitening, Dental Enamel, Hardness Tests, Chromatography.

¹ Cirurgião-dentista

² Graduanda, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Pará

³ Mestranda em Odontologia, Universidade Federal do Pará

⁴ Professor (a) Doutor (a), Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Pará

INTRODUÇÃO

O clareamento dental é um procedimento conservador de baixo custo, que vem sendo amplamente utilizado por cirurgiões-dentistas^{1,2}. Embora estudos tenham comprovado a eficácia do tratamento clareador, efeitos adversos sobre os tecidos dentários também são descritos na literatura^{3,4}, e devem ser cuidadosamente avaliados para que seu uso possa ser considerado seguro.

Este procedimento pode ser realizado em consultório, através da aplicação de peróxido de hidrogênio em forma de gel na superfície dentária. Sabe-se que o baixo pH desse agente clareador pode induzir alterações morfológicas da estrutura do esmalte^{5,2}, e também provocar sensibilidade dentinária a partir de alterações microestruturais no órgão dental, como a redução da microdureza⁶, alterações na composição química do dente⁷ e defeitos morfológicos, tais como depressões, irregularidades e formação de porosidades⁸.

Materiais bioativos têm sido recentemente utilizados como agentes dessensibilizantes para minimizar os efeitos deletérios dessas lesões⁹. Estudos *in vitro* sobre os efeitos dessensibilizantes dos materiais bioativos mostraram: redução da permeabilidade dentinária, oclusão dos túbulos dentinários¹⁰ e têm revelado efeitos remineralizantes¹¹.

Agentes dessensibilizantes como o fosfosilicato de sódio e cálcio (NovaMin®), fosfato de cálcio amorfo (ACP), a nanohidroxiapatita e a caseína fosfopeptídeo-fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP) vêm sendo incorporados aos géis clareadores, ou estão sendo utilizados concomitantemente ao tratamento clareador, para reduzir os efeitos negativos à estrutura dental^{12,13}.

A maioria dos trabalhos publicados tem sido desenvolvidos em condições laboratoriais, que não refletem as condições encontradas no ambiente oral. A cavidade bucal apresenta fatores que podem interferir na ação do agente clareador como a presença de saliva, que possui a capacidade de tamponamento, devido ao bicarbonato e sistema fosfato que contém eletrólitos inorgânicos, como fósforo, cálcio, e flúor, bem como a presença de enzimas e bactérias, fatores estes que dificultam a comparação com os resultados obtidos em estudo *in situ*¹⁴.

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos dos agentes bioativos no esmalte dental submetido a tratamento clareador com peróxido de hidrogênio de alta concentração por meio da KHN e IC. A hipótese nula é que os agentes bioativos não influenciam na dureza e na estrutura química do esmalte.

MATERIAIS E MÉTODOS

Aspectos éticos

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará com o número do parecer 335.938.

Preparação dos espécimes

Foram utilizados terceiros molares humanos inclusos, obtidos por doação na Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia da UFPA, após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos voluntários. Os dentes foram limpos e armazenados em água destilada em temperatura ambiente até o momento do preparo dos espécimes. Cada dente foi seccionado no sentido transversal no limite coroa/raiz, ao longo da junção amelocementária, com auxílio de broca diamantada 4138 (KG Sorensen, Cotia, SP, BR) sob refrigeração ar/água, sendo suas coroas selecionadas para o experimento e as raízes desprezadas. Em seguida, foram armazenadas em água destilada. As superfícies coronárias vestibulares foram recortadas com disco de aço de dupla face (KG Sorensen®), acionados por micromotor em baixa rotação (KAVO, Berlin, Steglitz, DE), sob refrigeração com água corrente para evitar a queima do tecido dental, e regularizadas com broca diamantada nº4138 formando fragmentos com área de 16 mm² e 3 mm de espessura. As dimensões dos fragmentos foram padronizadas e aferidas com paquímetro digital (Mitutoyo, São Paulo, SP, BR). A porção recortada correspondeu sempre à área central da superfície coronária vestibular, de forma a se obter prismas de esmalte com as mesmas inclinações. O aplainamento do esmalte superficial foi realizado com lixas de óxido de alumínio de granulações 600, 1000 e

1200, sequencialmente, em uma politriz APL-4 (Arotec, São Paulo, SP, BR) com pasta diamantada Alpha Micropolisha 10 (Union Carbide, Greensburg, LA) e disco de feltro (FGM, Joinville, SC, BR).

Fase clínica

Seleção dos pacientes

Foram selecionados cinco voluntários (três homens e duas mulheres, idade 18-24 anos), que preenchiam os seguintes critérios de inclusão: não possuir restaurações extensas, coroa dental clínica de 5 mm no mínimo, não apresentar lesões cariosas, não se encontrar em quadro de doença periodontal, não fumante, não praticar esportes aquáticos, não ter problemas gastroesofágicos, apresentar fluxo e pH salivar normais. Durante o tratamento, os voluntários foram instruídos para não fazer uso de bebidas alcoólicas e com corantes.

Fixação dos espécimes

Todos os voluntários receberam profilaxia previamente ao tratamento. Os espécimes foram fixados nas superfícies vestibulares dos molares superiores e inferiores utilizando o cimento resinoso autoadesivo RelyX U200 (3M/ESPE, São Paulo, SP, BR), que dispensa a necessidade de realizar o condicionamento ácido e a aplicação de primer/adetivo em esmalte, tornando o procedimento mais seguro para futura remoção dos espécimes fixados, diminuindo o risco de remoção de esmalte sadio. A fotopolimerização foi efetivada com o aparelho LED (Radii, SDI, Bayswater, Victoria, AU) por 30 segundos.

Clareamento dental

Após a aplicação e fotoativação da barreira gengival com o fotopolimerizador LED Radii, o agente clareador Pola Office 37,5% (SDI®) foi aplicado sobre as superfícies vestibulares dos dentes e dos espécimes por 30 minutos.

Tratamento com o agente bioativo

Após o tratamento clareador, os voluntários receberam a aplicação do agente bioativo de acordo com

o grupo avaliado (Tabela 1). Foram realizadas três sessões com o intervalo de sete dias entre elas.

Tabela 1. Divisão dos grupos

GRUPO	AGENTE CLAREADOR	AGENTE BIOATIVO
CONTROLE	Controle (negativo)	Sem agente bioativo
POLA	Pola Office 37,5% (SDI) (controle positivo)	Sem agente bioativo
NANO	Pola Office 37,5% (SDI)	Nanohidroxiapatita (Nano P)
CPP-ACP	Pola Office 37,5% (SDI)	CPP-ACP (MI Paste Plus)
NOVA	Pola Office 37,5% (SDI)	NovaMin® (Sensodyne Repair e Protect)

Imediatamente após as sessões de clareamento, o creme dental foi aplicado durante 5 minutos com um aplicador descartável (Microbrush-Vigodent Coltene, Rio de Janeiro, RJ, BR) sobre as superfícies clareadas e posteriormente removido.

Todos os voluntários integrantes deste estudo receberam uma escova dental Reach (Johnson & Johnson, São Paulo, SP, BR) e o dentífrico Colgate Total 12 (Colgate-Palmolive, São Paulo, SP, BR) para a higienização, com orientação para uso de duas vezes ao dia, que foram utilizados nas duas semanas que antecederam o início do tratamento e durante o seu desenvolvimento. Após o clareamento, os espécimes foram removidos com alicate ortodôntico de remoção de bandas (ICE, São Paulo, SP, BR) e levados para as análises laboratoriais.

Microdureza Knoop

Para a mensuração de KHN do esmalte foi utilizado o microdurômetro FM-700 (Future Tech Corp., Tokyo, JP) aplicando-se uma carga de 25 gf durante 15 segundos. Foram realizadas cinco endentações em cada espécime separadas por 100 µm. Previamente à fixação dos espécimes na boca dos voluntários, foi realizada a análise inicial de KHN, que serviu como linha de base. Imediatamente após o tratamento clareador e com o agente bioativo, foi efetuada a remoção dos espécimes e foram realizadas as análises finais de KHN.

Para complementar, o percentual de alteração de microdureza Knoop (%KHN) foi calculado empregando a fórmula:

$$\%KHN = \frac{KHN \text{ final} - KHN \text{ inicial}}{KHN \text{ inicial}} \times 100$$

Cromatografia de íons

Após a análise de KHN, foi retirada a camada de dentina dos espécimes com uma broca diamantada 3100 (KG Sorensen®) acoplada à turbina de alta rotação (KAVO®), restando o esmalte, que foi triturado, autoclavado e submetido à digestão química com 3 mL de HNO₃ (ácido nítrico), 1 mL de HCl (ácido clorídrico) e 1 mL de H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) em um forno de micro-ondas MarsXpress (CEM, São Paulo, SP, BR). Em seguida, as amostras foram transferidas para tubos tipo Falcon (Cralplast, Cotia, SP, BR) para serem diluídas (50x) em água destilada/deionizada. Para a leitura da cromatografia faz-se necessário a diluição da amostra devido à sensibilidade do equipamento ao componente Nitrato. As amostras foram diluídas para 303x a partir da amostra de 50x. A quantificação dos íons Ca, F e P foram realizadas no cromatógrafo de íons ICS2000DUAL (DIONEX, Califórnia, USA), e foram expressas em porcentagem (%), onde 1% é igual a 10.000 ng/g (ppm).

Análise estatística

O software estatístico utilizado para este estudo foi o BioEstat 5.0, com nível de significância de 5%. Para a análise de significância entre as médias inicial e final, e entre os grupos de KHN, utilizou-se o teste de Análise de Variância uma via (ANOVA) e teste de Tukey (p<0,05).

RESULTADOS

Microdureza Knoop

A média e desvio padrão de KHN dos grupos avaliados apresentam-se discriminados na Tabela 2. Os grupos CONTROLE e NANO não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre as médias de KHN inicial e final, entretanto, os demais grupos

avaliados apresentaram diferenças estatisticamente significantes. A análise estatística (p<0,05) entre os grupos mostrou que as médias de KHN iniciais não diferiram estatisticamente entre si. O NANO não diferiu estatisticamente do CONTROLE, porém, os grupos CPP-ACP e NOVA apresentaram médias de KHN finais maiores e diferentes estatisticamente do CONTROLE. O POLA apresentou a menor média de KHN final e diferença estatística significativa dos demais grupos.

Tabela 2. Comparações das médias (desvio padrão) de microdureza Knoop iniciais e finais dos grupos avaliados, pelo teste de Tukey (p<0,05).

Grupos (n= 5)	Inicial	Final
CONTROLE	349.20 ± 11.92 Aa	348.86 ± 10.01 Aa
POLA	347.60 ± 4.48 Aa	320.44 ± 4.97 Bb
NANO	344.02 ± 5.72 Aa	347.30 ± 8.93 Aa
CPP-ACP	345.59 ± 0.86 Aa	370.77 ± 2.20 Cb
NOVA	347.08 ± 4.82 Aa	366.95 ± 2.27 Cb

* Grupos com a mesma letra são estatisticamente semelhantes
Maiúsculo: intergrupos
Minúsculo: inicial / final

O percentual de alteração da KHN (%KHN) encontra-se ilustrada no Gráfico 1. O percentual de KHN final dos grupos avaliados em ordem decrescente foi: CPP-ACP, NOVA, NANO, CONTROLE e POLA.

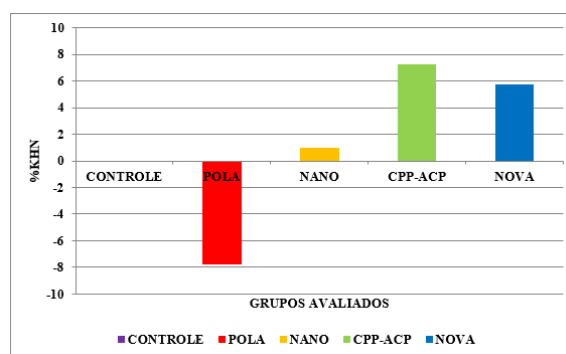


Gráfico 1. Gráfico representativo das alterações de microdureza Knoop (%KHN) dos grupos avaliados.

Cromatografia de Íons

A porcentagem dos componentes químicos está discriminada na Tabela 3. Todos os grupos avaliados apresentaram aumento no percentual de íons F, Ca e P, exceto o POLA, quando comparados ao CONTROLE. O grupo CPP-ACP teve o maior percentual dos componentes avaliados, seguido respectivamente, dos grupos NOVA, NANO e CONTROLE. O POLA apresentou redução no percentual de íons F e Ca, e aumento no percentual de P em relação ao CONTROLE.

Tabela 3. Porcentagem (%) de íons flúor (F), cálcio (Ca) e fósforo (P) dos grupos avaliados.

Grupos	Componentes Químicos %		
	F	Ca	P
CONTROLE	0,21	48,47	18,90
POLA	0,18	35,07	27,59
NANO	0,24	68,94	29,34
CPP-ACP	0,31	77,89	34,31
NOVA	0,29	71,07	30,46

DISCUSSÃO

O grupo clareado, sem o emprego de agente bioativo, apresentou redução significativa da KHN confirmando resultados anteriores, que mostraram que o clareamento causa diminuição da dureza do esmalte^{15,16,17}.

A análise química também mostrou redução dos percentuais de Ca, F e P, podendo justificar a perda de dureza encontrada neste grupo.

A hidroxiapatita vem sendo muito utilizada por ser um material que apresenta as propriedades de biocompatibilidade e bioatividade^{18,19}. Quando transformada em partículas nano, a mesma possui o potencial de atuar como um reservatório de Ca²⁺ e PO⁴³⁻ para manter o estado supersaturado para a mineralização dentária²⁰. O que elucida a capacidade dessas partículas nano para a oclusão de túbulos dentinários, bem como a sua capacidade para facilitar a deposição e crescimento de cristais em dentes desmineralizados²¹, podendo ser empregada no aumento dos componentes minerais do esmalte clareado²².

Neste estudo, os grupos clareados que utilizaram a nanohidroxiapatita não diferiram nos valores de KHN em relação ao grupo não clareado, revelando efetividade na preservação da dureza do esmalte. A cromatografia de íons identificou aumento nos percentuais de Ca, F e P, o que provavelmente contribuiu para o aumento da dureza deste substrato.

Entretanto, o grupo NANO apresentou menor percentual de dureza quando comparado aos grupos CPP-ACP e NOVA.

CPP-ACP é um complexo de fosfopeptídeos de caseína e fosfato de cálcio amorfo, que constitui um grupo de peptídeos derivados do leite. Os resultados mostraram que o CPP-ACP promoveu aumento nos percentuais de Ca, F e P, e na dureza do esmalte clareado. Isto pode ser explicado pela capacidade deste material de se unir ao cálcio e se ligar com o biofilme e esmalte do dente²³. A introdução do flúor na composição do CPP-ACP gerou nanocomplexos de Ca, P e F (CPP-ACFP), o que fornece não só um reservatório de Ca e P, provenientes do CPP, mas também um reservatório de flúor na superfície dentária, aumentando assim, a resistência do esmalte à desmineralização frente aos ácidos^{24,25}.

A tecnologia NovaMin® (Fosfosilicato de cálcio e sódio) foi desenvolvida inicialmente para fazer reparo ósseo e recentemente ela está sendo formulada para práticas de higiene bucal²⁶. O grupo NOVA também apresentou percentuais elevados dos íons Ca, F e P, assim como, o aumento na dureza do esmalte submetido ao tratamento clareador, de modo semelhante ao grupo CPP-ACP. Este resultado está relacionado à sua capacidade bioativa de liberar íons fosfato e cálcio, formando uma camada reparadora sobre a estrutura dentária, que de acordo com o fabricante, se assemelha a hidroxiapatita (3-7 µm)^{27,28}.

Vale ressaltar que o dentifrício utilizado pelos voluntários para a higienização durante a pesquisa possuía flúor na sua composição, podendo ter interagido com os agentes bioativos, favorecendo o aumento dos percentuais de íons Ca, F, P e na dureza do esmalte²⁹. Tem sido relatado que a adição de fluoreto ao agente clareador contribui de modo significativo na prevenção da desmineralização do esmalte³⁰.

A hipótese nula deste estudo foi rejeitada, pois, os agentes bioativos influenciaram positivamente na preservação da dureza e da estrutura química do esmalte submetido a tratamento clareador.

CONCLUSÃO

O uso dos agentes bioativos CPP-ACP, NovaMin® e Nanohidroxiapatita associado ao tratamento clareador com peróxido de hidrogênio em alta concentração reduziram os efeitos deletérios ao esmalte clareado, promovendo aumento de dureza e dos íons Ca, F, e P.

REFERÊNCIAS

1. Rezende M, Loguercio AD, Kossatz, S, Reis A. Predictive factors on the efficacy and risk/intensity of tooth sensitivity of dental bleaching: A multi regression and logistic analysis. *J Dent.* 2016; 45:1-6.
2. Gruber A, Colli L, Muniz C, Ottoni R, Borba M. Efeito do uso de agentes clareadores com cálcio na microdureza do esmalte dental. *RFO, Passo Fundo.* 2017; 22(3):298-302.
3. Sa Y, Chen D, Liu Y, Wen W, Xu M, Jiang T, Wang Y. Effects of two in-office bleaching agents with different pH values on enamel surface structure and color: An in situ vs. in vitro study. *J Dent.* 2012; 40:26-34.
4. Zeczkowski M, Tenuta LM, Ambrosano, GM, Aguiar FH, Lima DA. Effect of different storage conditions on the physical properties of bleached enamel: an in vitro vs in situ study. *J Dent.* 2015; 43(9):1154-61.
5. Margaritis V, Mamai-Homata E, Koletsis-Kounari H. Novel methods of balancing covariates for the assessment of dental erosion: a contribution to validation of a synthetic scoring system for erosive wear. *J Dent.* 2011; 39:361-7.
6. Borges AB, Yui KC, D'Avila TC, Takahashi CL, Torres CR, Borges AL. Influence of remineralizing gels on bleached enamel microhardness in different time intervals. *Oper Dent.* 2010; 35(2):180-6.
7. Cakir FY, Korkmaz Y, Firat E, Oztas SS, Gurgan S. Chemical analysis of enamel and dentin following the application of three different at-home bleaching systems. *Open Dent.* 2011; 36(5):529-36.
8. Moraes I, Silva L, Porto I, Lima Neto C, Santos N, Fragoso L. Effect of in-office bleaching with 35% hydrogen peroxide with and without addition of calcium on the enamel surface. *Microsc Res Tech.* 2015; 78(11):975-81.
9. Pintado-Palomino K, Peitl Filho O, Zanotto ED, Tirapelli CA. Clinical, randomized, controlled study on the use of desensitizing agents during tooth bleaching. *J Dent.* 2015; 43(9):1099-1105.
10. Wang Z, Jiang T, Sauro S, Pashley Dh, Toledano M, Osorio R, Liang S, Xing W, Sa Y, Wang Y. The dentine remineralization activity of a desensitizing bioactive glass-containing toothpaste: an in vitro study. *Aust Dent J.* 2011; 56:372-81.
11. Tschoppe P, Zandim, DL, Martus P, Kielbassa AM. Enamel and dentine remineralization by nano-hydroxyapatite toothpastes. *J Dent.* 2011, 39:430-7.
12. De Vasconcelos M, Cunha G, Borges D, Machado T, Dos Santos S. Tooth whitening with hydrogen/carbamide peroxides in association with a CPP-ACP paste at different proportions. *Aust Dent J.* 2012; 57:213-19.
13. Yamamoto TW, de Carvalho RCR. Efeito da utilização de dentifrícios com diferentes compostos bioativos nas propriedades superficiais do esmalte dental clareado. *Rev Odontol Univ Cid São Paulo.* 2017; 25(2):154-63.
14. Smidt A, Feuerstein O, Topel M. Mechanical, morphologic, and chemical effects of carbamide peroxide bleaching agents on human enamel in situ. *Quintessence Int.* 2011; 42(5): 407-12.
15. Gjorgievska E, Nicholson JW. Prevention of enamel demineralization after tooth bleaching by bioactive glass incorporated into toothpaste. *Aust Dent J.* 2011; 56(2): 193-200.
16. Ferreira SDS, Araújo JLN, Morhy ON, Tapety CMC, Youssef M, Sobral MAP. The effect of fluoride therapies on the morphology of bleached human dental enamel. *Mic Res Tech.* 2011; 74:512-6.
17. Borges AB, Santos LFTF, Augusto MG, Bonfietto D, Hara AT, Torres CRG. Tooth brushing abrasion susceptibility of enamel and dentin bleached with calcium-supplemented hydrogen peroxide gel. *J Dent.* 2016; 49:54-9.
18. LeGeros RZ. Calcium phosphate materials in restorative dentistry: a review. *Adv Dent Res.* 1988; 2:164-80.
19. Sun L, Berndt CC, Gross KA. Material fundamentals and clinical performance of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings: a review. *J Bio Mat Res.* 2001; 58:570-92.
20. Huang S, Gao S, Cheng L, Yu H. Remineralization potential of nanohydroxyapatite on initial enamel lesions: an in vitro study. *Caries Res.* 2011; 45:460-8.
21. Yu J, Yang H, Li K, Lei J, Zhou L, Huang C. A novel application of nanohydroxyapatite/mesoporous silica biocomposite on treating dentin hypersensitivity: an in vitro study. *J Dent.* 2016; 50:21-9.
22. Kim YS, Kwon HK, Kim BI. Effect of nano-carbonate to prevent re-stain after dental bleaching in vitro. *J Dent.* 2011; 39(9):636-64.
23. Reynolds EC. Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate: the scientific evidence. *Adv Dent Res.* 2009; 21(1):25-9.

24. Ruchi G, Vijay P. CCP-ACP complex as a new adjunctive agent for remineralization. A review. *Oral Health Prev Dent.* 2011; 9:151-65.
25. Mastroberardino S, Campus G, Strohmenger L, Villa A, Cagetti MG. An innovative approach to treat incisors hypomineralization (MIH): a combined use of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate and hydrogen peroxide - a case report. *Case Rep Dent.* 2012; 2012:379593.
26. Neuhaus KW, Milleman JL, Milleman KR. Effectiveness of a calcium sodium phosphosilicate containing prophylaxis paste in reducing dentine hypersensitivity immediately and 4 weeks after a single application: a double-blind randomized controlled trial. *J Clin Period.* 2013; 40:349-57.
27. Cavalli V, Rodrigues LK, Paes-Leme AF. Effects of the addition of fluoride and calcium to low-concentrated carbamide peroxide agents on the enamel surface and subsurface. *Photomed Laser Surg.* 2011; 29:319-25.
28. Farmakis E, Kozyrakis K, Khabbaz MG, Schoop U, Beer F, Moritz A. *In vitro* evaluation of dentin tubule occlusion by densed and neodymium-doped yttrium-aluminum-garnet laser irradiation. *J Endod.* 2012; 38(5):662-6.
29. Yu H, Li Q, Hussain M, Wang Y. Effects of bleaching gels on the surface microhardness of tooth-colored restorative materials in situ. *J Dent.* 2008; 36(4):261-7.
30. Hui-Ping C. Effect of fluoride containing bleaching agents on enamel surface properties. *J Dent.* 2008; 36:718-25.