

Alteration of Hydroxyapatite Surface after Tooth Bleaching with Nonthermal Atmospheric Pressure Plasma

Seoul Hee Nam¹, Hae June Lee², Jin Woo Hong^{3*}, and Gyoo Cheon Kim^{1**}

¹Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Pusan National University, Yangsan, 626-870, Republic of Korea

²Department of Electrical Engineering, Pusan National University, Busan, 609-735, Republic of Korea

³Department of Internal Medicine, School of Korean Medicine, Pusan National University, Yangsan, 626-870, Republic of Korea

(received October 13, 2014; revised November 26, 2014; accepted November 27, 2014)

Nonthermal atmospheric pressure plasma has attracted great interest for biomedical applications. The plasma consists of charged particles, radicals, and a strong electric field as the fourth state of matter. This study evaluated the change in the surface roughness after tooth bleaching by plasma in combination with a low concentration (15%) of carbamide peroxide, specifically whether the application of plasma produced detriments, such as demineralization and structural change, with the goal of efficient and safe tooth bleaching. After being combined with plasma and 15% carbamide peroxide, the hydroxyapatite surface was significantly smoother with a low roughness average value. Tooth bleaching with 15% carbamide peroxide alone produced an irregular surface and increased the surface roughness with high roughness average value. Tooth bleaching with plasma resulted in no significant variations in

hydroxyapatite in terms of change in surface roughness and surface topography. The application of tooth bleaching with plasma is not deleterious to dental hard tissue, implicating it as a safe tooth bleaching technique.

Key words: nonthermal atmospheric pressure plasma, hydroxyapatite, surface roughness, tooth bleaching, streptococcus mutans

서론

치아 법랑질은 약 96%의 무기질과 4%의 물과 유기질로 이루어졌으며, 인체에서 가장 단단한 조직이다[1]. 법랑질의 대부분을 차지하고 주요한 무기질 성분은 hydroxyapatite (HAP)이며, 그 화학식은 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 이다[2]. 칼슘과 인은 치아 경조직 형성에 필수적 성분이며, HAP 결정에 존재한다. HAP는 격자구조로 법랑질 표면에 균일하게 부착되어 있고 하부 법랑질을 보호하는 층을 형성한다[3].

오늘날 심미적인 외관에 관심이 높아짐에 따라 치아 미백은 수요가 급증되고 있고 환자와 치과 종사자에 의해 빠르게 수용되어지고 있는 심미치의학적 영역이다[4]. 치아 미백제는 10~35%의 다양한 농도를 가진 과산화수소(HP ; H_2O_2)와 과산화요소(CP ; $\text{CH}_6\text{N}_2\text{O}_3$)가 있으며, CP는 겔의 형태로 HP 및 요소로 분해되어진다. 결과적으로 HP는 치아 내에 다양하게 착색된 유기성분을 산화과정을 통하여 착색된 물질을 분해함에 따라 치아미백이 이루어진다[5]. 임상에서 주로 많이 사용되는 전문가 미백은 고농도 HP에 높은 온도의 광원을 적용함으로써 HP의 반응을 빠르게 증가시켜 향상된 미백효

*Correspondence to: Jin Woo Hong, Department of Internal Medicine, School of Korean Medicine, Yangsan Campus of Pusan National University, Yangsan, Republic of Korea.

Tel.: +82-10-6261-9869, Fax: +82-55-360-5991

E-mail: jwhong@pusan.ac.kr

**Correspondence to: Gyoo Cheon Kim, Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Pusan National University, Beomeo-ri, Mulgeum-eup, Yangsan-si Gyeongsangnam, 626-870, Republic of Korea.

Tel.: +82-51-510-8243, Fax: +82-51-510-8241

E-mail: ki91000m@pusan.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

과를 야기하며, 이러한 미백기술은 즉각적인 결과를 보인다고 보고되고 있다[6,7]. 그러나 다수의 연구에서 고농도 HP와 높은 온도를 가진 광원의 적용은 치아 경조직에 형태학적 구조의 변화를 일으킨 것으로 알려져 왔다[8-10]. 몇몇 다른 연구에서도 기존 치아미백의 결과로서 표면 거칠기가 증가된 것을 보고한 바 있다[11,12]. 뿐만 아니라, 증가된 표면의 거칠기는 치아표면의 박테리아 부착을 증가시키고, 치면 세균막 형성에 중요한 역할을 하는 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)의 부착이 용이해져 치아우식증을 야기한다는 보고되고 있다[13]. 따라서 기존의 높은 온도를 가진 광원을 이용하는 전문가 미백은 치아 표면에 유해한 변화를 일으켜 사용에 주의를 요하고 있는 실정이다.

법랑질의 표면특성에 관한 연구에는 주사전자 현미경(SEM)과 원자력 현미경(AFM)이 주로 사용된다. SEM은 주로 표면 형태를 입체적으로 분석하고 정확한 변화를 관찰할 수 있는 편리한 방법이다[14]. AFM은 3차원적으로 표면의 지형학적 정보에 실질적인 변화를 제공한다[15]. 대부분의 표면 거칠기 파라미터는 평균 거칠기(Roughness Average; Ra) 수치가 사용된다. 치의학적 연구 영역에서, 이 방법은 나노미터의 범위에서 법랑질의 거칠기, 부식 및 탈회의 측정을 정량적으로 가능하기 때문에 널리 이용되고 있다[16,17]. 치아의 탈회과정은 법랑질 표면의 인회석 결정에서의 Ca^{2+} 와 PO_4^{3-} 이온이 손실되면서 탈회가 시작된다[18]. 불규칙한 치아표면의 측정은 탈회 진행여부를 판단하는 중요한 지표가 되고 박테리아 부착으로 인한 치아우식증 유발에 원인이 된다. 그러므로 치아미백에 따른 표면의 거칠기의 변화를 측정하는 것은 미생물 부착을 유도하여 치아우식증을 진행함으로 반드시 고려되어야 하며 더 나아가 치아의 경조직의 안전성과 직결되어 있다.

우리의 이전 연구에서 저온 대기압 플라즈마 장치는 반응성이 높은 다양한 레디칼을 발생시켜 생활치 미백과 실험치 미백에 두드러진 미백효과를 보였으며, 플라즈마 발생 시 온도는 인체와 유사한 37°C 을 유지했다[19-22]. 그러나 플라즈마를 적용하여 미백된 법랑질의 미세구조학적 변화로 인한 표면의 해로운 영향에 대한 정보가 부족하다. 따라서, 본 연구의 목적은 경조직에 안전한 치아미백을 위하여 치아의 주요성분인 HAP 표면에 저온 대기압 플라즈마와 저농도인 15% CP를 적용한 후 표면의 거칠기 변화와 *S. mutans* 부착여부를 평가 하였다.

재료 및 방법

저온 대기압 플라즈마 장치

본 연구에 사용된 저온 대기압 플라즈마 장치의 도식

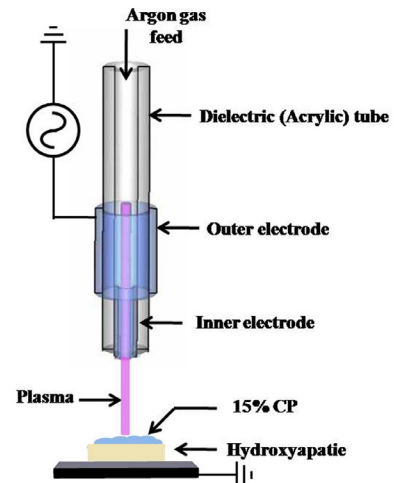


Fig. 1. A schematic drawing of the experimental process using nonthermal atmospheric pressure plasma.

화된 그림과 실험과정은 Fig. 1과 같다. 저온 대기압 플라즈마 장치는 2.5 W의 전력을 가진 파워모듈에 의하여 작동되고 플라즈마 제트는 공기 중에 발생되며 아르곤 가스 2.5 L/min^{-1} 가스유량에 의해 생성된다. 플라즈마 제트와 HAP 표면의 거리는 1 cm 간격을 유지하여 시행하였다.

실험 과정

본 연구에는 $0.50 \times 0.06 \times 0.08 \text{ mm}$ 두께를 가진 60개의 HAP disc (Dense Hydroxyapatite Discs, Clarkson Chromatography Products Inc., South Williamsport, PA, USA)를 사용하여 세 그룹($n=20$)으로 나누어서 진행하였다. 그룹 1은 대조군으로 표면에 아무런 처리를 하지 않았다. 그룹 2는 저농도인 5.4% HP를 함유하고 있는 15% CP 미백겔(approximately 1 mm thick, Kool white 15%, Pac-dent International, Walnut, CA, USA)과 저온 대기압 플라즈마를 함께 적용하였다. 플라즈마 제트는 HAP 표면으로부터 1 cm 거리에 위치시켰다. 그룹 3은 15% CP 미백겔 단독으로 HAP 표면에 도포하였다. 총 적용 시간은 30분이고 처리 후, HAP 표면은 멸균증류수로 깨끗하게 세정한 후 공기 중에서 건조시켰다.

표면의 거칠기

AFM (Digital Instruments, Plainview, NY, USA)는 표면의 거칠기를 측정하는데 사용되고 Ra 수치를 정량화할 수 있다. 각 그룹 당 10개의 HAP disc는 표면 조도를 관찰하기 위하여 AFM 통하여 분석되었다. 모든 HAP disc의 거칠기는 AFM의 팁 접촉 모드로 측정하고 세밀한 이미지를 얻기 위해 0.7016 Hz 의 낮은 스캔 속도에서 수집하였다. $10 \mu\text{m}$ 의 $\times 10 \mu\text{m}$ 의 영역과 이미지

당 최대 256×256 픽셀의 해상도로 분석 되었으며 Ra 수치의 결과는 평균 $Ra \pm$ 표준편차(SD)로 표시하였다.

S. mutans 접종

S. mutans 균주는 brain heart infusion (BHI, Fluka, Switzerland)) 액체 배지에서 24 시간 동안 배양하였다. 각 그룹 당 10개의 HAP disc는 1 ml BHI 액체 배지에 5×10^7 농도의 *S. mutans*를 10 μ l 접종하였다. *S. mutans*를 적용시킨 HAP disc는 37°C에서 24 시간 동안 배양 하였다.

SEM 분석

미백 적용 되어진 HAP disc 표면에 *S. mutans* 균주의 부착을 관찰하기 위하여 SEM (S3500N, Hitachi Co., Japan)촬영을 시행하였다. *S. mutans*가 부착된 HAP disc는 2.5% glutaraldehyde 용액에 2시간 30분 동안 적용 시킨 후 1% 사산화오스름 용액에 2시간 동안 처리하였다. 그 후 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 순서로 알코올 용액에 탈수 과정을 거친 후 hexamethyldisilane (HMDS) 용액을 처리하였다. 전 처리한 HAP disc는 자연 건조시킨 다음 백금으로 코팅하여 15 kV 가속전압으로 2000 배 확대하여 관찰하였다.

통계적 분석

HAP disc 표면의 거칠기는 SPSS 21.0 (Version 21, SPSS, Chicago, IL, USA) 통계 프로그램을 통하여 분석 되었다. 그룹 간의 Ra수치는 유의성 검증을 위하여 유의수준 $\alpha=0.05$ 에서 일원분산분석법(one-way ANOVA), 사후검증으로 Tukey's test를 시행하였다.

결과

HAP disc 거칠기 분석

Fig. 2는 AFM 측정에 의한 HAP disc 표면 거칠기의 변화를 보여준다. 저온 대기압 플라즈마와 저농도 15% CP를 함께 적용한 HAP disc 표면은 매끈하고 부드러운 표면을 보이는 반면, 15% CP 단독으로 처리한 HAP disc 표면은 더욱 거칠어진 표면을 보였다. 각 그룹의 정량적인 평균 Ra수치는 Table 1과 같다. 그룹 1, 2, 3의 평균 Ra수치는 각각 232.54 ± 38.79 , 117.64 ± 4.45 , 및 435.68 ± 30.67 을 보였다. 저온 대기압 플라즈마를 적용한 HAP disc가 낮은 Ra수치가 관찰되었고 이는 아무런 처리를 하지 않은 대조군에 비하여 1.98배 감소하였다. 반면에 15% CP 단독으로 처리한 HAP disc 표면은 높은 Ra수치를 보였고 아무런 처리를 하지 않은 대조군에 비

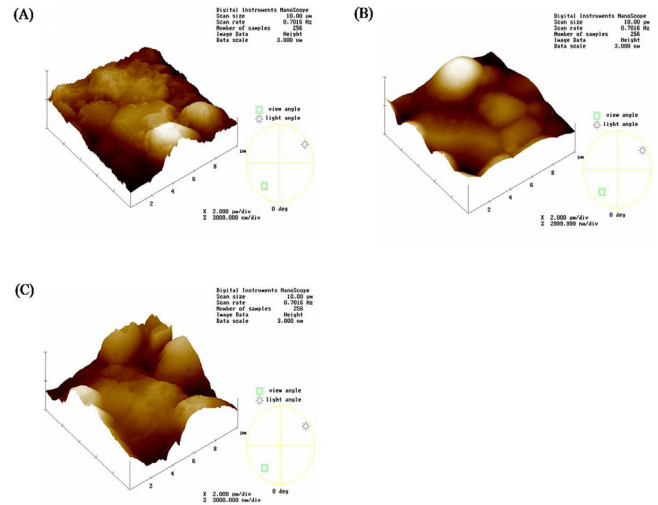


Fig. 2. The topographical images of the hydroxyapatite (HAP) surface (A) with no experiment (B) 15% CP and plasma (C) 15% CP alone.

Table 1. The Mean $Ra \pm SD$ values (μ m) by Statistical Analysis One-Way ANOVA test.

Group	N	Mean $Ra \pm SD$	ANOVA p-values
Control	10	232.54 ± 38.79^b	
15% CP + Plasma	10	117.64 ± 4.45^a	0.000
15% CP	10	435.68 ± 30.67^c	

CP: carbamide peroxide, Ra: roughness average, SD: standard deviation.

a, b, c: Different letters indicate statistically significant differences among the groups by one-way ANOVA and Tukey's test ($p < 0.05$).

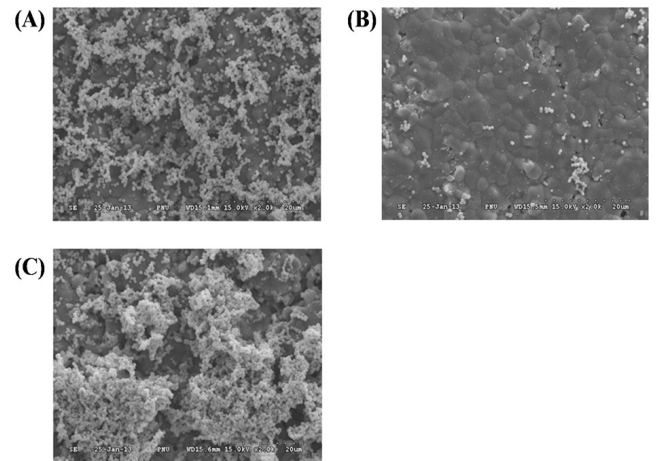


Fig. 3. Representative SEM photomicrographs of adhered *S. mutans* on the hydroxyapatite (HAP) surface (A) with no experiment (B) 15% CP and plasma (C) 15% CP alone.

하여 1.87배 증가하였다.

S. mutans 부착

S. mutans 균의 부착 양상을 SEM으로 관찰한 결과, 저온 대기압 플라즈마와 저농도인 15% CP를 적용한 HAP disc 표면은 *S. mutans* 균이 거의 부착되지 않았으며, 15% CP 단독으로만 적용한 HAP disc 표면은 *S. mutans* 균의 높은 부착율을 보였다(Fig. 3).

고찰

오늘날 치아미백 시스템은 보다 나은 미백 효과를 환자들에게 제공하기 위해 많은 노력을 기울이고 있다[4]. 이러한 측면에서 치아미백을 위한 새로운 에너지원으로 저온 대기압 플라즈마는 하전입자 및 유기기를 포함하는 높은 반응성을 가진 여러 활성종이 풍부하게 존재한다[23]. 또한, 저온 대기압 플라즈마는 인체와 유사한 온도로 공기 중에 발생하고 넓은 범위의 주파수에 따라 다양한 공급 가스로 작동가능하다[19-22]. 이러한 플라즈마의 특성을 고려하여 볼 때 치아 미백을 수행함에 있어서 플라즈마의 적용은 유력한 심미치의학 영역의 새로운 기술이 될 것이다. 이는 지금까지의 연구를 바탕으로 플라즈마의 적용은 치아 미백에 있어 현저한 색 변화를 보여줌으로 효과를 입증하였다[19-22].

HAP는 인체의 골격 및 치아의 무기질과 화학적 뿐만 아니라 구조적 유사성을 가지기 때문에 뼈와 치아를 대체하여 인체에 식립 할 수 있는 최적의 생체 재료이다[24]. 또한, HAP는 성숙한 성인의 법랑질 결정을 이루는 것으로 잘 알려져 있다[25]. 따라서 치아의 법랑질 표면에 대한 HP의 부정적 효과는 치아 경조직 모델 물질인 HAP에서 평가되었다[26]. 본 연구는 플라즈마를 이용한 경조직의 안전한 치과응용을 위하여 HAP에 적용하여 표면 거칠기의 변화와 박테리아 부착 여부를 확인하기 위해 평가 하였다. 표면의 거칠기는 AFM 이미지 및 Ra 수치에 의해 상세한 변화를 제공하였고 박테리아 부착은 대표적인 치아우식증의 원인균인 *S. mutans*를 접중하여 SEM을 통하여 확인하였다.

임상적 상황에서 치아의 법랑질 표면은 완전히 미백제와 광원에 노출된다. 이러한 이유 때문에 표면의 변화를 조사하는 것은 무엇보다 중요하다. 실질적으로 치아미백의 효과와 치아의 구조적 변화 사이에 큰 모순 가지고 있다고 보고 된 바 있다[27,28]. 더욱이, 많은 연구에서 물리적 또는 화학적 특성에 영향을 미칠 수 있는 치아 미백의 부작용에 대하여 보고하였다. 이러한 변화

들은 치아의 감소된 미세경도 및 약화된 치아 구조로 표현되었다[29]. 심지어, 탈회현상은 미백된 HAP에서 무기성분의 변화로 일어난다고 밝혀졌다[27]. 치아표면의 형태변화는 무기질 결정구조가 분해됨에 따라 표면에 미세구멍의 크기가 넓게 된다[16,30]. Jiang 등[31]은 30% HP가 표면에 심각한 변형을 나타낸다고 보고하였다. 높은 농도의 미백제는 치아 경조직에 크고 빠른 변화를 일으킬 수 있다. 최근 연구에서는 표면 거칠기가 치아표면에 해로운 영향을 미치는 것으로 관찰되었다[32]. 기존의 치아 미백 처치는 표면 거칠기의 변화를 야기하고 치아 구조에 비가역적인 손상을 일으킨다고 알려졌다[33]. Fu 등[34]은 역시 치아 미백에 의한 법랑질 표면의 마이크로 및 나노 형태의 변화를 보고한 바 있다. 더욱이, 이러한 표면 거칠기의 변화가 치아 표면에 박테리아 부착을 증가시켜 치면 세균막 형성을 촉진 할 수 있다[35]. 이는 HAP의 격자구조 사이의 틈이 커짐에 따라 치아우식증으로 진행이 되는 것이다. 또한, 이러한 변화는 치아 색의 변화, 환한 치아 빛의 감소 및 불투명도의 증가와 깊은 관련성을 가진다. 따라서 표면 거칠기의 변화로 인한 박테리아의 부착은 치아 미백 과정에서 중요한 변수이므로 반드시 고려되어야한다.

본 연구에서 15% CP 단독으로 도포한 HAP disc 표면은 증가된 표면 거칠기를 유도하고 이는 형태학적 변화를 촉진하는 것으로 나타났다. 15% CP 단독처리에 따른 지나치게 거친 표면은 치아를 구성하는 주요성분인 HAP의 분해와 관련되고 이는 법랑질의 탈회 진행을 야기한다. 또한, 거친 표면의 영향으로 *S. mutans*의 높은 부착율을 보였고 이러한 결과는 치아우식증으로 이환될 수 있는 가능성이 높다는 것을 시사한다. 한편, HAP disc에 저온 대기압 플라즈마와 15% CP를 적용한 결과, 표면의 결합으로 인한 거친 표면이나 탈회현상을 초래하지 않았으며 오히려 낮은 Ra수치를 가진 부드러운 표면이 관찰되었다. 본 연구결과를 바탕으로 볼 때 저온 대기압 플라즈마를 적용한 표면은 석회화된 무기질 결정을 공격 하지 않았다. 이는 대표적인 활성산소이며 치아 미백에 주요한 역할을 하는 수산화 라디칼(Hydroxyl radical)이 플라즈마 발생 시에 풍부하게 생산되어져 표면에 무기질 결정에 영향을 주지 않고 오직 단백질만을 빠르게 제거하기 때문이다[18].

따라서 저온 대기압 플라즈마의 적용은 표면에 탈회와 같은 유해한 영향을 미치지 않고 낮은 미생물 부착율로 치아우식증으로 이환율이 적으므로 치아 미백을 수행 할 수 있는 효과적이고 안전한 장비이다. 그러므로 저온 대기압 플라즈마를 이용한 치아 미백 기술은 치아의 높은 미백효과와 경조직에 비 파괴적인 에너지원으

로 임상에서 치아 미백으로 문제가 되는 여러 측면을 해결 할 수 있는 새로운 치아미백장비가 될 것이다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의해 지원되었음.

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interest.

References

- Zonghan X, Michael S, Paul M, Hoffman M. On the critical parameters that regulate the deformation behavior of tooth enamel. *Biomaterials*. 2002;9:2697-2703.
- Poggio C, Lombardini M, Colombo M, Bianchi S. Impact of two toothpastes on repairing enamel erosion produced by a soft drink: An AFM in vitro study. *J Dent*. 2010;38:868-874.
- Sun L, Liang S, Sa Y, Wang Z, Ma X, Jiang T, Wang Y. Surface alteration of human tooth enamel subjected to acidic and neutral 30% hydrogen peroxide. *J Dent*. 2011;39:686-692.
- Gallagher A, Maggio B, Bowman J, Borden L, Mason S, Felix H. Clinical study to compare two in-office (chairside) whitening systems. *J Clin Dent*. 2002; 13:219-224.
- Suliman MA. An overview of tooth-bleaching techniques: chemistry, safety and efficacy. *Periodontol* 2000. 2008;48:148-169.
- Haywood VB, Heymann HO. Nightguard vital bleaching. *Quint Int*. 1989;20:173-176.
- Kugel G, Kastali S. Tooth whitening efficacy and safety: a randomized and controlled clinical trial. *Compend Contin Educ Dent*. 2000;29:516-521.
- Kwon YH, Huo MS, Kim KH, Kim SK, Kim YJ. Effects of hydrogen peroxide on the light reflectance and morphology of bovine enamel. *J Oral Rehabil*. 2002;29:473-477.
- Justino LM, Tames DR, Demarco FF. In situ and in vitro effects of bleaching with carbamide peroxide on human enamel. *Oper Dent*. 2004;29:219-225.
- Hairul BR, Lim CT, Chng HK, Yap AU. Nanoindentation study of human premolars subjected to bleaching agent. *J Biomech*. 2005;38:2204-2211.
- Titley K, Torneck CD, Smith D. The effect of concentrated hydrogen peroxide solutions on the surface morphology of human tooth enamel. *J Endod*. 1988;14:69-74.
- Shannon H, Spencer P, Gross K, Tira D. Characterization of enamel exposed to 10% carbamide peroxide bleaching agents. *Quintessence Int*. 1993;24:39-44.
- Wiater A, Choma A, Szczodrak J. Insoluble glucans synthesized by cariogenic streptococci: a structural study. *J Basic Microbiol*. 1999;39:265-273.
- Josey AL, Meyers LA, Romaniuk K, Symons AL. The effect of a vital bleaching technique on enamel surface morphology and the bonding of composite to enamel. *J Oral Rehabil*. 1996;23:244-250.
- Watari F. Compositional and morphological imaging of CO₂ laser irradiated human teeth by low vacuum SEM, confocal laser scanning microscopy and atomic force microscopy. *J Mater Sci Mater Med*. 2001;12:189-194.
- Basting RT, Rodrigues Jr AL, Serra MC. The effect of 10% carbamide peroxide bleaching material on microhardness of sound and demineralized enamel and dentin in situ. *Oper Dent*. 2003;26:531-539.
- Fawzy AS, El-Askary FS, Amer MA. Effect of surface treatments on the tensile bond strength of repaired water-aged anterior restorative micro-fine hybrid resin composite. *J Dent*. 2008;36:969-976.
- Pinto CF, Oliveira R, Cavalli V, Giannini M. Peroxide bleaching agent effects on enamel surface microhardness, roughness and morphology. *Braz Oral Res*. 2004;18: 306-311.
- Lee HW, Kim GJ, Kim JM, Park JK, Lee JK, Kim GC. Tooth bleaching with nonthermal atmospheric pressure plasma. *J Endod*. 2009;35:587-591.
- Lee HW, Nam SH, Mohamed AAH, Kim GC, Lee JK. Atmospheric pressure plasma jet composed of three electrodes: application to tooth bleaching. *Plasma Process Polym*. 2010;7:274-280.
- Park JK, Nam SH, Kwon HC, Mohamed AAH, Lee JK, Kim GC. Feasibility of nonthermal atmospheric pressure plasma for intracoronary bleaching. *Int Endod J*. 2011;44:170-175.
- Nam SH, Lee HW, Cho SH, Lee JK, Jeon YJ, Gyoo, Kim GC. High-efficiency tooth bleaching using non-thermal atmospheric pressure plasma with low concentration of hydrogen peroxide. *J Appl Oral Sci*. 2013;21:265-270.
- Iza F, Kim GJ, Lee SM, Lee JK, Walsh JL, Zhang YT, Kong MG. Microplasmas: sources, particle kinetics and biomedical applications. *Plasma Process Polym*. 2008;5:322-344.
- Kim HJ, Son MK, Lee KK, Lee BA, Kim YJ. Surface characteristics and biocompatibility of titanium coated with dentin-derived hydroxyapatite. *Int J Oral Biol*. 2012;37:9-16.
- Sydney-Zax M, Mayer I, Deutsch D. Carbonate content in developing human and bovine enamel. *J Dent Res*. 1991;70:913-916.
- Tanizawa Y. Reaction characteristics of a tooth-bleaching agent containing H₂O₂ and NaF: in vitro study of crystal structure change in treated hydroxyapatite and chemical states of incorporated fluorine. *Int J Cosm Sci*. 2005;56:121-134.

27. Al-Salehi SK, Wood DJ, Hatton PV. The effect of 24h non-stop hydrogen peroxide concentration on bovine enamel and dentin mineral content and microhardness. *J Dent.* 2007;35:845-850.
28. Markovic L, Jordan RA, Lakota N, Gaengler P. Micromorphology of enamel surface after vital tooth bleaching. *J Endod.* 2007;33:607-610.
29. Oltu ü, Gürkan S. Effect of three concentrations of carbamide peroxide on the structure of enamel. *J Oral Rehabil.* 2000;27:332-340.
30. Lopes GC, Bonisconi L, Baratieri LN, Vieira LC, Monteiro Jr S. Effect of bleaching agents on the hardness and morphology of enamel. *J Esthet Restor Dent.* 2002; 14:24-30.
31. Jiang T, Ma X, Wang Z, Tong H, Hu J, Wang Y. Beneficial effects of hydroxyapatite on enamel subjected to 30% hydrogen peroxide. *J Dent.* 2008;36:907-914.
32. de A Silva MF, Davies RM, Stewart B, DeVizio W, Tonholo J, da Silva Júnior JG, Pretty IA. Effect of whitening gels on the surface roughness of restorative materials in situ. *Dent Mater.* 2006;22:919-924.
33. Joiner A. Review of the effects of peroxide on enamel and dentine properties. *J Dent.* 2007;35:889-896.
34. Fu B, Hoth-Hannig W, Hannig M. Effects of dental bleaching on micro- and nanomorphological alterations of the enamel surface. *Am J Dent.* 2007;20:35-40.
35. Hosoya N, Honda K, Lino F, Arai T. Changes in enamel surface roughness and adhesion of *Streptococcus mutans* to enamel after vital bleaching. *J Dent.* 2003;31:543-548.