

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

PAULA CICÍLIA FAQUIM RODRIGUES

**EFEITO DA APLICAÇÃO DO GÁS OZÔNIO NA RESISTÊNCIA DE
UNIÃO ENTRE RESINA COMPOSTA E DENTINA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

-Modalidade artigo científico-

GOIÂNIA
2009

PAULA CICÍLIA FAQUIM RODRIGUES

**EFEITO DA APLICAÇÃO DO GÁS OZÔNIO NA RESISTÊNCIA DE
UNIÃO ENTRE RESINA COMPOSTA E DENTINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Goiás, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. João Batista de Souza
Co-orientador: Prof. Dr. Carlos José Soares

GOIÂNIA
2009

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**

**BANCA EXAMINADORA DA DESEFA DA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Aluna: Paula Cícilia Faquim Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. João Batista de Souza

Co- orientador: Prof. Dr. Carlos José Soares

Membros:

1. Prof. Dr. João Batista de Souza

2. Prof. Dr. Carlos Estrela

3. Profa. Dra. Fernanda Cristina Pimentel Garcia

Suplente:

1. Prof. Dr. Fabrício Luscino Alves de Castro

Data: 13/03/2009

*“Muitas vezes as pessoas são egocêntricas, ilógicas e insensatas.
Perdoe-as assim mesmo.*

*Se você é gentil, as pessoas podem acusá-lo de egoísta, interesseiro.
Seja gentil assim mesmo.*

*Se você é um vencedor, terá alguns falsos amigos e alguns inimigos verdadeiros.
Vença assim mesmo.*

*Se você é honesto e franco, as pessoas podem enganá-lo.
Seja honesto e franco assim mesmo.*

*O que você levou anos para construir, alguém pode destruir de uma hora para outra.
Construa assim mesmo.*

*Se você tem paz e é feliz, as pessoas podem sentir inveja.
Seja feliz assim mesmo.*

*O bem que você faz hoje pode ser esquecido amanhã.
Faça o bem assim mesmo.*

*Dê ao mundo o melhor de você, mas isso pode nunca ser o bastante.
Dê o melhor de você assim mesmo.*

***Veja você que, no final das contas, é entre você e Deus.
Nunca foi entre você e as outras pessoas.”***

Madre Teresa de Calcutá

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho...

*Aos meus pais **Osmar** e **Alcione**, em especial minha querida mãe,*

*Que se empenharam para a minha formação pessoal e profissional e me deram
a oportunidade de construir e realizar cada um dos meus sonhos.
Agradeço pela compreensão, pelo apoio e por sempre acreditar em minha capacidade.
A vocês dedico não apenas este trabalho, mas a minha vida.*

*Ao **Tiago**...*

*... meu namorado, amigo e grande companheiro.
Por apoiar meus sonhos, demonstrando amor, companheirismo e dedicação.
Pela paciência e compreensão nos momentos difíceis e nos períodos de ausência.
Por estar ao meu lado sempre com uma palavra de otimismo e incentivo.
A conquista de hoje não é somente minha, mas nossa, pois o seu amor meu deu
forças para prosseguir. Obrigada por trilhar mais essa vitória comigo.
AMO VOCÊ !!!*

...a todos vocês com grande carinho!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus,

*Pela presença constante em minha vida, principalmente nos momentos difíceis.
Te agradeço por colocar em meu caminho tantas pessoas dispostas a me ajudar.
Obrigada por guiar a minha vida em direções cada vez mais elevadas e nobres.
“E ainda se vier noites traiçoeiras e se a cruz pesada for Cristo estará contigo.
O mundo pode até fazer você chorar, mas Deus te quer sorrindo”*

Ao meu orientador Prof. Dr. João Batista de Souza,

*Estar ao seu lado todos esses anos e poder compartilhar um pouco da sua
grande sabedoria, sempre me enalteceu e me fez ficar mais confiante na
vivência e no entendimento da odontologia e da vida. Muito obrigada pelas
suas palavras, pelos seus ensinamentos e pelo seu exemplo de conduta, sempre
de extremo caráter e plena dedicação à docência. Agradeço por ter acreditado
na minha capacidade, pelo incentivo, compreensão e paciência. Espero levar
daqui não só o exemplo e a admiração de um grande professor, mas também
um verdadeiro amigo. Sinto-me honrada por ter sido sua orientada!
A você todo o meu respeito, admiração e eterna gratidão!*

A Karla e Leandro ...

...queridos amigos desde a graduação. Obrigada pelo constante apoio, companheirismo, incentivo e principalmente pela amizade em todos os momentos. Nega, agradeço toda consideração e carinho que sempre recebi de sua família. Amigos, não há palavras para expressar o meu carinho e admiração por vocês. Espero ter sempre vocês em minha vida!

A Cláudia Daniela,

Obrigada pela amizade, companheirismo e maravilhosos momentos de muita conversa e alegria. Não tenho como retribuir toda ajuda e apoio constante durante o mestrado. Fico muito feliz por poder chamá-la de AMIGA!

*“Amigo é a base quando falta o chão!
Benditos sejam todos os amigos de raízes, verdadeiros.
Porque amigos são herdeiros da real sagacidade.
Ter amigos é a melhor cumplicidade!”
Machado de Assis*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Lawrence Gonzaga Lopes ,

exemplo de pesquisador e professor, obrigada pelo incentivo desde a graduação e pela disposição com que sempre solucionou minhas dúvidas.

Sem seu apoio não seria possível atingir este objetivo.

Ao Prof. Dr. Carlos Estrela,

agradeço por toda ajuda e por me receber em seu laboratório. É uma honra poder trabalhar com um exemplo de ser humano e pesquisador.

Ao co-orientador Prof. Dr. Carlos José Soares,

pelas sugestões na realização deste trabalho, pela atenção recebida e pela oportunidade de conhecer e trabalhar em outra instituição de ensino.

A Faculdade de Odontologia da UFG,

na pessoa do diretor Prof. Dr. Gersinei Carlos de Freitas, pela oportunidade de conhecer tantas pessoas importantes em minha vida e por ser o alicerce da minha formação profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFG e todos os Professores do programa e convidados,

pelos ensinamentos e por esta oportunidade de crescimento profissional.

Aos queridos funcionários da Pós-Graduação Fábio e Gláucia,

pelo carinho que me recebem, sempre prontos e dispostos a me ajudar com competência, paciência e amizade. Muito obrigada!

Aos amigos do mestrado:

Fabiana, Karlla, Cíntia, Eduardo, Érica, Luciano, Karine, Nádia, Geovane, Antônio Hélio, Larissa, Evelin, Lila, Angélica, Andréia, Daniela, Henrique, Érika e Aleimar.

pela oportunidade da amizade, pelos conhecimentos compartilhados e por todos os momentos especiais que vivenciamos.

A Gláucia e Francine,

que foram importantes companhias durante o mestrado, agradeço o apoio, a atenção e o carinho.

As amigas de graduação Larissa e Thaís,

que mesmo um pouco distante sempre me apoiaram e torceram por mim.

Ao Tiago, Eduardo, Geovane e Renato,

que generosamente também contribuíram para a realização desta pesquisa. Obrigada!

A Fernandinha e Carol,

por me receber com tanto carinho na UFU e por ter me auxiliado em todos os momentos necessários, sempre com paciência e disposição.

Ao Prof. Dr. Jesiel Freitas Carvalho do Instituto de Física da UFG, a Profa. Dra. Fernanda Cristina Pimentel Garcia da UnB e a Anay Borges de Sousa do LCQA da Faculdade de Farmácia/UFU,

que me receberam em seus laboratórios permitindo a conclusão da minha pesquisa. Obrigada pela gentileza, educação e atenção!

A representante da empresa Dentsply Núbia,

por ter disponibilizado materiais e equipamentos odontológicos essenciais para execução deste trabalho.

Ao CNPq,

Pelo apoio financeiro, sem o qual não poderia ter me dedicado plenamente ao mestrado e a minha pesquisa.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho meus sinceros agradecimentos!!!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT	xiv
1. CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA.....	15
2. JUSTIFICATIVA.....	22
3. OBJETIVOS.....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
5. PUBLICAÇÃO	38
6. CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

O ₃	Ozônio
O ₂	Oxigênio
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
Er:YAG	Érbio, Ítrio, Alumínio, Granada
BisGMA	Bisfenol A-Glicidil Metacrilato
HEMA	2 hidroxil-etil-metacrilato
%	Porcentagem
X	Indica número de vezes (Ex: 20X de aumento)
p	Nível de significância
pKa	Constante de ionização
ANOVA	Análise de variância
MPa	Mega Pascal
N	Newton
°C	Graus Celsius
rpm	Rotações por minuto
mm	Milímetro
cm	Centímetro
s	Segundo
min	Minutos
h	Hora
g	Gramas
mL	Mililitro

g/L	Grama por litro
mm/min.	Milímetro por minuto
mL/min.	Mililitro por minuto

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do gás ozônio e do ascorbato de sódio na resistência de união entre dentina e resina composta. O esmalte oclusal de 40 terceiros molares humanos foi removido expondo uma superfície plana de dentina. Os dentes foram divididos aleatoriamente em quatro grupos (n=10): (G1) dentina não tratada com ozônio (grupo controle); (G2) gás ozônio aplicado por 40s seguido pelo condicionamento ácido; (G3) condicionamento ácido seguido pela aplicação do gás ozônio por 40s; e (G4) gás ozônio por 40s com subsequente aplicação do ascorbato de sódio 10% por 10 min. Coroas de resina composta foram confeccionadas incrementalmente. Os espécimes obtidos foram seccionados obtendo palitos com área de secção transversal de 1mm^2 a serem testados em ensaio de microtração (0,5 mm/min). Os valores de resistência de união a microtração foram analisados por meio da análise de variância ANOVA em fator único e teste de Tukey ($\alpha=0,05$). Todos os palitos fraturados foram analisados em estereomicroscópio (40X). Os resultados mostraram que o G1 apresentou maiores valores de resistência de união quando comparado ao G2 e G3 ($p=0,00$). Os valores de resistência de união do G1 e G4 foram similares ($p=0,158$) e maiores que do G2, porém não houve diferença entre os valores de G3 e G4 ($p=0,115$). O uso do ozônio antes do condicionamento ácido (G2) resultou em menor valor de resistência de união em todas condições avaliadas ($p=0,00$). A aplicação do gás ozônio diminuiu a resistência de união ao teste de microtração da interface dentina/resina composta, porém os valores foram revertidos quando do uso do ascorbato de sódio.

Descritores: Ozônio, Antioxidantes, Resinas compostas, Resistência à tração.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of ozone gas and its use with an antioxidant on the resin-dentin microtensile bond strength. The occlusal enamel of forty human third molars was then removed to expose a flat superficial dentin surface. The teeth were randomly divided into four groups (n = 10): (G1) untreated dentin with ozone (control group); (G2) ozone gas application for 40 s followed by acid etching; (G3) acid etching followed by ozone gas for 40s; and (G4) ozone gas for 40s with subsequent application of sodium ascorbate 10% for 10 min. Composite build-ups were constructed incrementally. Specimens were sectioned to obtain sticks with cross-sectional areas of 1mm² to be tested in tension (0.5 mm/min). The microtensile bond strength values were analyzed by one-way ANOVA and Tukey's test ($\alpha=0.05$). All sticks fractured were then observed under a stereomicroscope (40X). The results showed that the G1 had higher values of microtensile bond strength when compared to G2 and G3 ($p=0.00$). The values of microtensile bond strength of G1 and G4 were similar ($p = 0.158$) and higher than the G2, but there was no difference between the values of G3 and G4 ($p=0.115$). The use of ozone prior to etching (G2) resulted in lower value of microtensile bond strength in all conditions evaluated ($p = 0.00$). The application of ozone gas decreased the microtensile bond strength of the interface dentin/composite resin, but the values were reversed when the use of sodium ascorbate.

Keywords: Ozone, Antioxidants, Composite Resins, Tensile Strength.

*1- CARACTERIZAÇÃO
DO PROBLEMA*

1- CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

O ozônio (O₃), variedade alotrópica do oxigênio, é constituído por moléculas triatômicas deste elemento¹⁻⁵. Apresenta-se de modo natural na forma de gás, de cor azul tênue^{2,4,5}. Este elemento é obtido a partir da dissociação do oxigênio molecular (O₂) em átomos de oxigênio ativado, que então reage com moléculas suplementares de O₂, mediante uma descarga elétrica, reações fotoquímicas ou artificialmente advindas de geradores elétricos^{1,2,4-6}. É um potente oxidante, que o torna em um forte agente antimicrobiano.^{1,3,4,7,8,9}

Devido suas propriedades bactericida, fungicida e virucida, o ozônio é muito utilizado na medicina e atualmente na odontologia vêm sendo usado no tratamento de lesões cariosas, na estomatologia, endodontia, periodontia e cirurgia^{1,3,5,10}.

A utilização do ozônio apresenta-se como uma alternativa conservadora no tratamento de lesões de cárie, devido sua comprovada propriedade antimicrobiana na inibição e/ou destruição de muitos microrganismos orais, tais como microrganismos Gram-positivos, Gram-negativos e *Candida albicans*⁸⁻¹².

O potencial oxidante do ozônio induz a destruição da parede celular e membrana citoplasmática de microrganismos^{1,4,8,13}. Durante esse processo, destrói glicoproteínas, glicolípídeos e outros aminoácidos, e bloqueia ou inibe o controle enzimático da célula⁶. Isto resulta no aumento da permeabilidade da membrana, que é o elemento chave da viabilidade celular, levando a imediata cessação da função. Desta forma, o ozônio pode facilmente entrar na célula e causar a morte do microrganismo.⁸

Ao avaliar o efeito antibacteriano da aplicação do gás ozônio em *Streptococcus mutans* (dentina humana), observou-se que houve uma redução significativa da quantidade de microrganismos em comparação com o grupo controle (sem tratamento)⁹. Resultados semelhantes foram observados por Baysan, Whiley e Lynch (2000)¹⁰, ao verificar o efeito

antimicrobiano em *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* com a aplicação da água ozonificada, por 10 e 20 s, em lesões cariosas radiculares primárias. Observaram que o ozônio aplicado por este período de tempo promoveu uma redução significativa da quantidade de microrganismos nas lesões cariosas. Em outro estudo⁸, analisou-se o efeito da água ozonificada sobre a efetividade antimicrobiana em microrganismos orais gram-positivos, gram-negativos e *Candida albicans*. Os resultados mostraram que a água ozonificada foi altamente efetiva em destruir ambos microrganismos estudados.⁸

Entretanto, as evidências de estudos avaliando a atividade antimicrobiana do ozônio em microrganismos são controversas. Estrela *et al.* (2007)¹³ observaram que a aplicação do gás ozônio por 20 min não foi suficiente para inativar *E. faecalis* presentes em canais radiculares infectados. Os resultados de outro estudo realizado por Baysan e Beighton (2007)¹⁴ mostraram que a aplicação do gás ozônio por 40 s não reduziu o número de microrganismos viáveis presentes na dentina infectada associada a lesões de cárie oclusais não cavitadas. Gerspach *et al.* (2008)¹⁵ comparando os efeitos imediatos do gás ozônio e o gel de clorexidina sobre bactérias de lesões cariosas oclusais cavitadas, observaram que a aplicação do ozônio ou da clorexidina durante 30 s não reduziu significativamente o número de bactérias em cavidades profundas.

Diante destas pesquisas que comprovam sua atividade antimicrobiana⁸⁻¹² e pela sua facilidade de aplicação, o ozônio vem sendo considerado como uma alternativa estratégica no tratamento de lesões de cáries radiculares e de cáries oclusais não cavitadas e cavitadas^{1,2,4,7,10,16-19}.

O seu uso no tratamento das lesões cariosas é baseado na atividade antimicrobiana, com capacidade de oxidar proteínas presentes nas lesões, permitindo a difusão de íons cálcio e fosfato pelas lesões cariosas e resultando a remineralização dos tecidos dentários afetados^{7,10,17,19,20}. Além disso, o ozônio pode descarboxilar o ácido pirúvico, o ácido mais

forte produzido naturalmente pelas bactérias cariogênicas durante a cariogênese, a ácido acético. Desta forma, a remineralização de lesões de cáries incipientes pode ocorrer quando a produção de ácido acético, ou outro ácido com alto pKa presente na placa, tampone o fluido do biofilme.^{4,17}

Holmes (2003)² em um estudo clínico randomizado, acompanhou por 18 meses o efeito da aplicação do gás ozônio em 178 lesões radiculares primárias não cavidadas, associado com a utilização diária de medidas remineralizantes pelos pacientes. As lesões receberam a aplicação do gás ozônio por 40 s durante os períodos de 3, 6, 12 e 18 meses. Após 18 meses, observou-se a paralisação de todas as lesões cariosas tratadas com a aplicação do gás. Em outro estudo semelhante, Baysan e Lynch (2004)⁷ avaliaram o efeito do ozônio sobre a severidade clínica de lesões de cárie radicular. Aplicaram gás ozônio por 10 s ou 20 s em 70 lesões e observaram que em ambos os períodos de aplicação do gás houve a reversão ou paralisação da maioria das lesões cariosas radiculares.

A utilização do ozônio em lesões cariosas oclusais não cavidadas em fóssulas e fissuras também foi estudada. Abu-Naba'A, Shorman e Lynch (2004)²¹ monitoraram 208 lesões cariosas em fóssulas e fissuras de molares permanentes por seis meses. Após a aplicação do gás ozônio por 10 s em 1, 3 e 6 meses, observaram que houve a remineralização de 81,7% das lesões. Huth *et al.* (2005)¹⁶, em um ensaio clínico controlado randomizado de boca dividida, avaliaram lesões cariosas em fóssulas e fissuras durante três meses. Após a aplicação do gás ozônio por 40 s em 57 lesões, observaram uma redução ou paralisação significativa da progressão das cáries tratadas com ozônio. Em adição, o uso do ozônio pode resultar também na reversão de lesões cariosas oclusais cavidadas previamente à curetagem da dentina amolecida¹⁸. Porém, Zaura, Buijs e Cate (2007)²² observaram, em estudo *in vitro*, que o ozônio não promoveu a reversão ou paralisação de lesões cariosas em dentina.

Embora a maioria das pesquisas comprovem sua eficácia no tratamento de lesões cáries^{1,2,4,7,10,16-20}, o ozônio é uma variedade alotrópica do oxigênio e por isso possui alta instabilidade, voltando a ser oxigênio em curto espaço de tempo^{1,3,11}. A presença de radicais livres de oxigênio pode inibir a polimerização dos sistemas adesivos, e como consequência diminuir a resistência de união entre o material restaurador e os substratos dentários²³⁻²⁸.

Para que ocorra a polimerização dos compósitos é necessária a presença de radicais livres formados por um sistema ativador/iniciador como ocorre com a fotopolimerização. Na fotopolimerização, os compósitos são expostos à luz visível sensibilizando o fotoiniciador, geralmente a canforoquinona. Ao ser excitada pela luz, a canforoquinona interage com uma amina para formar os radicais livres. Esses radicais livres reagem com um monômero para iniciar a reação de polimerização. Desta forma, o radical livre é transferido para o monômero (metacrilato), que vai reagindo com outro monômero e assim por diante, propagando o fenômeno da polimerização até que os radicais livres reajam entre si formando moléculas estáveis. Porém, nem todos os monômeros reagem com outros formando ligações cruzadas, portanto não ocorre a formação de uma cadeia polimérica perfeitamente tridimensional.^{29,30} E o oxigênio, por possuir uma reatividade muito maior que a do monômero, quando está presente durante o processo de polimerização, reage com os radicais livres das cadeias em crescimento interferindo no processo de polimerização^{24,31}.

Desta forma, algumas preocupações surgem em realizar um procedimento adesivo após o uso do ozônio e poucas pesquisas foram desenvolvidas com o objetivo de avaliar estas variáveis.

Schmidlin, Zimmermann e Bindl (2005)²⁸ avaliaram a influência da aplicação do gás ozônio na resistência de união ao cisalhamento em dentina e esmalte de dentes bovinos e não observaram redução na força de cisalhamento de adesão entre substrato dentário e restauração. Al Shamsi *et al.* (2008)³² investigaram o efeito da aplicação do gás ozônio sobre

a resistência de união ao cisalhamento de braquetes ortodônticos ao esmalte e observaram que a aplicação do ozônio não afetou os valores da resistência de união. Bitter *et al.* (2008)³³ investigaram os efeitos dos agentes antibacterianos laser Er: YAG e gás ozônio na resistência de união (*push-out*) de pinos de fibra ao canal radicular e observaram que o tratamento com laser Er:YAG ou gás ozônio afetaram a retenção adesiva dos pinos de fibra, dependendo do tipo de agente cimentante (Panavia F 2.0, Variolink II, RelyX Unicem ou Ketac Cem).

Apesar da presença de estudos^{28,32,33} avaliando a resistência de união após aplicação do gás ozônio, as implicações do seu uso sobre a dentina antes de procedimentos adesivos ainda não estão bem esclarecidas. Ao verificar estes estudos observa-se que estes utilizaram o ensaio mecânico de cisalhamento para avaliar a resistência de união. Porém, de acordo com Sano *et al.*³⁷ e Pashley *et al.*³⁸, este teste não é o mais indicado para avaliar a resistência de união de materiais odontológicos ao substrato dentário. Devido ao teste de cisalhamento, por analisar áreas de união de maior dimensão, estar associado a uma distribuição não uniforme do estresse pela interface adesiva, avaliando provavelmente a distribuição dos defeitos introduzidos na interface dente/restauração durante o preparo da amostra, ao invés de avaliar a verdadeira resistência de união^{34,35}. Na tentativa de minimizar esta ocorrência, o teste de microtração apresenta-se como um dos testes mais utilizados para medir a resistência de união dos mais variados materiais e situações. Este teste, por utilizar áreas de união reduzidas de 0,5 a 1mm², demonstra uma melhor distribuição de estresse e menor quantidade de defeitos na interface, minimizando a incidência de fraturas coesivas.³⁶⁻³⁸

Por outro lado, para neutralizar o oxigênio responsável pela polimerização incompleta dos monômeros resinosos, indica-se a utilização de um agente antioxidante (ascorbato de sódio a 10%) sobre a superfície exposta aos radicais livres de oxigênio⁴⁰⁻⁴⁶. O uso de agentes antioxidantes, tais como os derivados do ácido ascórbico, agem como estabilizadores de

radicais livres, pois são capazes de neutralizar o efeito do oxigênio no processo de polimerização de materiais adesivos³⁹⁻⁴⁵.

Levando em consideração o que foi exposto, nota-se que a aplicação do gás ozônio resulta na liberação de radicais livres, neste caso de oxigênio, e que este interfere na resistência de união entre resina composta e o substrato dentário e que a utilização de agentes antioxidantes neutraliza o oxigênio.

2- JUSTIFICATIVA

2- JUSTIFICATIVA

Por apresentar facilidade de aplicação, a utilização do gás ozônio no tratamento de lesões cáries apresenta-se como uma terapia promissora^{2,7,10,16,17,18,19,21}. Porém, pela sua alta instabilidade, o ozônio torna-se rapidamente em oxigênio, podendo inibir a polimerização do sistema adesivo e conseqüentemente reduzir sua resistência de união²³⁻²⁸. Portanto, necessita-se de mais pesquisas que verifiquem se há influência da aplicação do gás ozônio na resistência de união entre substrato dentário e restauração de resina composta. E em adição, verificar o efeito potencial do ascorbato de sódio como agente antioxidante, utilizado após a aplicação do ozônio. Isto se justifica pelo fato de constar na literatura nacional e internacional poucas pesquisas^{28,32,33} avaliando as implicações da aplicação do ozônio sobre o tecido dentário antes de procedimentos adesivos.

Além disso, na presente pesquisa utilizou o ensaio mecânico de microtração, que segundo Sano *et al.* (1994)³⁷ é o teste mais indicado para verificar a resistência de união, diferente do que é relatado nas pesquisas sobre o assunto, na qual utilizam o ensaio mecânico de cisalhamento, que não é teste mecânico mais apropriado para análise da resistência de união .

Pelo exposto acima, acredita-se que esta pesquisa assume um caráter relevante. Desta forma, os resultados deste estudo poderão permitir que, após a utilização desta nova técnica no tratamento de lesão de cárie, ou seja, o gás ozônio, um procedimento restaurador seja realizado com sucesso e com perspectiva de longevidade e durabilidade adesiva.

Assim sendo, pelo constante desenvolvimento de novos materiais e aprimoramento das técnicas para avaliação de suas propriedades, estudos são necessários para consolidar novos conceitos e avaliar o provável desempenho clínico destes materiais, assim como estudar possíveis alternativas para melhorá-lo.

3- OBJETIVOS

3-OBJETIVOS

3.1- Objetivo Geral

Avaliar o efeito do gás ozônio na resistência de união entre o substrato dentário e resina composta.

3.2- Objetivos Específicos

- Avaliar a resistência de união da resina composta à dentina humana após a aplicação do gás ozônio.
- Verificar o efeito do gás ozônio na resistência de união entre dentina e resina composta com a realização do condicionamento ácido antes e após a aplicação do ozônio;
- Analisar o efeito da aplicação de um agente antioxidante (ascorbato de sódio 10%) sobre a resistência de união da resina composta a dentina humana tratada com gás ozônio.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Tipo de estudo: Estudo laboratorial *in vitro*.

4.2- Local de execução: Universidade Federal de Goiás e Universidade Federal de Uberlândia.

4.3- Delineamento do estudo

Unidade experimental: 40 terceiros molares humanos, distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, dez (10) dentes em cada grupo⁴⁷.

Fatores estudados: Resistência de união entre dentina e resina composta em quatro condições experimentais.

Variáveis de resposta:

- Resistência de união ao teste de microtração (MPa).
- Tipo de fratura observado em lupa estereoscópica.

4.4- Aspectos éticos e legais

Por envolver dentes humanos, este estudo *in vitro*, foi aprovado junto ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás, sob número do protocolo 033/08 em 05/05/2008. Os dentes foram doados para pesquisa após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos pacientes e pelo responsável pela pesquisa.

4.5- Obtenção e seleção da amostra

Esta pesquisa foi executada segundo a descrição metodológica dos seguintes autores Carvalho et al. (1994)³⁶; Sano et al. (1994)³⁷; Pashley et al. (1995)³⁴; ISO TR 11405 (1994)⁴⁶; Eckert e Platt (2007)⁴⁷; Reis et al. (2008)⁴⁸.

Os dentes foram extraídos, por indicação prévia de exodontia, durante a disciplina de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás. Foram selecionados 40 terceiros molares humanos hígidos, livres de cárie e com ausência de defeitos ou trincas.

4.6- Instrumentos e procedimentos

4.6.1- Preparo das amostras

Os dentes recém-extraídos foram raspados com uma cureta periodontal 13/14 Hu-Friedy para a remoção de restos de ligamento periodontal e, em seguida, limpos com pasta de pedra-pomes e água, aplicada com o auxílio de escova tipo Robson em baixa rotação. Sequencialmente, por um período não superior a três meses, os dentes foram armazenados, em água deionizada a 4°C, contendo Timol a 0,2% (Terapêutica Pharmacia de Manipulação, Goiânia, GO, Brasil) a fim de prevenir a desidratação e o crescimento bacteriano.

As superfícies oclusais foram cortadas no sentido perpendicular ao longo eixo do dente, aproximadamente a 2,0 mm acima da junção amelo-cementária, utilizando uma máquina metalográfica de cortes seriados, ISOMET 1000 (Buehler Ltda, Lake Bluff, IL, EUA) e disco de corte diamantado n. 11-4244 (Diamond Wafering Blade, Buehler Ltda, Lake Bluff, IL, EUA), série 15HC, 4" X 0,012" (Diâmetro 104 mm x 0,3 mm Espessura), sob constante irrigação com água destilada e em baixa velocidade (150rpm).

Para a regularização das superfícies, foram utilizadas lixas de carbureto de silício de granulação 320 (Norton, São Paulo, SP, Brasil) sob adequada refrigeração à água, em uma Politriz manual Aropol S (Arotec, Cotia, SP, Brasil), até a completa eliminação das ilhas de esmalte e exposição total da superfície da dentina. Para padronização da *smear layer*, os

dentes foram submetidos a um desgaste com lixa de granulação 600 (Norton, São Paulo, SP, Brasil), com auxílio da Politriz, sob refrigeração abundante, durante um minuto. Após a limpeza das superfícies dentinárias com água corrente por 10s, os dentes foram armazenados em água deionizada. Posteriormente, os dentes foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de estudo (n= 10, dez dentes em cada grupo), sendo um grupo controle e três grupos experimentais, como descritos no fluxograma apresentado na Figura 1.

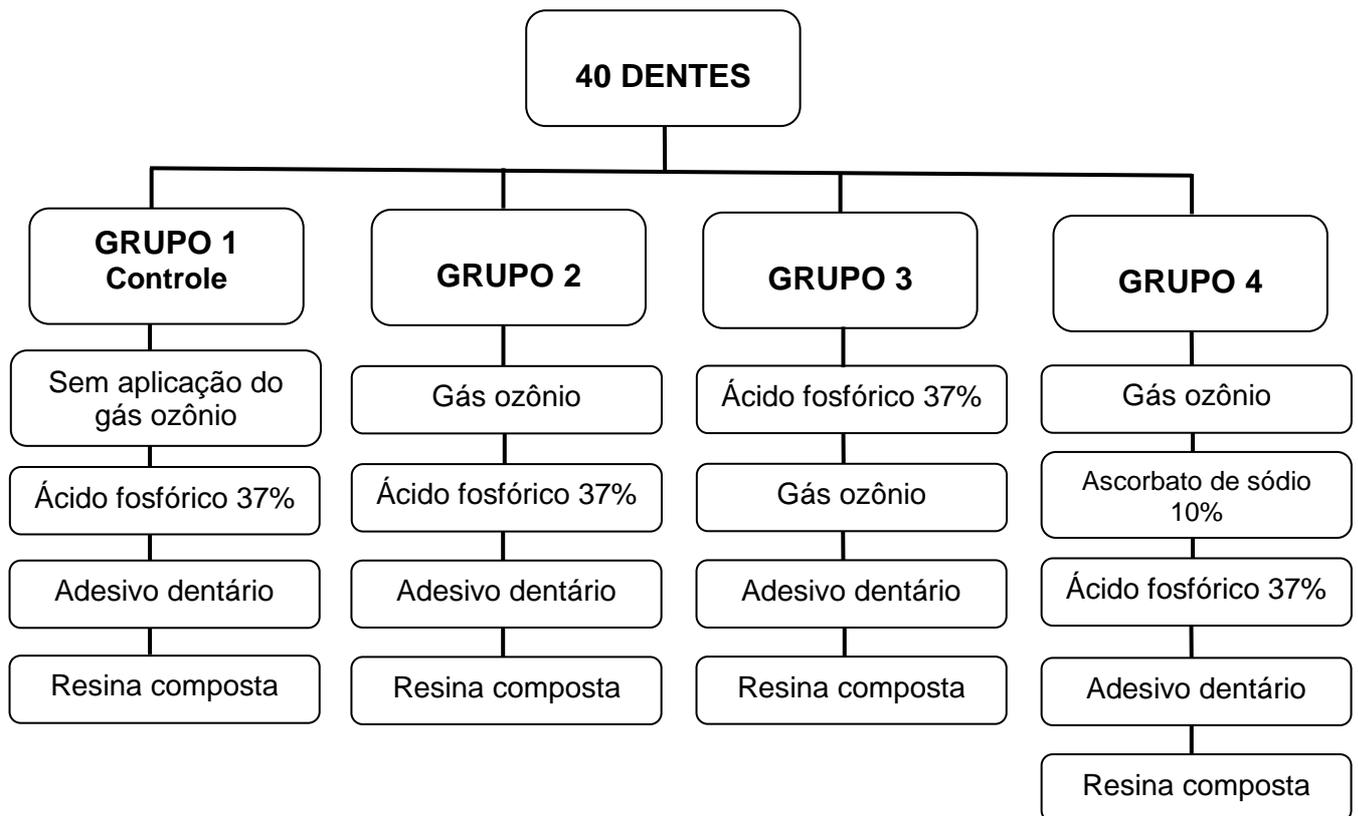


Figura 1. Apresentação dos grupos de estudo e procedimentos realizados em seu respectivo grupo.

Os materiais utilizados em cada grupo de estudo, bem como o fabricante, a composição e o número do lote, estão apresentados no Quadro 1.

Nome comercial	Fabricante	Composição	Lote *
Condicionador dental gel a 37% †	Dentsply Indústria e Comércio Ltda, Petrópolis, RJ, Brasil.	Ácido fosfórico, sílica coloidal e corante	724970 04-10
Single Bond 2 [†]	3M Dental Products, ST. Paul, MN, USA.	BisGMA, HEMA, dimetacrilatos, etanol, água, inovador sistema fotoiniciador e um copolímero funcional de metacrilato de ácidos poliacrílico e polialcenóico.	8RB 2011-04
Resina Composta [†] TPH ³	Dentsply Caulk, Milford, USA.	BisGMA, BisEMA, trietileno glicol dimetacrilato, canforquinona, estabilizador e pigmento. Cor A3.	492008 01/2009
Ascorbato de sódio 10%	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.	Sódio D-Isoascorbato monohidratado 10% em água destilada.	03619DD

Quadro 1. Apresentação dos materiais. Nome comercial, fabricante, composição e número do lote de fabricação dos materiais utilizados na pesquisa.

Fonte: Fabricantes

* Utilizou-se o mesmo lote de fabricação em cada material para realização dos procedimentos;

† Os materiais foram utilizados conforme instruções dos seus respectivos fabricantes.

Todos os procedimentos realizados nos grupos listados na Figura 1 foram executados de maneira padrão conforme o exposto abaixo:

- Gás ozônio

Foi aplicado numa concentração de 5,0 g/L por 40s^{1,2,10,21}, utilizando um gerador de gás ozônio (Gerador PXZ3507; Eaglesat Tecnologia em Sistemas, São José dos Campos, SP, Brasil) acoplado a uma autoclave. O dente, após secagem com papel absorvente, foi colocado no interior da autoclave com a superfície dentinária exposta, após o corte da superfície oclusal, posicionada abaixo do orifício de saída do gás ozônio.

- Ácido fosfórico 37%

A aplicação do ácido fosfórico 37% foi realizada por 15 s, seguida de lavagem com água deionizada por 15 s e remoção do excesso de água com papel absorvente, tomando o cuidado para não exercer pressão sobre a superfície dentinária.

- Ascorbato de sódio a 10%

Aplicou-se 10 mL de solução de ascorbato de sódio a 10% por 10 min com a utilização de uma seringa descartável, irrigando-se sobre a amostra 1 mL de solução a cada minuto (1mL/min.), seguida de lavagem com 10 mL de água deionizada e remoção do excesso de água com papel absorvente^{39,41,43,44}.

- Adesivo dentário

Realizou-se a aplicação de duas camadas consecutivas do sistema adesivo Single Bond 2 na superfície condicionada, com auxílio de um *microbrush*. Aplicou-se o *microbrush* saturado de adesivo agitando-o gentilmente na superfície por 15 s e fotopolimerizou-o por 10 s, com o fotopolimerizador posicionado perpendicularmente ao substrato dentário e a uma distância de aproximadamente 5mm da dentina exposta. Para a fotopolimerização utilizou-se o aparelho Foto-ativador *Smart Lite* (Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, Germany), com intensidade luminosa média de 950mW/cm² (medida com auxílio de um radiômetro) seguindo as recomendações do fabricante.

- Resina composta

Para obtenção da “coroa” de resina composta, inicialmente confeccionou-se uma matriz utilizando uma tira de poliéster aderida a uma fita crepe. Com a utilização de uma sonda milimetrada, a matriz foi posicionada nos dentes na altura de 5 mm, altura esta desejada

dos blocos de resina composta. A resina composta foi inserida em pequenos incrementos horizontais, de aproximadamente 1 mm, utilizando uma espátula suprafill ½ (SSWhite Duflex Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Cada incremento foi fotopolimerizado por 10 s, com o mesmo fotopolimerizador e forma de fotopolimerização (distância e direção) citados anteriormente, até se obter a parte de resina composta aderida ao tecido dentinário, com aproximadamente 5 mm de altura. Após a fotopolimerização final da resina composta por 40 s, os dentes foram armazenados em estufa bacteriológica, em frascos contendo água deionizada, a 37°C por 24 horas.

4.6.2- Obtenção dos “palitos” para o teste de microtração

Os espécimes formados por dente e resina composta, foram fixados horizontalmente em suportes de acrílico, com dimensões de 4,0 cm x 2,5 cm x 0,3 cm, com godiva de baixa fusão Exata (DFL Indústria e Comércio Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Os conjuntos foram acoplados ao dispositivo da cortadeira metalográfica ISOMET 1000 (Figura 2.A). Com a utilização de um disco de corte diamantado n. 11-4244, em baixa velocidade, com constante irrigação, realizou-se o corte das raízes no sentido perpendicular ao longo eixo do dente (Figura 2.B), aproximadamente 3,0 mm abaixo da junção amelo-cementária. Posteriormente, os espécimes, cujas raízes foram cortadas, foram fixados verticalmente nos suportes de acrílico com godiva de baixa fusão e realizou-se os cortes para a obtenção dos palitos.

Cada conjunto formado, pelos espécimes e os suportes de acrílico, foi fixado novamente à cortadeira para secção dos palitos, paralela ao longo eixo do dente, sob constante irrigação, a uma velocidade programada de 200 rpm e com carga de 150g.

Os cortes foram realizados paralelamente ao longo eixo do dente, inicialmente no sentido vestibulo-lingual (Figuras 2.C e 2.D) e posteriormente no sentido mesio-distal

(Figuras 2.E e 2.F), iniciando-se junto a uma das superfícies proximais até atingir a superfície proximal oposta, acutelando-se para não separar totalmente as “fatias”. A espessura do disco diamantado é de aproximadamente 0,3 mm, o que foi considerado quando do posicionamento do mesmo. Assim sendo, cada corte foi realizado respeitando-se uma distância de 1,3 mm entre eles, com o objetivo de se obter fatias com aproximadamente 1,0 mm de espessura. A Figura 2.F ilustra o aspecto quadriculado da superfície após os cortes.

Para a obtenção dos “palitos” de forma individualizada, as bases dos espécimes, abaixo da junção amelo-cementária, foram seccionadas perpendicularmente ao longo do eixo do dente, com auxílio de um disco de diamante dupla face n. 7020 (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil), montado em mandril e em baixa rotação. Deste modo, obteve-se espécimes em forma de “palitos” (Figura 2.G), com secção transversal de aproximadamente $1,0\text{mm}^2$. Os “palitos” formados pela união de resina composta ao esmalte dentário foram excluídos, bem como os que apresentaram falhas de adesão.

Em média, foram obtidos 10 palitos por dente, dependendo do tamanho e da forma do dente. Os “palitos” foram armazenados em *ependorfs* rotulados e contendo água deionizada, mantidos em estufa a 37°C , durante 24 horas até a realização do ensaio mecânico. Previamente à realização do ensaio mecânico, a área de secção transversal de cada “palito” foi aferida com auxílio de um paquímetro digital universal (Digimatic Caliper, Mitutoyo, Tokyo, Japan) apresentando aproximadamente $1,0\text{mm}^2$ (Fig. 2.H).

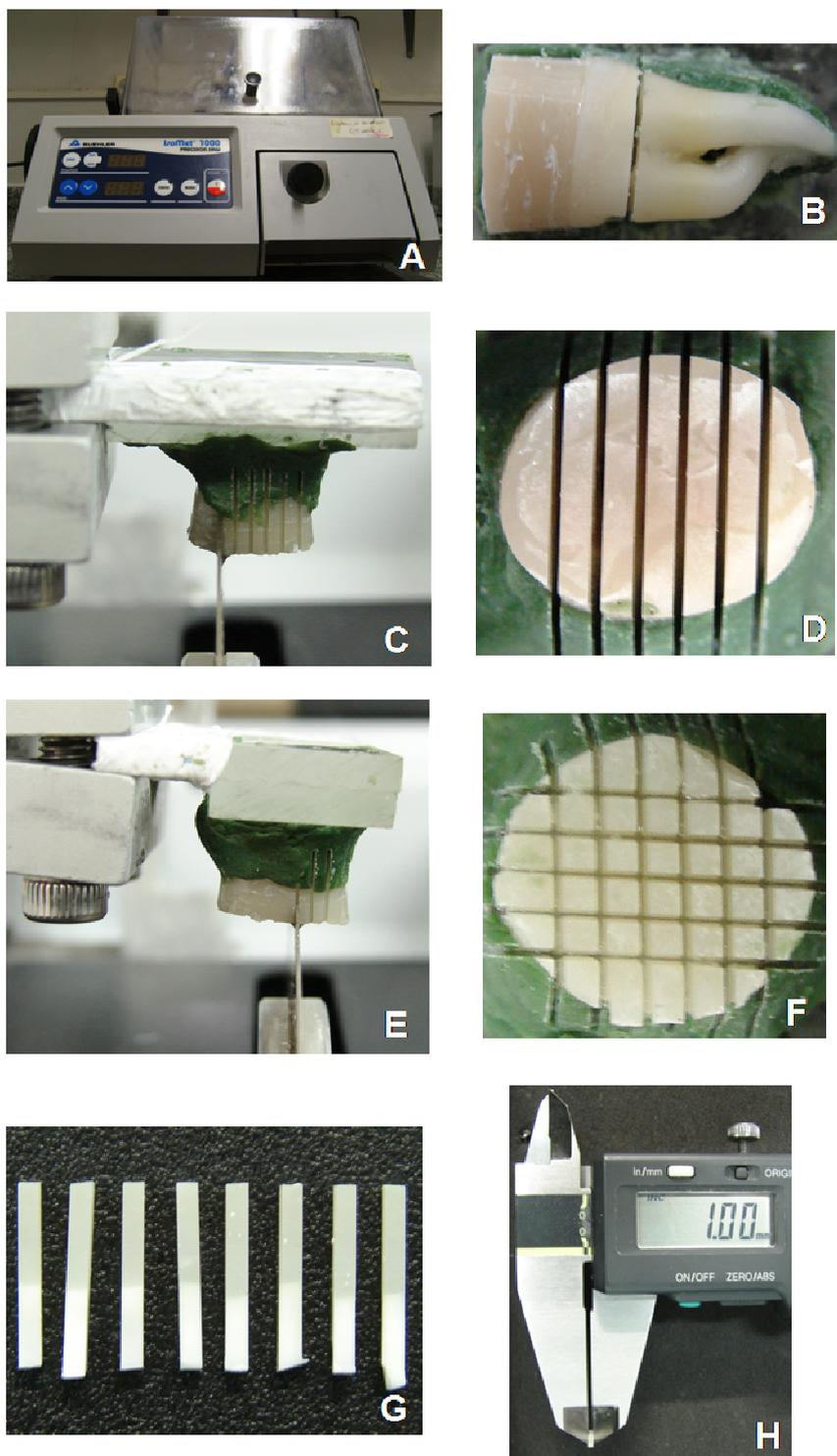


Figura 2. Preparo dos espécimes em forma de palitos. **A)** máquina de corte; **B)** corte perpendicular das raízes; **C)** cortes realizados de forma paralela em fatias no sentido V-L; **D)** visão oclusal após corte no sentido V-L; **E)** cortes realizados de forma paralela em fatias no sentido M-D; **F)** visão oclusal da superfície quadriculada após corte no sentido M-D; **G)** palitos do corpo do dente individualizados; **H)** medição da espessura do palito.

4.6.3- Ensaio mecânico de microtração

O ensaio mecânico de microtração foi realizado com a utilização de um dispositivo acoplado à máquina de ensaio Universal EMIC DL 2000 (São José dos Pinhais, PR, Brasil), como apresentado na Figura 3.A. O dispositivo de microtração é composto por duas partes: uma base metálica, localizada na parte inferior, que se apresenta fixada por parafusos à máquina de ensaio, e uma parte superior fixada, na sua extremidade superior, à célula de carga de 5N para a realização do ensaio de microtração (Figura 3.B).

Para a realização do ensaio, os “palitos” foram individualmente apreendidos com uma pinça e fixados pelas suas extremidades ao dispositivo de microtração (Figura 3.C) com um adesivo instantâneo a base de cianocrilato, Super Bonder Gel (Henkel Loctite Adesivos Ltda, Itapevi, SP, Brasil), associado a um acelerador da reação do adesivo (Flashtac Cyanoacrylate Accelerator, NHP), de forma a posicionar a área de adesão do “palito”, perpendicularmente, ao longo eixo da força de tração.

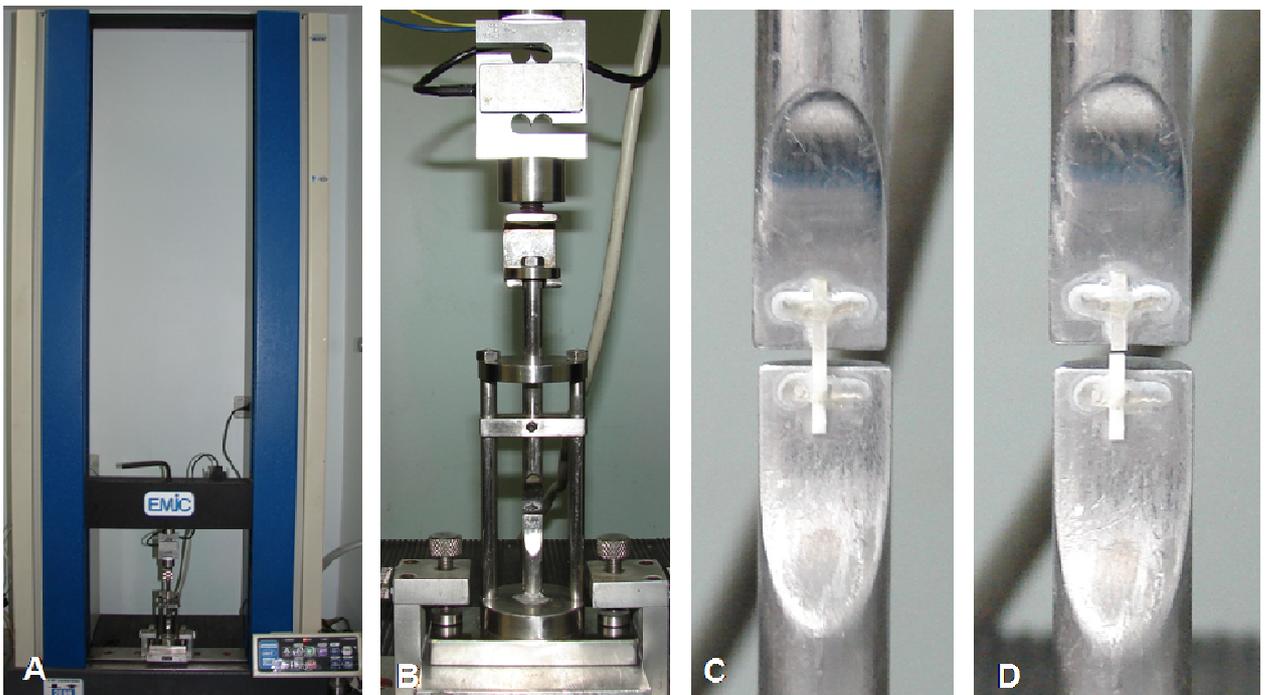


Figura 3. Ensaio mecânico de microtração. **A)** Máquina de ensaios mecânicos EMIC DL 2000; **B)** Dispositivo para fixação do palito na máquina de ensaios; **C)** Palito fixado ao dispositivo com adesivo a base de cianocrilato; **D)** Ruptura do palito após aplicação da força de microtração.

Após a fixação do “palito” no dispositivo da máquina universal, o ensaio foi realizado a uma velocidade de 0,5 mm/min. até a fratura do palito (Figura 3.D). Todo o ensaio foi monitorado por um programa de computador, interligado à célula de carga na máquina de ensaio. No momento da fratura, o movimento era interrompido imediatamente e os valores da força de tração expressos em Newton (N) eram visualizados no monitor do computador e registrados para posterior cálculo da resistência de união em MPa.

Os palitos que foram perdidos durante o corte, em cortadeira metalográfica, na colagem ou durante o manuseio no ensaio foram considerados como excluídos.

Tendo sido realizado o ensaio de microtração, as extremidades dos “palitos” fraturados foram cuidadosamente removidas do dispositivo e a dimensão dos lados do palito (B=base e L= altura), que formam área de secção da interface, foi medida e registrada com o auxílio de um paquímetro universal digital (Digimatic Caliper, Mitutoyo), como precisão de 0,01mm, para a obtenção dos valores reais da área de cada “palito”. A área de secção transversal foi calculada pela seguinte fórmula matemática, com o valor expresso em mm² :

$$A = B \times L \quad \text{Onde, } A = \text{Área de secção transversal, } B = \text{base e } L = \text{altura.}$$

Os valores da resistência de união foram obtidos pelo cálculo da tensão de tração, que é a razão da força de tração expressa no momento da fratura do palito pela área de secção transversal da extremidade do palito fraturado, ou seja, pela seguinte fórmula e expressos em MPa:

$$\text{Tensão de tração} = \frac{F(N)}{A} \quad \text{Onde, } F = \text{Força e } A = \text{Área de secção transversal}$$

Após o teste, as partes de cada palito foram armazenadas em *ependorfs* contendo água deionizada, apresentando identificação correspondente ao respectivo grupo de estudo para posterior análise do tipo de fratura.

4.6.4- Análise do tipo de fratura

Após o teste de microtração, cada parte do “palito” foi analisada em estereomicroscópio (Olympus SZPT 40, Tokyo, Japan) com aumento de 40X, para visualização do tipo de fratura. A classificação estipulada para o tipo de fratura foi a seguinte:

- Adesiva: ruptura da interface resina/dentina;
- Coesiva em resina composta: ruptura da resina composta;
- Coesiva em dentina: ruptura da estrutura dentinária;
- Mista: ruptura adesiva e coesiva em resina composta e/ou dentina.

4.7- Tratamento e interpretação dos dados

Os valores de resistência adesiva foram expressos em MPa. Os dados obtidos foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) em fator único, seguida pelo teste de comparação de média de Tukey em todos os grupos com o nível de significância de 5% ($p=0,05$), para a comparação múltipla entre as médias, identificando quais as médias que, tomadas duas a duas, diferem significativamente entre si.

5- PUBLICAÇÃO

5- PUBLICAÇÃO

Título da publicação:

**“EFFECT OF OZONE APPLICATION ON THE RESIN-DENTIN
MICROTENSILE BOND STRENGTH”**

Formatação da publicação baseado nas normas da revista Dental Materials.

**EFFECT OF OZONE APPLICATION ON THE RESIN-DENTIN MICROTENSILE
BOND STRENGTH**

Paula Cicília Faquim Rodrigues^a, João Batista de Souza^{a,*}, Carlos José Soares^b,
Lawrence Gonzaga Lopes^a, Carlos Estrela^c

^a Department of Prevention and Oral Rehabilitation, School of Dentistry, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil.

^b Department of Operative Dentistry and Dental Materials, School of Dentistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil.

^c Department of Stomatologic Science, School of Dentistry, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil

*** Address correspondence to:** Prof. Dr. Carlos Estrela, Department of Stomatologic Science, School of Dentistry, Federal University of Goiás, Brazil. Praça Universitária esquina com 1^a Avenida, s/n, Setor Universitário. 74605-220, Goiânia, GO, Brazil. Phone: +55 62 32096050; fax: 55 62 35211882. E-mail address: estrela3@terra.com.br.

Effect of Ozone Application on the Resin-Dentin Microtensile Bond Strength

ABSTRACT

Objective. The aim of this study was to evaluate the effect of ozone and sodium ascorbate on the resin-dentin microtensile bond strength (μ TBS).

Methods. The occlusal enamel of human third molars was removed to expose a flat superficial dentin surface. The teeth were randomly divided into four groups (n = 10): Con, dentin not treated with ozone (control group); OzoAc, ozone application for 40 s followed by acid etching; AcOzo, acid etching followed by ozone application for 40 s; and OzoSa, ozone and subsequent application of 10% sodium ascorbate for 10 min. Composite build-ups were constructed incrementally. Specimens were sectioned to obtain sticks with cross-sectional areas of 1 mm² for tension tests (0.5 mm/min). The μ TBS values were analyzed using one-way ANOVA and the Tukey test ($\alpha=0.05$). All sticks that fractured were analyzed under stereomicroscopy (40X).

Results. The Con group had significantly higher μ TBS values than the OzoAc and AcOzo groups ($p=0.001$). The μ TBS values of the Con and OzoSa groups were similar ($p= 0.158$) and higher than those of the OzoAc group. No difference was found between the μ TBS values of the AcOzo and OzoSa groups ($p=0.115$). The use of ozone before etching (OzoAc group) resulted in lower values of microtensile bond strength in all conditions evaluated ($p = 0.001$). The predominant failure mode was adhesive.

Significance. The application of ozone decreased the μ TBS of the dentin-composite resin interface, but values were reversed when sodium ascorbate was used.

Keywords: Ozone, Antioxidants, Composite Resins, Tensile Strength.

Introduction

Ozone (O_3) consists of triatomic molecules of oxygen [1-5]. This element is obtained by the dissociation of oxygen molecules (O_2) into activated oxygen atoms that then react with other O_2 molecules because of an electrical discharge or photochemical reaction; ozone may also be artificially produced by electric generators [1,2,4-6]. It is a powerful oxidant, which makes it a powerful antimicrobial agent [1,3,4,7,8].

Because of its bactericidal, fungicidal and virucidal properties, ozone is widely used in medicine and in several areas of dentistry, such as stomatology, endodontics, periodontics, surgery and treatment of carious lesions [1,3,5,9]. Its use in the treatment of carious lesions is based on its antimicrobial activity and its capacity to oxidize proteins in the lesions, which promotes the diffusion of calcium and phosphate ions and leads to the remineralization of dental tissues [7,9,10,11]. Holmes [2] conducted a randomized clinical study and found that all leathery noncavitated primary root caries were arrested after treatment with ozone applications for 40 s. In a similar study, Baysan and Lynch [7] found that most caries were arrested or reversed after the application of ozone for 10 and 20 s. The use of ozone may also result in reversal of occlusal open carious lesions before soft dentin is curretted [12].

However, because of its high instability, ozone rapidly turns into oxygen [1,3,13], which may inhibit the polymerization of the adhesive and thus reduce bond strength [14-17] because the reactivity of oxygen is much greater than that of the monomer. Therefore, if there is oxygen available during the polymerization, it will react with the free radicals of the growing chains and affect polymerization [14,15,18].

An antioxidant agent should be applied to the surface exposed to oxygen free radicals to neutralize the effect of products that release oxygen and to restore the values of tensile bond strength of composite resin to dental substrate [19-25]. Antioxidant agents, such as sodium

ascorbate, act as stabilizers of free radicals, and restoration may be performed immediately after the contact of the dental substrate with oxygen [21].

Therefore, adhesive procedures after the use of ozone raise concerns, but few studies were carried out to evaluate important variables. This study evaluated the effect of ozone alone or with an antioxidant on the microtensile bond strength between dentin and resin composite. The hypothesis tested was that the application of ozone may affect the resin-dentin microtensile bond strength, and that this effect may be reversed by the addition of sodium ascorbate.

Materials and Methods

Forty extracted, caries-free human third molars were used. The teeth were collected after obtaining patient informed consent according to the 033/08 study approval issued by the Review Board of the Federal University of Goiás, Brazil. Residual soft tissue was removed from the tooth surface with a hand scaler. The teeth were stored in a 0.2% aqueous thymol solution for no longer than three months.

Occlusal enamel was removed by transversally cutting the specimens at about 2.0 mm above the cemento-enamel junction with a diamond saw perpendicular to the tooth's long axis using a diamond blade in an Isomet 1000 unit (Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, USA) under constant irrigation with distilled water and at low speed (150 rpm). A flat dentin surface was exposed after wet grinding the occlusal enamel with 320-grit SiC paper to complete enamel removal. The enamel-free exposed dentin surfaces were further polished using wet 600-grit silicon-carbide paper for 60 s to create a standardized smear layer. The teeth were stored in deionized water and then randomly divided into four experimental groups with ten teeth for each tested condition, as shown in Figure 1. The materials used in each study group and the manufacturers, the composition and batch number are described in Table 1.

Ozone, applied to the flat dentin surface at a concentration of 5.0 g/l for 40 s [1,2,9] was produced by electric discharge through oxygen current (Generator PXZ3507; Eaglesat Tecnologia em Sistemas Ltda., São José dos Campos, SP, Brazil). The specimens were irrigated with 10 ml of 10% sodium ascorbate for 10 min at a flow rate of 1 ml min⁻¹, and then washed with 10 ml of deionized water; excess water was removed with absorbent paper [19,21,23,24].

Dentin was etched for 15 s with phosphoric acid, rinsed with deionized water for 15 s and blot dried with absorbent paper. The adhesive was applied with a microbrush to wet the

surface, and then brushed for 15 s. The same procedure was repeated for the second layer. The adhesive was then light-cured for 10 s using a Lite Smart photo-activator (DeTrey Dentsply GmbH, Konstanz, Germany) at a light intensity of $950\text{mW}/\text{cm}^2$. The resin-composite build-up block was constructed to the height of 5 mm on the bonded surfaces at 1-mm increments that were light activated for 10 s each using the same light unit and light intensity. All the bonding procedures were carried out by a single operator.

After storage in deionized water at 37°C for 24 h, the specimens were longitudinally sectioned in both “x” and “y” directions across the bonded interface with a diamond blade in an Isomet 1000 saw (Isomet 1000, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL 60044, USA) at 200 rpm to obtain sticks with cross-sectional areas of approximately 1mm^2 . Specimens originated from the areas immediately above the pulp chamber and the remaining dentin thickness were measured with a digital caliper (Absolute Digimatic, Mitutoyo, Tokyo, Japan).

All sticks were mounted on a testing apparatus with cyanoacrylate adhesive (Super Bonder Gel, Henkel Loctite Adesivos Ltda, Itapevi, SP, Brazil) applied over all faces [26] and stressed to failure at $0.5\text{mm}/\text{min}$ in a universal testing machine (Universal EMIC DL 2000, São José dos Pinhais, PR, Brazil). The fractured sticks were carefully removed from the apparatus and the cross-sectional area at the site of failure was measured to the nearest 0.01mm with a digital caliper, and measurements were recorded for the calculation of the bond strength. The μTBS value of each stick was calculated as the force (N) at failure divided by the bonded area (mm^2) and expressed in MPa.

The bond failure modes were evaluated using stereomicroscopy (Olympus SZPT 40, Tokyo, Japan) at 40X magnification and classified as adhesive (failure at resin/dentin interface); cohesive in resin composite (failure of resin composite); cohesive in dentin (dentin failure in dentin), and mixed (mixed with cohesive failure of the neighboring substrates).

The experimental unit was the tooth, and an average number of 10 sticks were obtained for each tooth. The mean values, therefore, represented the value of each experimental unit.

As only one factor was under study, a one-way analysis of variance (ANOVA) was used. The Tukey test for multiple comparisons between means was used to complement ANOVA and to identify the values that differed significantly between each other. The level of confidence was established at $\alpha= 0.05$.

Results

Only results for sticks that did not debond before microtensile testing are presented. The results of one-way ANOVA revealed statistically significant differences between the groups ($p = 0.001$; Table 2). Means and standard deviations of microtensile bond strength values are shown in Table 3.

The bond strengths between the resin composite and dentin in the Con group (29.7 ± 3.7) were significantly higher than in the OzoAc and AcOzo groups (15.0 ± 4.6 and 20.7 ± 4.5 ; $p=0.001$). The Con and OzoSa groups showed similar values and there were no significant differences between these two groups ($p=0.158$). Mean value was higher in the OzoSa group than in the OzoAc and AcOzo groups, but it was significantly higher when compared with the OzoAc group ($p=0.001$).

The use of ozone before etching (OzoAc group) resulted in a bond strength value that was significantly lower than that found for the AcOzo group, in which ozone was applied after etching ($p=0.035$).

Table 4 summarizes the percentage of failure modes of the specimens fractured in the test groups. The predominant failure mode was adhesive. High rates of cohesive failures were noticed in the Con group, normally associated with higher bond strengths. Cohesive failures were not detected in the OzoSa group.

Discussion

Because of its antimicrobial action, ozone may promote the inhibition or destruction of many oral microorganisms, such as Gram-positive and Gram-negative germs and *Candida albicans* [1-9,13,27]. However, evidence from studies that evaluated its antimicrobial effect on oral microorganisms is controversial. Estrela et al. [28] found that the application of ozone for 20 min was not sufficient to inactivate *Enterococcus faecalis* in infected root canals. Baysan and Beighton [29] reported that the application of ozone for 40 s did not reduce the number of viable microorganisms in infected dentin associated with noncavitated occlusal carious lesions.

Ozone seems to be a promising therapy in the treatment of root and occlusal caries and noncavitated occlusal carious lesions because it is easy to apply and yields satisfactory clinical results [1,2,4,7,9,10,11,12,30]. However, ozone is an unstable molecule and rapidly decomposes in oxygen [1,3,13]. Oxygen can inhibit the polymerization of adhesive systems and consequently reduce the bond strength between the adhesive restorative material and hard tissues [14-17]. A typical example is the bond strength reduction observed after dental bleaching with hydrogen peroxide or carbamide peroxide because of the presence of residual oxygen [31,32]. The fact that this study showed a statistically significant reduction of the μ TBS values after ozone application when compared with the Con group (without ozone application) may be assigned to the presence of residual oxygen after the use of ozone. Contrary to what was observed by Schmidlin, Bindl and Zimmermann [33], which evaluated the effect of shear bond strength on the application of ozone to dentin and enamel of bovine teeth, there was no reduction in adhesion between the dental substrate and the resin composite. Similar findings were reported by Al Shamsi et al. [34], who found no significant reduction of shear bond strength of orthodontic brackets to enamel when ozone was applied for 10 s before the adhesive procedure.

The disagreement between our study results and those quoted above may be associated with the fact that other studies used the mechanical shear test to evaluate bond strength, and we used a tensile test. This test examines areas of greater union and is associated with a non-uniform distribution of stresses on the adhesive interface [35-38]. To reduce this effect, the microtensile test is one of the most used tests to measure the bond strength of several materials and situations [37,39,40]. This test, which uses reduced union areas of 0.5 to 1 mm², shows a better distribution of stress and fewer defects at the interface [40,41]. Moreover, differences in results may be associated with the type of dental substrate under analysis; our study evaluated the bond strength of dentin, whereas Al Shamsi et al. [34] used only enamel. Dentin contains a large volume of water and organic matter, is a wet tissue formed by dentinal tubules, and the presence of smear layer makes bonding to the substrate more difficult when compared with enamel, which is composed mainly of hydroxyapatite that adheres to adhesive systems and promotes a stronger bond than the one obtained with dentin [42,43]. In addition, Schmidlin, Bindl and Zimmermann [33] used bovine teeth to test bond strength, whereas human teeth were used in our study.

The order of ozone application and acid etching was changed in two of our study groups (OzoAc and AcOzo groups) to evaluate a possible change in microtensile bond strength. The group in which phosphoric acid was applied before ozone (AcOzo group) showed a statistically significant increase in the value of bond strength when compared with the group in which conditioning was performed after ozone application (OzoAc group). Some chemical interaction might have occurred between ozone and phosphoric acid when the acid was used after ozone. Ozone molecules found in the dentin substrate after application may affect the action of phosphoric acid used to condition dentin, and may interfere with adhesion to the substrate. Etching exposes the collagen fibrils that are interpenetrated by monomers (primers) and form a hybrid layer, which is one of the most likely elements to join dentin [44-46]. Thus, any

interference in the formation of the hybrid layer may affect the bond strength of adhesive materials to dental substrates. Further studies should be conducted to confirm and explain the reaction of ozone with phosphoric acid.

To neutralize the oxidative effect of ozone, 10% sodium ascorbate was applied for 10 min after the use of ozone [21,22,25]. The analysis of results showed that sodium ascorbate reversed the bond strength values of adhesive composites to human dentin. The performance in this group was statistically similar to that of the Con group, in which there was no ozone application, but strength values were higher than that found in the groups that received only ozone application (OzoAc and AcOzo groups). Although no studies have evaluated the use of ascorbate after ozone, these results were expected as part of the same principle and in agreement with studies that evaluated the effect of an antioxidant on the bond strength of an adhesive composite to enamel/dentin after dental bleaching [19,20,25,47].

Fracture mode of sticks submitted to bond testing should be considered when measuring bond strength [37,48]. Stereomicroscopy and descriptive analysis in this study revealed the prevalence of adhesive fractures in all groups, which validates this study because the values recorded estimate, in general, the actual bond strength on the adhesive interface. However, the control group, which obtained the highest value of μ TBS (MPa), had a higher number of cohesive fractures in dentin than the other groups.

Few studies investigated the application of ozone to hard tissues and bonding. Ozone applied for 40 s did not change the physical characteristics of enamel, and did not negatively affect microleakage and sealant penetration [6]. In addition, application of ozone to the dentin for 120 s did not compromise the mechanical properties of the Prime & Bond NT, Excite, Silorane and Syntac/Heliobond adhesive systems [49]. The effect of ozone on the push-out bond strength of fiber posts to root canal dentin was evaluated, and results showed that

treatment with ozone might affect the retention of adhesively luted fiber posts depending on the luting agent (Panavia F 2.0 , Variolink II, RelyX Unicem or Ketac Cem) [50].

The results of this study showed that ozone application and its use with sodium ascorbate affects μ TBS values, which confirms our study hypothesis. Compromised bond strengths were effectively reversed when ozone was treated with 10% sodium ascorbate.

Our literature review and this study results showed that the implications of ozone application to dental substrates before adhesive restorations are not well understood. Therefore, further studies should be conducted to evaluate these variables.

Conclusion

Under the tested conditions and within the limitations of this in vitro study, ozone decreased the microtensile bond strength between dentin and composite resin, but the use of an antioxidant after ozone application reversed the values of microtensile bond strength.

Acknowledgements

This investigation was supported, in part, by CNPq grant no. 134096/2007-0. The authors thank Dentsply for the donation of some of the materials used in this study. The authors also thank Professor Jesiel Freitas Carvalho from the School of Physics of Federal University of Goiás and Professor Fernanda Cristina Pimentel Garcia from University of Brasília for their contributions to this study.

References

- 1- Baysan A, Lynch E, Grootveld M. The use of ozone for the management of primary root carious lesions. *Tissue Preservation and Caries Treatment*. Quintessence Book 2001, Chapter 3, 49-67.
- 2- Holmes J. Clinical reversal of root caries using ozone, double blind, randomised, controlled 18-month trial. *Gerodontology* 2003; 20:106-114.
- 3- Stubinger S, Sander R, Filippi A. The use of ozone in dentistry and maxillofacial surgery: A review. *Quintessence Int* 2006; 37:353-359.
- 4- Azarpazhooh A, Limeback H. The application of ozone in dentistry: A systematic review of literature. *J Den* 2008; 36:104-116.
- 5- Nogales CG, Ferrari PA, Kantorovich EO, Lange-Marques JL. Ozone therapy in medicine and dentistry. *J Contemp Dent Pract* 2008; 9:75-84.
- 6- Celiberti P, Pazera P, Lussi A. The impact of ozone treatment on enamel physical properties. *Am J Dent* 2006; 19:67-72.
- 7- Baysan A, Lynch E. Effect of ozone on the oral microbiota and clinical severity of primary root caries. *Am J Dent* 2004; 17:56-60.
- 8- Nagayoshi M, Fukuizumi T, Kitamura C, Yano J, Terashita M, Nishihara T. Efficacy of ozone on survival and permeability of oral microorganisms. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19:240–246.
- 9- Baysan A, Whiley RA, Lynch E. Antimicrobial effect of a novel ozone-generating device on microorganisms associated with primary root carious lesion in vitro. *Caries Res* 2000; 34:498–501.
- 10- Baysan A, Lynch E. The use of ozone in dentistry and medicine. Part 2. Ozone and root caries. *Prim Dent Care* 2006; 13:37-41.

- 11- Baysan A, Lynch E. Clinical reversal of root caries using ozone: 6-month results. *Am J Dent* 2007; 20:203-208.
- 12- Dahnhardt JE, Jaeggi T, Lussi A. Treating open carious lesions in anxious children with ozone. A prospective controlled clinic study. *Am J Dent* 2006; 19:267-270.
- 13- Nagayoshi M, Kitamura C, Fukuizumi T, Nishihara T, Terashita M. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. *J Endod* 2004; 30:778-781.
- 14- Ruyter IE. Unpolymerized surface layers on sealants. *Acta Odont Scand* 1981; 39:27-32.
- 15- Rueggeberg FA, Margeson DH. The effect of oxygen inhibition on an unfilled/filled composite system. *J Dent Res* 1990; 69:1652-58
- 16- Spyrides GM, Perdigão J, Pagani C, Araújo MA, Spyrides SM. Effect of whitening agents on dentin bonding. *J Esthet Dent* 2000; 12:264–70.
- 17- Cavalli V, Gianinni M, Carvalho RM. Effect of carbamide peroxide bleaching agents on tensile strength of human enamel. *Dent Mat* 2004; 20:733-9.
- 18- Suh BI. Oxygen-inhibited layer in adhesion dentistry. *J Esthet Restor Dent* 2004; 16:316-323.
- 19- Lai SC, Tay FR, Cheung GS, Mak YF, Carvalho RM, Wei SH *et al.* Reversal of compromised bonding in bleached enamel. *J Dent Res* 2002; 81:477-481.
- 20- Yiu CKY, García-Godoy F, Tay FFR, Pashley DH, Imazato S, King NM, Lai SCN. A nanoleakage perspective on bonding to oxidized dentin. *J Dent Res* 2002; 81:628-632.
- 21- Kaya AD, Turkun M. Reversal of dentin bonding to bleached teeth. *Oper Dent* 2003; 28:825–29.
- 22- Turkun M, Kaya AD. Effect of 10% sodium ascorbate on the shear bond strength of composite resin to bleached bovine enamel. *J Oral Rehabil* 2004; 31:1184–91.

- 23- Vongphan N, Senawongse P, Somsiri W, Harnirattisai C. Effects of sodium ascorbate on microtensile bond strength of total-etching adhesive system to NaOCl treated dentine. *J Dent* 2005; 33:689-95.
- 24- Weston CH, Ito S, Wadgaonkar B, Pashley DH. Effects of time and concentration of sodium ascorbate on reversal of NaOCl-induced reduction in bond strengths. *J Endod* 2007; 33:879-81.
- 25- Gökçe B, Cömlekoğlu ME, Ozpinar B, Türkün M, Kaya AD. Effect of antioxidant treatment on bond strength of a luting resin to bleached enamel. *J Dent* 2008; 36:780-5.
- 26- Soares CJ, Soares PV, Santos-Filho PC, Armstrong SR. Microtensile specimen attachment and shape--finite element analysis. *J Dent Res* 2008; 87:89-93.
- 27- Hems RS, Gulabivala K, Ng Y-L, Ready D, Spratt DA. An in vitro evaluation of the ability of ozone to kill a strain of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2005; 38:22–29.
- 28- Estrela C, Estrela CRA, Decurcio DA, Hollanda ACB, Silva JA. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. *Int Endod J* 2007; 40:85– 93.
- 29- Baysan A, Beighton D. Assessment of the ozone-mediated killing of bacteria in infected dentine associated with non-cavitated occlusal carious lesions. *Caries Res* 2007; 41:337–341.
- 30- Huth KC, Paschos E, Brand K, Hickel R. Effect of ozone on non-cavitated fissure lesions in permanent molars. A controlled prospective clinical study. *Am J Dent* 2005; 18:223-228.
- 31- Attin T, Hannig C, Wiegand A, Attin R. Effect of bleaching on restorative materials and restorations-a systematic review. *Dent Mater* 2004; 20:852-61.
- 32- Cavalli V, Giannini M, Carvalho RM. Effect of carbamide peroxide bleaching agents on tensile strength of human enamel. *Dent Mater* 2004; 20:733-9.

- 33- Schmidlin PR, Zimmermann J, Bindl A. Effect of ozone on enamel and dentin bond strength. *J Adhes Dent* 2005; 7:29-32.
- 34- Al Shamsi AH, Cunningham JL, Lamey PJ, Lynch E. The effects of ozone gas application on shear bond strength of orthodontic brackets to enamel. *Am J Dent*. 2008; 21(1):35-8.
- 35- Retief DH. Standardizing laboratory adhesion tests. *Am J Dent* 1991; 4:231-6.
- 36- Watanabe I, Nakabayashi N. Measurement methods for adhesion to dentine: the current status in Japan. *J Dent* 1994; 22:67-72.
- 37- Pashley DH, Sano H, Ciuchi B, Yoshiyama M, Carvalho RM. Adhesion testing of dentin bonding agents: A review. *Dent Mater* 1995; 11:117-125.
- 38- Burke FJ, Hussain A, Nolan L, Fleming GJ. Methods used in dentine bonding tests: an analysis of 102 investigations on bond strength. *Eur J Prosthodont Restor Dent* 2008; 16:158-65.
- 39- Schreiner RF, Chappell RP, Glaros AG, Eick JD. Microtensile testing of dentin adhesives. *Dent Mater* 1998; 14:194–201.
- 40- Pashley DH, Carvalho RM, Sano H, Nakajima M, Yoshiyama M, Shono Y, Fernandes CA, Tay F. The microtensile bond test: a review. *J Adhes Dent* 1999; 1:299-309.
- 41- Sano, H, Shono T, Sonoda H, Takatsu T, Ciucchi B, Carvalho R, Pashley DH. Relationship between surface area for adhesion and tensile bond strength – evaluation of a micro-tensile bond test. *Dent Mater* 1994; 10:236-240.
- 42- Pashley EL, Tao L, Matthews WG, Pashley DH. Bond strengths to superficial, intermediate and deep dentin in vivo with four dentin bonding systems. *Dent Mater* 1993; 9:19-22.
- 43- Al-Salehi SK, Burke FJ. Methods used in dentin bonding tests: an analysis of 50 investigations on bond strength. *Quintessence Int* 1997; 28:717-23.

- 44- Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res* 1982; 16:265-273.
- 45- Nakabayashi N. The hybrid layer: A resin-dentin composite. *Proc Finn Dent Soc* 1992; 88:321-329.
- 46- Kato G, Nakabayashi N. Effect of phosphoric acid concentration on wet-bonding to etched dentin. *Dent Mater.* 1996 Jul;12(4):250-5.
- 47- Kimyai S, Valizadeh H. The effect of hydrogel and solution of sodium ascorbate on bond strength in bleached enamel. *Oper Dent* 2006; 31:496-9.
- 48- Armstrong SR, Boyer DB, Keller JC. Microtensile bond strength testing and failure analysis of two dentin adhesives. *Dent Mater* 1998; 14(1):44-50.
- 49- Magni E, Ferrari M, Hickel R, Huth KC, Ilie N. Effect of ozone gas application on the mechanical properties of dental adhesives bonded to dentin. *Dent Mater* 2008; 24:1428–1434.
- 50- Bitter K, Noetzel J, Volk C, Neumann K, Kielbassa AJ. Bond strength of fiber posts after the application of erbium:yttrium-aluminum-garnet laser treatment and gaseous ozone to the root canal. *J Endod* 2008; 34:306-309.

Figure

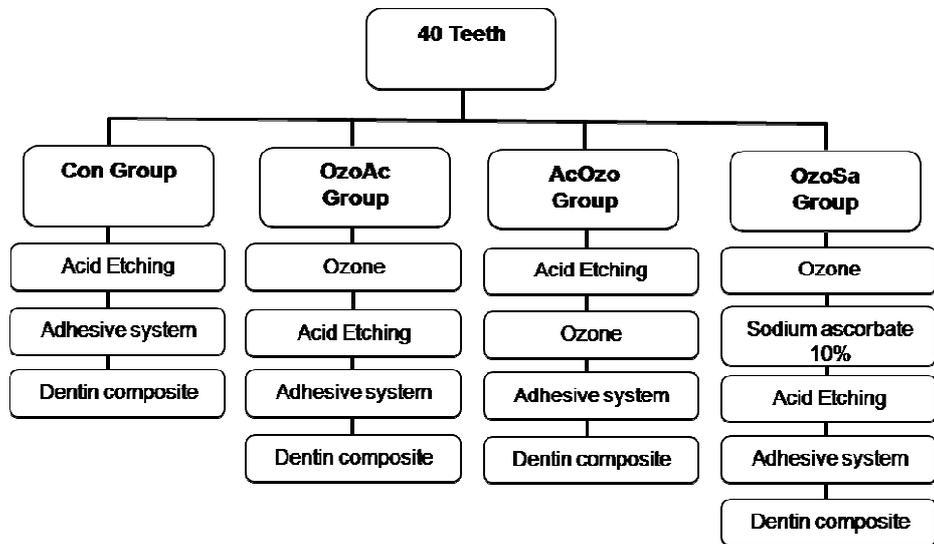


Figure 1 – Experimental design

Tables

Table 1. Chemical compositions and batch numbers of the materials used in the study

Material /Manufacturer/ Batch no.	Composition
Total-etch * (Dentsply Indústria e Comércio Ltda, Petrópolis, RJ, Brazil) Batch 724970	37% phosphoric acid gel.
Single Bond 2* (3M Dental Products, ST. Paul, MN, USA) Batch 8RB	Bis-GMA, HEMA, dimethacrylates, polyalquenoic and polyacrylic acid copolymer, photoinitiators, water and ethanol.
TPH ³ resin composite* (Dentsply Caulk, Milford, USA) Batch 492008	Bis-GMA, BisEMA, triethylene glycol dimethacrylate, camphorquinone, stabilizer and pigment. Color A3.
Sodium ascorbate (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) Batch 03619DD	Sodium D-Isoascorbate monohydrate, 10% in distilled water.

* The materials were used according to manufacturers' directions.

Table 2 – Summary of the one-way ANOVA results

	SS	df	MS	F	P
Between groups	1185.055	3	395.018	19.603	.000
Within groups	725.416	36	20.150		
Total	1910.471	39			

Table 3 - Means and standard deviations of microtensile bond strength values

Group	<i>N</i>	Microtensile bond strength: MPa ± SD (<i>n</i>)
Con	10	29.7 (3.7) ^a
OzoAc	10	15.0 (4.6) ^c
AcOzo	10	20.7 (4.5) ^b
OzoSa	10	25.3 (4.9) ^{ab}

Groups with different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$).

Table 4 – Percentage of failure modes of specimens fractured in the tested groups.

	Failure Mode (%)			
	Adhesive	Mixed	Cohesive in dentin	Cohesive in composite
Con	56.8	30.0	4.4	8.8
OzoAc	71.0	27.6	0.7	0.7
AcOzo	68.1	29.7	1.1	1.1
OzoSa	68.9	29.9	1.2	0
Total	66.9	28.9	1.7	2.5

*6-CONCLUSÕES
/CONSIDERAÇÕES
FINAIS*

6-CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo demonstraram que:

- O gás ozônio diminuiu a resistência de união, ao teste de microtração, entre dentina e resina composta;
- Aplicação do ozônio antes do condicionamento ácido promoveu maior redução da resistência de união, quando comparado com a aplicação do ozônio depois do condicionamento;
- A utilização de um agente antioxidante (ascorbato de sódio 10%), após a aplicação do ozônio, aumentou os valores da resistência de união.

Levando em consideração a revisão de literatura, as limitações deste estudo *in vitro* e os resultados da presente pesquisa, as implicações da aplicação de ozônio sobre o substrato dentário antes de restaurações adesivas ainda não estão bem esclarecidas. Desta forma, outras pesquisas devem ser desenvolvidas com o objetivo de avaliar estas variáveis.

*7-REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- 1- Baysan A, Lynch E, Grootveld M. The use of ozone for the management of primary root carious lesions. *Tissue Preservation and Caries Treatment*. Quintessence Book 2001, Chapter 3, 49-67.
- 2- Holmes J. Clinical reversal of root caries using ozone, doubleblind, randomised, controlled 18-month trial. *Gerodontology* 2003; 20:106-114.
- 3- Stubinger S, Sander R, Filippi A. The use of ozone in dentistry and maxillofacial surgery: A review. *Quintessence Int* 2006; 37:353-359.
- 4- Azarpazhooh A, Limeback H. The application of ozone in dentistry: A systematic review of literature. *J Dent* 2008; 36:104-116.
- 5- Nogales CG, Ferrari PA, Kantorovich EO, Lange-Marques JL. Ozone therapy in medicine and dentistry. *J Contemp Dent Pract* 2008; 9:75-84.
- 6- Celiberti P, Pazera P, Lussi A. The impact of ozone treatment on enamel physical properties. *Am J Dent* 2006; 19:67-72.
- 7- Baysan A, Lynch E. Effect of ozone on the oral microbiota and clinical severity of primary root caries. *Am J Dent* 2004; 17:56-60.
- 8- Nagayoshi M, Fukuizumi T, Kitamura C, Yano J, Terashita M, Nishihara T. Efficacy of ozone on survival and permeability of oral microorganisms. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19:240-246.
- 9- Polydorou O, Pelz K, Hahn P. Antibacterial effect of an ozone device and its comparison with two dentin-bonding systems. *Eur J Oral Sci* 2006; 114:349-353.
- 10- Baysan A, Whiley RA, Lynch E. Antimicrobial effect of a novel ozone-generating device on microorganisms associated with primary root carious lesion in vitro. *Caries Res* 2000; 34:498-501.
- 11- Nagayoshi M, Kitamura C, Fukuizumi T, Nishihara T, Terashita M. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. *J Endod* 2004; 30:778-781.
- 12- Hems RS, Gulabivala K, Ng Y-L, Ready D, Spratt DA. An in vitro evaluation of the ability of ozone to kill a strain of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2005; 38:22-29.
- 13- Estrela C, Estrela CRA, Decurcio DA, Hollanda ACB, Silva JA. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. *Int Endod J* 2007; 40:85-93.

* As referências apresentadas nesse capítulo se referem àquelas citadas na Caracterização do Problema e na Justificativa, e não às apresentadas no artigo científico. Referências seguindo as normas de Vancouver.

- 14- Baysan A, Beighton D. Assessment of the ozone-mediated killing of bacteria in infected dentine associated with non-cavitated occlusal carious lesions. *Caries Res* 2007; 41:337–341.
- 15- Gerspach IH, Savtchenko VP, Dahnhardt JE, Meyer J, Lussi A. Comparison of the immediate effects of gaseous ozone and chlorhexidine gel on bacteria in cavitated carious lesions in children in vivo. *Clin Oral Invest* 2008; Nov. 26.
- 16- Huth KC, Paschos E, Brand K, Hickel R. Effect of ozone on non-cavitated fissure lesions in permanent molars. A controlled prospective clinical study. *Am J Dent* 2005; 18:223–228.
- 17- Baysan A, Lynch E. The use of ozone in dentistry and medicine. Part 2. Ozone and root caries. *Prim Dent Care* 2006; 13:37-41.
- 18- Dahnhardt JE, Jaeggi T, Lussi A. Treating open carious lesions in anxious children with ozone. A prospective controlled clinic study. *Am J Dent* 2006; 19:267-270.
- 19- Baysan A, Lynch E. Clinical reversal of root caries using ozone: 6-month results. *Am J Dent* 2007; 20:203-208.
- 20- Hodson N, Dunne SM, Swift EJ. Using ozone to treat dental caries. *J Esthet Restor Dent* 2007; 19:303-305.
- 21- Abu-Naba’A L, Al Shorman HM, Lynch E. 6-months fissure sealant retention over ozone- treated occlusal caries. IADR Abstract no. 3472; 2004.
- 22- Zaura E, Buijs MJ, Cate JM. Effects of Ozone and Sodium Hypochlorite on Caries-Like Lesions in Dentin. *Caries Res* 2007; 41:489–492.
- 23- Ruyter IE. Unpolymerized surface layers on sealants. *Acta Odont Scand* 1981; 39:27-32.
- 24- Rueggeberg FA, Margeson DH. The effect of oxygen inhibition on an unfilled/filled composite system. *J Dent Res* 1990; 69:1652-58
- 25- Spyrides GM, Perdigão J, Pagani C, Araújo MA, Spyrides SM. Effect of whitening agents on dentin bonding. *J Esthet Dent* 2000; 12:264–70.
- 26- Cavalli V, Gianinni M, Carvalho RM. Effect of carbamida peroxide bleaching agents on tesile strength of human enamel. *Dent Mat* 2004; 20:733-9.
- 27- Legremani DB. Resistência adesiva à dentina após clareamento dental. Bauru, 2005, Dissertação. Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
- 28- Schmidlin PR, Zimmermann J, Bindl A. Effect of ozone on enamel and dentin bond strength. *J Adhes Dent* 2005; 7:29-32.
- 29- Stanebury JW. Curing dental resins and composites by photopolymerization. *J Esthet Dent* 2000; 12:300-308.
- 30- Silva APB. Efeito de um agente antioxidante e de solventes orgânicos adesivos sobre a resistência de união ao esmalte humano tratado com peróxido de carbamida a 10%.

Piracicaba, 2005. Dissertação. Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

- 31- Suh BI. Oxygen-inhibited layer in adhesion dentistry. *J Esthet Restor Dent* 2004; 16:316-323.
- 32- Al Shamsi AH, Cunningham JL, Lamey PJ, Lynch E. The effects of ozone gas application on shear bond strength of orthodontic brackets to enamel. *Am J Dent*. 2008; 21(1):35-8.
- 33- Bitter K, Noetzel J, Volk C, Neumann K, Kielbassa AJ. Bond Strength of Fiber Posts after the Application of Erbium:Yttrium-Aluminum-Garnet Laser Treatment and Gaseous Ozone to the Root Canal. *J Endod* 2008; 34:306-309.
- 34- Pashley DH, Sano H, Ciuchi B, Yoshiyama M, Carvalho RM. Adhesion testing of dentin bonding agents: A review. *Dent Mater* 1995; 11:117-125.
- 35- Garcia FC, D'Alpino PHP, Terada RSS, Carvalho RM. Testes mecânicos para a avaliação laboratorial da união resina/dentina. *Rev Fac Odontol Bauru* 2002; 10:118-27.
- 36- Carvalho RM, Sano H, Ciucchi B, Yoshiyama M, Pashley DH. Determinação da resistência adesiva a dentina através de um dispositivo de microtração. *Rev odontol FOB* 1994; 2:77-82.
- 37- Sano, H, Shono T, Sonoda H, Takatsu T, Ciucchi B, Carvalho R, Pashley DH. Relationship between surface area for adhesion and tensile bond strength – evaluation of a micro-tensile bond test. *Dent Mater* 1994; 10:236-240.
- 38- Pashley DH, Carvalho RM, Sano H, Nakajima M, Yoshiyama M, Shono Y, Fernandes CA, Tay F. The micro tensile bond test: a review. *J Adhes Dent* 1999; 1: 299-309.
- 39- Lai SC, Tay FR, Cheung GS, Mak YF, Carvalho RM, Wei SH *et al.* Reversal of compromised bonding in bleached enamel. *J Dent Res* 2002; 81:477-481.
- 40- Yiu CKY, García-Godoy F, Tay FFR, Pashley DH, Imazato S, King NM, Lai SCN. A Nanoleakage Perspective on Bonding to Oxidized Dentin. *J Dent Res* 2002; 81:628-632.
- 41- Kaya AD, Turkun M. Reversal of dentin bonding to bleached teeth. *Oper Dent* 2003; 28:825–29.
- 42- Turkun M, Kaya AD. Effect of 10% sodium ascorbate on the shear bond strength of composite resin to bleached bovine enamel. *J Oral Rehabil* 2004; 31:1184–91.
- 43- Vongphan N, Senawongse P, Somsiri W, Harnirattisai C. Effects of sodium ascorbate on microtensile bond strength of total-etching adhesive system to NaOCl treated dentine. *J Dent* 2005; 33:689-95.
- 44- Weston CH, Ito S, Wadgaonkar B, Pashley DH. Effects of time and concentration of sodium ascorbate on reversal of NaOCl-induced reduction in bond strengths. *J Endod* 2007; 33:879-81.

- 45- Gökçe B, Cömlekoğlu ME, Ozpınar B, Türkün M, Kaya AD. Effect of antioxidant treatment on bond strength of a luting resin to bleached enamel. *J Dent* 2008; 36:780-5.
- 46- International Organization for Standardization. Technical report ISO TR 11405. Dental materials- guidance on testing of adhesion to tooth structure. Switzerland, 1994.
- 47- Eckert GJ, Platt JA. A statistical evaluation of microtensile bond strength methodology for dental adhesives. *Dent Mater* 2007; 23:385-91.
- 48- Reis A, de Carvalho Cardoso P, Vieira LC, Baratieri LN, Grande RH, Loguercio AD. Effect of prolonged application times on the durability of resin-dentin bonds. *Dent Mater* 2008; 24:639-44.