

**AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DA MORFOLOGIA DENTINÁRIA APÓS
APLICAÇÃO DO OZÔNIO E DO ASCORBATO DE SÓDIO**

Daniel Rodrigues; Paula Cicília Faquim Rodrigues; Carlos Estrela; Lawrence Gonzaga Lopes;
Rodrigo Borges Fonseca; João Batista de Souza

Faculdade de Odontologia – Universidade Federal de Goiás

daniel_rodrigues01@hotmail.com

Palavras chaves: Dentina, Ozônio, Ataque Ácido Dentário, Ácido ascórbico

Revisado pelo orientador.

Daniel Rodrigues (orientando); Paula Cicília Faquim Rodrigues; Carlos Estrela; Lawrence Gonzaga Lopes; Rodrigo Borges Fonseca; João Batista de Souza (orientador)

INTRODUÇÃO

O ozônio (O_3), 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 (O_2) em átomos de oxigênio ativado, que então reage com moléculas suplementares de O_2 , mediante uma descarga elétrica, reações fotoquímicas ou artificialmente advindas de geradores elétricos^{1,2,4}. É um potente oxidante, que o torna em um forte agente antimicrobiano^{1, 3, 4, 6-8}.

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^{1,3,5,9}..

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*⁷⁻¹⁰. 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^{6, 9, 11-13}. Além disto, 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 fluído do biofilme^{4,11}.

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, 14}. 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 dentários^{15, 16}.

Para neutralizar este 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 oxigênio^{17, 18}. 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 adesivos^{17, 19}, permitindo que um procedimento restaurador seja

realizado com sucesso e perspectiva de longevidade, durabilidade adesiva e ausência de microinfiltração^{20, 21}.

Sabe-se que o oxigênio liberado pela utilização de agentes clareadores alteram as propriedades tanto do esmalte quanto da dentina²²⁻²⁴. Há, então, de verificar se ocorrem alterações da morfologia dos substratos dentinários quando da presença do oxigênio livre decorrente da aplicação do gás ozônio e se o ascorbato de sódio associado ao gás interfere na morfologia da dentina.

Muitos testes podem ser empregados para analisar a morfologia da superfície de um material, dentre elas, a mais utilizada é a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Possui a capacidade de proporcionar uma imagem de alguma ponto da amostra com alta resolução, desde dimensões entre 500 nm até dimensões abaixo de nm e ainda fornecer uma identificação da natureza dos elementos presentes na mesma^{25, 26}. Apesar do MEV ser capaz de gerar imagens em nanoescala e subnanoscale de resolução, a preparação da amostra é complicada e invasora, que pode alterar a estrutura primária das amostras.²⁵⁻²⁸.

Uma nova técnica vem sendo empregada, oferecendo uma série de vantagens em relação o MEV, trata-se da Microscopia de Força Atômica (AFM)²⁶. O AFM fornece uma real topografia em forma de imagem tridimensional de uma superfície da amostra. Ela dá uma imagem do computador em tempo real, e assim pode ser utilizado para o acompanhamento de processos dinâmicos²⁶. Pode ser utilizado de forma a não sofrer distorções pela presença de água e outros líquidos. A técnica não é destrutiva, assim amostras podem ser visualizados por diversas vezes.^{26, 27}.

Como uma amostra não requer ampla preparação para ser analisada por AFM pode ser mapeado muitas vezes, sendo o seu próprio controle. Além disso, porque AFM é um software dirigido, possui uma alta precisão matemática de mapeamento, podendo obter dados quantitativos sobre a caracterização da superfície, tais como rugosidade, fractais, picos, etc. As imagens obtidas por MEV, embora úteis, não informam um parâmetro numérico para a superfície aspereza, como a obtida por AFM²⁶.

Desta forma, para uma completa avaliação da morfologia da dentina humana após aplicação do gás ozônio e do ascorbato de sódio será utilizado o AFM e o MEV.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a morfologia dentinária após aplicação do gás ozônio e do ascorbato de sódio por imagem microscópica.

Objetivos Específicos

- Visualizar a morfologia da dentina humana após a aplicação do gás ozônio por meio do Microscópio de Força Atômica e Microscópio Eletrônico de Varredura.
- Analisar o efeito do gás ozônio na morfologia da dentina humana com a realização do condicionamento ácido antes e após a aplicação do ozônio por meio do Microscópio de Força Atômica e Microscópio Eletrônico de Varredura.
- Verificar, por meio do Microscópio de Força Atômica e Microscópio Eletrônico de Varredura, o efeito da aplicação de um agente antioxidante (ascorbato de sódio 10%) sobre a morfologia da dentina humana tratada com gás ozônio.

METODOLOGIA

Tipo de estudo: Estudo laboratorial *in vitro*.

Local de execução: Universidade Federal de Goiás.

Delineamento do estudo:

Unidade experimental: 7 terceiros molares humanos, cada dente forneceu 4 amostras que foram distribuídas em quatro grupos.

Fatores estudados: Morfologia de dentina tratada em quatro condições experimentais.

Variáveis de resposta:

- Morfologia dentinária visualizada por meio de Microscópio de Força Atômica (AFM).
- Morfologia dentinária visualizada por meio de Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).

Aspectos éticos e legais

Por envolver dentes humanos este projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás. Os dentes foram doados para pesquisa

após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos pacientes e pelo responsável pela pesquisa. A pesquisa foi aprovada no Comitê de Ética em Pesquisa da FO UFG sob protocolado sob o nº 85/2010.

Obtenção e seleção da amostra

Os dentes foram extraídos, por indicação prévia de exodontia, durante as disciplinas de Estágio em Clínica Integrada I, II e III da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás. Foram selecionados 7 terceiros molares humanos hígidos, livres de cárie e com ausência de defeitos ou trincas.

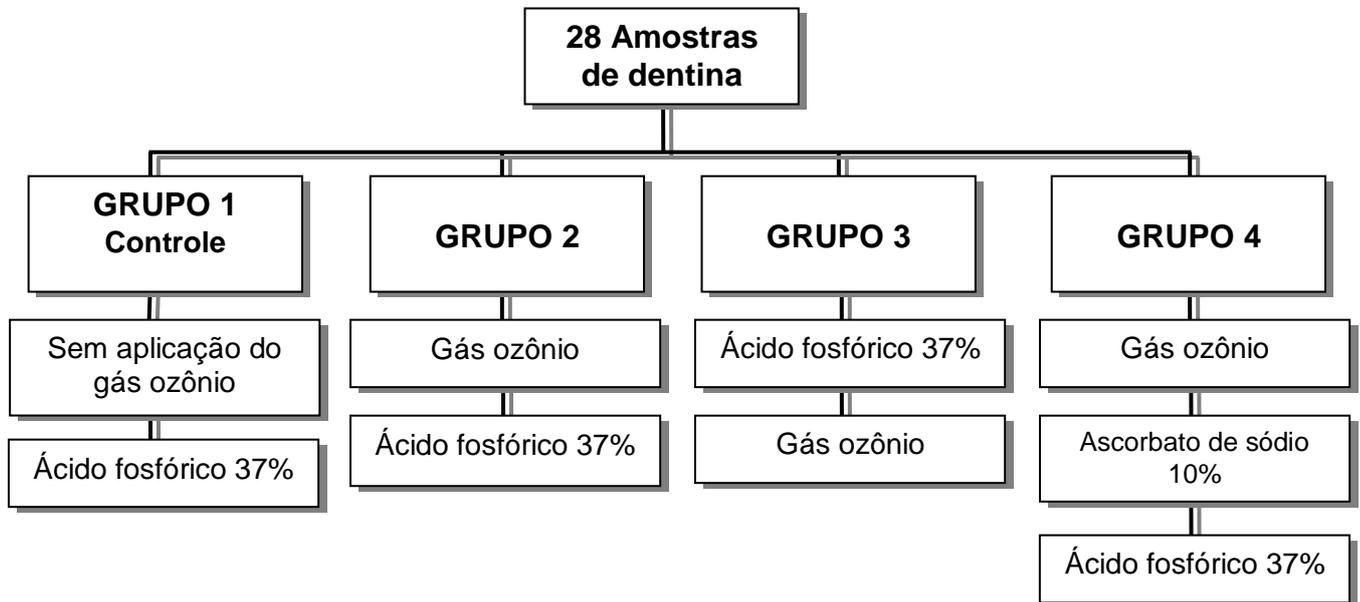
Preparo das amostras

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 de 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.

Os dentes foram cortados no sentido perpendicular ao longo eixo do dente para obter-se “fatias” de dentina com aproximadamente 2mm de espessura. Os dentes foram fixados horizontalmente em suportes de acrílico, com dimensões de 4,0 cm x 2,5 cm x 0,3 cm, com godiva de alta fusão Exata (DFL Indústria e Comércio Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e foram acoplados ao dispositivo da cortadeira metalográfica Labcut 1010 (Exttec®, Enfield, USA). Com a utilização de um disco de corte diamantado, em baixa velocidade (150 rpm), com constante irrigação, foi realizado um corte à aproximadamente 3,0 mm acima da junção amelo-cementária e outro corte a 2mm acima do primeiro corte. Todas as “fatias” de dentina foram aferidas com auxílio de um paquímetro digital universal (Digimatic Caliper, Mitutoyo, Tokyo, Japan) para confirmar 2mm de espessura.

Posteriormente as “fatias” foram polidas com lixas de carbetto de silício (SiC paper)⁴³, na seguinte sequência nº 800, 1000, 1200, com irrigação constante, para que seu perfil de rugosidade não ultrapasse o alcance do Microscópio de Força Atômica, que é em torno de 5,85µm⁴². Durante o polimento existe a formação de uma camada de “*smear layer*” que foi removida utilizando em um dispositivo de limpeza ultrassônico onde as amostras permaneceram por 5 minutos.

Após, cada “fatia” de dentina altamente polida foi seccionada em quatro partes iguais produzindo, assim, um total de quatro amostras por dente. Estas quatro amostras de cada dente foram divididas entre os quatro grupos experimentais, para minimizar a variabilidade entre diferentes “fatias” de dentina^{25, 29, 30}. Os grupos estudados foram quatro (n=7, 28 amostras para todos os grupos) sendo um grupo controle e três grupos experimentais, como descritos no fluxograma apresentado na Figura 1.



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

Os materiais que foram utilizados em cada grupo de estudo, bem como o fabricante e a composição, estão descritos a baixo:

- MAGIC ACID gel condicionador a 37%, composição Solução de ácido fosfórico a 37%. L 001/10
- Ascorbato de sódio 10%: composição: Sódio D-Isoascorbato monohidratado 10% em água destilada.

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}, 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.

- 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%

Foi aplicado 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 absorvente³¹⁻³³.

As amostras foram armazenadas em *ependorfs* rotulados de acordo com o grupo de estudo e número do dente de origem, contendo água deionizada, mantidos em estufa bacteriológica a 37° C, até a realização da avaliação microscópica com o AFM e o MEV.

A avaliação morfológica das amostras dentinárias foi realizada da seguinte maneira: seis amostras de cada grupo foram preparadas para serem avaliadas por meio do Microscópio Eletrônico de Varredura, conforme descrito abaixo, enquanto que uma amostra de cada grupo ficou livre dos preparos para Microscópio Eletrônico de Varredura e foi avaliada Microscopia de Força Atômica.

Microscópio Eletrônico de Varredura

As amostras receberam o seguinte preparo: desidratação em concentrações ascendentes de álcool etílico a 25%, 50% e 75% por 15 minutos cada uma; 95% por 30 minutos com uma troca após 15 minutos e 100% por 60 minutos, com uma troca após 30 minutos; e então as amostras foram levadas há uma metalizadora (Sistema para deposição de filmes de ouro, Denton Vacuum, Desk V) recobertas com ouro^{4,7}. Foram feitas três tomadas de cada amostra no MEV (Microscópio Eletrônico de Varredura, Jeol, JSM – 6610, equipado com EDS, Thermo scientific NSS Spectral Imaging) no modo elétrons secundários (SE), nas

magnificações de 1:1000, 1:5000 e 1:15000, sendo a mais relevante levada para interpretação e comparação^{26, 30, 34}.

Microscópio de Força Atômica

Foi analisada uma amostra de cada grupo no AFM (Microscópio de Força Atômica Agilent Technologies 5500) no modo de não contato, pois assim as amostras poderiam passar pelo mesmo protocolo que as amostras analisadas em MEV, foram feitas quatro tomadas com mesma magnificação em três pontos da amostra.

Tratamento e interpretação das imagens

As análises de amostras provenientes da mesma “fatia”, submetidas aos diferentes procedimentos de cada grupo, e amostras de “fatias” diferentes de diferentes grupos foram comparadas as do grupo controle e dos demais grupos experimentais e comparadas em relação a morfologia.

RESULTADOS

Os resultados mostraram que as diferentes sequências de aplicação do ozônio e do condicionamento ácido, assim como aplicação do ascorbato de sódio após a utilização do ozônio geraram diferenças na micro morfologia dentinária em relação ao grupo controle, no qual foi feito apenas o condicionamento ácido por 15 segundos. Todos os protocolos removeram de forma significativa a *smear layer* e a *smear plug* dos túbulos dentinários, visto que quando não há esse efeito não é possível observá-los na microscopia^{35, 36}. Nos grupos 2 e 4, em que o ácido foi utilizado após o ozônio, foi possível observar a presença de grânulos na superfícies da dentina (Imagens 2, 4, 6 e 8 pontos A), o que sugere que a *smear layer* não foi removida^{35, 36}. No grupo 3, em que o ácido foi empregado antes do ozônio, a desmineralização foi semelhante ao do grupo controle, promovendo uma superfície “limpa”, porem não foi possível observar em nenhuma das imagens a presença das fibrilas de colágeno (Imagem 6 ponto B), observadas em todos os outros grupos (Imagens 5,6 e 8 pontos C). Nas imagens de AFM, o grupo 1 e 2 apresentaram uma desmineralização mais uniforme (Imagem 9 e 11), tanto na embocadura dos túbulos quanto na topografia da superfície, o que é confirmado pelo MEV (Imagem 1 e 3) enquanto que os grupos 2 e 4 apresentaram uma menor padronização da sua superfície (Imagens 10 e 12).

G
R
U
P
O
1

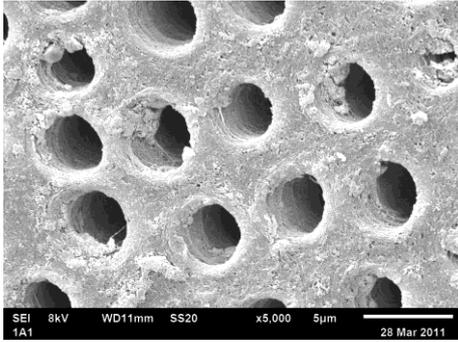


Imagem 1: magnificação de 1:5.000

G
R
U
P
O
2

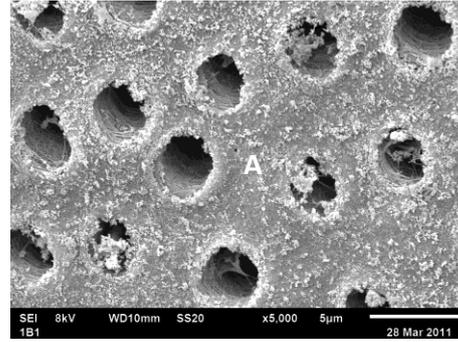


Imagem 2: magnificação de 1:5.000, ponto A localizado em local de grande quantidade de *smear layer* remanescente.

G
R
U
P
O
3

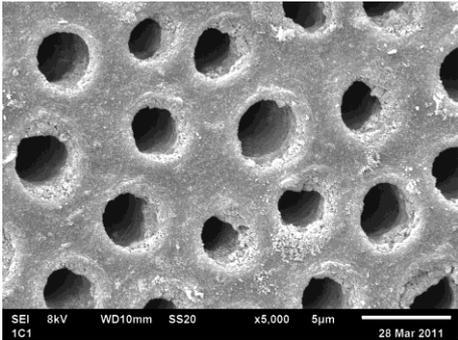


Imagem 3: magnificação de 1:5.000

G
R
U
P
O
4

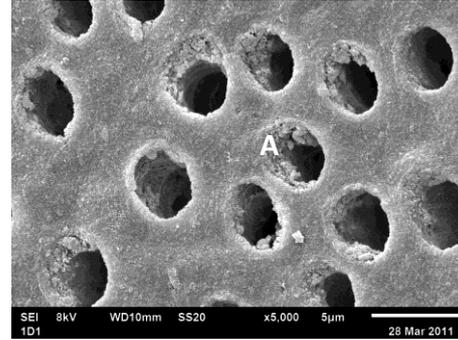


Imagem 4: magnificação de 1:5.000, ponto A em região de *smear layer*.

G
R
U
P
O
1



Imagem 5: magnificação de 1: 20.000, ponto C em região de fibrilas colágeno.

G
R
U
P
O
2

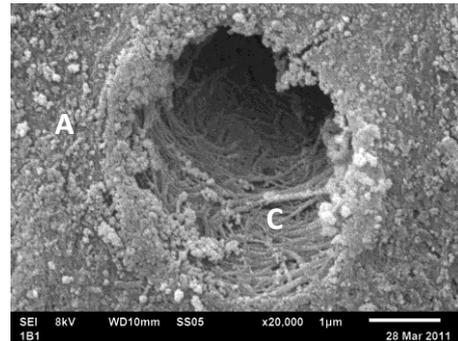


Imagem 6: magnificação de 1: 20.000, ponto A em região de *smear layer*. ponto C em região de fibrilas colágeno.

G
R
U
P
O
3

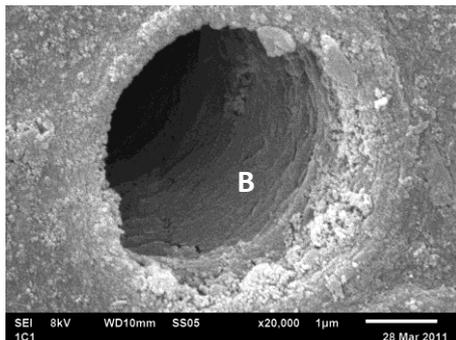


Imagem 7: magnificação de 1: 20.000, ponto B em região com ausência de fibrilas colágeno.

G
R
U
P
O
4

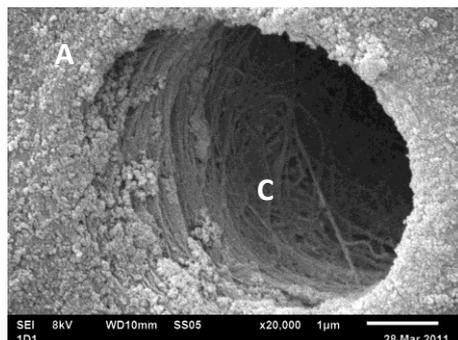


Imagem 8: magnificação de 1: 20.000, ponto A em região de *smear layer*. ponto C em região de fibrilas colágeno.

G
R
U
P
O
1

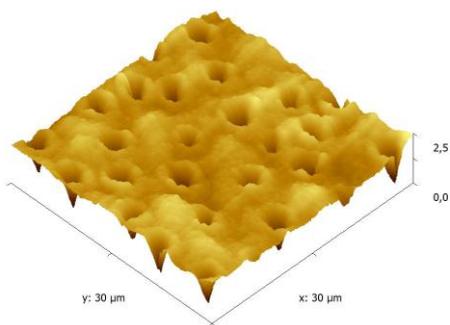


Imagem 9: modelo 3D gerado pelo AFM

G
R
U
P
O
2

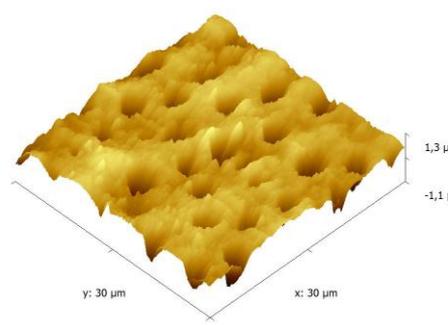


Imagem 10: modelo 3D gerado pelo AFM

G
R
U
P
O
3

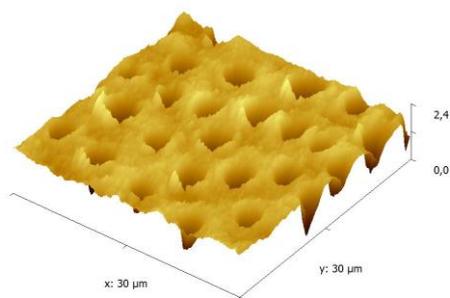


Imagem 11: modelo 3D gerado pelo AFM

G
R
U
P
O
4

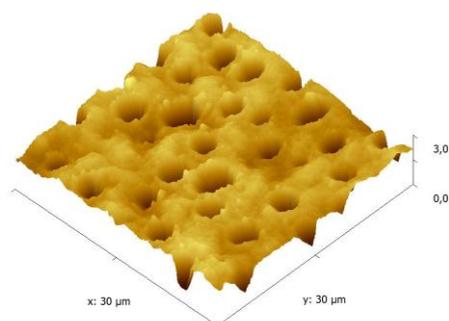


Imagem 12: modelo 3D gerado pelo AFM

DISCUSSÃO

Embora a maioria das pesquisas comprove a eficácia do ozônio no tratamento de lesões cáries^{1, 2, 4, 6, 9-11, 37}, é essencial conhecer as alterações que este pode causar na estrutura dentária após sua aplicação³⁸.

A alta atividade de oxidação do ozônio, pode também modificar algumas propriedades físicas do esmalte e da dentina³⁹. Cardenaro *et al.*⁴⁰ sugeriram que alguns efeitos dos radicais livres no esmalte produzidos por géis clareadores a base de peróxido de hidrogênio poderiam ocorrer na utilização do ozônio. As alterações na superfície do esmalte são atribuídas à modificação de sua composição orgânica após o tratamento com os agentes clareadores a base de peróxido, que liberam radicais livres de oxigênio²³. Estas mudanças na composição química do esmalte diminuem consideravelmente a quantidade de cálcio e fósforo, além de modificarem a morfologia da maioria dos cristais da camada superficial quando comparados com esmalte não submetido ao clareamento²². Na dentina também são

observadas mudanças na morfologia, como a redução de seus componentes orgânicos que são fundamentais para os procedimentos adesivos, além de diminuir significativamente sua microdureza²³.

Em um estudo realizado por Rodrigues¹⁶ quatro grupos semelhantes ao do presente estudo, com os mesmos protocolos de aplicação do ácido fosfórico, do ozônio e do ascorbato, foram submetidos ao ensaio mecânico de microtração para avaliar a resistência de união. Os resultados indicaram que os grupos 2 e 3, tiveram valores menores de resistência de união, enquanto que o grupo 4 teve valores semelhantes ao grupo 1, controle. O estudo sugere que isto pode ocorrer pela ação direta do ozônio na dentina, ou pela interação do mesmo como o ácido fosfórico.

Restos de *smear layer* e a falta de padronização no diâmetro dos túbulos dentinários³⁵, observados nas amostras 2 e 4, sugerem que uma menor efetividade do condicionamento ácido nas superfícies pode ter ocorrido por interação do ozônio com o ácido fosfórico.

A literatura é bastante escassa quanto à reação de oxidação do ácido fosfórico. Em um estudo de 1979⁴¹, propuseram o uso de ozônio e peróxido de hidrogênio, como fonte de radicais livres do oxigênio para oxidação de alguns ácidos e outras substâncias, dentre elas o ácido fosfórico. O estudo revelou que a concentração utilizada de peróxido de hidrogênio é eficiente na oxidação de diversos compostos, entre eles, compostos fosfóricos, como o ácido fosfórico⁴¹, sendo assim é possível que na presente pesquisa o ozônio tenha interagido com o ácido fosfórico e por sua vez reduziu a eficácia do condicionamento ácido. Gwinnett⁴² por meio do MEV, comprovou que o condicionamento ácido ampliava os túbulos dentinários e facilitava o escoamento de monômeros resinosos para o seu interior. Pashley *et al.*⁴³ comprovou a eficiência de alguns ácidos em remover a *smear layer* da superfície dentária e melhorar a adesão de materiais restauradores adesivos à estrutura dentária, portanto a menor eficiência do condicionamento ácido na superfície dentária e a presença de *smear layer* dificultam a penetração de adesivos, e conseqüentemente sendo deletérias a duração das restaurações adesivas^{42, 44}.

Para neutralizar o oxigênio produzido pelo ozônio, responsável também 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 oxigênio²⁹⁻³⁴. A presença de *smear layer* e *smear plug* no grupo 4, em menor proporção que no grupo 2, indica que o ascorbato de sódio inibiu em grande parte o oxigênio residual,

porém, não em sua totalidade, estes dados corroboram com os resultado dos testes de resistência de união apresentados por Rodrigues¹⁶.

No grupo 3, não foi possível observar fibrilas de colágeno, presentes em todos os outros grupos, o que provavelmente ocorreu pela ação do ozônio sobre as fibrilas colágeno. Kinght *et. al*³⁹ suspeitaram desse efeito em um estudo sobre a formação de biofilme em dentina previamente tratada com ozônio, visto que quando o ozônio entra em contato com fluídos orgânicos, reage imediatamente com espécies reativas do oxigênio⁴⁵. Em um estudo com gelatina⁴⁵, um derivado de baixo peso molecular do colágeno, para utilização de ozônio em esterilização de alimentos, comprovou que o uso do ozônio em grandes concentrações causou danos evidentes à estrutura protéica do alimento. As fibrilas de colágeno são fundamentais para a união dos sistemas adesivo com a dentina^{46, 47} podendo ser uma das causas do baixos valores de resistência de união no trabalho de Rodrigues¹⁶.

CONCLUSÃO

Por meio dessa pesquisa foi possível concluir que:

- 1- A utilização do ozônio antes do ácido fosfórico altera a eficácia do condicionamento ácido quanto à remoção da *smear layer*, o mesmo efeito pode ser observado quando a ascorbato de sódio é utilizado, porém com menor intensidade.
- 2- A utilização do ozônio depois do ácido fosfórico altera a micro estrutura dentinária, podendo ser um fator prejudicial quanto à resistência de união de agentes adesivos.
- 3- O ascorbato de sódio diminui o efeito do ozônio antes do condicionamento ácido, mas não o anulou por completo.
- 4- Mais estudos são necessários para avaliar o efeito do ozônio sobre a superfície dentinária e sua interação com o ácido fosfórico.

AGRADECIMENO

A equipe realizadora desse trabalho agradece a todo LAMMAR/UFG pela obtenção das imagens e medidas em MEV e AFM, e pelo auxílio em outras etapas fundamentais para conclusão dessa pesquisa, em especial a Dr^a Tatiane Oliveira dos Santos.

REFERÊNCIAS

1. Mill T, Gould CW. Free-radical oxidation of organic phosphonic acid salts in water using hydrogen peroxide, oxygen, and ultraviolet light. *Environmental Science & Technology* 1979;13(2):205-08.
2. Holmes J. Clinical reversal of root caries using ozone, doubleblind, randomised, controlled 18-month trial. *Gerodontology* 2003;20(10):8.
3. Stubinger S, Sader R, Filippi A. The use of ozone in dentistry and maxillofacial surgery: a review. *Quintessence Int* 2006;37(5):353-9.
4. Azarpazhooh A, Limeback H. The application of ozone in dentistry: a systematic review of literature. *J Dent* 2008;36(2):104-16.
5. Nogales C, Ferrari P, Kantorovich E. The application of ozone in dentistry: A systematic review of literature. *J Den* 2008; 36:104-16. *J Contemp Dent Pract* 2008;9:9.
6. Baysan A, Lynch E. Effect of ozone on the oral microbiota and clinical severity of primary root caries. *Am J Dent* 2004;17(1):56-60.
7. 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;19:6.
8. 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(4):349-53.
9. Baysan A, Whiley RA, Lynch E. Antimicrobial effect of a novel ozone- generating device on micro-organisms associated with primary root carious lesions in vitro. *Caries Res* 2000;34(6):498-501.
10. Hems RS, Gulabivala K, Ng YL, 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(1):22-9.
11. Baysan A, Lynch E. The use of ozone in dentistry and medicine. Part 2. *Prim Dent Care* 2006;13:4.
12. Baysan A, Lynch E. Clinical reversal of root caries using ozone: 6-month results. *Am J Dent* 2007;20:5.
13. Hodson N, SM, Dunne, Swift E. Using ozone to treat dental caries. *J Esthet Restor Dent* 2007;19. .
14. Nagayoshi M, Kitamura C, Fukuizumi T, Nishihara T, Terashita M. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. *J Endod* 2004;30(11):778-81.
15. Ruyter I. Unpolymerized surface layers on sealants. *Acta Odont Scand* 1981; 39:27-32. *Acta Odont Scand* 1981;39:4.
16. Rodrigues P. Effect of Ozone Application on the Resin-Dentin Microtensile Bond Strength. 2009, Dissertação. Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Goiás. 2009.
17. Yiu CK, Garcia-Godoy F, Tay FR, Pashley DH, Imazato S, King NM, et al. A nanoleakage perspective on bonding to oxidized dentin. *J Dent Res* 2002;81(9):628-32.
18. Gokce B, Comlekoglu ME, Ozpinar B, Turkun M, Kaya AD. Effect of antioxidant treatment on bond strength of a luting resin to bleached enamel. *J Dent* 2008;36(10):780-5.
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(7):477-81.
20. Turkun M, Turkun LS. Effect of nonvital bleaching with 10% carbamide peroxide on sealing ability of resin composite restorations. *Int Endod J* 2004;37(1):52-60.

21. Kimyai S, Valizadeh H. Comparison of the effect of hydrogel and a solution of sodium ascorbate on dentin-composite bond strength after bleaching. *J Contemp Dent Pract* 2008;9:6.
22. Legramandi D. Resistência adesiva à dentina após clareamento dental. . São Paulo Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.2005.
23. Pécora J, Filho AC, Neto MS, Silva R. In vitro action of various bleaching agents on the microhardness of human dentin. 1994;5:5.
24. Chng HK, Palamara JE, Messer HH. Effect of hydrogen peroxide and sodium perborate on biomechanical properties of human dentin. *J Endod* 2002;28(2):62-7.
25. Chng HK, Ramli HN, Yap AU, Lim CT. Effect of hydrogen peroxide on intertubular dentine. *J Dent* 2005;33(5):363-9.
26. Batista L, Júnior J, Silva M, Tonholo J. Atomic force microscopy of removal of dentin smear lay. *Microsc Microanal* 2007;13:5.
27. Kubinek R, Zapletalova Z, Vujtek M, Novotný R, Kolarova H, SEM HCEodsuaAa. Examination of dentin surface using AFM and SEM. *Modern Research and Educational Topics in Microscopy* 2007;2:5.
28. Ma S, Cai J, Zhan X, Wu Y. Effects of etchant on the nanostructure of dentin: an atomic force microscope study. *Scanning* 2009;31:6.
29. Yang B, Adelung R, Ludwig K, Bossmann K, Pashley DH, Kern M. Effect of structural change of collagen fibrils on the durability of dentin bonding. *Biomaterials* 2005;26(24):5021-31.
30. Rusin RP, Agee K, Suchko M, Pashley DH. Effect of a new desensitizing material on human dentin permeability. *Dent Mater* 2010;26(6):600-7.
31. Kaya AD, Turkun M. Reversal of dentin bonding to bleached teeth. *Oper Dent* 2003;28(6):825-9.
32. 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.:6.
33. Weston C, Ito S, Wadgaonkar B, Pashley D. Effects of time and concentration of sodium ascorbate on reversal of NaOCl-induced reduction in bond strengths. *J Endod* 2007;33:9.
34. Reis A, CA K-J, FH FdS, Stanislawczuk R, Loguercio A. The use of warm air stream for solvent evaporation: effects on the durability of resin-dentin bonds. *Oper Dent* 2010;35:7.
35. Pimenta RA, Penido CVdSR, Cruz RdA, Alves JB. Morphology of the dentin on primary molars after the application of phosphoric acid under different conditions. *Braz Oral Res* 2010;24(3):5.
36. Susin AH, Alves LS, Melo GP, Lenzi TL. Comparative scanning electron microscopic study of the effect of different dental conditioners on dentin micromorphology. *J Appl Oral Sci* 2008;16(2):100-5.
37. Dahnhardt J, Jaeggi T, Lussi A. Treating open carious lesions in anxious children with ozone. A prospective controlled clinic study. *Am J Dent* 2006;19:3.
38. Kinney J, Marshall S, Marshall G. The mechanical properties of human dentin: a critical review a re-evaluation of the dental literature. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003;14(1):16.
39. Knight G, McIntyre J, Craig G, Mulyani, Zilm P. The inability of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus* to form a biofilm in vitro on dentine pretreated with ozone. *Aust Dent J.* 2008;Dec;53(4):6.

40. Cadenaro M, Delise C, Antoniollo F, Navarra O, Lenarda RD, Breschi L. Enamel and dentin bond strength following gaseous ozone application. *J Adhes Dent*. 2009 Aug;11(4):287-92. 2009; Aug;11(4):5.
41. Mill T, Gould CW. Free-radical oxidation of organic phosphonic acid salts in water using hydrogen peroxide, oxygen, and ultraviolet light. *Environmental Science & Technology* 1979;13 (2):3.
42. Gwinnett A. The morphologic relationship between dental resins and etched dentin. *J Dent Res* 1977;Oct;56(10):5.
43. Pashley EL, Tao L, Derkson G, Pashley DH. Dentin permeability and bond strengths after various surface treatments. *Dent Mater* 1989;5(6):375-8.
44. Pashley DH, Carvalho RM. Dentine permeability and dentine adhesion. *J Dent* 1997;25(5):355-72.
45. Cataldo F. On the action of ozone on gelatin. *Int J Biol Macromol*. 2007 Jul 1;41(2):6.
46. Walshaw P, McComb D. SEM evaluation of the resin-dentin interface with proprietary bonding agents in human subjects. *J Dent Res* 1994;May;73(5):8.
47. Van Meerbeek B, Lambrechts P, Inokoshi S, Braem M, Vanherle G. Factors affecting adhesion to mineralized tissues. *Oper Dent* 1992;Suppl 5:111-24.