

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

ESTUDO IN VITRO DO EFEITO DO OZONO NA RESISTÊNCIA ADESIVA À DENTINA POR MICROTRAÇÃO

Trabalho submetido por
Flávia Sofia Carvalho Leandro
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Outubro de 2023

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

ESTUDO IN VITRO DO EFEITO DO OZONO NA RESISTÊNCIA ADESIVA À DENTINA POR MICROTRAÇÃO

Trabalho submetido por
Flávia Sofia Carvalho Leandro
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Joana Vasconcelos e Cruz

Outubro de 2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Prof. Doutora Joana Vasconcelos e Cruz por toda a paciência e ajuda neste percurso, sem dúvida que foi uma enorme inspiração. Apesar dos obstáculos ultrapassados conseguiu manter a sua boa disposição, rigor, dedicação e profissionalismo acima de tudo. Obrigada por acreditar em mim e no meu potencial.

Ao Prof. Doutor António Delgado pelo auxílio na elaboração e análise dos resultados estatísticos.

Ao Prof. Doutor Mário Polido pela disponibilização tanto do laboratório de biomateriais como também dos materiais necessários para esta experiência.

À Egas Moniz School of Health and Science, ao corpo docente e ao Prof. Doutor José João Mendes por todas as oportunidades que me disponibilizaram durante o meu percurso. Sem dúvida que foram os meus melhores 5 anos rodeada das melhores pessoas.

À 2M Pharma por estarem sempre prontas a nos ajudar com o material que era imprescindível para esta experiência.

Aos meus pais que sempre acreditaram em mim, no meu potencial e me deram força para aguentar todos os dias, mesmo estando longe de casa. Apesar de todo o sacrifício que passamos, tenho a certeza de que tudo foi feito do coração.

Às minhas amigas que me acompanharam durante estes 5 anos. Obrigada pelos momentos inesquecíveis, risadas, e por estarem sempre do meu lado. Um especial obrigado à minha colega de box/casa, a Marta, por ter uma paciência de santa para mim e ser a minha rocha desde o primeiro dia de aulas. Sempre serás uma amiga/irmã para a vida.

Por fim, ao meu namorado Duarte, que apesar de me aturar, acreditou sempre na minha capacidade e inteligência para ultrapassar os obstáculos. Sem dúvida que tornas os meus dias mais felizes.

Este estudo deu origem à escrita do artigo “*Antibacterial effect of ozone on cariogenic bacteria and its potential prejudicial effect on dentin bond strength*”, com os respetivos autores: Marta Santos, Flávia Leandro, Prof.^a Doutora Helena Barroso, Prof. António Delgado, Prof. Doutor Luís Proença, Prof. Doutor Mário Polido e Prof.^a Doutora Joana Vasconcelos e Cruz. Este artigo está em processo de submissão na revista *Pharmaceutics* à edição especial “*Biomaterials and Agents: Pharmaceutical and Biomedical Applications in Dental Research*”.

Os resultados preliminares do estudo realizado no artigo também foram apresentados no 6º Congresso Internacional do CiiEM “*Immediate and future challenges to foster One Health*” (5-7 julho de 2023 no Instituto Universitário Egas Moniz), tendo como título “*In vitro study of the antibacterial effect of ozone on cariogenic bacteria*” e como autores: Marta Santos, Flávia Leandro, Prof.^a Doutora Joana Vasconcelos e Cruz, Prof. Doutor Mário Polido, Prof. Doutor António Delgado e Prof.^a Doutora Helena Barroso (Anexo I).

RESUMO

Objetivos: Avaliação da resistência adesiva na dentina, por microtração (μ TBS), após aplicação de diversas formas de ozono.

Materiais e Métodos: 20 molares humanos hígidos foram distribuídos aleatoriamente por 4 grupos (n=5): (1) CTR (controle); (2) O₃_GAS (ozono gasoso); (3) O₃_AG (água ozonizada); (4) O₃_AG+GAS (água ozonizada + gás). Inicialmente, foram realizadas cavidades classe I em todas as amostras, a fim de expor a dentina para a aplicação do ozono. Posteriormente, as amostras foram expostas a diversas formas de ozono, conforme o grupo e restauradas recorrendo ao sistema adesivo Optibond™ FL (Kerr Corporation, Orange, CA, USA) e resina composta Filtek Z250 (3M ESPE, Seefeld, Germany) com incrementos de 2 mm, perfazendo uma altura de 3 mm acima da superfície oclusal. Após o armazenamento em água destilada durante 24h a 37°C, as amostras foram seccionadas em palitos de 1 mm² para serem testadas através do teste de microtração. Para análise estatística foram utilizados os testes ANOVA *one-way*, *Tukey HSD* e *Games-Howell* (nível de significância de 5%, SPSS v.28.0).

Resultados: Após análise estatística verificaram-se diferenças estatisticamente significativas entre o grupo CTR e os grupos de ozono (O₃_GAS, O₃_AG, O₃_AG+GAS) ($p < 0,001$). Contudo, entre os diferentes grupos de ozono não foram verificadas diferenças significativas ($p > 0,05$).

Conclusão: Independentemente da forma de ozono aplicada (gás ou água), o ozono interfere na resistência adesiva à dentina por microtração (μ TBS).

Palavras-chave: Ozono, resistência adesiva, dentina, adesão.

ABSTRACT

Objective: Evaluation of dentin bonding strength by microtensile bond strength (μ TBS) after application of different forms of ozone.

Materials & Methods: 20 healthy human molars were randomly assigned to 4 groups (n=5): (1) CTR (control); (2) O₃_GAS (ozone gas); (3) O₃_AG (ozonated water); (4) O₃_AG+GAS (ozonated water + ozone gas). Initially, class I cavities were made in all the samples to expose the dentin for the application of ozone. Subsequently, the samples were treated with different forms of ozone, depending on the group, and restored using the Optibond™ FL adhesive system (Kerr Corporation, Orange, CA, USA) and Filtek Z250 composite resin (3M ESPE, Seefeld, Germany) in 2 mm increments, making a height of 3 mm above the occlusal surface. After storage in distilled water for 24 hours at 37°C, the samples were sectioned into 1 mm² sticks to be tested using the microtensile test. The ANOVA *one-way*, *Tukey HSD* and *Games-Howell* tests (5% significance level, SPSS v.28.0) were used for statistical analysis.

Results: Statistical analysis showed statistically significant differences between the CTR group and the ozone groups (O₃_GAS, O₃_AG, O₃_AG+GAS) ($p < 0.001$). However, there were no significant differences between the different ozone groups ($p > 0.05$).

Conclusion: Regardless of the form of ozone applied (gas or water), ozone reduces the dentin microtensile bond strength.

Keywords: Ozone, microtensile bond strength, dentin, adhesive.

ÍNDICE GERAL

I. INTRODUÇÃO.....	13
1. História do ozono	13
2. Molécula de ozono	13
3. Propriedades biológicas	14
4. Métodos de administração do ozono	16
4.1 Ozono em gás	16
4.2 Água ozonizada	16
4.3 Óleo ozonizado	17
5. Sistema de produção.....	17
5.1 Sistema ultravioleta	18
5.2 Sistema de plasma frio.....	18
5.3 “Corona discharge system”	18
6. Ozonoterapia na medicina dentária.....	18
6.1 Ozonoterapia e dentisteria	19
7. Adesão em dentisteria	21
7.1 Adesão à dentina.....	23
7.2 Sistemas adesivos	26
7.2.1 Sistema adesivo <i>etch-and-rinse</i>	27
8. Estudos para avaliação da resistência adesiva.....	28
8.1 Resistência adesiva à microtração (μ TBS).....	29
8.2 Norma de orientação da <i>Academy of Dental Materials</i> (ADM).....	29
9. Enquadramento	30
II. OBJETIVOS.....	31
1. Hipóteses de estudo.....	31
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
1. Local do Estudo	33
2. Seleção das amostras	33
3. Materiais.....	34
4. Preparação das amostras	35
4.1 Preparação da cavidade	36
4.2 Aplicação do ozono	37
4.3 Protocolo adesivo e restauração das amostras	39
4.4 Corte das amostras.....	41
5. Teste de resistência adesiva à microtração (μ TBS).....	41
6. Análise estatística.....	43
IV. RESULTADOS.....	45
V. DISCUSSÃO.....	49
1. Relevância Clínica	58
VI. CONCLUSÃO.....	59

1. Perspetivas futuras	59
<i>VII. BIBLIOGRAFIA</i>	<i>61</i>

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1. Posicionamento da amostra no suporte de acrílico</i>	35
<i>Figura 2. Micrótomo de tecidos duros (Accutom-50, Struers A/S, Ballerup, Denmark) 35</i>	
<i>Figura 3. Calibrador de instrumentos rotatórios.....</i>	36
<i>Figura 4. Paquímetro digital do calibrador de instrumentos rotatórios</i>	36
<i>Figura 5. Preparações cavitárias Classe I.....</i>	36
<i>Figura 6. Esquema representativo da aplicação de ozono, passo a passo. A) Grupo O₃_GAS B) Grupo O₃_AG C) Grupo O₃_AG+GAS.....</i>	38
<i>Figura 7. Esquema representativo do protocolo de aplicação do sistema adesivo</i>	39
<i>Figura 8. Restauração das cavidades com uma altura de 3 mm acima da superfície oclusal, totalizando um build-up de resina de 5,5 mm.....</i>	40
<i>Figura 9. Estufa de incubação (Mettert INE 400, Schwabach, Germany).....</i>	40
<i>Figura 10. Craveira digital (Vogel Germany, Kevelaer, Germany).....</i>	41
<i>Figura 11. Máquina de testes universal (Shimadzu, Autograph AG-IS, Tokyo, Japan) 42</i>	
<i>Figura 12. Figura representativa dos tipos de falhas resultantes</i>	42
<i>Figura 13. Equação da resistência adesiva (Bs) relacionando a força medida pela máquina de testes universais (F) e a área de interface adesiva de cada palito (A).....</i>	43
<i>Figura 14. Gráfico de barras comparativo dos quatro grupos experimentais relativamente ao teste de resistência adesiva (MPa). Foram verificadas diferenças significativas entre os quatro grupos (ANOVA, Z=16,255; p<0,001). As barras de erro apresentadas correspondem aos erros de padrão das médias.....</i>	45

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1. Lista de materiais dentários utilizados</i>	<i>34</i>
<i>Tabela 2. Protocolo de aplicação do ozono nas amostras, passo a passo.....</i>	<i>37</i>
<i>Tabela 3. Protocolo de aplicação do sistema adesivo</i>	<i>39</i>
<i>Tabela 4. Tabela de análise descritiva dos grupos experimentais.....</i>	<i>45</i>
<i>Tabela 5. Resultados do teste ANOVA one-way considerando a resistência adesiva como uma variável dependente entre os grupos e nos grupos.....</i>	<i>46</i>
<i>Tabela 6. Tabela de comparações múltiplas entre os quatros grupos experimentais com a variável dependente (resistência adesiva) recorrendo aos testes Tukey HSD e Games- Howell. Nivel de significância $p=0,05$.</i>	<i>46</i>

LISTA DE SIGLAS

μ TBS – *microtensile bond strength*

ADM - *academy of Dental Materials*

AG – água

ANOVA – análise de variância

Bis-EMA – bisfenol A etoxilado dimetacrilato

Bis-GMA – bisfenol A glicidil metacrilato

GPDM – glicerol-fosfato dimetacrilato

HEMA – 2-hidroxietil metacrilato

LED – longo eixo do dente

MMEP – mono-2-(metacrilóiloxi) ftalato de etilo

MMPs – metaloproteinases da matriz

MPa – megapascal

O₃ – ozono

pH - potencial de hidrogénio

pKa – produto inversamente proporcional da constante de acidez

SiO₂ - Dióxido de silício

TEGDMA – dimetacrilato de trietileno glicol

UDMA – uretano dimetacrilato

UV – ultravioleta

I. INTRODUÇÃO

1. História do ozono

A descoberta do ozono iniciou-se em 1785 quando Van Marum detetou que o ar próximo da sua máquina eletrostática apresentava um odor diferente na presença de partículas elétricas. Mais tarde em 1801, Cruickshank reconheceu o mesmo odor derivado do ânodo durante a eletrólise da água. No entanto, apenas em 1840, este composto foi oficialmente descoberto por Christian Frederick Schönbein que o denominou de “ozono” e em 1856 começou a ser utilizado na desinfecção de salas cirúrgicas (Gupta & Mansi, 2012; Srikanth et al., 2013). No ano seguinte, em 1857, Werner Von Siemens desenvolveu um gerador de ozono denominado de “*Siemens type*” que consiste num gerador dielétrico cilíndrico que integra a maioria dos geradores de ozono atuais (Srikanth et al., 2013).

Ao nível da medicina, a primeira aplicação medicinal do ozono ocorreu em 1870 pelo Dr. C. Lender que utilizou o ozono para purificar o sangue em tubos de ensaio. Mais tarde, o médico dentista Dr. E. A. Fisch, em 1931, começou a utilizar a água ozonizada em procedimentos dentários e na cura de feridas. Posteriormente Dr. E. A. Fisch apresentou o ozono ao alemão Dr. Erwin Payr que o utilizou pela primeira vez numa cirurgia (Almaz & Sönmez, 2015; Srikanth et al., 2013; Suh et al., 2019).

Após a descoberta e implementação do ozono pelo Dr. E. A. Fisch, a sua utilização na medicina e medicina dentária evoluiu existindo, assim, uma maior quantidade de médicos e médicos dentistas a aplicar o composto no seu quotidiano clínico (ISCO3, 2020).

2. Molécula de ozono

O ozono consiste num gás incolor composto por 3 átomos de oxigénio (O_3) presente na atmosfera, no qual consegue filtrar os raios ultravioletas (UV) provenientes do sol e, ainda, manter o equilíbrio biológico da biosfera. A sua formação ocorre na natureza quando os raios UV associam os átomos de oxigénio em grupo de três ou durante as descargas elétricas provocadas pelos trovões e relâmpagos. Desta forma, este composto envolve a terra a uma altitude de 50.000-100.000 pés, de forma a proteger os organismos vivos dos raios UV (Gulafsha & Anuroopa, 2019; Santana et al., 2016; Srikanth et al.,

2013). O ozono, apesar de ser mais pesado do que o ar, desenvolve uma autolimpeza da terra através da limpeza do ar e ligação com os poluentes presentes (Tiwari et al., 2016).

O composto triatômico é um gás altamente instável que depende da temperatura e da pressão, por isso não pode ser armazenado, uma vez que facilmente se decompõe em oxigênio puro. Assim, apresenta um tempo de semivida de 40 minutos a 20°C ou 140 minutos a 0°C e um alto potencial de oxidação (Saini, 2011; Tiwari et al., 2016). A sua produção ocorre através da fotodissociação da molécula de oxigênio em átomos de oxigênio ativado, que por sua vez, reagem com outras moléculas de oxigênio (Naik et al., 2016). Portanto, o ozono, apesar de não ser uma molécula radical, ainda é o terceiro oxidante mais potente, logo a seguir ao flúor (Saini, 2011).

3. Propriedades biológicas

O ozono corresponde a uma molécula oxidante altamente reativa que apresenta propriedades desinfetantes tanto na sua forma gasosa como aquosa, ou seja, tem capacidade bactericida, fungicida e viricida (Naik et al., 2016; Srikanth et al., 2013).

A aplicação do ozono apresenta diversos benefícios como o seu efeito antibacteriano, capacidade imunoestimulante e analgésico, efeito anti-hipóxico, vasodilatador, bioenergético e biossintético (Gupta & Deepa, 2016).

Efeito antibacteriano e antiviral

O ozono produz reações diretas nas moléculas destruindo, de forma indireta, as bactérias devido à produção de radicais livres. Durante a oxidação iniciada pelo ozono, o sistema enzimático é inibido e as glicoproteínas, glicolípidos e aminoácidos são destruídos provocando, por consequência, uma destruição das paredes celulares e membranas citoplasmáticas dos organismos. Subsequentemente, existe um aumento da permeabilidade da membrana que proporciona uma entrada facilitada do ozono no interior das células e morte celular das bactérias (Almaz & Sönmez, 2015). O ozono é eficaz contra bactérias resistentes a antibióticos como as bactérias Gram positivas e anaeróbicas, uma vez que existe um aumento da sua atividade antibacteriana no meio líquido de pH ácido. No que concerne às infeções virais, as células infetadas tornam-se

resistentes ao peróxido provocando uma alteração da transcriptase reversa envolvida na síntese das proteínas, quando existe um contacto com o ozono (Gupta & Mansi, 2012).

Efeito imunoestimulante

O ozono intervém no sistema imunológico humoral e celular, impulsionando o aumento de células imunocompetentes, produção de imunoglobulinas e ativação dos macrófagos. Como tal, a aplicação de ozono é benéfica na ativação do sistema imune em indivíduos imunodeprimidos, dado que diminui a inflamação e estimula a cicatrização. No entanto, é de notar que o efeito depende da dose administrada, uma vez que doses altas podem causar um efeito imunodepressor enquanto doses baixas podem provocar um efeito imunoestimulante (Gulafsha & Anuroopa, 2019; Gupta & Deepa, 2016).

Efeito anti-hipóxico e analgésico

O ozono estimula o transporte de oxigénio no sangue provocando uma alteração do metabolismo celular como a ativação de procedimentos aeróbicos. Assim, a aplicação de doses baixas de ozono ativa enzimas como superóxido dismutase, catalase, desidrogenase e glutathione peroxidase, que são fundamentais na proteção do organismo contra os radicais livres de oxigénio (Gupta & Deepa, 2016; Naik et al., 2016). No que concerne ao efeito analgésico e anti-inflamatório, o ozono pode diminuir a formação de mediadores inflamatórios e mediadores metabólicos da dor através da produção de substâncias como as interleucinas e prostaglandinas (Gulafsha & Anuroopa, 2019; Naik et al., 2016).

Efeito vasodilatador

O ozono é aplicado no tratamento de distúrbios circulatórios, uma vez que previne a criação de agregados de eritrócitos e aumenta a superfície de contacto para o oxigénio. Deste modo, o ozono otimiza o metabolismo dos tecidos inflamados, aumenta a oxigenação e diminui os processos inflamatórios locais. Sob outro ponto de vista, o ozono também apresenta a capacidade de estimular a produção de vasodilatadores como o óxido nítrico, sendo este responsável pela estimulação da angiogénese e dilatação de vénulas e arteríolas (Gupta & Deepa, 2016; Gupta & Mansi, 2012).

Efeito biossintético

O ozono intensifica o mecanismo da síntese proteica. O aumento do número de mitocôndrias e ribossomas permite o aumento da atividade funcional e a regeneração dos tecidos e órgãos (Gulafsha & Anuroopa, 2019).

Remineralização

No ponto de vista da medicina dentária, o ozono apresenta vantagens a nível dentário como a estimulação da remineralização dos tecidos dentários e a dilatação dos túbulos dentinários. Assim, a sua aplicação proporciona uma remoção das proteínas da lesão cariosa e a difusão de iões de cálcio e fósforo (Floare et al., 2022; Gupta & Mansi, 2012; Sen & Sen, 2020).

4. Métodos de administração do ozono

A administração de ozono intraoral inclui a aplicação de ozono na forma de gás, água ou em óleo.

4.1 Ozono em gás

O ozono na forma gasosa é manuseado através de um sistema aberto ou um sistema de aspiração fechado, de forma a impedir a inalação do gás pelas vias respiratórias devido à sua toxicidade (Gupta & Deepa, 2016; Srikanth et al., 2013).

O ozono gasoso é um tratamento não invasivo utilizado com uma maior regularidade na dentisteria e endodontia. Na dentisteria, ozono gasoso é administrado antes da colocação das restaurações diretas devido à sua propriedade desinfetante, para além de atuar também no tratamento de dentes hipomineralizados (Gulafsha & Anuroopa, 2019).

4.2 Água ozonizada

A água ozonizada, apesar de ser a forma de ozono mais económica, demonstra-se eficaz na eliminação de microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, vírus e fungos (Gupta & Deepa, 2016; Srikanth et al 2013). No biofilme, o ozono aquoso

apresenta uma atividade bactericida forte contra as bactérias presentes (Gulafsha & Anuroopa, 2019).

Na medicina dentária, a confecção de água ozonizada é geralmente obtida através de águas de alta pureza e a concentração de ozono dissolvido pode variar entre 1/4 a 1/5 da concentração de gás formado. É de notar que ozono em água refrigerada (2-3°C) tem uma maior solubilidade em comparação com a água em temperatura ambiente. Porém, a água à temperatura ambiente é mais reativa do que a refrigerada e é mais adequada na aplicação intraoral em situações de hipersensibilidade ao frio (ISCO3, 2020).

O ozono na forma aquosa pode ser utilizado devido às suas propriedades desinfetantes e esterilizantes, efeito hemostático, aceleração da cicatrização e melhoria no transporte de oxigénio e nos processos metabólicos (Sandhu, 2021).

4.3 Óleo ozonizado

O óleo ozonizado é obtido a partir de uma reação química desenvolvida nos extratos puros de plantas, de forma a obter um óleo espesso (Gulafsha & Anuroopa, 2019; Sandhu, 2021).

O óleo é utilizado na cura de infeções fúngicas e revela uma eficácia contra *Streptococci*, *Enterococci*, *Staphylococci*, *Pseudomonas*, *Escherichia coli* e *Mycobacteria* (Malik et al 2020).

5. Sistema de produção

Para fins terapêuticos, a produção de ozono é realizada por geradores próprios que permitem que o oxigénio atravesse os tubos de alta voltagem com saídas de 4000 V a 14000 V. Desta forma, existem três mecanismos diferentes na produção do ozono, o sistema ultravioleta, sistema de plasma frio e “*corona discharge system*” (Tiwari et al., 2016).

5.1 Sistema ultravioleta

A luz ultravioleta transmitida permite a divisão da molécula de oxigénio em dois átomos de oxigénio através da absorção da luz emitida. Por consequência, os dois átomos de oxigénio unem-se a uma molécula de oxigénio produzindo o ozono (Sen & Sen, 2020).

Este sistema é responsável pela produção de ozono em baixa concentração e geralmente é utilizado na estética, saunas e na purificação do ar (Gulafsha & Anuroopa 2019; Sen & Sen, 2020).

5.2 Sistema de plasma frio

O oxigénio é ionizado entre dois elétrodos que são divididos por uma barreira dielétrica a uma temperatura de 20°C. Assim, quando se gera uma tensão entre o ânodo e o cátodo forma-se um campo eletrostático que permite a divisão do oxigénio em átomos de oxigénio. Como resultado, os átomos resultantes reagem com outra molécula de oxigénio e formam o ozono (Sen & Sen, 2020).

O sistema de plasma frio é utilizado na purificação do ar e água (Gulafsha & Anuroopa, 2019).

5.3 “Corona discharge system”

No determinado sistema, o plasma é formado no momento que o oxigénio atravessa o sistema “*corona discharge*”. O plasma produz um único átomo de oxigénio que reage com outras moléculas de oxigénio e por consequência produz o ozono (Sen & Sen, 2020).

O sistema “*corona discharge*” produz ozono em concentrações mais altas (3-6%) e por essa razão é mais utilizado na medicina e na medicina dentária. No entanto, durante o processo, existe a formação de óxido nitroso (Gulafsha & Anuroopa, 2019).

6. Ozonoterapia na medicina dentária

A ozonoterapia corresponde a um tratamento médico complementar que utiliza uma mistura de oxigénio-ozono como agente terapêutico proveniente de um gerador médico certificado. Todavia, a aplicação de ozono é um método complementar e não uma

alternativa a um tratamento, ou seja, a ozonoterapia completa os tratamentos, mas não os substitui (ISCO3, 2020).

A ozonoterapia na medicina dentária tem sido cada vez mais utilizada em diversas áreas como periodontologia, endodontia, dentisteria e cirurgia devido ao seu evidente poder de desinfecção. Desta forma, este composto com ação desinfetante, pode ser aplicado no tratamento de cáries, gengivite e periodontite, líquen plano oral, osteonecrose mandibular, tratamento endodôntico, halitose e controlo da dor (Suh et al., 2019).

6.1 Ozonoterapia e dentisteria

A cárie dentária é uma doença multifatorial crónica mediada por bactérias cariogénicas que desmineralizam as estruturas dentárias através de ácidos produzidos pela fermentação de hidratos de carbono (Almaz & Sönmez, 2015; Cellik et al., 2018). A presença de biofilme e a sua composição constituem um dos fatores importantes no desenvolvimento da cárie dentária. À vista disso, a composição da microflora depende do genótipo do indivíduo, ou seja, se a biodiversidade do biofilme for reduzida existe uma maior tendência de desenvolver lesões de cárie (Marsh, 2005). Porém, para além da presença de biofilme e má higiene oral, é imprescindível a presença de hidratos de carbono na cavidade oral. Assim, o consumo excessivo de hidratos de carbono promove a produção de um ambiente ácido que estimula a alteração do equilíbrio da microflora oral, uma vez que permanecem espécies mais tolerantes a ácidos e, ainda, promove desmineralização das estruturas dentárias (Santos et al., 2020).

A desmineralização pode ocorrer em qualquer localização da estrutura dentária coberta pelo biofilme, como o esmalte, dentina ou cemento e pode provocar cavitação dentária, desconforto, dor ou até mesmo perda da peça dentária (Almaz & Sönmez, 2015). Como tal, a cárie tem tendência de se desenvolver em locais onde o biofilme permanece um longo período como os sulcos e fissuras nas superfícies oclusais, superfícies cervicais proximais do ponto de contacto e ao longo da margem gengival. Estes locais são mais propícios a desenvolverem lesões de cárie, uma vez que são localizações protegidas de determinadas influências mecânicas como a ação da língua e das bochechas e a escovagem dentária. O aparecimento de lesões de cárie na cavidade oral não acontece da mesma forma nas diferentes localizações, ou seja, as localizações junto às glândulas

salivares maiores apresentam uma maior proteção à desmineralização devido à capacidade de tampão da saliva (Fejerskov et al. 2015).

O tratamento da cárie envolve a remoção mecânica do tecido mole, descolorado e infetado, de forma a permanecer apenas dentina dura hipermineralizada (Farges et al., 2015). No entanto, a remoção convencional do tecido infetado não garante que todas as bactérias cariogênicas são eliminadas, visto que algumas bactérias remanescentes podem ficar aprisionadas no interior dos túbulos dentinários e na *smear layer*. As bactérias residuais na dentina podem provocar cáries secundárias, como também sensibilidade pós-operatória e inflamação pulpar (Krunić et al., 2018; Nedeljkovic et al., 2015). Assim, uma das razões para existirem falhas nas restaurações está relacionada com a presença de bactérias residuais, e, portanto, a utilização de soluções antibacterianas após a remoção da lesão de cárie e preparação cavitária torna-se bastante vantajoso (Krunić et al., 2018).

A remoção incompleta da cárie com o método *Stepwise excavation* consiste num protocolo minimamente invasivo que tem como objetivo evitar a exposição pulpar em dentes com cáries extensas. Assim, este método permite criar um equilíbrio metabólico entre o biofilme e a dentina desmineralizada promovendo a remineralização do tecido. Durante o tratamento e remoção do tecido cariado deixa-se uma camada fina de dentina cariada interna entre a cavidade e a polpa, uma vez que esta apresenta uma capacidade de remineralização. Desta forma, após um determinado período, o dente tem capacidade de formar dentina terciária evitando, subsequentemente, a possibilidade de existir uma exposição pulpar. A conjugação do método *Stepwise excavation* com a aplicação de ozono demonstrou-se eficaz na redução da quantidade de bactérias devido à sua capacidade de desinfecção (Edwards et al., 2021; Mese et al., 2020).

A dentisteria minimamente invasiva é uma abordagem que é cada vez mais utilizada na prática clínica, sendo que um dos seus objetivos é a manutenção da quantidade de tecido dentário, a fim de preservar os dentes durante um longo período (FDI World Dental Federation, 2017). Esta abordagem tende a ser cada vez mais conservadora, pelo que a implementação de protocolos que visem a remoção minimamente invasiva é cada vez mais estudada. Como tal, a ozonoterapia na medicina dentária surgiu como um novo procedimento no tratamento de doenças orais como a cárie dentária (Sen & Sen, 2020).

O ozono na dentisteria moderna é utilizado para eliminar as bactérias presentes nas lesões cariosas de forma indolor e com segurança, para além de reverter a progressão da cárie dentária, como em casos de cáries incipientes (Garg & Tandon, 2009; Santos et al.,

2020). O ozono, devido à sua propriedade oxidante, tem uma ação disruptiva nas bactérias cariogênicas, visto que descarboxila o ácido mais forte produzido por estas, o ácido pirúvico, em ácido acético e dióxido de carbono. Assim, a remineralização das lesões cariosas incipientes pode ser determinada pelo efeito tampão do fluido da placa durante a produção de ácido acético ou outros ácidos com pKa elevados, uma vez que diminui a extensão da queda do pH da placa (Elsayad, 2010; Floare et al., 2022; Tiwari et al., 2016).

No entanto, dado que o ozono é uma molécula instável que facilmente se converte em oxigênio e a polimerização do material restaurador é inativado por este composto poderá haver uma relação negativa ao combinar os dois compostos. A relação pode surgir porque a reatividade do oxigênio é maior relativamente ao do monómero presente no compósito. Assim, o oxigênio reage com outros radicais livres da cadeia de crescimento e interfere na polimerização, reduzindo a resistência adesiva (Oliveira et al., 2020; Rodrigues et al., 2011).

7. Adesão em dentisteria

A adesão é definida pela união de duas superfícies ou materiais através das forças de atração, não existindo a participação de uma força externa. A adesão pode ser desenvolvida através da formação de ligações químicas primárias (covalente, iônica ou metálica) ou ligações de força secundária (ligações de hidrogênio ou forças de *Van der Waals*). No entanto, independentemente da ligação desenvolvida, a adesão necessita de uma interação forte molecular entre os dois substratos em contacto íntimo (Anusavice et al., 2013; Breschi et al., 2013).

A adesão à estrutura dentária acontece através de quatro tipos de mecanismos, nomeadamente mecânico, por adsorção, por difusão ou combinação dos três mecanismos. A adesão mecânica acontece quando existe penetração mecânica da resina e a formação de *resin tags* no substrato dentário. A adesão por adsorção desenvolve-se quando se cria uma ligação química com os componentes orgânicos (colagénio tipo I) e inorgânicos (hidroxipatite). Por último, a adesão por difusão consiste na precipitação das substâncias no substrato dentário permitindo a ligação mecânica ou química dos monómeros de resina (Ritter et al., 2018).

Para existir uma boa adesão existem diversos fatores importantes que necessitam de serem alcançados como a energia de superfície, molhabilidade e ângulo de contacto.

A energia de superfície consiste num excesso de energia molecular no exterior do material em comparação com o seu interior. Uma energia de superfície elevada torna o material mais suscetível a ligar-se a outro material, de forma a diminuir a sua energia e tornar-se estável. No entanto, para melhorar a adesão é fundamental aumentar a energia de superfície, visto que é necessário unir o substrato dentário ao material restaurador através do adesivo. Desta forma, para aumentar a energia de superfície da estrutura dentária pode-se realizar diversos procedimentos como a profilaxia com pasta de pedrapomes, condicionamento ácido ou aplicação de solventes para eliminar os contaminantes (Anusavice et al., 2013; Breschi et al., 2013).

A molhabilidade é definido pela atração de um líquido pela superfície de um material sólido e pode ser determinado através do ângulo de contacto, isto é, o ângulo formado entre o líquido e a superfície sólida. Uma superfície limpa e lisa apresenta uma melhor molhabilidade, visto que o líquido flui facilmente sobre a superfície formando um ângulo de contacto próximo de 0° . Desta forma, quanto menor o ângulo de contacto ($<90^\circ$), maior será a molhabilidade, energia de superfície e por consequência a adesão. Contudo, se o ângulo de contacto for maior que 90° , a molhabilidade, energia de superfície e adesão serão, por consequência, menores (Anusavice et al., 2013).

Para além destes fatores, existem outras variáveis que influenciam a adesão como a rugosidade da superfície, limpeza, viscosidade do adesivo, mudança dimensional do adesivo e durabilidade do adesivo e da interface. As superfícies rugosas aumentam a área de superfície levando a uma maior probabilidade de interagir com outras moléculas. A viscosidade do adesivo também influencia adesão, visto que um adesivo mais viscoso, como não flui facilmente pela superfície, afeta o contacto íntimo entre os substratos. No que diz respeito à limpeza, é fundamental a limpeza da superfície antes da adesão porque se a superfície for contaminada com sangue, saliva ou água, o contacto íntimo entre a superfície e o adesivo será comprometido. Por fim, durante a polimerização, o adesivo sofre mudanças dimensionais que conduzem a um contração e criação de forças que puxam o adesivo do substrato e danificam a adesão (Breschi et al., 2013).

7.1. Adesão à dentina

A dentina humana é um tecido conjuntivo avascular mineralizado formado, aproximadamente, por 70% de material inorgânico (hidroxipatite), 20% de material orgânico (90% colagénio tipo I e 10% proteínas não colagénicas) e 10% de água (Grawish et al., 2022). O esmalte, devido ao seu elevado conteúdo mineral, recobre e protege a dentina coronária enquanto o cimento envolve a dentina radicular, de forma a fixar os dentes ao osso alveolar (Goldberg et al., 2011). Em comparação com o esmalte, a dentina é menos mineralizada e por consequência menos dura. Porém, o seu conteúdo mineral é relativamente maior do que o cimento que a rodeia (Grawish et al., 2022; Ritter et al., 2018).

A dentina é um substrato complexo permeável que apresenta diversos túbulos dentinários com forma de cone invertido desde a junção amelodentinária ou cemento-dentinária até à câmara pulpar (Marshall et al., 1997; Tjäderhane, 2015). No seu interior existem processos celulares odontoblásticos, ou seja, prolongamentos de odontoblastos, e um fluido composto por proteoglicanos, tenascina, transferrina e albumina (Grawish et al., 2022; Marshall et al., 1997). A densidade e o diâmetro destes túbulos diferem com base na profundidade e localização, sendo que a dentina superficial apresenta uma menor quantidade de túbulos dentinários (15,000 – 20,000 mm^2) em comparação com a dentina junto à polpa (45,000 - 65,000 mm^2). Desta forma, a quantidade de túbulos dentinários presentes influenciam a adesão, ou seja, quando existem menos túbulos, a impregnação da resina ocorre ao nível da dentina intertubular, e nas regiões com mais túbulos, a impregnação acontece na dentina peritubular (Grawish et al., 2022; Hilton et al., 2013; Marshall et al., 1997; Sofan et al., 2017).

No que diz respeito aos tipos de dentina envolvidas nos túbulos dentinários, a dentina intertubular é responsável por rodear e separar os túbulos dentinários, enquanto, a dentina peritubular destaca-se por envolver o lúmen dos túbulos. Porém, ambas as dentinas se diferem uma da outra, visto que a dentina intertubular apresenta uma matriz de colagénio tipo I mineralizada e a dentina peritubular é altamente mineralizada, mas não apresenta fibras de colagénio (Goldberg et al., 2011; Marshall et al., 1997; Özcan & Volpato, 2020; Spencer et al., 2010; Tjäderhane, 2015).

A adesão à dentina, relativamente à adesão do esmalte, é considerada desafiante devido às alterações estruturais dos seus componentes e propriedades como a permeabilidade, humidade e fluxo do fluido dentinário, e a dentina esclerótica. De acordo

com a teoria hidrodinâmica, perante um estímulo externo, o fluido dentinário presente no interior dos túbulos dentinários, movimenta-se e ativa os nervos pulpares provocando dor. Assim, esta teoria afirma que o fluido dentinário é o motivo pelo qual existe hipersensibilidade dentária e umidade na dentina (Gholampour & Jalali, 2018; Pashley & Carvalho, 1997; Perdigão, 2010).

Na preparação mecânica da cavidade existe a formação de detritos orgânicos e inorgânicos que se denominam de *smear layer* na superfície dentária e *smear plugs* no interior dos túbulos dentinários. A *smear layer* é uma camada composta por hidroxiapatite, colagénio desnaturado, biofilme bacteriano e saliva, e a sua espessura e morfologia pode variar com base no tamanho da preparação cavitária. A presença da *smear layer* constitui uma barreira perante a movimentação do fluido, visto que encerra os orifícios dos túbulos dentinários diminuindo a permeabilidade cerca de 86% (Perdigão, 2010; Marshall et al., 1997; Sofan et al., 2017). Para além disso, esta camada de detritos pode também afetar de forma negativa a adesão adequada, dado que apresenta forças coesivas relativamente baixas e interfere com a ação dos monómeros na dentina (Anusavice et al., 2013; Van Meerbeek et al., 2020). Assim, a *smear layer* pode ser eliminada através do condicionamento ácido, porém, existe um aumento da permeabilidade dentinária que também afeta negativamente a resistência de união entre a resina e a dentina porque as resinas hidrofóbicas não se ligam a substratos hidrofílicos (Perdigão, 2010). Após a remoção da *smear layer*, os monómeros adesivos conseguem infiltrar-se entre a rede de colágeno formando uma camada híbrida com melhor qualidade (Özcan & Volpato, 2020).

O condicionamento ácido tem como objetivo criar retenções micromecânicas na superfície dentária, sendo necessário aplicar um ácido e enxaguar com a finalidade de promover uma limpeza e eliminar a *smear layer*, resíduos e hidroxiapatite. Na dentina, a aplicação do ácido ortofosfórico remove a *smear layer* e desmineraliza cerca de 4 a 6 µm expondo as fibras de colagénio, que por sua vez estão suspensas em água (Sofan et al., 2017; Van Meerbeek et al., 2020). Segundo Breschi et al. (2013), o condicionamento ácido prolongado pode provocar uma desmineralização excessiva da dentina intertubular e peritubular resultando numa infiltração incompleta dos monómeros de resina e forças adesivas relativamente baixas. Assim, o tempo máximo de aplicação do ácido ortofosfórico na dentina não deve ultrapassar os 15 segundos (Anusavice et al., 2013; Breschi et al., 2013; Van Meerbeek et al., 2020).

Ao contrário do esmalte, a dentina não deve ser completamente seca, visto que perante a desidratação, as redes de colagénio tendem a colapsar formando uma camada impermeável ao sistema adesivo. Porém, a dentina não deve apresentar uma quantidade de água excessiva porque estará mais suscetível ao aparecimento de infiltrações. Assim, de modo a manter a humidade adequada para a formação da camada híbrida deve-se aplicar um *primer* com o intuito de manter a rede de colagénio hidratada e remover o excesso de água presente na dentina (Anusavice et al., 2013; Breschi et al., 2013; Pashley & Carvalho, 1997).

O adesivo constituiu um dos passos mais importantes na adesão à dentina, uma vez que é necessário preencher os espaços na rede de colagénio, de maneira a formar uma camada híbrida e os *resin tags*.

A camada híbrida representa uma camada desenvolvida na dentina resultante da ação do condicionamento ácido e infiltração da resina adesiva (Nakabayashi et al., 1982). Esta camada tem como finalidade selar a dentina, diminuir a sensibilidade pós-operatória e evitar cáries secundárias (Salvio et al., 2013). A sua qualidade, para além de depender do grau de conversão do adesivo, também depende da efetividade da infiltração da resina, visto que as infiltrações inadequadas de resina podem levar a uma diminuição da adesão e uma maior tendência para degradação hidrolítica (Anusavice et al., 2013; Pashley & Carvalho, 1997). Assim, pode existir fatores que comprometem a infiltração da resina tal como a viscosidade do adesivo e o colapso da rede de colagénio.

Relativamente à longevidade da camada híbrida, esta depende de diversos fatores físicos e químicos. Os fatores físicos incluem as forças oclusais e alterações dimensionais através das alterações da temperatura da cavidade oral, enquanto os fatores químicos englobam os agentes bacterianos e ácidos do fluido dentinário, saliva, comida e bebidas (Anusavice et al., 2013; Breschi et al., 2008). Por outro lado, a durabilidade da camada híbrida pode ser prejudicada devido à sua sensibilidade à degradação hidrolítica. A degradação hidrolítica consiste na hidrólise dos monómeros resinosos, ou seja, destruição dos monómeros através da água e desorganização das fibras de colagénio. As fibras de colagénio expostas são destruídas pelas metaloproteinases de matriz (MMPs), originando uma diminuição da força adesiva e um desenvolvimento de microinfiltração e pigmentação (Özcan & Volpato, 2020).

7.2 Sistemas adesivos

Os sistemas adesivos são monómeros hidrofílicos e hidrofóbicos de resina, cuja sua função é permitir a adesão do substrato dentário ao material restaurador (Perdigão, 2007; Sofan et al., 2017).

Atualmente, os sistemas adesivos dividem-se em duas categorias: (1) pela geração (1^o-8^o geração) e (2) pela estratégia adesiva (Perdigão, 2020). A classificação pela geração agrupa os sistemas adesivos pelas suas características e introdução no mercado, desde a 1^o geração até à 8^o geração. Contudo, a sua nomenclatura é questionável e pouco informativa e, por isso, a classificação mais utilizada baseia-se na estratégia adesiva. (Anusavice et al., 2013; Perdigão, 2020).

A nomenclatura baseada na estratégia adesiva tem em conta a interação do sistema adesivo com o substrato dentário e a *smear layer*. Os sistemas adesivos que incorporam o condicionamento ácido prévio correspondem ao adesivo *etch-and-rinse*, visto que eliminam a *smear layer* e os *smear plugs*. Os adesivos sem condicionamento prévio são denominados de adesivos autocondicionantes, como o sistema *self-etch*, uma vez que não conseguem remover a *smear layer* (Perdigão, 2020). O sistema *etch-and-rinse* pode apresentar três ou dois passos, enquanto o sistema *self-etch* dispõe de um a dois passos. Mais recentemente surgiu o sistema adesivo universal que pode ser utilizado com o método *etch-and-rinse* ou *self-etch* dependendo da situação clínica (Perdigão, 2020).

Os sistemas adesivos incorporam três componentes nomeadamente o ácido, *primer* e o adesivo. O ácido remove a *smear layer* e o conteúdo mineral como a hidroxiapatite, expondo as fibras de colagénio (Breschi et al., 2018; Van Meerbeek et al., 2020). Geralmente, o ácido mais utilizado na adesão é o ácido ortofosfórico com uma concentração entre os 30% e 40% e deve ser removido com água após a sua aplicação no substrato dentário (Perdigão, 2020; Van Meerbeek et al., 2020).

O *primer*, aplicado posteriormente, consiste numa solução hidrofílica e hidrofóbica de monómeros resinosos que proporcionam a impregnação dos monómeros de resina na dentina e evitam o colapso das fibras de colagénio. O monómero 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) é um dos monómeros mais utilizados no *primer*, uma vez que apresenta uma elevada hidrofília e características químicas semelhantes aos dos solventes (Anusavice et al., 2013; Breschi et al., 2018; Pashley & Carvalho, 1997). Os solventes (acetona, etanol e água) também são incorporados no *primer* com o intuito de melhorar a molhabilidade e a mobilidade molecular e diminuir a viscosidade. Para garantir uma infiltração adequada

é necessário aplicar durante 10-20 segundos e secar para evaporar os solventes presentes, sendo que, a secagem inadequada pode comprometer a adesão à dentina. Assim, o tempo recomendado para secar o *primer* corresponde a pelo menos 10 segundos (Anusavice et al., 2013; Breschi et al., 2013; Van Meerbeek et al., 2020).

Por fim, o *bond* apresenta uma mistura de monómeros com carácter hidrofóbico (bis-GMA, TEGDMA e UDMA) que possibilitam a difusão do adesivo na dentina infiltrada com o *primer*. Assim, a resina adesiva para além de aprimorar a polimerização do *primer* também melhora as propriedades mecânicas do adesivo e da camada híbrida, visto que estabiliza a camada híbrida e forma *resin tags* no interior dos túbulos dentinários (Anusavice et al., 2013; Breschi et al., 2018; Perdigão, 2020; Van Meerbeek et al., 1998)

7.2.1 Sistema adesivo *etch-and-rinse*

O sistema adesivo *etch-and-rinse* de três passos é considerado o *gold standard* dos sistemas adesivos e, por isso, requer a aplicação prévia do ácido ortofosfórico, seguida da aplicação do *primer* e do *bond* (Breschi et al., 2013; Sofan et al., 2017; Van Meerbeek et al., 2020). Por outro lado, o sistema *etch-and-rinse* de dois passos, tal como o anterior, inicia-se com o condicionamento prévio com o ácido, no entanto, a etapa seguinte modifica-se porque existe a incorporação do *primer* e do *bond* no mesmo frasco.

O sistema *etch-and-rinse* de três passos procede à aplicação de um ácido forte, nomeadamente o ácido ortofosfórico de 30-40%, de forma isolada, com o intuito de desmineralizar o esmalte e a dentina cerca de 4 a 6 µm de profundidade e remover a *smear layer* (Perdigão, 2020; Sofan et al., 2017; Van Meerbeek et al., 2020). Após a aplicação do ácido é imprescindível enxaguar com água, de forma a remover o ácido do substrato dentário e secar. Porém, ao contrário do esmalte, a dentina não pode ser secada excessivamente devido à presença das fibras de colagénio (Perdigão, 2020; Van Meerbeek et al., 2020). Assim, de forma a manter a humidade da dentina, deve-se aplicar o *primer* durante 15 segundos, de forma a hidratar novamente as fibras de colagénio e secar gentilmente até evaporar os solventes (Van Meerbeek et al., 2020).

A última etapa limita-se à aplicação do *bond* numa camada espessa possibilitando a infiltração dos monómeros hidrofóbicos nos túbulos dentinários e entre as fibras de colagénio. Posteriormente, procede-se à fotopolimerização da resina adesiva com o

propósito de estabilizar a interface adesiva e formar a camada híbrida e as *resin tags* (Cardoso et al., 2011; Van Meerbeek et al., 2020).

O sistema adesivo *etch-and-rinse* de dois passos, apesar de ser uma técnica mais simples, os seus resultados são inferiores em comparação com o *etch-and-rinse* de três passos. A conjugação do *primer* e do *bond* numa única etapa apresenta uma capacidade limitada de infiltração na dentina desmineralizada e uma maior tendência de degradação hidrolítica da camada híbrida (Cardoso et al., 2011).

A técnica *etch-and-rinse* é um método eficaz na adesão da dentina e esmalte, no entanto, o seu principal problema centra-se na desmineralização excessiva da dentina com a exposição das fibras de colagénio. Como referido anteriormente, a desidratação da dentina pode provocar o colapso das fibras de colagénio e por consequência uma diminuição da resistência adesiva (Van Meerbeek et al., 2020). Outro ponto negativo desta técnica é a capacidade de degradação através de enzimas metaloproteinases de matriz. As enzimas metaloproteinases de matriz (MMPs) degradam o colagénio presente na camada híbrida, diminuindo a durabilidade das restaurações. Geralmente, estas enzimas são ativadas durante a aplicação do ácido ortofosfórico (Perdigão, 2020; Van Meerbeek et al., 2020).

8. Estudos para avaliação da resistência adesiva

Os testes *in vitro* apresentam uma elevada importância no fornecimento de novas informações fidedignas no desenvolvimento de materiais dentários. De forma a compreender e aperfeiçoar o desempenho clínico dos materiais é indispensável a realização de diversos testes de resistência (Armstrong et al., 2017; Van Meerbeek et al., 2010).

Segundo Van Meerbeek e colaboradores (2010), os testes ideais de resistência adesiva, para além da sua rapidez e facilidade, devem apresentar a possibilidade de avaliar uma variável, mantendo as restantes inalteráveis e ainda comparar diversos materiais e/ou técnicas. Devem ainda permitir a avaliação simultânea de diversos grupos experimentais utilizando instrumentos mais económicos. Posto isto, o objetivo principal dos testes de resistência reside na recolha de informações suficientes que contribuem para os resultados experimentais.

A adesão ao substrato dentário deve garantir uma resistência adequada às forças intraorais, um bom selamento marginal e uma elevada durabilidade (Armstrong et al., 2017). Surgem desta forma, diversas metodologias de teste utilizadas na medição da adesão à dentina e ao esmalte, como os testes de resistência macro ou micro. Por norma, os testes macro abrangem uma área de interface adesiva superior a 3 mm², enquanto os testes micro envolvem uma área igual ou inferior a 1 mm² (Van Meerbeek et al., 2010).

8.1 Resistência adesiva à microtração (μ TBS)

Em 1994, Sano e colaboradores introduziram nos testes micro, um novo teste correspondente à resistência adesiva à microtração (μ TBS) com o intuito de avaliar a resistência à tração e o módulo de elasticidade da dentina (Armstrong et al., 2010; Sano et al., 2020; Van Meerbeek et al., 2010). Os testes micro, como referido anteriormente, admite a uma área de interface adesiva igual ou inferior a 1 mm², assim, o mesmo dente é seccionado em amostras pequenas possibilitando um maior número de testes (Van Meerbeek et al., 2010).

Em comparação com os testes de adesão macro, os μ TBS possuem mais vantagens como a utilização económica de dentes, uma distribuição de tensão superior e um melhor controlo da avaliação regional como por exemplo a diferenciação da dentina periférica e dentina central. Por essa razão, a resistência à microtração demonstrou um desempenho relativamente superior na análise da adesão em comparação com os métodos tradicionais como a resistência ao cisalhamento (Van Meerbeek et al., 2010). Contudo, os testes de microtração podem apresentar desvantagens como a desidratação e danos nas amostras, para além de existir a possibilidade de as amostras após a fratura serem perdidas durante a sua remoção da máquina (Armstrong et al. 2010).

8.2 Norma de orientação da *Academy of Dental Materials* (ADM)

Na atualidade, a norma ISO/TS 11405:2015 está desatualizada, pelo que não é utilizada nos testes de adesão à estrutura dentária. Portanto, os testes de microtração realizados e as suas recomendações para a investigação são regidas pelas diretrizes da *Academy of Dental Materials* (ADM). A norma evidencia um protocolo e um guia para o desenvolvimento dos testes de microtração, de forma a padronizar os procedimentos e a sua repetição (Armstrong et al., 2017).

9. Enquadramento

A cárie dentária corresponde a uma doença multifatorial que afeta os tecidos duros orais, sendo que um dos seus principais fatores para ocorrer é a presença de bactérias cariogénicas (Cangul et al., 2020). A diminuição das bactérias cariogénicas no biofilme é um dos critérios preventivos para impossibilitar o aparecimento de cáries e tratar a doença. No entanto, o tratamento mecânico convencional não consegue remover totalmente o tecido infetado, podendo assim, permanecer bactérias remanescentes por baixo das restaurações (Almaz & Sönmez, 2015; Farges et al., 2015). Visto que as cáries secundárias podem estar associadas à acumulação de bactérias por baixo das restaurações, a aplicação de agentes antimicrobianos pode ser vantajosa na sua remoção e prevenção do reaparecimento (Almaz & Sönmez, 2015).

Atualmente, o ozono tem sido cada vez mais promissor na medicina dentária devido às suas propriedades antimicrobianas e elevada capacidade de oxidação (Almaz & Sönmez, 2015). Por esse motivo, os profissionais têm vindo a utilizar este composto na sua prática clínica, uma vez que elimina as bactérias cariogénicas presentes de uma forma indolor e segura e, ainda, reverte a progressão da cárie dentária (Garg & Tandon, 2009; Santos et al., 2020).

Por outro lado, estudos indicam que o ozono, após a sua aplicação, é extremamente instável e por isso decompõe-se em radicais livres de oxigénio, que por sua vez, inibem a polimerização do material restaurador. Por consequência, pode existir uma diminuição na eficácia adesiva e comprometimento da estabilidade da interface adesiva resultante da acumulação de oxigénio residual e desnaturação do complexo de proteínas presentes na matriz orgânica da dentina (Can et al., 2022; Cadenaro et al., 2009; Garcia et al., 2012).

Tendo em conta este dilema e a escassez de artigos é importante investigar o efeito de diversas formas de ozono na resistência adesiva da dentina através de testes de microtração (μ TBS). A dentina poderá beneficiar da aplicação do ozono, no entanto, a adesão à dentina pode ser considerada difícil. Assim, este estudo permite analisar se existe compromisso na adesão à dentina após aplicação de ozono nas diversas formas (água e/ou gás).

II. OBJETIVOS

O objetivo do estudo *in vitro* corresponde à avaliação da resistência adesiva na dentina, por microtração, após a aplicação do ozono.

1. Hipóteses de estudo

Hipótese Nula: A aplicação de ozono, antes da restauração, não apresenta diferenças significativas na resistência adesiva da dentina.

Hipótese alternativa: A aplicação de ozono, antes da restauração, apresenta diferenças significativas na resistência adesiva da dentina.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Local do Estudo

O estudo experimental em questão decorreu no Laboratório de Biomateriais da Egas Moniz School of Health and Science (Anexo II), sendo que, o mesmo, foi aceite pela Comissão de Ética com o respetivo número do processo interno 1137 (Anexo III).

2. Seleção das amostras

No estudo foram selecionados vinte molares humanos hígidos sem cáries, tratamentos endodônticos e/ou restaurações cedidos pelo Banco de Dentes Humano da Clínica Dentária Universitária Egas Moniz (Anexo IV). As extrações dos dentes ocorreram no máximo 6 meses antes do estudo e após a extração, as amostras foram armazenadas em cloramina T trihidratada a 0,5%. Posteriormente, os dentes foram limpos e desinfetados com uma solução de cloramina T trihidratada a 0,5% e armazenados em água destilada a 4-7°C de temperatura. A água destilada foi trocada semanalmente até à data da preparação cavitária, de modo a evitar a decomposição da amostra (Armstrong et al., 2017).

No seguinte estudo, o principal objetivo foi verificar a resistência adesiva na dentina após a aplicação de diversas formas do ozono. Por essa razão, as amostras selecionadas foram distribuídas aleatoriamente em 4 grupos (n=5):

- Grupo CTR (n=5): Sem aplicação do ozono (controlo).
- Grupo O₃_GAS (n=5): Aplicação de ozono gasoso com uma concentração de 40 µg/mL durante 80 segundos.
- Grupo O₃_AG (n=5): Aplicação de 100 mL de água ozonizada com uma concentração de 80 µg/mL.
- Grupo O₃_AG+GAS (n=5): Aplicação de 100 mL de água ozonizada com uma concentração de 80 µg, seguida da aplicação de 40 µg/mL de ozono gasoso durante 80 segundos.

3. Materiais

Os materiais utilizados no decorrer do estudo experimental foram listados na Tabela 1 com base na sua composição:

Tabela 1. Lista de materiais dentários utilizados

Material	Composição	Lote	Validade
Ácido ortofosfórico (Bestdent, Hebei, China)	Ácido ortofosfórico a 37%.	31222	12/2024
Optibond™ FL (Kerr Corporation, Orange, CA, USA)	Primer: 2-hidroxietil metacrilato (HEMA), glicerol-fosfato dimetacrilato (GPDM), mono-2-(metacrilóiloxi) ftalato de etilo (MMEP), água, etanol, fotoiniciador (canforoquinona), hidroxitolueno butilado. Bond: Bisfenol A glicidil metacrilato (Bis-GMA), HEMA, GPDM, uretano dimetacrilato (UDMA), fotoiniciador (canforoquinona), partículas (SiO ₂ , vidro de bário, aluminoborosilicato, fator de acoplamento A174).	Primer: 9668388 Bond: 9389738	31/03/2025 31/05/2024
Resina Filtek Z250 (3M ESPE, Seefeld, Germany)	Cerâmica tratada com silano, bisfenol A etoxilado dimetacrilato (Bis-EMA), UDMA, Bis-GMA, dimetacrilato de trietileno glicol (TEGDMA), óxido de alumínio e óxido de titânio.	9675474	11/12/2025
Cola Zapit (Dental Ventures of America, Corona, CA, USA)	Base: Etil-2-cianoacrilato, polimetilmetacrilato, hidroquinona. Acelerador: Heptano, acetona, N, N-dimetil-p-toluidina.	-	-

4. Preparação das amostras

Na fase inicial, os dentes foram posicionados, com cera colante, no suporte de acrílico (Figura 1), de modo a serem seccionados no micrótomo de tecidos duros (Accutom-50, Struers A/S, Ballerup, Denmark) (Figura 2). O corte perpendicular ao longo eixo do dente (LED) foi realizado abaixo da junção amelocementária, com o intuito de separar a raiz da porção coronária.



Figura 1. Posicionamento da amostra no suporte de acrílico



Figura 2. Micrótomo de tecidos duros (Accutom-50, Struers A/S, Ballerup, Denmark)

Após o corte das raízes das amostras, a polpa dentária foi eliminada do interior da câmara pulpar utilizando uma colher de dentina e preencheu-se com cola cianoacrilato (Pecol, Águeda, Portugal).

4.1 Preparação da cavidade

Para a realização da cavidade Classe I, as porções coronárias das amostras foram posicionadas no suporte de acrílico com cera colante, a fim de serem colocadas no calibrador de instrumentos rotatórios (Figura 3). O calibrador apresenta um paralelômetro que permite a colocação da turbina em diversas posições para realizar as cavidades (Manso et al., 2011). Assim, para iniciar a preparação da cavidade, a broca cilíndrica de extremidade reta foi colocada paralelamente ao longo eixo do dente (LED) das amostras, no sulco central da superfície oclusal. É de notar que o suporte acrílico e a base do calibrador de instrumentos estão paralelos ao chão e os parafusos manuais bem apertados, de forma a padronizar as cavidades realizadas.

A profundidade e as dimensões da cavidade são medidas em milímetros através do paquímetro digital integrado no calibrador de instrumentos rotatórios (Figura 4).

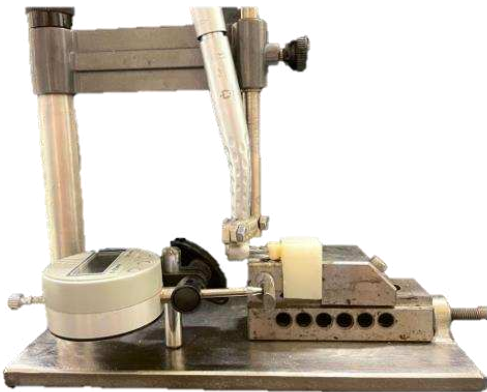


Figura 3. Calibrador de instrumentos rotatórios



Figura 4. Paquímetro digital do calibrador de instrumentos rotatórios

De modo a garantir que a preparação da cavidade seja efetuada num substrato de dentina, foram realizadas cavidades de Classe I (Figura 5) com uma profundidade de 2,5 mm e um comprimento e largura, nomeadamente, de 4 mm x 5 mm, com uma irrigação abundante de água (Makishi et al., 2015).



Figura 5. Preparações cavitárias Classe I

4.2 Aplicação do ozono

Após a realização das cavidades Classe I, as amostras foram submetidas a diferentes formas de ozono, consoante o grupo a que foram distribuídas (Tabela 2):

Tabela 2. Protocolo de aplicação do ozono nas amostras, passo a passo

GRUPO	PROTOCOLO EXPERIMENTAL
Grupo CTR	1. Sem aplicação do ozono.
Grupo O₃_GAS (Figura 6.A)	<p>1. Programar o gerador Ozonette Dent (Sedecal, Madrid, Spain) no modo contínuo a uma concentração de 40 µg/mL, acoplado a uma garrafa de oxigénio medicinal (Nippon Gases, Maia, Portugal).</p> <p>2. Com recurso a um extensor e uma agulha de irrigação Sterican (B Braun, Melsungen, Germany) insuflar o ozono diretamente na cavidade durante os 80 segundos.</p>
Grupo O₃_AG (Figura 6.B)	<p>1. Colocar 1 L de água de osmose reversa refrigerada a 4°C obtida através do sistema Mili Q (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) na coluna de ozonização (Philozon, Nova esperança, Brasil).</p> <p>2. Programar o gerador Ozonette Dent (Sedecal, Madrid, Spain) no modo contínuo a uma concentração de 80 µg/mL a 30 L/H durante 5 minutos, de forma a obter a água ozonizada. O gerador está acoplado a uma garrafa de oxigénio medicinal (Nippon Gases, Maia, Portugal).</p> <p>3. Colocar 100 mL de água ozonizada no interior da cavidade com uma seringa Omnifix (B Braun, Melsungen, Germany) e agulha de irrigação Sterican (B Braun, Melsungen, Germany) durante 80 segundos.</p>
Grupo O₃_AG+GAS (Figura 6.C)	<p>1. Preparar a água ozonizada conforme o procedimento descrito no grupo O₃_AG.</p> <p>3. Colocar 100 mL de água ozonizada no interior da cavidade com uma seringa Omnifix (B Braun, Melsungen, Germany) e agulha</p>

	<p>de irrigação Sterican (B Braun, Melsungen, Germany) durante 80 segundos.</p> <p>4. Após a irrigação da cavidade com água ozonizada aplicar o ozono na sua forma gasosa.</p> <p>5. Programar o gerador Ozonette Dent (Sedecal, Madrid, Spain) no modo contínuo a uma concentração de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, acoplado a uma garrafa de oxigênio medicinal (Nippon Gases, Maia, Portugal).</p> <p>2. Com recurso a um extensor e uma agulha de irrigação Sterican (B Braun, Melsungen, Germany) insuflar o ozono diretamente na cavidade durante os 80 segundos.</p>
--	--



Figura 6. Esquema representativo da aplicação de ozono, passo a passo. A) Grupo O₃_GAS B) Grupo O₃_AG C) Grupo O₃_AG+GAS

4.3 Protocolo adesivo e restauração das amostras

Seguidamente procedeu-se à aplicação do sistema adesivo Optibond™ FL (Kerr Corporation, Orange, CA, USA) em todas as amostras com a técnica *etch-and-rinse*, segundo as instruções do fabricante (Tabela 3 e Figura 7):

Tabela 3. Protocolo de aplicação do sistema adesivo

Técnica de aplicação do sistema adesivo
1. Aplicação de ácido ortofosfórico 37% durante 15 segundos no esmalte e dentina, seguida de uma lavagem de 15 segundos com o intuito de remover o ácido aplicado e uma secagem minuciosa, de forma evitar a desidratação da dentina.
2. Aplicar o <i>primer</i> , no esmalte e dentina, com um <i>microbrush</i> e realizar movimentos circulares durante 15 segundos.
3. Secar durante 5 segundos para evaporar os solventes.
4. Aplicação do <i>bond</i> com um <i>microbrush</i> e esfregar em movimentos circulares durante 15 segundos
5. Secar durante 5 segundos e fotopolimerizar durante 10 segundos

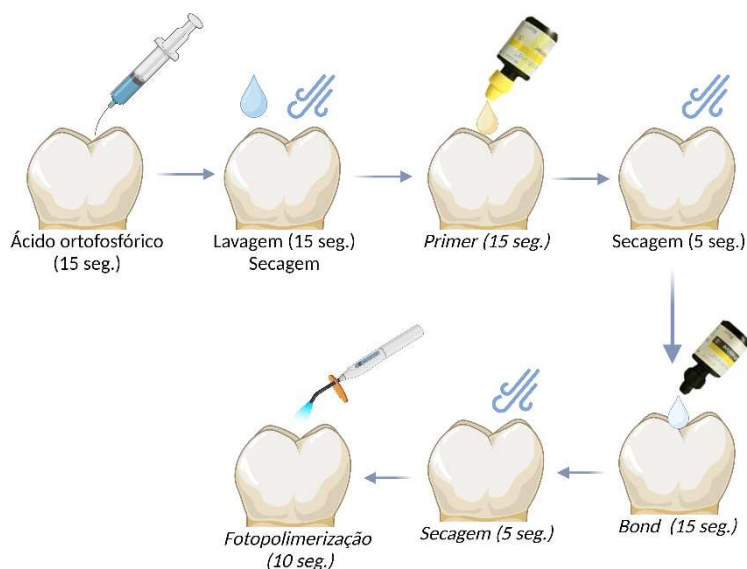


Figura 7. Esquema representativo do protocolo de aplicação do sistema adesivo

Após a aplicação do sistema adesivo, as cavidades foram restauradas com resina composta microhíbrida Filtek Z250 cor A2 (3M ESPE, Seefeld, Germany) em incrementos de 2 mm até atingir uma altura de 3 mm acima da superfície oclusal (Figura 8), totalizando um *build-up* de resina de 5,5 mm (Armstrong et al., 2017). Os incrementos realizados foram fotopolimerizados durante 20 segundos através do fotopolimerizador Elipar™ DeepCure-S (3M ESPE, Seefeld, Germany) com uma intensidade de 900 mW/cm² medidos através do radiômetro Optilux Radiometer (Kerr, Orange, CA, USA). A medição da intensidade do fotopolimerizador foi repetida a cada três utilizações.



Figura 8. Restauração das cavidades com uma altura de 3 mm acima da superfície oclusal, totalizando um build-up de resina de 5,5 mm.

No final da restauração, as amostras foram colocadas na estufa (Memmert INE 400, Schwabach, Germany) (Figura 9) a 37°C, armazenadas em água destilada, durante 24 horas.



Figura 9. Estufa de incubação (Memmert INE 400, Schwabach, Germany)

4.4 Corte das amostras

Antes de iniciar o corte das amostras em palitos, a restauração foi marcada com uma caneta de acetato vermelha, de forma a facilitar a sua identificação após o corte.

As amostras foram novamente posicionadas no suporte de acrílico com cera colante e colocadas no micrótomo de tecidos duros (Accutom-50, Struers A/S, Ballerup, Denmark) a uma baixa rotação, a fim de serem seccionadas longitudinalmente nos sentidos vestibulo-lingual e mesio-distal. No final dos cortes obtiveram-se palitos com uma secção transversal de $1 \pm 0,3 \text{ mm}^2$, sendo que os palitos de esmalte foram descartados.

5. Teste de resistência adesiva à microtração (μ TBS)

As dimensões de cada palito foram registadas com uma craveira digital (Vogel Germany, Kevelaer, Germany) (Figura 10), com o intuito de calcular a área da secção transversal da interface adesiva.

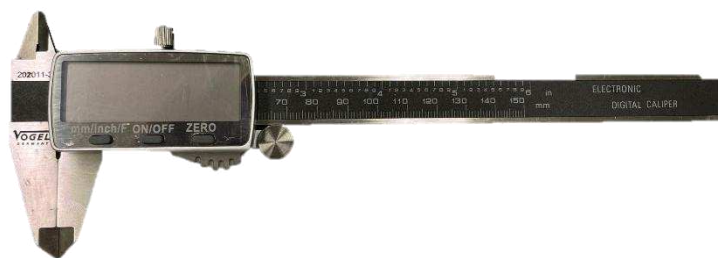


Figura 10. Craveira digital (Vogel Germany, Kevelaer, Germany)

Os palitos resultantes foram colados com cola cianoacrilato (Zapit, Dental Ventures of America, Corona, CA, USA) nos *jigs* metálicos de aço inoxidável, de forma a serem submetidos a forças de microtração na máquina de testes universal (Shimadzu, Autograph AG-IS, Tokyo, Japan) (Figura 11), a uma velocidade de 0,5 mm/min e uma célula de carga de 0,5 N (Armstrong et al., 2017).

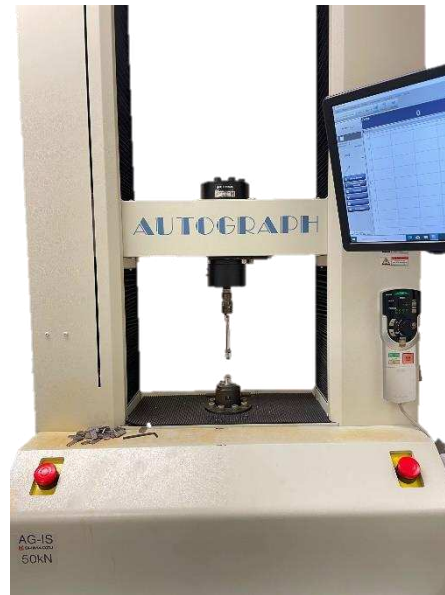


Figura 11. Máquina de testes universal (Shimadzu, Autograph AG-IS, Tokyo, Japan)

As falhas resultantes foram observadas através de uma lupa estereoscópica (EMZ-8TR, MejiTechno Co., Ltd., Saitama, Japan), com o intuito de classificar as falhas em (Figura 12):

- Falha adesiva: Fratura na interface adesiva;
- Falha coesiva dentina: Fratura a nível da dentina;
- Falha coesiva resina: Fratura a nível da resina;
- Falha mista: Fratura tanto na interface adesiva, como também na dentina ou resina.

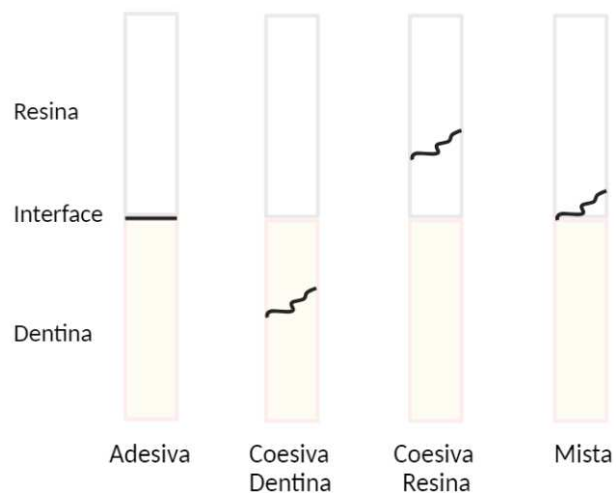


Figura 12. Figura representativa dos tipos de falhas resultantes

Os valores da força de tensão aplicada na fratura (N) e a área dos palitos (mm^2) foram registrados para posteriormente calcular o valor da resistência adesiva (μTBS) em MPa, de acordo com a fórmula (Figura 13).

$$Bs = \frac{F}{A}$$

Figura 13. Equação da resistência adesiva (B_s) relacionando a força medida pela máquina de testes universais (F) e a área de interface adesiva de cada palito (A).

Apenas as fraturas adesivas foram contabilizadas para o cálculo da resistência adesiva à microtração, ainda assim, as falhas pré-testes foram anotadas com um valor de 0 MPa (Armstrong et al., 2017). As fraturas adesivas, coesivas e mistas encontram-se detalhadas no Anexo V.

6. Análise estatística

De forma analisar e comparar a resistência adesiva à microtração (μTBS) dos diversos grupos foi utilizado o programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 28.0, com um nível de significância de 5%, de forma a aceitar a hipótese nula, caso $p \geq 0,05$.

Os grupos foram avaliados através de uma análise de variância (ANOVA) *one-way*, para verificar se as diferentes estratégias de ozono influenciaram a resistência adesiva à dentina por microtração (μTBS). Para analisar as diferenças significativas entre os diversos grupos foram utilizados dois testes, nomeadamente o *Tukey HSD* e *Games-Howell*.

IV. RESULTADOS

Para analisar os dados de cada grupo foi realizado uma tabela de análise descritiva que engloba a média da resistência adesiva em MPa, desvio-padrão e o erro padrão dos grupos experimentais (Tabela 4).

Tabela 4. Tabela de análise descritiva dos grupos experimentais

Descritivas								
Resistência Adesiva								
	N	Média	Desvio padrão	Erro Padrão	95% de Intervalo de Confiança para Média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
Controlo	5	33,2877	9,37736	4,19368	21,6441	44,9312	25,07	49,21
O3_GAS	5	15,2529	5,98761	2,67774	7,8183	22,6875	8,89	23,55
O3_AG	5	8,0871	1,65845	,74168	6,0278	10,1463	6,42	10,66
O3_AG+GAS	5	12,6469	4,86908	2,17752	6,6012	18,6927	6,54	17,95
Total	20	17,3186	11,31509	2,53013	12,0230	22,6143	6,42	49,21

Os resultados obtidos através do teste de resistência adesiva à microtração (μ TBS) encontram-se ilustrados na Figura 14. Com recurso ao teste ANOVA *one-way* (Tabela 5) foram verificadas diferenças estatisticamente significativas ($Z=16,255$; $p<0,001$) entre os grupos, chegando à conclusão de que os diversos métodos de aplicação de ozono afetam a média de resistência adesiva à microtração.

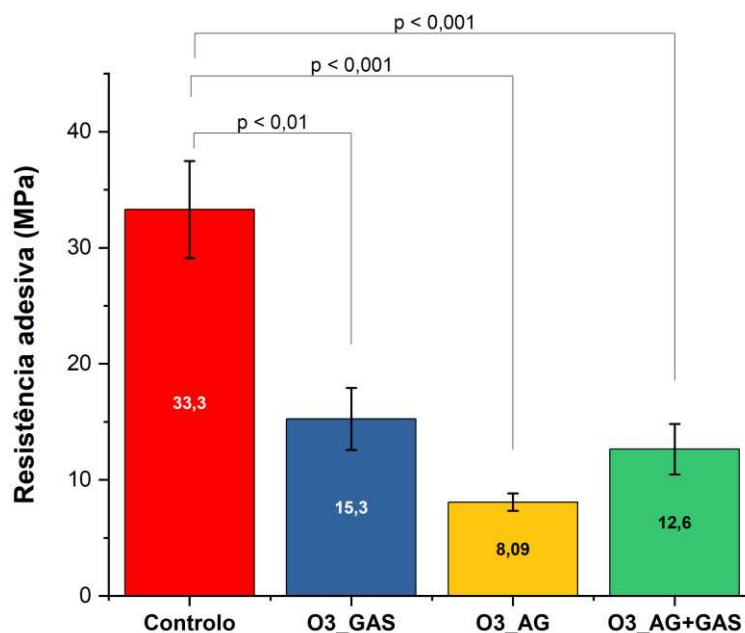


Figura 14. Gráfico de barras comparativo dos quatro grupos experimentais relativamente ao teste de resistência adesiva (MPa). Foram verificadas diferenças significativas entre os quatro grupos (ANOVA, $Z=16,255$; $p<0,001$). As barras de erro apresentadas correspondem aos erros de padrão das médias.

Tabela 5. Resultados do teste ANOVA one-way considerando a resistência adesiva como uma variável dependente entre os grupos e nos grupos.

ANOVA					
Resistência Adesiva					
	Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	Z	Sig.
Entre Grupos	1831,616	3	610,539	16,255	<,001
Nos grupos	600,979	16	37,561		
Total	2432,595	19			

Devido às diferenças significativas entre os grupos registrados no teste ANOVA one-way foi realizado uma tabela de comparação múltipla entre os diversos grupos (Tabela 6) recorrendo aos testes *Tukey HSD* e *Games-Howell* com um nível de significância $p=0,05$.

Tabela 6. Tabela de comparações múltiplas entre os quatros grupos experimentais com a variável dependente (resistência adesiva) recorrendo aos testes *Tukey HSD* e *Games-Howell*. Nível de significância $p=0,05$.

Comparações múltiplas							
Variável dependente: Resistência Adesiva							
	(I) Grupo Experimental	(J) Grupo Experimental	Diferença média (I-J)	Erro Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%	
						Limite inferior	Limite superior
Tukey HSD	Controlo	O3_GAS	18,03476*	3,87614	,001	6,9450	29,1245
		O3_AG	25,20058*	3,87614	<,001	14,1109	36,2903
		O3_AG+GAS	20,64072*	3,87614	<,001	9,5510	31,7304
	O3_GAS	Controlo	-18,03476*	3,87614	,001	-29,1245	-6,9450
		O3_AG	7,16582	3,87614	,288	-3,9239	18,2555
		O3_AG+GAS	2,60596	3,87614	,906	-8,4838	13,6957
	O3_AG	Controlo	-25,20058*	3,87614	<,001	-36,2903	-14,1109
		O3_GAS	-7,16582	3,87614	,288	-18,2555	3,9239
		O3_AG+GAS	-4,55986	3,87614	,650	-15,6496	6,5299
	O3_AG+GAS	Controlo	-20,64071*	3,87614	<,001	-31,7304	-9,5510
		O3_GAS	-2,60596	3,87614	,906	-13,6957	8,4838
		O3_AG	4,55986	3,87614	,650	-6,5299	15,6496
Games-Howell	Controlo	O3_GAS	18,03476*	4,97567	,035	1,4325	34,6370
		O3_AG	25,20058*	4,25876	,012	8,3627	42,0385
		O3_AG+GAS	20,64072*	4,72531	,018	4,2923	36,9892
	O3_GAS	Controlo	-18,03476*	4,97567	,035	-34,6370	-1,4325
		O3_AG	7,16582	2,77856	,168	-3,4298	17,7614
		O3_AG+GAS	2,60596	3,45136	,872	-8,5531	13,7650
	O3_AG	Controlo	-25,20058*	4,25876	,012	-42,0385	-8,3627
		O3_GAS	-7,16582	2,77856	,168	-17,7614	3,4298
		O3_AG+GAS	-4,55986	2,30037	,308	-13,1045	3,9848
	O3_AG+GAS	Controlo	-20,64071*	4,72531	,018	-36,9892	-4,2923
		O3_GAS	-2,60596	3,45136	,872	-13,7650	8,5531
		O3_AG	4,55986	2,30037	,308	-3,9848	13,1045

*. A diferença média é significativa no nível 0.05.

Através do teste *Tukey HSD*, o grupo de controlo (CTR) regista diferenças significativas comparativamente com o grupo O₃_GAS ($p=0,001$), O₃_AG ($p<0,001$) e O₃_AG+GAS ($p<0,001$). No entanto, entre os grupos de aplicação de ozono não se verificaram diferenças significativas ($p>0,05$).

De forma a complementar o teste anterior, o teste *Games-Howell* relata que o grupo de controlo (CTR) apresenta diferenças significativas relativamente ao grupo O₃_GAS ($p=0,035$), O₃_AG ($p=0,012$) e O₃_AG+GAS ($p=0,018$). Tal como o teste *Tukey HSD*, não se verificaram diferenças significativas entre os grupos experimentais de aplicação de ozono (O₃_GAS, O₃_AG e O₃_AG+GAS), uma vez que entre eles, a diferença média era superior a 0,05.

V. DISCUSSÃO

A medicina dentária conservadora tem evoluído nos últimos anos, sendo fundamental estudar novas aplicações e métodos que permitam conservar a estrutura dentária. Um dos métodos, que tem sido cada vez mais implementado na prática clínica, é a aplicação de ozono previamente a uma restauração definitiva, visto que este composto é um desinfetante eficaz contra as bactérias cariogénicas (Cadenaro et al., 2009). Atualmente, o ozono permite remover as bactérias cariogénicas remanescentes que ficam aprisionadas no interior dos túbulos dentinários ou na *smear layer*, de forma a evitar o aparecimento de cáries secundárias, falhas nas restaurações, pulpites irreversíveis, periodontite apical ou necrose (Cadenaro et al., 2009; Can et al., 2022; Kapdan & Öztaş, 2013).

A adesão à dentina continua a ser um problema em comparação com o esmalte devido à complexidade da estrutura dentária. As alterações fisiológicas na dentina provocadas pela cárie dentária, como a dentina terciária, podem provocar um aumento de espessura da dentina, que por sua vez, afeta a permeabilidade da dentina e a adesão (Perdigão, 2020).

Com a desmineralização, a hidroxiapatite presente na dentina é removida expondo, assim, as fibras de colagénio que estão suspensas em água. Ao contrário do esmalte, a dentina necessita de manter a sua hidratação, a fim de assegurar a estabilidade da rede de colagénio e garantir a formação da camada híbrida. Se não existir uma hidratação adequada, as fibras de colagénio colapsam e impendem a infiltração correta do adesivo podendo, assim, interferir na formação de uma boa camada híbrida (Anusavice et al., 2013).

A hibridação da dentina corresponde ao resultado da associação molecular de polímeros adesivos e o tecido dentário duro. Como consequência deste processo é formado uma camada híbrida que, para além de oferecer uma adesão estável, permite estabelecer uma impermeabilidade contra as bactérias e fluidos da cavidade oral (Nakabayashi & Pashley, 1998). Uma vez estabelecida, a qualidade desta camada depende do grau de conversão do adesivo e da infiltração da resina. Uma infiltração incompleta da resina pode estar associada à viscosidade do adesivo ou o colapso da rede de colagénio e, por esses motivos, pode existir uma diminuição da adesão (Anusavice et al., 2013; Pashley & Carvalho, 1997).

O ozono é uma molécula de 3 átomos de oxigénio que apresenta diversas vantagens devido à sua capacidade de diminuir a carga microbiana e toxinas orgânicas. Assim, o ozono demonstra-se eficaz como um agente antimicrobiano quando é utilizado contra bactérias, fungos, vírus e protozoários (Dalkilic et al., 2012). No entanto, existem estudos que afirmam que existe uma preocupação na utilização do ozono, antes da restauração definitiva, porque referem que este desinfetante pode influenciar a resistência adesiva das resinas compostas (Can et al., 2022; Garcia et al., 2012). Segundo Garcia e colaboradores (2012), a instabilidade do ozono permite a sua dissociação em moléculas de oxigénio e radicais de hidroxilo, sendo estes uns dos fatores responsáveis pela inibição da polimerização das resinas compostas e compromisso da resistência adesiva. Assim, o estudo *in vitro* realizado teve como objetivo verificar se a aplicação do ozono previamente à restauração poderá influenciar a resistência adesiva através da microtração. Para tal, foram utilizadas diversas formas de aplicação de ozono (gasoso e aquoso) para verificar a sua influência na adesão.

Ao longo do estudo, um dos principais cuidados que se pretendeu alcançar foi a aproximação às condições clínicas. Como tal, recorreu-se à utilização de ozono, produzido através de um gerador Ozonette Dent (Sedecal, Madrid, Spain) que gera ozono através de oxigénio medicinal. Assim, o ozono medicinal, ao contrário do ozono gerado através do ar ambiente, possui uma concentração de ozono superior e não apresenta elementos reativos de nitrogénio que são contraindicados na prática clínica (ISCO3, 2020). A escolha da concentração utilizada de ozono gasoso teve como base as concentrações definidas pela ISCO3 (2020), sendo 40 µg/mL a concentração mais utilizada na prática clínica, quando se pretende uma ação antibacteriana. Ainda assim, de forma a garantir o protocolo de aplicação de ozono mais adequado foram realizados ensaios prévios fazendo variar a concentração e tempo de aplicação de ozono para analisar as condições que produziram uma atividade bacteriana mais eficaz contra bactérias cariogénicas. Após esse ensaio preliminar optou-se por selecionar para este estudo a concentração de 40 µg/mL durante 80 segundos nos grupos de ozono gasoso. Por outro lado, na ozonização da água programou-se a concentração mais elevada (80 µg/mL), visto que a água não tem a capacidade de incorporar toda a concentração administrada, apenas permanecendo cerca de 1/4 (ISCO3, 2020).

Apesar da maioria dos artigos utilizarem o sistema *self-etch*, no estudo utilizou-se o sistema Optibond™ FL (Kerr Corporation, Orange, CA, USA) que corresponde a um

etch-and-rinse de 3 passos, uma vez que é considerado o *gold standard* da adesão. A escolha do sistema adesivo baseou-se no facto do *etch-and-rinse* de 3 passos ser um sistema mais confiável em termos de adesão, para além de apresentar uma maior força de adesão à dentina em comparação com os restantes adesivos (Anusavice et al., 2013; Breschi et al., 2013).

Tendo em conta os resultados obtidos, é possível afirmar que, independentemente da forma de ozono aplicada (gasoso, aquoso ou ambas simultaneamente), a aplicação do ozono, anteriormente à restauração com resina composta, influencia a resistência adesiva na dentina quando é submetida ao teste de microtração. Assim sendo, os resultados levaram a que a hipótese nula fosse rejeitada e a hipótese alternativa aceite, uma vez que se verificaram diferenças estatisticamente significativas na resistência adesiva da dentina após a aplicação do ozono.

Apesar de se tentar manter as condições mais favoráveis na aplicação do ozono gasoso, verificou-se uma desidratação da dentina, ao fim dos 80 segundos, podendo ser uma das principais razões pela qual a resistência adesiva na dentina foi inferior (Cadenaro et al., 2009; Can et al., 2022).

Com a desidratação da dentina, a água que envolve as fibras de colagénio evapora-se provocando o colapso das mesmas. O colapso da rede de colagénio diminui a permeabilidade da dentina às resinas adesivas, o que dificulta a formação da camada híbrida, para além de diminuir a resistência de união (Anusavice et al., 2013; Pashley & Carvalho, 1997; Perdigão, 2020). Desta forma, a desidratação da dentina provocada pela exposição de ozono gasoso pode originar uma diminuição da molhabilidade, que por sua vez pode interferir na adesão (Cadenaro et al., 2009; Rosales et al., 1999).

Por outro lado, o fenómeno da desidratação provocado pelo ozono em contacto com a dentina não poderá ser a única explicação uma vez que, nas amostras em que se aplicou a água ozonizada a adesão também foi igualmente prejudicada.

Assim, outro fator que pode ter influenciado os resultados corresponde à presença de moléculas de oxigénio residuais provenientes da instabilidade do ozono. O oxigénio residual reage as cadeias de monómeros interferindo, assim, na polimerização (Cadenaro et al., 2009; Can et al., 2022; Rodrigues et al., 2011). Além disso, segundo Cadenaro e colaboradores (2009), a presença de oxigénio residual origina modificações mecânicas na dentina como a desnaturação e desestabilização do complexo de proteínas presentes na

matriz orgânica da dentina. Assim, as alterações no complexo de proteínas podem ser um dos responsáveis pela redução da resistência de adesão.

Os estudos disponíveis na literatura são insuficientes para permitir uma comparação adequada dos resultados, uma vez que existem poucos que estudam a ação do ozono na resistência adesiva na dentina através da microtração. Apesar do número reduzido de artigos disponíveis foram analisados os que apresentavam semelhanças com as condições do estudo em questão.

Can e colaboradores (2022) realizaram um estudo que permite verificar os efeitos dos desinfetantes de cavidade, entre eles o ozono, na resistência adesiva da dentina. O protocolo utilizado difere da presente investigação em diversos fatores, como a concentração de cloramina T trihidratada (5%), o gerador de ozono (OzoneDTA, Apoza, New Taipei City, Taiwan) utilizado, o tempo de aplicação (30 segundos), ausência de informações sobre a concentração de ozono aplicado e por fim o sistema adesivo (G-Premio Bond que corresponde a um sistema universal). Embora o protocolo aplicado seja diferente, os resultados obtidos foram bastante semelhantes, ou seja, o estudo revelou igualmente uma diminuição estatisticamente significativa da resistência adesiva da dentina por microtração nos grupos de ozono, em comparação com os grupos de controle. Para tal, Can e colaboradores (2022) justificam esse acontecimento através da presença de oxigênio residual na cavidade.

No estudo de Dalkilic e colaboradores (2012) foi analisado o efeito de diferentes desinfetantes na microtração da dentina. Os resultados permitiram analisar que o ozono gasoso diminuiu significativamente a resistência adesiva por microtração em comparação com o grupo de controle. O estudo utilizou um gerador diferente, nomeadamente o Ozonytron X delivery system (OzonyTron X-Biozonix, Munich, Germany) que utiliza igualmente oxigênio medicinal para desenvolver o ozono, durante 60 segundos, porém não refere a concentração de ozono aplicado. O sistema adesivo utilizado foi o Clearfil SE Bond (Kuraray, Tokyo, Japan) e a resina composta Clearfil Majesty Posterior (Kuraray, Tokyo, Japan). Contudo, apesar das diferenças nos protocolos utilizados, este estudo *in vitro* obteve resultados coerentes com os publicados por Dalkilic e colaboradores (2012).

No artigo de Rodrigues e colaboradores (2011), os autores estudaram o efeito do ozono, na sua forma gasosa, antes do sistema adesivo e após na resistência adesiva à dentina. Assim, o protocolo utilizado no seguinte estudo difere em diversas

características, nomeadamente, o desinfetante das amostras (Timol 0,2%), o gerador de ozono, concentração, tempo de aplicação, sistema adesivo (Single Bond 2^a, 3M Dental Products, St Paul, MN, USA) e resina composta (TPH3 resin composite, Dentsply Caulk, Milford, DE, USA). O ozono gasoso foi obtido pelo gerador PXZ3507 (Eaglesat tecnologia em sistemas Ltda, São José dos campos, SP, Brazil) e administrado a uma concentração de 5 g/L durante 40 segundos. Apesar do tempo de aplicação ser inferior, a concentração utilizada, ao ser convertida, corresponde a 5000 µg/mL, ou seja, uma concentração mais elevada. Os resultados observados afirmam uma redução estatisticamente significativa na resistência adesiva, tanto nos grupos que se aplicou ozono antes do sistema adesivo como naqueles que se aplicou posteriormente.

Por outro lado, o tema continua a ser bastante controverso porque existem outros artigos que concluem que a aplicação de ozono não interfere com a resistência adesiva.

No estudo realizado por Cadenaro e colaboradores (2009), o seu principal objetivo consiste na avaliação da resistência adesiva por microtração da dentina como também do esmalte perante a aplicação do ozono na sua forma gasosa. Os resultados obtidos permitem esclarecer que não se registaram diferenças significativas na resistência adesiva à dentina. O artigo utilizou amostras provenientes de bovinos, apesar de os autores afirmarem que não existem diferenças entre os dentes humanos e bovinos. Para além disso, embora o tempo de aplicação de ozono ter sido igual (80 segundos), os autores não referem a concentração de ozono administrado. Outro aspeto importante é o facto de ter sido utilizado o gerador HealOzone (KaVo, Biberach/Riss, Germany), sendo este responsável por formar ozono através do ar ambiente. Assim, como o ar ambiente apresenta mais componentes para além do oxigénio, a quantidade de ozono produzido será significativamente menor do que ao utilizar oxigénio medicinal (Brazzelli et al., 2006; ISCO3, 2020). Por fim, existem também diferenças nos sistemas adesivos utilizados, visto que no referido estudo foram aplicados Clearfil Protect Bond e o Xeno III, que correspondem, respetivamente, a um *self-etch* de 2 passos e um *self-etch* de 1 passo. O sistema *self-etch* apresenta um *primer* ácido que permite a desmineralização do conteúdo mineral com uma desidratação reduzida dos substratos devido à presença de solventes (Perdigão, 2020). Assim, as utilizações de diferentes sistemas adesivos nos dois estudos poderão também explicar as diferenças, dado que, o *etch-and-rinse* desidrata mais a dentina, devido ao condicionamento ácido prévio, contribuindo para o colapso da rede de colagénio (Breschi et al., 2013). Segundo Cadenaro e colaboradores (2009), o ozono

apresenta também a capacidade de desidratar a dentina e alterar a composição das fibras de colagénio. Considerando que no artigo foi utilizado o sistema *self-etch*, a aplicação de ozono desidrata menos a dentina e por esse motivo existe um menor colapso das fibras de colagénio. O contrário acontece quando se utiliza o sistema *etch-and-rinse* com uma concentração de ozono alta com eficácia antibacteriana, ou seja, com a aplicação deste protocolo, a dentina apresenta uma maior desidratação e desmineralização que potencia o colapso das fibras de colagénio e por consequência interfere na resistência adesiva. Por essa razão, o sistema adesivo utilizado pode ser uma das razões pela qual o artigo não apresentou diferenças significativas na resistência adesiva (Cadenaro et al., 2009; Dalkilic et al., 2012).

Os resultados obtidos por Garcia e colaboradores (2012) afirmam que a resistência adesiva na dentina não foi afetada após o tratamento com o ozono gasoso ou água ozonizada, isto é, não existiram diferenças significativas entre o grupo de controlo e os grupos de ozono nas duas experiências realizadas. O estudo foi dividido em duas experiências, nomeadamente, a primeira em que se aplicou o ozono antes da restauração e a segunda em que se administrou o ozono após a restauração definitiva e corte das amostras em palitos. Os grupos experimentais de ozono utilizaram o gerador Ozone & life model O&L3 (São José dos Campos, SP, Brazil), que obtém o ozono a partir de oxigénio medicinal. No grupo de ozono gasoso, a concentração de ozono administrado corresponde a 2100 ppm durante 120 segundos, ou seja, para além da unidade de concentração ser expressa em ppm em vez de $\mu\text{g}/\text{mL}$, a duração da aplicação foi superior. No grupo da água ozonizada, tanto a quantidade de água utilizada para ozonizar (500 mL) como também a concentração programada para a ozonização (20 mg/L) são menores. Assim, a concentração final da água apresenta uma concentração de ozono muito inferior, podendo assim explicar a ausência de interferência na resistência adesiva na dentina.

Na investigação de Kapdan & Öztaş (2013), o gerador HealOzone (Kavo Dental, Biberach, Germany) foi o responsável pela formação do ozono, sendo que como foi referido anteriormente, o oxigénio obtido provém do ar ambiente, assim, a concentração de ozono final será menor. Apesar do tempo de aplicação ser igual, ou seja, 80 segundos, não foi referido a concentração de ozono que foi aplicado. Os resultados demonstraram que não existiram diferenças significativas entre o grupo de controlo e o grupo de ozono gasoso, apesar do grupo de ozono apresentar um ligeiro aumento da resistência adesiva. O gerador pode ser uma das razões pela qual não existem diferenças significativas, uma

vez que, este produz ozono através do ambiente. Assim, a concentração final de ozono será inferior, podendo não ser suficiente para provocar alterações nas propriedades da dentina (ISCO3, 2020).

Oznurhan e colaboradores (2015) estudaram o efeito de diversos desinfetantes na resistência adesiva por microtração, sendo que utilizaram o ozono aquoso e gasoso como um dos desinfetantes. A água ozonizada foi produzida através do gerador (TeknO3zone, Izmir, Turkey), de forma a obter uma concentração final de 3,5 ppm a 4 ppm. Por fim, a água ozonizada foi administrada durante 30 segundos na cavidade, porém, não foi explicito o volume final de água aplicada. O ozono gasoso, ao contrário da água ozonizada, foi gerado através do HealOzone (Kavo Dental, Biberach, Germany) e aplicado durante 30 segundos. Contudo, não esclarecem a concentração de ozono gasoso aplicado na cavidade. Para além disso, existem também diferenças nos sistemas adesivos e resina composta utilizados, visto que no estudo utilizou-se, respetivamente, Adper prime and bond NT (Dentsply Detrey, Konstanz, Germany) e Tetric N-Ceram (Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein). Os resultados do estudo permitiram referir que a água ozonizada apresentou um aumento na resistência adesiva em comparação com o grupo de controlo e o ozono gasoso não apresentou diferenças significativas em comparação com o grupo de controlo. Uma das razões poderá ser o tempo de aplicação do ozono, uma vez que a sua duração de contacto foi apenas 30 segundos, e o gerador utilizado, visto que utiliza o ar ambiente para produzir o ozono. Por outro lado, os autores Oznurhan e colaboradores (2015) justificam o aumento da resistência adesiva à microtração quando se aplica água ozonizada devido ao efeito da água abrir os túbulos dentinários e remover os detritos orgânicos. Este resultado não foi observado no presente estudo possivelmente devido ao maior volume (100 mL) e tempo de aplicação da água ozonizada (80 segundos), que pode ter contribuído para uma maior quantidade de ozono e radicais livres de oxigénio no interior da cavidade como também dos túbulos dentinários. O oxigénio residual, ao permanecer no interior da cavidade, potencia alterações ao nível da dentina que interferem na resistência adesiva (Cadenaro et al., 2009).

Com base nos artigos analisados e os resultados obtidos na seguinte investigação pode refletir-se que as possíveis razões pela qual a aplicação do ozono diminui a resistência adesiva são a desidratação da dentina provocada pelo ozono gasoso, a presença de oxigénio residual, o gerador de ozono e o sistema adesivo utilizado (Cadenaro et al., 2009; Can et al., 2022).

Durante a aplicação do ozono gasoso constatou-se uma maior desidratação na dentina, ao fim dos 80 segundos, em comparação com a água ozonizada. Ao existir uma maior desidratação da dentina existe uma maior tendência para a rede de colagénio colapsar e afetar a formação da camada híbrida, visto que não se consegue obter uma boa infiltração da resina (Anusavice et al., 2013; Cadenaro et al., 2009; Pashley & Carvalho, 1997). Contudo, os resultados entre os diversos grupos (água e gás) não demonstraram diferenças significativas. Portanto, embora a desidratação provocada pelo ozono contribua para a diminuição da resistência adesiva, não pode ser considerada a principal razão porque para tal era necessário que os grupo da água ozonizada apresentassem uma maior resistência adesiva em comparação com o grupo com gás apenas.

Outro aspeto importante é o sistema adesivo utilizado no estudo (*etch-and-rinse*) ser diferente dos artigos analisados (*self-etch*). Como referido anteriormente o *etch-and-rinse* é um sistema que incorpora um condicionamento ácido prévio, assim, existe uma maior desmineralização da dentina e esmalte que, por sua vez, expõe mais as fibras de colagénio, em comparação com o *self-etch* (Anusavice et al., 2013; Breschi et al., 2013). Se existir uma desidratação prévia provocada pelo ozono, essa desidratação será potenciada após o condicionamento ácido, visto que expõe uma maior quantidade das fibras de colagénio, existindo assim uma maior tendência para estas colapsarem se não existir hidratação (Breschi et al., 2013). Ao contrário do *etch-and-rinse*, o *self-etch* como apresenta um primer ácido, o seu poder de desmineralização é relativamente menor e por consequência a desidratação é menor, visto que o *primer* incorpora solventes responsáveis pela hidratação da dentina. Por essa razão, o sistema *self-etch* seria uma melhor escolha tendo em conta os problemas associados com a desidratação (Breschi et al., 2013).

Outro motivo que pode ter impacto nos resultados é a utilização de um gerador diferente, visto que nos artigos, a maioria, utilizou um gerador que produz ozono através do ar ambiente, que não garante a mesma eficácia antibacteriana. O ar ambiente, para além do oxigénio, apresenta também outros compostos como nitrogénio. Por essa razão, a quantidade final de ozono é menor em comparação com o ozono obtido através do oxigénio medicinal, dado que a concentração de oxigénio do ar ambiente é relativamente menor, para além de não garantir a mesma eficácia antibacteriana. Por outro lado, a utilização do ar ambiente apresenta também outra desvantagem que é a presença de

elementos reativos de nitrogénio que são contraindicados na prática clínica devido à sua citotoxicidade (ISCO3, 2020).

Por fim, o aspeto que possivelmente apresenta um maior impacto nos resultados obtidos no estudo é a presença de oxigénio residual. O ozono devido à sua instabilidade decompõe-se rapidamente em moléculas de oxigénio que reagem com os monómeros da polimerização, diminuindo o grau de conversão do polímero e reduzindo assim a resistência adesiva (Cadenaro et al., 2009; Can et al., 2022; Rodrigues et al., 2011). Em todos os grupos de ozono observou-se realmente uma redução da resistência adesiva que pode ser explicada pela quantidade de oxigénio presente na cavidade, visto que estes radicais livres podem entrar no interior dos túbulos dentinários (Can et al., 2022). Nos artigos analisados, a maioria não referencia as concentrações de ozono ou são menores do que no estudo, assim, pode chegar-se à conclusão de que as diferenças foram devido à menor quantidade de oxigénio residual. Uma vez que existem menos radicais livres de oxigénio residual, estas moléculas terão interferido menos na qualidade da polimerização formando, assim, uma camada híbrida mais coesa e estável, ao contrário do que terá acontecido neste estudo.

Devido à escassez de artigos relativos à ação do ozono na resistência adesiva por microtração seria fundamental, no futuro, realizar um maior número de estudos relativamente a este assunto. Apesar dos resultados analisados não serem vantajosos na prática clínica, permitem dar um importante contributo e alerta para os profissionais que já incorporam esta ferramenta na sua prática clínica. Além disso, este estudo permite ainda alertar para a importância de se desenvolver novas investigações que possam clarificar o efeito do ozono na adesão bem como desenvolver novas abordagens que permitam aliar os benefícios da utilização do ozono como agente antibacteriano ao mesmo tempo que se obtém uma adesão eficaz. Assim, seria importante estudar se seriam obtidos os mesmos resultados caso fosse aplicado um agente antioxidante, de forma a inativar os radicais livres que se formam devido à decomposição do ozono. Outra alternativa a considerar seria estudar quanto tempo após a aplicação de ozono, a adesão deixaria de ser prejudicada, de forma a estabelecer um protocolo clínico mais seguro e eficaz. Devido aos artigos existentes serem maioritariamente com sistema adesivo *self-etch* seria relevante estudar, de forma a comparar, o efeito do ozono na resistência entre dois sistemas adesivos diferentes, nomeadamente o *self-etch* e o *etch-and-rinse*.

1. Relevância Clínica

A dentisteria minimamente invasiva é uma abordagem atual que é cada vez mais preconizada na prática clínica. O seu principal objetivo consiste em preservar uma maior quantidade de tecido dentário remineralizado, de forma a manter os dentes durante um longo período (FDI World Dental Federation, 2017). Atualmente, a dentisteria minimamente invasiva tem sido um dos métodos que abrange a aplicação de ozono para prevenir o aparecimento de cáries e o seu tratamento (Gupta & Mansi, 2012; Naik et al., 2016).

O ozono na medicina dentária tem evoluído com o passar dos anos, sendo que existem diversos profissionais que o aplicam na sua prática clínica devido ao seu efeito antibacteriano amplamente estudado. Assim, este composto consiste numa ferramenta prática, indolor e eficaz, podendo ser aplicado em zonas de dentina mais profundas, a fim de evitar um maior desgaste e, conseqüentemente, a exposição pulpar (Badhe et al., 2022; Garg & Tandon, 2009). Diversos autores referem que o ozono apresenta uma ação antibacteriana eficaz contra as bactérias cariogénicas, mas ao contrário dos antibióticos, este composto é eficaz contra espécies com resistências antibióticas (Gupta & Mansi, 2012; Naik et al., 2016). Assim, o ozono apresenta um papel fundamental no tratamento da cárie, uma vez que é eficaz na regeneração pulpar inicial relacionada com a cárie avançada, evitando assim tratamentos endodônticos (ISCO3, 2020).

Apesar de existirem diversos artigos sobre o ozono e a sua eficácia, existem ainda poucos estudos publicados relativamente à interferência do ozono na adesão como também acerca da metodologia mais adequada de forma a evitar esse acontecimento. Os artigos publicados apresentam protocolos pouco padronizados e diferentes entre si, o que dificulta a obtenção de conclusões com um grande nível de evidência científica.

Por esse motivo, são necessários mais estudos *in vitro* para avaliar melhor o efeito do ozono na resistência adesiva e, ainda, para compreender qual a melhor forma de aplicar o ozono na prática clínica sem comprometer a longevidade da interface adesiva.

VI. CONCLUSÃO

O ozono, apesar de ser promissor na medicina dentária e parecer demonstrar uma eficácia contra as bactérias cariogénicas, a partir do estudo realizado pode concluir-se que:

1. Os grupos de ozono verificaram diferenças estatisticamente significativas na resistência adesiva na dentina por microtração em comparação com o grupo de controlo.
2. Independentemente da forma de ozono aplicada (gasoso ou aquoso), os resultados foram semelhantes entre si, chegando à conclusão de que ambas as forma de aplicação de ozono afetam a resistência adesiva na dentina.

Embora o ozono apresente vantagens clinicamente interessantes, como a sua eficácia antibacteriana e capacidade desinfetante, é necessário o desenvolvimento de mais estudos com um protocolo experimental bem definido. Assim, a conceção de uma metodologia adequada e padronizada permite estabelecer protocolos replicáveis clinicamente com um nível de evidência científica relevante.

1. Perspetivas futuras

Tendo em conta o estudo efetuado, em investigações futuras será pertinente:

- Avaliar a resistência adesiva da dentina por teste de microtração após aplicação de ozono, seguido de um antioxidante.
- Avaliar, passado uma semana, o efeito do ozono na resistência adesiva da dentina por microtração, sendo necessário colocar uma restauração provisória após a aplicação do ozono.
- Verificar a resistência adesiva após aplicação do ozono, seguida da sua lavagem, com um intervalo de 5 minutos antes da colocação do sistema adesivo e a restauração definitiva.
- Comparar o efeito do ozono na resistência entre dois sistemas adesivos diferentes, nomeadamente o *self-etch* e o *etch-and-rinse*.

- Analisar a interface adesiva antes e após aplicação de ozono através do microscópio eletrônico de varrimento (SEM), de forma a entender melhor o seu efeito no substrato dentinário.
- Analisar o efeito da aplicação do ozono na polimerização dos materiais restauradores.

VII. BIBLIOGRAFIA

Almaz, M. E., & Sönmez, I. Ş. (2015). Ozone therapy in the management and prevention of caries. *Journal of the Formosan Medical Association*, 114(1), 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2013.06.020>

Anusavice, K. J., Shen, C., & Rawls, H. R. (2013). *Phillips science of dental materials* (12th ed.). Elsevier.

Armstrong, S., Geraldeli, S., Maia, R., Raposo, L. H. A., Soares, C. J., & Yamagawa, J. (2010). Adhesion to tooth structure: A critical review of “micro” bond strength test methods. *Dental Materials*, 26(2), e50–e62. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2009.11.155>

Armstrong, S., Breschi, L., Özcan, M., Pfefferkorn, F., Ferrari, M., & Van Meerbeek, B. (2017). Academy of Dental Materials guidance on in vitro testing of dental composite bonding effectiveness to dentin/enamel using micro-tensile bond strength (μ TBS) approach. *Dental Materials*, 33(2), 133-143. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2016.11.015>

Badhe, H., Kalaskar, R., Balasubramanian, S., Kamki, H., & Kalaskar, A. (2022). Antimicrobial Effect of Ozone Therapy in Deep Dentinal Carious Lesion: A Systematic Review. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 15(2), S252-S260. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10005-2168>

Brazzelli, M., McKenzie, L., Fielding, S., Fraser, C., Clarkson, J., Kilonzo, M., & Waugh, N. (2006). Systematic review of the effectiveness and cost-effectiveness of HealOzone® for the treatment of occlusal pit/fissure caries and root caries. *Health Technology Assessment*, 10(16), iii–80. <https://doi.org/10.3310/hta10160>

Breschi, L., Ferracane, J. L., Cadenaro, M., Mazzoni, A., & Hilton, T. J. (2013). Adhesion to Enamel and Dentin. In T. J. Hilton, J. L. Ferracane, & J. C. Broome (Eds.), *Summit's Fundamentals of Operative Dentistry: A Contemporary Approach* (4th Ed., pp. 423–505). Quintessence Publishing Company.

Breschi, L., Maravic, T., Cunha, S. R., Comba, A., Cadenaro, M., Tjäderhane, L., Pashley, D. H., Tay, F. R., & Mazzoni, A. (2018). Dentin bonding systems: From dentin

collagen structure to bond preservation and clinical applications. *Dental Materials*, 34(1), 78-96. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2017.11.005>

Cadenaro, M., Delise, C., Antonioli, F., Navarra, O. C., Lenarda, R. D., & Breschi, L. (2009). Enamel and Dentin Bond Strength Following Gaseous Ozone Application. *J Adhes Dent*, 11(4), 287-292.

Can, D. B., Dundar, A., & Barutcugil, Ç. (2022). Effect of Cavity Disinfection Protocols on Microtensile Bond Strength of Universal Adhesive to Dentin. *International Journal of Dental Sciences*, 24(3), 91-102. <https://doi.org/10.15517/IJDS.2022.50966>

Cangul, S., Erpacal, B., Adiguzel, O, Sagmak, S., Unal, S., & Tekin, S. (2020). Does the Use of Ozone as a Cavity Disinfectant Affect the Bonding Strength of Antibacterial Bonding Agents?. *Ozone: Science & Engineering*, 42(6), 565-570. <https://doi.org/10.1080/01919512.2020.1746633>

Cardoso, M. V., Neves, A. A., Mine, A., Coutinho, E., Landuyt, K., V., Munck, J., & Van Meerbeek, B. (2011). Current aspects on bonding effectiveness and stability in adhesive dentistry. *Australian Dental Journal*, 56(1), 31-44. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2011.01294.x>

Cellik, O., & Bahsi, E. (2018). Effect of Different Restorative Materials on Microleakage of Ozone Gas and Traditional Cavity Disinfectant Applied Teeth. *The Journal of the International Ozone Association*, 41(2), 175-185. <https://doi.org/10.1080/01919512.2018.1510766>

Dalkilic, E. E., Arisu, H. D., Kivanc, B. H., Uctasli, M. B., & Omurlu, H. (2012). Effect of different disinfectant methods on the initial microtensile bond strength of a self-etch adhesive to dentin. *Lasers in Medical Science*, 27(1), 819-825. <https://doi.org/10.1007/s10103-011-0987-x>

Edwards, D., Stone, S., Bailey, O., & Tomson, P. (2021). Preserving pulp vitality: Parte one- strategies for managing deep caries in permanent teeth. *British Dental Journal*, 230(2), 77-82. <https://doi.org/10.1038/s41415-020-2590-7>

Elsayad, I. I. (2010). Chemical analysis and surface morphology of enamel following ozone application with different concentrations and exposure times. *Journal of Advanced Research*, 2(2), 131-136. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.10.001>

Farges, J. C., Alliot-Licht, B., Renard, E., Ducret, M., Gaudin, A., Smith, A. J., & Cooper, P. R. (2015). Dental Pulp Defence and Repair Mechanisms in Dental Caries. *Mediators of inflammation*, 2015, 1-16. <https://doi.org/10.1155/2015/230251>

Fejerskov, O., Nyvad, B., & Kidd, E. (2015). *Dental Caries: The disease and its clinical management* (3rd ed.). Wiley Blackwell.

FDI World Dental Federation (2017). FDI policy statement on Minimal Intervention Dentistry (MID) for managing dental caries. *International dental journal*, 67(1), 6–7. <https://doi.org/10.1111/idj.12308>

Floare, A. D., Focht, D., Hadjuma, I., Talpos, I. C. N., Bălean, O. I., Muntean, C. V., Sebeșan, D., Jumanca, D. E., & Gălușcan, A. (2022). Ozone and microstructural morphological changes of tooth enamel. *Rom J Morphol Embryol*, 63(3), 539-544. <https://doi.org/10.47162/RJME.63.3.08>

Garcia, E. J., Serrano, A. P. M., Urruchi, W. I., Deboni, M. C., Reis, A., Grande, R. H. M., & Loguercio, A. D. (2012). Influence of Ozone Gas and Ozonated Water Application to Dentin and Bonded Interfaces on Resin-Dentin Bond Strength. *J Adhes Dent*, 14(4), 363-370. <https://doi.org/10.3290/j.jad.a22707>

Garg, R. K. & Tandon, S. (2009). Ozone: A new face of dentistry. *The Internet Journal of Dental Science*, 7(2).

Gholampour, S., & Jalali, A. (2018). Thermal analysis of the dentine tubule under hot and cold stimuli using fluid–structure interaction simulation. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 17, 1599-1610. <https://doi.org/10.1007/s10237-018-1046-3>

Goldberg, M., Kulkarni, A. B., Young, M., & Boskey, A. (2011). Dentin: Structure, composition and mineralization. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*, 3(2), 711–735. <https://doi.org/10.274/e281>

Grawish, M. E., Grawish, L. M., Grawish, H. M., Grawish, M. M., Holiel, A. A., Sultan, N., & El-Negoly, S. A. (2022). Demineralized Dentin Matrix for Dental and Alveolar Bone Tissues Regeneration: An Innovative Scope Review. *Tissue engineering and regenerative medicine*, 19(4), 687–701. <https://doi.org/10.1007/s13770-022-00438-4>

Gulafsha, M., & Anuroopa, P. (2019). Miracle of ozone in dentistry: An overview. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 8(3), 665-677. <https://doi.org/10.20959/wjpr20193-14388>

Gupta, G., & Mansi, B. (2012). Ozone therapy in periodontics. *Journal of medicine and Life*, 5(1), 59-67.

Gupta, S., & Deepa, D. (2016). Applications of ozone therapy in dentistry. *Journal of Oral Research and Review*, 8(2), 86-91. <https://doi.org/10.4103/2249-4987.192243>

Hilton, T. J, Ferracane J. L., & Broome, J. C. (2013). *Summitt's fundamentals of operative dentistry: A contemporary approach* (4th ed). Quintessence publishing company.

ISCO3. (2020). *Declaração de Madrid na ozonoterapia* (3rd ed.). International Scientific Committee of Ozone Therapy.

Kapdan, A., & Öztaş, N. (2013). Effects of chlorhexidine and gaseous ozone on microleakage and on the bond strength of dentin bonding agents with compomer restoration on primary teeth. *Journal of Dental Sciences*, 10(1), 1-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jds.2013.02.026>

Krunić, J., Stojanović, N., Đukić, L., Roganović, J., Popović, B., Simić, I., & Stojić, D. (2019). Clinical antibacterial effectiveness and biocompatibility of gaseous ozone after incomplete caries removal. *Clinical Oral Investigations*, 23, 785-792. <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2495-x>

Makishi, P., Thitthaweerat, S., Sadr, A., Shimada, Y., Martions, A. L., Tagami, J., & Giannini, M. (2015). Assessment of current adhesives in class I cavity: Nondestructive imaging using optical coherence tomography and microtensile bond strength. *Academy of Dental Materials*, 31(9), e190-e200. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.06.013>

Malik, T., Kaura, S., & Kakria, P. (2020). Dental Ozone: A Boon for Dentistry. *Indian Journal of Dental Sciences*, 12(1), 49-52. https://doi.org/10.4103/IJDS.IJDS_27_19

Manso, A. G. M., González-Lopez, S., Bolaños-Carmona, V., Maurício, P. J. B. T. D., Félix, S. A., & Carvalho, P. A. (2011). Regional Bond Strength to Lateral Walls in Class I and II Ceramic Inlays Luted with Four Resin Cements and Glass-Ionomer Luting

Agent. *The journal of Adhesive Dentistry*, 13(5), 455-465.
<https://doi.org/10.3290/j.jad.a19816>

Marsh, P. D. (2005). Dental plaque: Biological significance of a biofilm and community life-style. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(6), 7-15.

Marshall, G. W., Marshall, S. J., Kinney, J. H., & Balooch, M. (1997). The dentin substrate: Structure and properties related to bonding. *Journal of Dentistry*, 25(6), 441-458.

Mese, M., Tok, Y. T., Kaya, S., & Akcay, M. (2020). Influence of ozone application in the stepwise excavation of primary molars: a randomized clinical trial. *Clinical Oral Investigations*, 24, 3529-3538. <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03223-6>

Naik, S. V., Rajeshwari, K., Kohli, S., Zohabhasan, S., & Bhatia, S. (2016). Ozone- A Biological Therapy in Dentistry- Reality or Myth?????. *The Open Dentistry Journal*, 10(1), 196-206. <https://doi.org/10.2174/1874210601610010196>

Nakabayashi, N., Kojima, K., & Masuhara, E. (1982). The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *Journal of biomedical materials research*, 16(3), 265–273. <https://doi.org/10.1002/jbm.820160307>

Nakabayashi, N., & Pashley, D. H. (1998). *Hybridization of Dental Hard Tissues*. Quintessence Publishing Company.

Nedeljkovic, I., Teughels, W., Munck, J., Meerbeek, B. V., & Landuyt, K. L. V. (2015). Is secondary caries with composites a material-based problem?. *Dental Materials*, 31(11), e247-277. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.09.001>

Oliveira, E. S., Souza, J. B., Oliveira, G. J., Bernardes, C. M. R., Boggian, L. C., Santana, L., Estrela, C. R. A., & Estrela, C. (2020). Effect of ozone and 10% sodium ascorbate on human dentin microhardness. *RSBO*, 17(2), 92-96.

Özcan, M., & Volpato, C. A. M. (2020). Current perspectives on dental adhesion: (3) Adhesion to intraradicular dentin: Concepts and applications. *The Japanese dental science review*, 56(1), 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2020.08.002>

Oznurhan, F., Ozturk, C., & Ekci, E. S. (2015). Effects of different cavity-disinfectants and potassium titanyl phosphate laser on microtensile bond strength to primary dentin. *Nigerian Journal of Clinical Practice*, 18(3), 400-404. <https://doi.org/10.4103/1119-3077.151774>

Pashley, D. H., & Carvalho, R. M. (1997). Dentine permeability and dentine adhesion. *Journal of Dentistry*, 25(5), 355-372.

Perdigão J. (2007). New developments in dental adhesion. *Dental clinics of North America*, 51(2), 333–357. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2007.01.001>

Perdigão, J. (2010). Dentin bonding—Variables related to the clinical situation and the substrate treatment. *Dental Materials*, 26(2), e24-e37. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2009.11.149>

Perdigão J. (2020). Current perspectives on dental adhesion: (1) Dentin adhesion - not there yet. *The Japanese dental science review*, 56(1), 190–207. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2020.08.004>

Ritter, A. V., Boushell, L. W., & Walter, R. (2018). *Art and science of operative dentistry* (7th ed.). Elsevier.

Rodrigues, P. C. F., Souza, J. B., Soares, C. J., Lopes, L. G., & Estrela, C. (2011). Effect of Ozone Application on the Residentin Microtensile Bond Strength. *Operative Dentistry*, 36(5), 537-544. <https://doi.org/10.2341/10-062-L>

Rosales, J. I., Marshall, G. W., Marshall, S. J., Watanabe, L. G., Toledano, M., Cabrerizo, M. A., & Osorio, R. (1999). Acid-etching and Hydration Influence on Dentin Roughness and Wettability. *Journal of Dental Research*, 78(9), 1554-1559. <https://doi.org/10.1177/00220345990780091001>

Saini R. (2011). Ozone therapy in dentistry: A strategic review. *Journal of natural science, biology, and medicine*, 2(2), 151–153. <https://doi.org/10.4103/0976-9668.92318>

Salvio, L. A., Hipólito, V. D., Martins, A. L., & Goes, M. F. (2013). Hybridization quality and bond strength of adhesive systems according to interaction with dentin. *European Journal of Dentistry*, 7(3), 315-326. <https://doi.org/10.4103/1305-7456.115416>

Sandhu, R. K. (2021). Ozone in Dentistry- A Review. *Journal of Advanced Medical and Dental Sciences Research*, 9(7), 115-119. <https://doi.org/10.21276/jamdsr>

Sano, H., Chowdhury, A. F. M. A., Saikaew, P., Matsumoto, M., Hoshika, S., & Yamauti, M. (2020). The microtensile bond strength test: Its historical background and application to bond testing. *Japanese Dental Science Review*, 56(1), 24-31. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2019.10.001>

Santana, M. S. C. A., Bridi, E. C., Navarro, R. S., Lima, C. J. Fernandes, A. B., Amaral, F. L. B., França, F. M. F., Turssi, C. P., & Basting, R. T. (2016). Dental bleaching with ozone: Effects on color and enamel microhardness. *Acta Odontol. Latinoam*, 29(1), 68-75.

Santos, G. M., Pacheco, R. L., Bussadori, S. K., Santos, E. M., Riera, R., Latorraca, C. O. C., Mota, P., Bellotto, E. F. B. C., & Martimbianco, A. L. C. (2020). Effectiveness and safety of ozone therapy in dental caries treatment: systematic review and meta-analysis. *The Journal of evidence-based dental practice*, 20(4), 1-17.

Sen, S., & Sen, S. (2020). Ozone therapy a new vista in dentistry: Integrated review. *Medical Gas Research*, 10(4), 189-192. <https://doi.org/10.4103/2045-9912.304226>

Sofan, E., Sofan, A., Palaia, G., Tenore, G., Romeo, U., & Migliaiu, G. (2017). Classification review of dental adhesive systems: From the IV generation to the universal type. *Annali di stomatologia*, 8(1), 1–17. <https://doi.org/10.11138/ads/2017.8.1.001>

Spencer, P., Ye, Q., Park, J., Topp, E. M., Misra, A., Marangos, O., Wang, Y., Bohaty, B. S., Singh, V., Sene, F., Eslick, J., Camarda, K., & Katz, L. (2010). Adhesive/Dentin Interface: The Weak Link in the Composite Restoration. *Annals of Biomedical Engineering*, 38(6), 1989-2003. <https://doi.org/10.1007/s10439-010-9969-6>

Srikanth, A., Sathish, M., & Harsha, A. V. (2013). Application of ozone in the treatment of periodontal disease. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 5(1), S89-S94. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.113304>

Suh, Y., Patel, S., Kaitlyn, R., Gandhi, J., Joshi, G., Smith, N. L., & Khan, S. A. (2019). Clinical utility of ozone therapy in dental and oral medicine. *Medical gas research*, 9(3), 163–167. <https://doi.org/10.4103/2045-9912.266997>

Tiwari, S., Avinash, A., Katiyar, S., Iyer, A. A., & Jain, S. (2016). Dental applications of ozone therapy: A review of literature. *The Saudi Journal for Dental Research*, 8(1), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.sjdr.2016.06.005>

Tjäderhane, L. (2015). Dentin Bonding: Can We Make it Last?. *Operative Dentistry*, 40(1), 4-18. <https://doi.org/10.2341/14-095-BL>

Van Meerbeek, B., Perdigão, J., Lambrechts, P., & Vanherle, G. (1998). The clinical performance of adhesives. *Journal of Dentistry*, 26(1), 1-20. [https://doi.org/10.1016/S0300-5712\(96\)00070-X](https://doi.org/10.1016/S0300-5712(96)00070-X)

Van Meerbeek, B., Peumans, M., Poitevin, A., Mine, A., Van Ende, A., Neves, A., & De Munck, J. (2010). Relationship between bond-strength tests and clinical outcomes. *Dental Materials*, 26(2), e100-e121. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2009.11.148>

Van Meerbeek, B., Yoshihara, K., Van Landuyt, K., Yoshida, Y., & Peumans, M. (2020). From Buonocore's Pioneering Acid-Etch Technique to Self-Adhering Restoratives. A Status Perspective of Rapidly Advancing Dental Adhesive Technology. *The journal of adhesive dentistry*, 22(1), 7–34. <https://doi.org/10.3290/j.jad.a43994>

ANEXOS

ANEXO I

IN VITRO STUDY OF THE ANTIBACTERIAL EFFECT OF OZONE ON CARIOGENIC BACTERIA

Marta Santos¹, Joana Cruz², Flávia Leandro¹, Mário Polido², António Delgado² and Helena Barroso^{2*}

¹ Egas Moniz School of Health & Science; marta.filipa00@gmail.com; flaviasofialeandro@gmail.com

² Egas Moniz Center for Interdisciplinary Research (CIEM); Egas Moniz School of Health & Science; joanavcruz@gmail.com; mpolido@egasmoniz.edu.pt; ant.delgado94@gmail.com; mhbarroso@egasmoniz.edu.pt

* Correspondence: marta.filipa00@gmail.com

† Presented at the 6th International Congress of CIEM—Immediate and Future Challenges to Foster One Health, Almada, 5–7 July 2023.



BACKGROUND

Dental caries is one of the most prevalent chronic diseases worldwide. It is a multifactorial condition, in which bacteria metabolize carbohydrates into organic acids, leading to the demineralization of hydroxyapatite (1,6). Recently there has been a paradigm shift towards a more conservative approach in the treatment of dental caries (4). As a result, ozone has been increasingly used as a complementary and conservative treatment due to its antibacterial action (2,3,5). However, there remains a lack of evidence and consensus on protocols (5). Consequently, this study aims to evaluate *in vitro* the antibacterial capacity of ozone on cariogenic bacteria and contribute to the development of a universal protocol.

MATERIAL AND METHODS

Suspensions of *Streptococcus mutans* ATCC 35668, *Streptococcus sobrinus* DSM 20742, *Lactobacillus casei* ATCC 393 and *Actinomyces naeslundii* DSM 43013 were exposed to 40µg of pure gaseous ozone and 60µg of ozonated water during 80 seconds through an ozone generator machine "Ozonette" (Sedecal, Madrid, Spain). The ozonated water was tested in two different ozone systems, an ozone water bubbler system (SimplyO3, Grand Ledge, USA) and a microbubble water ozonation column (Philozon, Nova Esperança, Brazil) (figure 1).



Figure 1 – Ozone generator machine; Ozone water bubbler system; Microbubble water ozonation column

A negative control group without ozone and a positive control group (chlorhexidine 2%) were used. After the ozone/chlorhexidine's action on the suspensions, aliquots were inoculated on specific culture medium and placed in the incubator at 37°C/48h (figure 2). The results were determined by counting the number of CFU (colony forming unit) on the inoculated media.



Figure 2 – Simplified protocol of gaseous ozone groups (A) and ozonated water groups (B)

RESULTS

All statistical procedures were performed using IBM SPSS version 28.0 (IBM, New York, USA), in which *Kruskal-Wallis* and *Bonferroni* tests were applied.

There were no statistically significant differences between the different bacteria analysed ($p=0.76$).

It was observed significant bacterial reduction after 80 seconds of ozone exposure in all the microorganisms tested, both on 40µg gaseous ozone ($p<0.01$), 60µg ozonated water ($p<0.01$) and 40µg gaseous ozone + 60µg ozonated water ($p<0.01$) groups (figure 3).

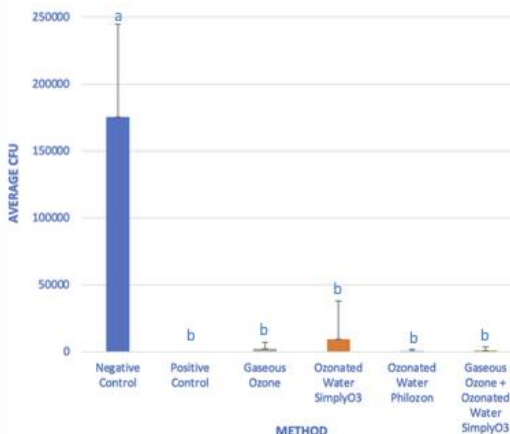


Figure 3 – Graph of averages and standard deviation for each method. The groups with different letters (a,b) show significant differences ($p<0.05$)

Ozone has similar results to Chlorhexidine ($p>0.05$) and although there seems to be a tendency for greater efficacy of ozonized water by the Philozon column compared to the SimplyO3 system, there is no statistical significance between them ($p=0.487$).

CONCLUSION

Ozone, in both water and gas forms, exhibits significant antibacterial activity against cariogenic bacteria, being an equally effective alternative to Chlorhexidine. This supports the need for further investigation as a potential preventive therapy for dental caries or as an antibacterial agent after mechanical caries removal.

ACKNOWLEDGMENTS This research was funded by Egas Moniz Cooperativa de Ensino Superior, CRL and 2M Pharma.

REFERENCES

1. Alvarinho J, Zeng L, Kafilic M, Palmer SR, Chakraborty B, Wen Z, et al. Biology of Oral Streptococci: Microbial Specter [Internet]. 2019 Oct 5 [cited 2023 May 2]; 655. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6247261/>; DOI: 10.1118/1.5160846; 6559-6562; 2019
2. Ubonoi A, Di Taranto V, Moe A, Moronobu E, Sakai G, Anggoro Y, et al. Chlorhexidine bacterial effectiveness: Neakstone Technology after incomplete caries removal. *European Journal of Paediatric Dentistry* [Internet]. 2023 Mar 1 [cited 2023 May 2]; 20(1):75–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39912644/>; DOI: <https://doi.org/10.2310/ajpo.2022.2812.24>
3. Mees M, Tsa YT, Kaya S, Alsay M. Influence of ozone application in the stepwise restoration of primary molars: a randomized clinical trial. *Clinical Oral Investigations* [Internet]. 2020 Oct [cited 2023 May 2]; 24(10):3529–3538. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33025881/>; DOI: <https://doi.org/10.1007/s00784-020-0523-6>
4. Prakrty B, Lincov T, Innes NP, Kasi E, Clarkson JE. Operative caries management in adults and children. *Cochrane Database of Systematic Reviews* [Internet]. 2019 Jul 24 [cited 2023 May 2]; 7 (7): CD013808. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6633082/>; DOI: <https://doi.org/10.1002/14611838.cd013808.pub4>
5. Santos GM, Pacheco HL, Escalvão SK, Santos SM, Reis A, de Oliveira Cruz Latorica C, et al. Effectiveness and Safety of Ozone Therapy in Dental Caries Treatment: Systematic Review and Meta-analysis. *Journal of Evidence-Based Dental Practice* [Internet]. 2020 Dec [cited 2023 May 2]; 20(4):101472. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33050100/>; DOI: 10.1016/j.jebdp.2020.101472
6. Pitt NB, Zero DT, Marsh PD, Estratini K, Watanabe JA, Barro-Gomez F, et al. Dental caries. *Nature Reviews Disease Primers* [Internet]. 2017 May 25 [cited 2023 May 2]; 3(1):17000. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28540017/>; DOI: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.31>

ANEXO II



COMUNICAÇÃO INTERNA

De: Direcção da "Egas Moniz, CRL"

Para: Portaria

Data: 01 de junho de 2023

ASSUNTO: Autorização de entrada

Informa-se que a aluna nº 113438, Flávia Sofia Carvalho Leandro, do 5º ano de MIMD, está autorizada a entrar e a permanecer nas instalações, inclusive aos fins-de semana e feriados, nomeadamente no Laboratório de Biomateriais, a partir de hoje e até dia 30 de setembro de 2023.



ANEXO III



Comissão de Ética EGAS MONIZ

Proc. Interno nº 1137

PLATAFORMA

Ex.ma Senhora

Flávia Leandro

Monte de Caparica, 15 de dezembro de 2022.

Ex.ma Senhora,

Em resposta ao Pedido de Parecer que submeteu à apreciação da Comissão de Ética da Egas Moniz, com o tema denominado: "**Estudo *in vitro* do efeito do ozono na resistência adesiva à dentina por microtração**", foi aprovado por unanimidade.

A Presidente da Comissão de Ética da Egas Moniz

Professora Doutora Maria Fernanda de Mesquita

ANEXO IV



Declaração da Direção Clínica para cedência de dentes do BDH para realização do trabalho de projeto final do Mestrado Integrado de Medicina Dentária

Código | IMP.CDEM.04_01

IDENTIFICAÇÃO DO ESTUDANTE: Flávia Sofia Carvalho Leandro (113438)

TÍTULO DO TRABALHO: Estudo *in vitro* do efeito do ozono na resistência adesiva à dentina por microtração

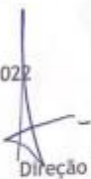
Excelentíssima Professora Doutora Fernanda de Mesquita – Presidente da Comissão de Ética,

O(a) aluno(a) Flávia Sofia Carvalho Leandro pode utilizar dentes 32 do Banco de Dentes Humanos (BDH) da Clínica Dentária Egas Moniz (CDEM).

Aguardo a aprovação da Comissão Científica e da Comissão de Ética, para cedência dos dentes.

Atenciosamente, com os melhores cumprimentos

Monte da Caparica, 11 de novembro de 2022


Direção Clínica

ANEXO V

<i>Falhas</i>	<i>Adesivas</i>	<i>Coesiva dentina</i>	<i>Coesiva resina</i>	<i>Mista</i>	<i>Pré-teste</i>
<i>CTR</i>	30,8%	11,5%	15,3%	15,3%	26,9%
<i>O₃_GAS</i>	30,9%	2,9%	27,9%	17,7%	20,6%
<i>O₃_AG</i>	32,6%	2,2%	15,2%	17,4%	32,6%
<i>O₃_AG+GAS</i>	28,8%	5,8%	17,3%	19,3%	28,8%