



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**INFLUÊNCIA DE DOIS AGENTES ANTIOXIDANTES NA CAMADA
HÍBRIDA DE RESTAURAÇÕES SUJEITAS A IRRIGAÇÃO
ENDODÔNTICA – CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA COM
MICROSCOPIA ELETRÓNICA DE VARRIMENTO**

Trabalho submetido por
Leonor Tavares da Rocha Sá Pinto
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

setembro de 2021



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

INFLUÊNCIA DE DOIS AGENTES ANTIOXIDANTES NA CAMADA HÍBRIDA DE RESTAURAÇÕES SUJEITAS A IRRIGAÇÃO ENDODÔNTICA – CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA COM MICROSCOPIA ELETRÓNICA DE VARRIMENTO

Trabalho submetido por
Leonor Tavares da Rocha Sá Pinto
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Alexandra Pinto

e coorientado por
Mestre Tomás Amorim Afonso

setembro de 2021

Agradecimentos

À Prof. Doutora Alexandra Pinto por toda ajuda, paciência, motivação e empenho nestes últimos meses de constantes desafios.

Ao Mestre Tomás Amorim por nunca me deixar desistir, por estar sempre presente e por ser um verdadeiro exemplo ao longo de todo o meu percurso.

Ao Professor António Alves de Matos por me ajudar e ensinar que há sempre uma solução no Microscópio Eletrónico de Varrimento.

Ao Prof. Doutor Mário Polido pela cedência na utilização dos equipamentos presentes no Laboratório de Biomateriais.

Ao Instituto Universitário Egas Moniz e à AAIUEM por tudo o que aprendi, por todas as amizades criadas e pelos melhores momentos ao longo destes 5 anos.

À box 3, minhas Chicas, Carol e Inês, para vocês não há palavras. Obrigada por tudo, por toda a amizade, por todos os ensinamentos e por estarem sempre presentes. Sem vocês não fazia sentido e não tinha conseguido. Forever yours.

Às restantes Bellinis da minha vida, Cláudia, Madalena e Sofia, obrigada por todas as conversas, copos, noites e confissões pela noite dentro. Obrigada por tornarem momentos simples em memórias inesquecíveis e por serem o verdadeiro significado de amizade. Adoro-vos.

Às minhas Gaijas, minhas amigas de sempre. Obrigada pelos melhores momentos e por serem a verdadeira alma da minha vida. Sem vocês não seria quem sou hoje. Xau, Laura.

Aos meus pais, Frederica e Ricardo, por tudo o que me proporcionaram e continuam a proporcionar. São os pilares da minha vida. À minha querida irmã e melhor amiga, Kiki, obrigada por seres a pessoa espetacular que és e por estares sempre ao meu lado. Together.

Ao Zé, a melhor pessoa que conheço. Obrigada por nunca me deixares desistir, por estares sempre ao meu lado, e por trazeres ao de cima o melhor de mim. Sem ti não tinha conseguido. Adoro-te.

Resumo

Objetivos: Avaliar a influência de dois agentes antioxidantes na camada híbrida sujeita a irrigação com hipoclorito de sódio através da Microscopia Eletrônica de Varrimento (MEV).

Materiais e Métodos: Foram selecionados 15 molares hígidos, extraídos há menos de 6 meses do Banco de Dentes da Clínica Dentária Egas Moniz. Todos os dentes foram seccionados removendo 2 a 3 mm abaixo da junção amelo-cimentária, e de seguida seccionados a 4 mm da superfície oclusal expondo a dentina. Sobre a dentina exposta foi simulada uma restauração com a resina composta GrandioSO (Voco, Alemanha). Foi utilizado o sistema adesivo *etch-and-rinse* de 3 passos Optibond FL™ (Kerr, USA). Após a restauração dos dentes, foi simulado um acesso endodôntico em oclusal.

Posteriormente, os dentes foram divididos em três grupos: Grupo controlo, $n=5$, em que as amostras foram somente irrigadas com hipoclorito de sódio (NaOCl); Grupo 1, $n=5$, em que as amostras foram irrigadas com NaOCl e posteriormente irrigadas com o agente antioxidante sintético Ascorbato de Sódio a 10%; e Grupo 2, $n=5$, em que as amostras foram irrigadas com NaOCl e posteriormente irrigadas com o agente antioxidante natural Proantocianidina a 5%.

Todos os dentes foram cortados exatamente a meio, paralelamente ao longo eixo do dente, para serem analisados com Microscopia Eletrônica de Varrimento (MEV).

Os resultados foram interpretados com recurso a estatística descritiva.

Resultados: Verificaram-se diferenças entre o Grupo controlo que apresentava um *gap* significativo na interface adesiva, o Grupo 1 que quase não apresentava *gap* e o Grupo 2 que não apresentava qualquer *gap*.

Conclusão: O NaOCl afeta a interface adesiva de restaurações pré-endodônticas, pois parece haver um fenómeno de remineralização decorrente do uso de antioxidante, seguido de armazenamento em saliva.

Palavras-chave: Hipoclorito de sódio, ascorbato de sódio, proantocianidina, microscopia eletrónica de varrimento

Abstract

Purpose: To evaluate the influence of two antioxidant agents on the hybrid layer undergone irrigation with sodium hypochlorite through Scanning Electron Microscopy (SEM).

Materials and Methods: 15 human molars, sound, extracted less than 6 months ago, were selected from the Egas Moniz Human Teeth Bank. The teeth were sectioned 2-3 mm below the amelocemental joint, and then sectioned 4 mm from the occlusal surface, exposing dentin. A restoration with the resin composite GrandioSO (Voco, Germany) was simulated on the exposed dentin. The 3-step etch-and-rinse adhesive system Optibond FL™ (Kerr, USA) was used. After the restoration of the teeth, an endodontic access was made in the occlusal surface.

The teeth were then divided into three different groups: Control group, $n=5$, in which the samples were only irrigated with sodium hypochlorite; Group 1, $n=5$, in which the samples were irrigated with sodium hypochlorite and subsequently irrigated with the synthetic antioxidant agent Sodium Ascorbate 10%; and Group 2, $n=5$, in which the samples were irrigated with sodium hypochlorite and subsequently irrigated with the natural antioxidant agent Proanthocyanidin 5%.

All the teeth were cut vertically, exactly in half, to be analyzed with Scanning Electron Microscopy (SEM).

The results were submitted to a descriptive statistical analysis.

Results: This study resulted in differences between the Control group, which presented a significant gap in the adhesive interface, Group 1, which presented nearly no gap and Group 2, which didn't present any gap.

Conclusion: NaOCl affects the adhesive interface of pre-endodontic restorations, for there appears to be a phenomenon of remineralization due to the use of the antioxidant agent, followed by storage in saliva.

Key words: Sodium hypochlorite, sodium ascorbate, proanthocyanidin, scanning electron microscopy

ÍNDICE

I)	INTRODUÇÃO	11
1.	<i>Endodontia</i>	<i>11</i>
1.1	Hipoclorito de Sódio	11
1.1.1	Aplicação e Mecanismo de Ação	11
1.1.2	Efeito do NaOCl na Dentina	12
1.2	Restaurações Pré-Endodônticas	13
2.	<i>Adesão.....</i>	<i>14</i>
2.1	Mecanismos Primários de Adesão	16
2.2	Sistemas Adesivos.....	17
2.2.1	Sistema Adesivo Etch-and-Rinse	19
2.2.2	Sistema Adesivo Self-etch	20
2.2.3	Sistemas Adesivos Universais ou Multimodo.....	22
2.3	Camada Híbrida	22
2.4	Influência do NaOCl na Resistência Adesiva	23
3.	<i>Agentes Antioxidantes.....</i>	<i>24</i>
3.1	Ascorbato de Sódio	24
3.2	Proantocianidina.....	25
3.3	Influência dos Agentes Antioxidantes no NaOCl	26
4.	<i>Resinas Compostas.....</i>	<i>26</i>
5.	<i>Estudo In Vitro.....</i>	<i>28</i>
5.1	Microscopia Eletrônica de Varrimento – MEV	28
6.	<i>Enquadramento do Estudo</i>	<i>29</i>
II)	OBJETIVOS DO ESTUDO	31
III)	HIPÓTESES DE ESTUDO	31
IV)	MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
1.	<i>Amostra de Estudo</i>	<i>33</i>
2.	<i>Materiais</i>	<i>33</i>
3.	<i>Preparação das Amostras</i>	<i>35</i>
4.	<i>Preparação das Amostras para Análise no MEV</i>	<i>40</i>
5.	<i>Análise Elementar por Difração de Raio-X.....</i>	<i>41</i>
V)	RESULTADOS.....	43

1.	<i>Microscopia Eletrônica de Varrimento</i>	<i>43</i>
2.	<i>Análise Elementar por Difração de Raio-X.....</i>	<i>45</i>
VI)	DISCUSSÃO	55
VII)	CONCLUSÃO	61
1.	<i>Relevância Clínica</i>	<i>61</i>
2.	<i>Perspetivas Futuras</i>	<i>61</i>
VIII)	BIBLIOGRAFIA.....	63

Índice de Figuras

Figura 1 - Composição das resinas compostas.....	26
Figura 2 - Classificação das resinas compostas	28
Figura 3 - Corte dos dentes no micrótomo de tecidos duros – Accutom-50, Struers A/S, Ballerup, Denmark	35
Figura 4 - LabolPol-4, Struers A/S, Ballerup, Denmark.....	35
Figura 5 - Restauração pré-endodôntica	36
Figura 6 - Elipar™ Deep Cure S (3M, St. Paul, MN, USA).....	36
Figura 7 - Simulação da abertura endodôntica.....	37
Figura 8 - Aberturas endodônticas	37
Figura 9 - Irrigação das amostras com hipoclorito de sódio	37
Figura 10 - Irrigação das amostras do Grupo 1 com ascorbato de sódio 10%.....	38
Figura 11 - Irrigação das amostras do Grupo 2 com proantocianidina 5%.....	38
Figura 12 - Dentes cortados e divididos pelos respetivos grupos de estudo.....	38
Figura 13 - Amostras dentro da máquina de evaporação a vácuo JEE-400.....	40
Figura 14 - MEV – JSM – 5400 18.....	41
Figura 15 - Metodologia de preparação das amostras em estudo para análise em MEV	42
Figura 16 - Grupo controlo (1500x).....	43
Figura 17 - Grupo controlo (500x).....	43
Figura 18 - Grupo irrigados com NaOCl e AS (500x).....	44
Figura 19 - Grupo irrigados com NaOCl e AS (1500x).....	44
Figura 20 - Grupo irrigados com NaOCl e PA (500x).....	44
Figura 21 - Grupo irrigados com NaOCl e PA (1500x).....	44
Figura 22 - Análise elementar da resina composta do grupo irrigados com NaOCl (500x)	45
Figura 23 - Análise elementar da camada híbrida do grupo irrigados com NaOCl (500x)	46
Figura 24 - Análise elementar da dentina do grupo irrigados com NaOCl (500x)	47
Figura 25 - Mapping dos elementos presentes no grupo irrigados com NaOCl (500x)	48
Figura 26 - Mapping dos dois elementos que caracterização a interface adesiva no grupo irrigados com NaOCl (500x).....	48

Figura 27 - Análise elementar da resina composta do grupo irrigados com NaOCl e AS (500x)	49
Figura 28 - Análise elementar da dentina do grupo irrigados com NaOCl e AS (500x)	50
Figura 29 - Mapping dos elementos presentes no grupo irrigados com NaOCl e AS (500x)	51
Figura 30 - Mapping dos dois elementos que caracterização a interface adesiva no grupo irrigados com NaOCl e AS (500x).....	51
Figura 31 - Análise elementar da dentina do grupo irrigados com NaOCl e PA (500x)	52
Figura 32 - Análise elementar da resina composta do grupo irrigados com NaOCl e PA (500x)	53
Figura 33 - Mapping dos elementos presentes no grupo irrigados com NaOCl e PA (500x)	54
Figura 34 - Mapping dos dois elementos que caracterização a interface adesiva no grupo irrigados com NaOCl e PA (500x).....	54

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Materiais utilizados – Composição e especificações técnicas.....	33
Tabela 2 - Grupos de estudo.....	37
Tabela 3 – Protocolo de utilização Etch-and-Rinse – Optibond FL™.....	39
Tabela 4 – Instruções do fabricante para a Resina Composta GrandioSo.....	39
Tabela 5 – Protocolo de irrigação com Hipoclorito de Sódio IUEM.....	39
Tabela 6 – Protocolo de preparação das amostras para visualização do MEV	40
Tabela 7 - Grupos de estudo.....	43

Lista de Siglas

3-MPS – 3-metacriloxipropiltrimetoxissilano

10-MDP – 10-Metacrilóiloxidecil dihidrogenofosfato

AS – Ascorbato de sódio

Bis-EMA – Bisfenol A glicidil dimetacrilato etoxilado

Bis-GMA – Bisfenol A glicidil dimetracrilato

GPDM – Glicerol fosfato dimetacrilato

HEMA – 2-Hidroxietil metacrilato

JAC – Junção amelocementária

MEV – Microscopia Eletrônica de Varrimento

MMP – Metaloproteinases

NaOCl – Hipoclorito de Sódio

PA – Proantocianidina

SEM – Scanning Electron Microscopy

TEGDMA – Trietileno glicol dimetracrilato

UDMA – Uretano dimetacrilato

I) INTRODUÇÃO

1. Endodontia

A Endodontia é uma especialidade da Medicina Dentária dedicada à morfologia, fisiologia e patologia da polpa dentária e tecidos perirradiculares. O seu estudo e prática engloba a biologia da polpa sã, a etiologia, diagnóstico, prevenção e tratamento de doenças e lesões pulpares e dos tecidos perirradiculares associados (AAE, 2019). A sua aplicação é ampla e inclui a resolução de problemas de origem pulpar ou periapical, via terapia pulpar vital, tratamento pulpar não-cirúrgico, retratamento de casos de insucesso, branqueamento interno e cirurgia endodôntica (Torabinejad & Walton, 2009). O objetivo principal do tratamento endodôntico é otimizar a desinfecção do canal radicular e prevenir a reinfecção. Desta forma, o tratamento é considerado bem-sucedido quando a instrumentação, a irrigação e a obturação do canal são adequadas (Basrani, 2011).

Para a obtenção de um nível ótimo de desinfecção dos canais, a irrigação é um dos passos mais importantes devido às suas funções mecânicas, químicas e microbiológicas. Durante a instrumentação mecânica existem zonas das paredes dos canais, istmos e possíveis canais laterais e acessórios, em que as limas não tocam. Assim, a irrigação é a única forma de remover dos canais o tecido inflamado e necrótico, microorganismos, biofilmes, entre outros detritos presentes (Haapasalo et al., 2014).

1.1 Hipoclorito de Sódio

1.1.1 Aplicação e Mecanismo de Ação

O hipoclorito de sódio, também designado por NaOCl, é um composto químico alcalino com um pH de aproximadamente 11-12, utilizado como agente irrigante em Endodontia (Hülsmann et al., 2009). Nas suas diversas concentrações, que variam entre 0,5 e 5,25%, é considerado o irrigante mais estudado e utilizado durante a preparação dos canais radiculares, por possuir as propriedades fundamentais de um agente irrigante: capacidade de dissolver tecido orgânico, capacidade antimicrobiana e baixa toxicidade em certas concentrações (Arashiro et al., 2010). É um agente oxidante, hidrolisante, bactericida e proteolítico utilizado como irrigante desde 1920 (Clarkson & Moule, 1998).

As suas vantagens incluem a capacidade de dissolver substâncias orgânicas e o baixo custo. As principais desvantagens são a sua citotoxicidade quando injetado nos tecidos perirradiculares que pode resultar em hemólise, ulceração ou mesmo necrose

(Hülsmann et al., 2009); mau odor e sabor; capacidade de branquear tecido por ser lixívia pura; e capacidade de corroer metal como o material utilizado diariamente na prática clínica. Além destas, o NaOCl não é capaz de eliminar todo o tipo de bactérias; não tem capacidade de remover por completo a *smear layer*; e altera as propriedades da dentina (AAE, 2011). A diminuição da concentração da solução de NaOCl reduz a sua toxicidade, efeito antibacteriano e capacidade de dissolução dos tecidos, mas, por outro lado, aumentar o seu volume ou temperatura promove a sua eficácia como agente irrigante de canais radiculares.

O cloro livre no NaOCl é capaz de dissolver tecido vital e necrótico ao quebrar as proteínas em aminoácidos (AAE, 2011), pois ao dissolver-se em água juntamente com matéria orgânica origina ácido hipocloroso (HOCl-) – um ácido fraco que atua como oxidante. A sua ação como solvente passa pela reação de cloraminação: o cloro livre liga-se ao grupo amina de proteínas (NH) para formar cloraminas que impedem o metabolismo celular, ao inibirem as enzimas bacterianas essenciais por oxidação irreversível (Basrani & Malkhassian, 2015).

A concentração certa a que o NaOCl deve ser utilizado continua uma questão em aberto. Muitos autores recomendam a sua utilização a 5,25%, no entanto outros preferem concentrações mais baixas de 3% ou mesmo de 0,5% (Abuhaimed & Neel, 2017; Hülsmann et al., 2009). Existem vários estudos que provam que o protocolo de irrigação com NaOCl mais eficaz é a sua utilização a 5,25% durante 40 minutos, pois a irrigação com 1,3% ou 2,5% durante o mesmo intervalo de tempo não se demonstrou eficaz na remoção de *E. faecalis* dos túbulos dentinários infetados. Assim, é por vezes recomendado a adição de outro agente irrigante ao protocolo de irrigação para aumentar o efeito antibacteriano durante a lavagem e modelagem dos canais radiculares (AAE, 2011).

1.1.2 Efeito do NaOCl na Dentina

Fisiologicamente e anatomicamente a dentina é uma estrutura complexa. É composta por 22% em peso de matéria orgânica e a maior parte desta é composta por colagénio tipo I, que contribui consideravelmente para as propriedades mecânicas da dentina. A sua estrutura tem uma configuração porosa onde se inserem os túbulos dentinários que permitem a invasão bacteriana, tornando a desinfeção da dentina um

processo desafiante. O NaOCl pode afetar mecanicamente as propriedades da dentina pela degradação dos seus componentes orgânicos (Basrani & Malkhassian, 2015).

O tratamento endodôntico pode causar o enfraquecimento físico dos dentes devido às alterações na estrutura da dentina causadas por NaOCl, EDTA ou hidróxido de cálcio. O NaOCl afeta negativamente a resistência à flexão, o módulo de elasticidade da dentina e aumenta a tensão de superfície do dente. Assim, todas estas alterações são diretamente atribuídas à depleção e alteração do colagénio dentinário (Karunanayake et al., 2019).

Como verificado experimentalmente em estudos prévios, as fibras de colagénio expostas na superfície dentinária apresentam uma energia de superfície mais baixa do que a da dentina mineralizada. Estas, quando em contacto com NaOCl, podem sofrer alterações e afetam a adesão por dois mecanismos reconhecidos. O primeiro mecanismo promove a desproteinização da dentina como estratégia de adesão, e o segundo mecanismo passa pelo envelhecimento da camada híbrida ao remover as fibras de colagénio desprotegidas (Nima et al., 2019).

Assim, o NaOCl aumenta a energia livre do substrato, melhorando a molhabilidade da dentina e consequente impregnação de monómeros (Nima et al., 2019). Além disto, o NaOCl tem um efeito proteolítico inespecífico capaz de dissolver e remover componentes orgânicos da dentina intertubular e peritubular, o que faz com que a abertura dos túbulos dentinários e dos canais laterais aumente, permitindo uma maior penetração dos monómeros adesivos na dentina com formação de ramos laterais de resina polimerizada (Nima et al., 2019).

1.2 Restaurações Pré-Endodônticas

Geralmente os dentes que necessitam de tratamento endodôntico apresentam danos estruturais extensos (Kharouf et al., 2020). Podemos classificar estes dentes em previamente restaurados, cariados, fraturados ou uma combinação dos três (Heydrich, 2005).

Desta forma, o objetivo principal de uma restauração pré-endodôntica é facilitar a colocação do dique de borracha a fim de obter um correto isolamento absoluto (Kharouf et al., 2020). Este método previne a contaminação do canal radicular por saliva, sangue e microrganismos durante todo o tratamento endodôntico; previne, ainda, a aspiração oral de instrumentos pelo paciente; retrai e protege tecidos moles e facilita o acesso ao campo

operatório. No entanto, a colocação do isolamento absoluto pode ser dificultada quando existe pouco remanescente dentário devido à falta de retenção pelo retentor, daí a importância de uma restauração pré-endodôntica (Kameyama et al., 2020).

Este tipo de restauração facilita a identificação de pontos de referência para os *stops* das limas endodônticas, reduz também o risco de escoamento marginal intraoperatório, ajuda a reduzir o tempo entre consultas e pode prevenir o extravasamento do agente irrigante de canais (Kharouf et al., 2020).

Apesar de ser um procedimento opcional, e por vezes demorado, a maior parte dos médicos dentistas opta pela realização de restaurações pré-endodônticas pelos seus benefícios. Além dos já mencionados anteriormente, estas restaurações promovem uma melhor remoção da *smear layer* durante a irrigação (Kharouf et al., 2020) e um selamento adequado do dente entre consultas (Kameyama et al., 2020). Para uma restauração pré-endodôntica ser adequada, tem de resistir ao *stress* mastigatório, ter excelentes propriedades estéticas e ser química e fisicamente estável (Kameyama et al., 2020). Assim, uma restauração pré-endodôntica estável é o primeiro passo para um tratamento endodôntico bem sucedido (Heydrich, 2005).

2. Adesão

Quando se fala em adesão, o primeiro pensamento não nos remete para o verdadeiro significado do termo. Para que a adesão ocorra é necessária a interação entre um aderente/substrato e um adesivo, que entre eles originam uma interface adesiva (Eick et al., 1997; Marshall et al., 2010). No sentido mais estrito, a adesão mede a força de atração entre dois materiais diferentes e diferencia-se da coesão, que relaciona as forças de atração presentes dentro de um único material (Hilton et al., 2013). Em Medicina Dentária, a superfície aderente pode ser esmalte, dentina, amálgama, resina composta, ou qualquer outro material restaurador. A superfície adesiva pode ser de uma única interface, como os selantes, ou de múltiplas interfaces, como é o caso de resina compósita aderida à dentina (Buonocore, 1955; Marshall et al., 2010).

Existem três tipos de adesão: química, física e mecânica. Por norma as forças da adesão física são muito fracas, ao passo que a adesão química é muito forte, mas muito difícil de se produzir de forma densa ao longo da interface adesiva. Já a adesão mecânica

é a forma mais eficaz de produzir uma interface adesiva forte. Cada tipo de adesão irá ser descrito em detalhe (Hilton et al., 2013; Marshall et al., 2010).

Embora seja fraca, a adesão física está sempre presente. As forças de *Van der Waals* ocorrem na interface adesiva, mas são muitas vezes suportadas por ligações significativamente mais fortes, como as de dipolos permanentemente presentes, além dos dipolos já induzidos por *Van der Waals* (Marshall et al., 2010).

A adesão química inclui ligações covalentes, iónicas, metálicas, e em alguns casos quelantes. Existem inúmeras formas de criar adesão química, no entanto, quando se tenta esta ligação entre superfícies diferentes, as ligações químicas são limitadas, o que resulta numa resistência de interface adesiva diminuída (Hilton et al., 2013; Marshall et al., 2010). Existem, porém, formas de promover a adesão química usando agentes de acoplamento como o silano. Este tipo de adesão é testado em materiais dentários há décadas, contudo, os resultados destes estudos demonstram-se decepcionantes. Os contaminantes são difíceis de eliminar por completo e interferem na adaptação necessária para se formarem ligações químicas, porém, a densidade destas ligações é tão baixa que por vezes são ofuscadas pelas ligações mecânicas (Marshall et al., 2010).

A adesão mecânica é o tipo mais comum, especialmente em materiais dentários. Existem diversas formas de descrever este tipo de adesão, mas é, de uma forma sucinta, o processo de penetração do adesivo no aderente, tornando-os mecanicamente interligados. Por exemplo, a formação da camada híbrida passa pela penetração de monómeros resinosos na matriz de fibras de colagénio que compõem a dentina condicionada. Uma vez polimerizados, estes conferem retenção mecânica à restauração (Marshall et al., 2010). No entanto, esta interface não pode ser considerada adesiva porque depende de forças de atrito entre as superfícies em contacto íntimo e precisa destas para obter estabilidade (Hilton et al., 2013).

Existe uma sequência de eventos que deve ser realizada de forma a cumprir os requisitos de uma correta adesão. Estes são a obtenção de uma superfície limpa, livre de água, detritos orgânicos e biofilme, para que confira uma elevada energia de superfície – esta pode ser obtida pelo condicionamento ácido previamente ao sistema adesivo (Buonocore, 1955); uma elevada molhabilidade, que de acordo com a equação de Wenzel, que relaciona os ângulos de contacto de uma superfície lisa com uma superfície rugosa, na presença de ângulos inferiores a 90° a molhabilidade aumenta com a rugosidade da superfície; um correto ângulo de contacto, obtido através do contacto íntimo dos materiais a serem aderidos, representa o equilíbrio energético entre as fases sólida, líquida e gasosa

envolvidas; a utilização de um adesivo de baixa viscosidade juntamente com uma tensão de superfície crítica apropriada, permite que este se espalhe e adapte aos detalhes da superfície aderente dentro do seu tempo de trabalho; resistência à separação de fases pelo adesivo, devido aos seus diluentes voláteis que causam esta separação durante a evaporação dos solventes presentes; e por último, a solidificação do adesivo, através da polimerização do mesmo, que por vezes é afetada pelo difícil acesso do fotopolimerizador (Marshall et al., 2010).

2.1 Mecanismos Primários de Adesão

Os mecanismos primários de adesão de qualquer material dentário destinado a ser aderido ao tecido dentário são: (1) molhabilidade de superfície, (2) micro-retenção e (3) interação química. Para que a adesão seja estável e duradoura, deve-se ter sempre em conta estes 3 conceitos (Van Meerbeek et al., 2020).

A molhabilidade de superfície é um requisito primário para se obter um contacto adequado entre o adesivo e o substrato na interface adesiva. Para que um líquido se espalhe uniformemente por uma superfície sólida, a tensão de superfície do primeiro tem de ser menor do que a energia de superfície livre do substrato (Van Meerbeek et al., 2020). A molhabilidade é comumente determinada pela medição do ângulo de contacto que idealmente se aproxima do zero, sendo que o grau de molhabilidade equivale ao grau de adesão (Marshall et al., 2010). Existem diversos fatores que desempenham papéis co-determinantes, como a rugosidade da superfície, a energia de superfície do substrato, o efeito promotor de adesão pelas forças capilares, a hidrofiliabilidade/hidrofobicidade da superfície, e os poros presentes na interface adesiva que diminuem a integridade da adesão (Van Meerbeek et al., 2020).

Em Medicina Dentária, os detritos presentes na *smear layer* – uma camada amorfa com aproximadamente 1-5µm de espessura, composta por detritos orgânicos e inorgânicos resultantes da instrumentação mecânica do esmalte e da dentina (Pashley, 1984) – interferem com a capacidade que o adesivo tem de se espalhar pela dentina, e por esta razão, é recomendada a utilização prévia de um ácido (Eick et al., 1997; Van Meerbeek et al., 2020).

A micro-retenção é o mecanismo primário mais provável de ocorrer em tecidos mineralizados como o esmalte e a dentina. Esta pode ser alcançada mecanicamente pela

instrumentação manual, e quimicamente com o condicionamento ácido (Van Meerbeek et al., 2020). Para uma adesão persistente, o condicionamento ácido do esmalte é imprescindível, não só por remover a *smear layer*, mas por simultaneamente criar micro-rugosidades onde a resina se infiltra, promovendo a ligação micromecânica (Eick et al., 1997). Por outro lado, o condicionamento ácido da dentina é menos preferido por desmineralizar por completo a sua camada superficial, expondo a rede de fibras de colagénio que dificilmente hibridiza com a penetração de resina (Van Meerbeek et al., 2020). A ligação micromecânica está na base da maioria dos adesivos atualmente utilizados pela formação de *resin tags* em volta dos prismas de esmalte e nos túbulos dentinários, e *nanotags* entre os cristais de esmalte ou colagénio dentinário (Marshall et al., 2010).

Na verdade, a interação química é a forma de contacto mais íntima entre átomos e moléculas, e acredita-se contribuir significativamente para a durabilidade da adesão. Esta interação não se traduz em ligações mais fortes, mas previne a diminuição das forças de união com o envelhecimento. A interação química deve ter como alvo principal a componente inorgânica da hidroxiapatite, com a qual interage ionicamente se for utilizado um sistema adesivo *self-etch* (Van Meerbeek et al., 2020). Este tipo de adesivo, juntamente com os universais, apresenta na sua constituição monómeros funcionais, que são vastamente estudados pela interação iónica entre o seu grupo fosfato e o cálcio presente na hidroxiapatite, promovendo assim uma adesão mais forte (Carrilho et al., 2019).

2.2 Sistemas Adesivos

Um sistema adesivo é composto por 3 componentes base: (1) o ácido, (2) o *primer*, e (3) o *bond*. O ácido é composto por moléculas acídicas que alteram e desmineralizam a hidroxiapatite superficial e removem a *smear layer* e *smear plugs* – detritos resultantes da instrumentação mecânica inicial, localizados 1-5µm para dentro dos túbulos dentinários (Pashley, 1990) – da superfície da dentina, e desmineralizam a hidroxiapatite superficial do esmalte expondo os prismas de esmalte (Pashley et al., 2011). O *primer* é composto por moléculas anfipáticas (moléculas com características hidrofílicas e hidrofóbicas) que ajudam a tornar a superfície da dentina, inicialmente apenas hidrofílica, numa superfície mais hidrofóbica, de forma a ligar-se às resinas que são extremamente hidrofóbicas (Hilton et al., 2013). O *primer* infiltra-se na dentina desmineralizada onde

posteriormente, após a sua aplicação, o *bond* se incorpora. Uma vez polimerizado forma o suporte estrutural da interface adesiva entre o dente e o material restaurador. Todo este processo origina uma zona onde estão presentes componentes de dentina e de resina, e a qual podemos designar como camada híbrida (Hilton et al., 2013).

A tecnologia dos sistemas adesivos está em constante evolução. Em 1951, Hagger experimentou pela primeira vez aderir uma resina acrílica na estrutura dentária através do monómero funcional glicerol fosfato dimetacrilato (GPDM) que hoje em dia ainda é utilizado como monómero funcional primário em sistemas adesivos como o Optibond FL, (Kerr, USA) (Van Meerbeek et al., 2020). Em 1952, Kramer e Mclean demonstraram que o GPDM melhorava a adesão à dentina por infiltrar a superfície e formar uma camada intermédia (Simonsen & Neal, 2011). Esta camada foi posteriormente denominada de camada híbrida (Reis et al., 2008). Em 1955, Buonocore demonstrou pela primeira vez que o condicionamento com ácido fosfórico aumenta a recetividade da superfície do esmalte ao adesivo, aumentando significativamente a resistência adesiva (Buonocore, 1955). Subsequentemente, Gwinnet e Matsui descobriram que resinas fluídas penetravam os prismas de esmalte condicionados na superfície para formar *microtags* de resina (Gwinnett & Matsui, 1967). A técnica de *total-etching*, em que é efetuado o condicionamento ácido simultaneamente no esmalte e na dentina, foi introduzida por Fusayama em 1980 (Fusayama, 1980). Nesta técnica, a *smear layer* é removida e a dentina superficial é desmineralizada, expondo a rede de colagénio e produzindo túbulos dentinários em forma de funil (Pashley, 1992). Em 1982, Nakabayashi et al. descreveram pela primeira vez a penetração de monómeros resinosos em dentina condicionada, formando uma matriz de colagénio reforçada por resina. Esta nova estrutura foi designada a nova camada híbrida e é composta por colagénio, monómeros resinosos, e componentes residuais da *smear layer* (Nakabayashi et al., 1982).

Os sistemas adesivos podem ser classificados por gerações, tipo de solvente, mecanismo de remoção da *smear layer* e por número de passos clínicos (Hilton et al., 2013). Quando classificados por geração, os adesivos são agrupados por características dos produtos e por ordem de inserção no mercado, sendo que existem 8 gerações, cada uma refletindo mudanças significativas nos componentes presentes (Hilton et al., 2013).

Os adesivos podem também ser classificados por tipo e concentração do solvente. Atualmente, os adesivos comercializados apresentam os solventes acetona, etanol e água, que possuem concentrações entre 8% e 49% (Perdigão et al., 2000). A maior parte dos sistemas *etch-and-rinse* contêm solventes voláteis (etanol ou acetona) que diminuem a

viscosidade e aumentam a molhabilidade. Os *self-etch* contêm frequentemente água que demonstra ter o mesmo efeito e permite a dissociação de ácidos fracos para a desmineralização do esmalte/dentina (Van Meerbeek et al., 1998). Solventes orgânicos evaporam facilmente e podem contribuir para a remoção da água presente na rede colagénio e na superfície da dentina, permitindo que os monómeros penetrem na rede de fibras de colagénio (Eick et al., 1997; Jacobsen & Söderholm, 1995).

A *smear layer* obstrui as entradas dos túbulos dentinários, diminuindo a permeabilidade da dentina até 86% (Pashley et al., 1978). Esta camada deve ser removida ou tornada permeável para permitir a impregnação dos monómeros na dentina. Desta forma, os sistemas adesivos, quando classificados por mecanismo de remoção da *smear layer*, são subdivididos em dois grandes grupos que serão mais abaixo descritos em detalhe: (1) adesivos *etch-and-rinse* e (2) adesivos *self-etch* ou *etch-and-dry* (Breschi et al., 2008; De Munck et al., 2005).

Por último, os adesivos podem ser classificados por número de passos clínicos. Esta classificação é a mais utilizada (Van Meerbeek et al., 2003). De um modo geral: os *etch-and-rinse* podem ser de três ou dois passos; e os *self-etch* de um ou dois passos (Tay & Pashley, 2002).

2.2.1 Sistema Adesivo *Etch-and-Rinse*

Os sistemas adesivos *etch-and-rinse*, inicialmente introduzidos como *total-etch*, pois antes deles não se condicionava a dentina, utilizam um ácido forte, como o ácido fosfórico, a 35-37% e pH de aproximadamente 0.9, para condicionar o esmalte e a dentina (Hilton et al., 2013). Este ácido tem de ser totalmente removido com água passados 15 segundos para não causar condicionamento excessivo (*over-etching*) (Chitrakar et al., 2012).

Como referido anteriormente, um sistema adesivo *etch-and-rinse* pode ser de 2 ou 3 passos. Esta combinação depende se o *primer* e o *bond* são utilizados juntos ou separados, visto que o ácido é sempre aplicado sozinho. Num *etch-and-rinse* de 2 passos, aplica-se o ácido em separado e de seguida uma combinação de um *primer* e um *bond*. O *etch-and-rinse* de 3 passos passa pela utilização do ácido, *primer* e *bond* em separado e pela respetiva ordem (Van Meerbeek et al., 2003).

Quando comparando o sistema de 2 passos com o de 3 passos, o primeiro revela-se uma técnica mais simples por ter menos passos clínicos, no entanto, apresenta uma *performance* laboratorial e clínica inferior (De Munck et al., 2012). Além destes,

apresenta uma componente resinosa baixa e uma componente solvente alta (Van Landuyt et al., 2007), uma camada de *bond* mais fina resultando numa absorção de *stress* inferior (Dietschi et al., 2002), resistência mecânica diminuída (Ikeda et al., 2005) e maior hidrofilicidade e permeabilidade (Hashimoto et al., 2004).

De um modo geral as vantagens de um adesivo *etch-and-rinse* são: adesão com base em ligações micromecânicas profundas no esmalte e na dentina (Van Meerbeek et al., 2003), remoção completa da *smear layer* através do ácido forte, presença no mercado há mais de 20 anos com estudos a comprovarem a sua eficácia (Peumans et al., 2012), elevada capacidade de absorção de *stress* e ser considerado a melhor abordagem para o esmalte, pois a durabilidade da adesão neste é longa (Van Meerbeek et al., 2020). As desvantagens incluem: agressividade do ácido na dentina, podendo causar desmineralização em excesso; remoção por completo da hidroxiapatite dentinária que serve como proteção natural; exposição profunda do colagénio; necessidade de criação de uma camada híbrida grossa, para suficiente infiltração da resina, que poderá sofrer micro-escoamento; e o envolvimento de apenas ligações químicas secundárias, que não contribuem substancialmente para a durabilidade da adesão na dentina (Van Meerbeek et al., 2020).

O sistema adesivo *etch-and-rinse* de 3 passos, nomeadamente o Optibond FL™ (Kerr, USA) é considerado o *gold standard* deste tipo de sistemas adesivos (Hilton et al., 2013), e por esta razão foi o escolhido para o atual projeto de investigação.

2.2.2 Sistema Adesivo *Self-etch*

Os sistemas adesivos *self-etch* utilizam uma solução de monómeros acídicos para dissolver a *smear layer* no esmalte e na dentina (Van Meerbeek et al., 2011). Estes adesivos também podem ser chamados de *etch-and-dry*, visto serem simplesmente secados com ar (Breschi et al., 2008), e em vez de removerem a *smear layer* presente, tornam-na permeável (Van Meerbeek et al., 2003). Alguns destes adesivos dissolvem a *smear layer* ao mesmo tempo que infiltram o esmalte e a dentina (Carvalho et al., 2005) através da componente mineral do substrato, que neutraliza os monómeros acídicos e inibe a sua capacidade de condicionar a dentina em profundidade (Salz et al., 2006).

Os adesivos *self-etch* podem ser de 1 ou 2 passos. Os de 1 passo, também conhecidos por “*all-in-one*”, combinam o ácido, *primer* e *bond* tudo num só passo (Van

Meerbeek et al., 2003). Quando de 2 passos, a técnica passa pela aplicação de um *primer* ácido e posteriormente um *bond* (Van Meerbeek et al., 2003).

Além da sua divisão por passos, os *self-etch* também podem ser classificados por resistência, segundo a sua composição química e acidez, que determinam as suas características morfológicas (Van Meerbeek et al., 2003). Os *self-etch* ultra-suaves têm um $\text{pH} > 2.5$ e são capazes de desmineralizar apenas centenas de nanómetros; os *self-etch* suaves têm um $\text{pH} \approx 2$ e profundidade de interação de $1\mu\text{m}$; os *self-etch* moderados têm $\text{pH} = 1-2$ e profundidade de interação de $1-2\mu\text{m}$; e os *self-etch* fortes têm $\text{pH} < 1$ e profundidade de interação de diversos μm (Van Meerbeek et al., 2011; Van Meerbeek et al., 2020).

A formação de *resin tags* nos túbulos dentinários apenas é conseguida através da utilização de sistemas adesivos *self-etch* fortes. Os *self-etch* suaves e ultra-suaves muitas vezes falham neste processo por apenas desmineralizarem ligeiramente os *smear plugs* e permitindo infiltração limitada de resina (Van Meerbeek et al., 2011).

As vantagens dos sistemas adesivos *self-etch* incluem: a desmineralização parcial da dentina que é suficiente para promover ligações químicas; exposição limitada das fibras de colagénio na dentina, conferindo melhor proteção contra a biodegradação enzimática (Hilton et al., 2013); formação de ligações iónicas primárias pela presença do monómero funcional 10-MDP, naqueles que o contêm (Arcari et al., 2007); presença no mercado há mais de 20 anos com estudos que comprovam a sua eficácia de adesão a 10 anos (Peumans et al., 2014); e a grande capacidade de absorção de *stress* pela aplicação do *bond* em separado na técnica de 2 passos (Hilton et al., 2013).

As desvantagens são: condicionamento insuficiente do esmalte, não permitindo micro-retenção suficiente para a formação de *resin tags*; possível interferência da *smear layer* na adesão, especialmente com adesivos ultra-suaves; e o facto de poderem formar camadas híbridas instáveis (Van Meerbeek et al., 2020).

Com estes sistemas adesivos a adesão à dentina é simplificada, no entanto o esmalte não é suficientemente desmineralizado. Por esta razão, recomenda-se o condicionamento ácido seletivo do esmalte previamente à aplicação do sistema *self-etch* (Van Meerbeek et al., 2020). O sistema adesivo *self-etch* de 2 passos, nomeadamente o Clearfil SE Bond (Kuraray, Japão) é considerado o *gold standard* deste tipo de sistemas adesivos (Van Meerbeek et al., 2020).

2.2.3 Sistemas Adesivos Universais ou Multimodo

Esta nova classe de sistemas adesivos surgiu pela modificação da formulação de sistemas adesivos pré-existentes. Estes adesivos são chamados de universais/multimodo porque podem ser utilizados como *self-etch*, *etch-and-rinse*, ou em combinação com condicionamento seletivo do esmalte e posterior *self-etch*. Os adesivos universais/multimodo têm a capacidade de aderir material restaurador, cimentos, e selantes com base de metacrilato, em dentina, esmalte, ionómeros de vidro e em diversos substratos restauradores indiretos como metais, alumina, zirconia e outras cerâmicas. Todos estes adesivos foram desenvolvidos a partir dos sistemas adesivos *self-etch* e por isso, apresentam monómeros acídicos na sua composição (Hilton et al., 2013). Alguns adesivos *self-etch* iniciais demonstravam um efeito negativo na dentina devido ao condicionamento ácido prévio, no entanto, apesar de ainda serem recentes e, todavia, em estudo, os adesivos universais/multimodo não apresentam qualquer efeito adverso quando aplicados em *etch-and-rinse*, tanto *in vivo* como *in vitro* (Perdigão et al., 2012).

Os sistemas universais/multimodo apresentam ainda elevada resistência adesiva a metais e a zirconia, provavelmente resultante do monómero funcional acídico 10-MDP presente na composição da maioria dos adesivos universais (Hilton et al., 2013). Este monómero reativo tem reportado elevada afinidade a dentina e esmalte, a metal, e a zirconia com a formação de ligações químicas (Hatibovic-Kofman et al., 1998). Os adesivos contendo o MDP e aplicados com a técnica *self-etch*, provaram tornar a interface adesiva mais resistente à biodegradação devido à adesão química aos cristais de hidroxiapatite residuais no substrato (Hilton et al., 2013).

A protocolo ideal de aplicação de um sistema universal é a combinação do condicionamento seletivo do esmalte, *etch-and-rinse*, com um *self-etch* de 2 passos (Van Meerbeek et al., 2020).

2.3 Camada Híbrida

A camada híbrida, como descrita anteriormente, é uma camada de inter-difusão de resina. Os monómeros resinosos infiltram-se na matriz de fibras de colagénio que compõem a dentina desmineralizada, e uma vez polimerizados completam o processo de hibridização (Nakabayashi et al., 1982). Na dentina, os cristais de hidroxiapatite conferem resistência enquanto a matriz de colagénio confere rigidez (Eick et al., 1997).

Visto que a adesão ocorre pela impregnação dos monómeros resinosos na dentina, a estabilidade da interface adesiva depende da criação de uma camada híbrida compacta e homogênea (Breschi et al., 2008). Na técnica de *etch-and-rinse*, após a desmineralização do substrato, os monómeros adesivos impregnam os túbulos dentinários, originando estabilidade adesiva se estes estiverem totalmente selados. Por outro lado, com a técnica *self-etch*, os monómeros acídicos desmineralizam e infiltram a dentina simultaneamente, fazendo com que a estabilidade adesiva dependa da ligação entre ambos (Breschi et al., 2008).

A longevidade clínica da camada híbrida envolve fatores físicos e químicos. Fatores físicos como as forças de mastigação, e alterações da temperatura da cavidade oral, afetam a estabilidade da interface (De Munck et al., 2005). Agentes químicos acídicos presentes no fluido dentinário, saliva, alimentos, bebidas e produtos bacterianos, apresentam-se também como um desafio para a interface adesiva, resultando em diversos padrões de degradação das fibras de colagénio não protegidas, e degradação dos monómeros e componentes resinosos (Frassetto et al., 2016).

Como a camada híbrida é formada pela matriz orgânica da dentina, por cristais residuais de hidroxiapatite, por monómeros resinosos e solventes, o seu envelhecimento pode ser causado por apenas um dos seus componentes, ou por uma combinação sinérgica de fenómenos de degradação presentes (Breschi et al., 2008). Quanto à durabilidade da adesão, o que importa é a qualidade da camada híbrida, e não a sua espessura (Van Meerbeek et al., 2020).

2.4 Influência do NaOCl na Resistência Adesiva

Existe uma controvérsia quanto ao verdadeiro efeito do NaOCl na adesão – alguns estudos demonstram uma melhoria significativa da resistência adesiva após a desproteinização com o NaOCl, enquanto outros provam que a adesão é negativamente afetada pela irrigação com NaOCl. Estes diferentes resultados devem-se, maioritariamente, à variedade inerente à composição dos sistemas adesivos, que apresentam matrizes monoméricas de resinas variadas e tipos de solventes orgânicos distintos (Nima et al., 2019).

O NaOCl pode diminuir a resistência adesiva entre a dentina e os componentes resinosos por afetar a polimerização dos mesmos na camada híbrida (Basrani &

Malkhassian, 2015) – o NaOCl residual interfere com a reação de polimerização dos radicais livres de resina (Abuhaimed & Neel, 2017).

De modo geral, os adesivos à base de acetona demonstram uma melhor *performance* quando comparados com adesivos à base de etanol. Apesar da técnica de desproteinização estar bastante explorada, continua a existir pouca informação quanto ao seu efeito a longo prazo na resistência adesiva (Nima et al., 2019).

3. Agentes Antioxidantes

Os agentes antioxidantes podem ser definidos como substâncias que em contacto com um substrato oxidável, mesmo em baixas concentrações, inibem a sua oxidação (Lopes et al., 2018). No corpo humano, os antioxidantes atuam ao neutralizar o *stress* oxidativo (Shalaby & Shanab, 2013). Estes agentes podem ser classificados como enzimáticos ou não-enzimáticos – de acordo com a sua estrutura molecular – e como sintéticos ou naturais. Existe ainda uma terceira classificação possível que tem em atenção a ação do antioxidante nos radicais livres – esta divide-se em agentes que modificam os radicais livres e os tornam mais fracos, e agentes que os neutralizam por completo (Shalaby & Shanab, 2013).

Apesar de quase todos os compostos antioxidantes serem isolados de fontes naturais, podem também ser sintetizados (Olmedo et al., 2021). Os agentes antioxidantes são considerados agentes reticuladores e facilitadores da polimerização. Exemplos de agentes antioxidantes incluem ácido ascórbico, ascorbato de sódio, ácido rosmarínico, extrato de chá verde e proantocianidina (Abuhaimed & Neel, 2017).

3.1 Ascorbato de Sódio

O ascorbato de sódio é um sal do ácido ascórbico – vitamina C solúvel em água – e é considerado um composto não-enzimático (Shalaby & Shanab, 2013). Ambos são reconhecidos pelo seu efeito antioxidante. Em 2014, Stevens observou que uma irrigação com ascorbato de sódio a 10%, após a irrigação com NaOCl, restaurava de imediato pelo menos 50% da resistência adesiva inicial em sistemas adesivos *self-etch* (Stevens, 2014). A diminuição da adesão em adesivos *etch-and-rinse* também foi revertida pela irrigação com ascorbato de sódio a 10% (Pashley et al., 2001).

O ascorbato de sódio é mais eficaz do que o ácido ascórbico a melhorar a resistência adesiva (Pashley et al., 2001). Estudos demonstram que o ascorbato de sódio promove a reação de polimerização de adesivos resinosos, sem deixar que o efeito do NaOCl interfira, e reverte a interrupção da adesão na dentina irrigada com NaOCl (Lai et al., 2001).

O seu mecanismo de ação primário é evitar a formação de radicais livres, ao acelerar a remoção de oxigênio residual na dentina (Miranda et al., 2013), sem afetar negativamente a atividade das metaloproteinases presentes (Nascimento et al., 2019). No entanto apresenta instabilidade na presença de água e oxigênio, e cor amarelada, podendo afetar a estética dentária (Olmedo et al., 2021).

O ascorbato de sódio é o antioxidante mais estudado nas ultimas décadas (Olmedo et al., 2021) e será o antioxidante sintético utilizado na presente investigação.

3.2 Proantocianidina

A proantocianidina é um antioxidante não-enzimático que está presente em altas concentrações em extrato de semente de uva, extrato de casca de pinheiro, arandos, grãos de cacau, casca de limoeiro e folhas de avelã (Manimaran et al., 2011; Olmedo et al., 2021). A atividade antioxidante da proantocianidina provem da reatividade com o agente dador de hidrogeno e elétrons, da estabilidade flavonoide, da capacidade de quelação com metais de transição, e solubilidade e interação com membranas (Ma & Zhang, 2017).

Estudos prévios demonstraram que a proantocianidina tem uma capacidade antioxidante 20 a 50 vezes superior à do ascorbato de sódio (Fine, 2000; Olmedo et al., 2021); uma absorção mais rápida e mais completa comparativamente ao NaOCl (Fine, 2000); a 5% é mais eficaz do que o ascorbato de sódio a 10%; o ácido gálico presente na sua constituição é o principal responsável por aumentar a resistência adesiva (Manimaran et al., 2011; Rodríguez-Barragué et al., 2021); e que a capacidade da proantocianidina de reticular e estabilizar o colagénio aumenta também a resistência adesiva. Todos estes fatores contribuem para a ação potente de reversão que a proantocianidina tem ao atuar no efeito negativo do NaOCl na camada híbrida (Abuhaimed & Neel, 2017).

Ao estar naturalmente presente em plantas, a proantocianidina é considerada segura para diversas aplicações clínicas e suplementos alimentares (Fine, 2000).

3.3 Influência dos Agentes Antioxidantes no NaOCl

Os agentes antioxidantes são soluções capazes de atuar como redutores numa reação de oxidação. O NaOCl tem um efeito oxidante potente nos componentes da camada híbrida, críticos para a iniciação da polimerização na interface adesiva, diminuindo assim as forças de adesão. Ao aplicar um agente antioxidante após a irrigação com NaOCl, o microambiente da dentina é convertido de um substrato oxidado, para um substrato reduzido – condição ótima. Esta reação devolve o potencial *redox* da dentina e facilita a polimerização dos compostos resinosos, restabelecendo as forças adesivas (Pashley et al., 2001). Estes agentes têm também a capacidade de remover os resíduos de NaOCl por reação de oxirredução (Abuhaimed & Neel, 2017).

4. Resinas Compostas

As resinas compostas são utilizadas como material restaurador em Medicina Dentária há quase 50 anos (Moszner & Hirt, 2012; Zhou et al., 2019). O termo compósito é utilizado para descrever materiais que apresentam pelo menos 2 fases distintas – no caso de resinas compostas, estas são a matriz orgânica ou fase orgânica e a matriz inorgânica ou fase de preenchimento ou dispersão, que são ligadas por um organo-silano ou agente de união, que adere a matriz inorgânica à resina orgânica (Moszner & Hirt, 2012) (Figura 1).

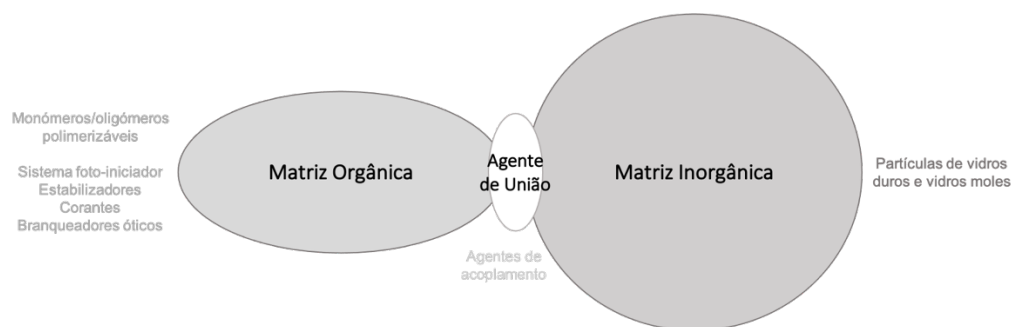


Figura 1 - Composição das resinas compostas

A matriz orgânica de um compósito fotopolimerizável é composta por monómeros/oligômeros polimerizáveis, um sistema foto-iniciador e aditivos como estabilizadores, corantes e branqueadores óticos. Os monómeros presentes na matriz orgânica são: o bisfenol-A-glicidil-dimetacrilato (Bis-GMA), o trietilenoglicol-

dimetacrilato (TEGDMA), o uretano-dimetacrilato (UDMA), o 2-hidroxietil-metacrilato (HEMA) ou o Bisfenol-A-glicidil-dimetacrilato-etoxilado (Bis-EMA) (Zhou et al., 2019). A matriz inorgânica depende diretamente do tipo e tamanho das suas partículas, divididas em vidros duros e vidros moles que incluem: quartzo, zinco, bário, estrôncio, sílica, entre outros (Ferracane, 2011; Zhou et al., 2019). Quanto ao agente de união, o mais utilizado atualmente é o 3-metacriloxipropiltrimetoxissilano (3-MPS) (Zhou et al., 2019).

As resinas compostas são utilizadas em restaurações diretas, na confecção de restaurações indiretas, como *inlays*, *onlays*, coroas, pontes e facetas, como cimentos e como selantes de fissuras (Moszner & Hirt, 2012).

As resinas compostas podem classificar-se de 3 formas distintas, em relação: (1) à viscosidade, (2) ao tipo de carga, e (3) ao tipo de resina. Em termos de viscosidade, temos as resinas convencionais, as fluídas (*flowable*) e as compactáveis (*packable*) (Ferracane, 2011). As resinas compactáveis apresentam elevada viscosidade, são facilmente condensáveis, permitem a execução de contatos interproximais ótimos, têm baixa contração de polimerização, e limitam a possibilidade de desgaste e fratura da restauração. Por outro lado, quando comparadas a resinas convencionais, as resinas fluídas apresentam baixa viscosidade devido à menor presença de partículas de carga. Estas resinas apresentam-se vantajosas em situações onde é necessário que ocorra escoamento da resina, de forma a promover um bom selamento da cavidade, e de forma a conservar a estrutura dentária ao máximo (Moszner & Hirt, 2012).

Devido à influência que as partículas de carga têm nas propriedades físicas das resinas, a classificação mais utilizada atualmente baseia-se no tipo e tamanho destas partículas. Assim sendo, as resinas compostas podem ser classificadas em:

- Macroparticuladas (10-50 μm);
- Microparticuladas (40-50 μm);
- Híbridas (10-50 μm e 10-50nm);
 - Microhíbridas
 - Nanohíbridas
- Nanoparticuladas (10-100 nm) (Ferracane, 2011; Zhou et al., 2019) (Figura 2).

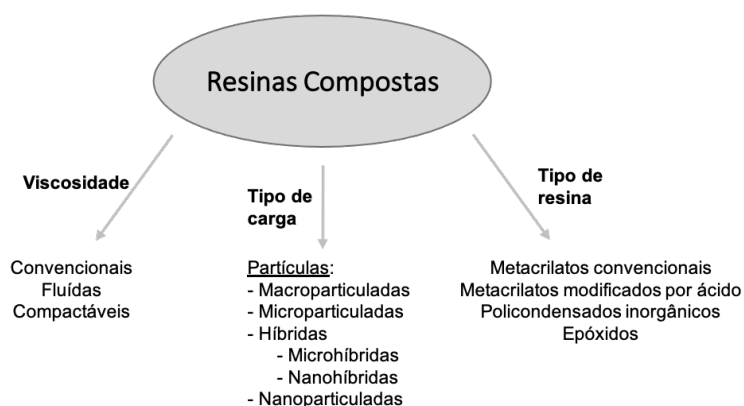


Figura 2 - Classificação das resinas compostas

As resinas compostas têm de corresponder totalmente aos requisitos físicos, químicos, toxicológicos e clínicos que lhes são exigidos. Cada componente presente num compósito influencia as suas propriedades de forma diferente. A taxa de polimerização, a sensibilidade à luz, a contração de polimerização, a estabilidade da cor, a absorção de água e a estabilidade de armazenamento, são maioritariamente influenciados pela composição da matriz orgânica. Quanto à resistência ao desgaste, dureza, radiopacidade, brilho, polimento e a libertação de iões de flúor, dependem da matriz inorgânica. Além disto, a resistência à flexão, módulo de elasticidade à flexão, consistência, translucidez, coeficiente de expansão térmica, solubilidade em água e biocompatibilidade dependem de ambas, matriz orgânica e matriz inorgânica. Por fim, para estabilidade a longo prazo e durabilidade dos compósitos, a interfase entre as duas matrizes é de elevada importância. O sucesso clínico de restaurações em resina composta depende também de fatores externos, como a preparação ótima da cavidade, boa adesão à camada adesiva, correta aplicação da resina por camadas/incrementos e polimerização adequada da mesma (Ferracane, 2011; Moszner & Hirt, 2012).

5. Estudo *In Vitro*

5.1 Microscopia Eletrónica de Varrimento – MEV

A microscopia eletrónica de varrimento (MEV) é a principal técnica de microscopia topográfica à escala nano- e micro- utilizada na investigação de materiais dentários. Tem como vantagem a profundidade de campo, que permite a obtenção de imagens topográficas a diferentes magnificações e que se transmitem com efeito de sombra-relevo, caracterizando uma imagem tridimensional (Chomette et al., 1986;

Marshall et al., 2010; Qaw et al., 2020). A análise química é feita analisando os raios-x libertados pelos elétrons.

O MEV funciona através de um feixe de elétrons altamente focados que percorrem a superfície da amostra por pontos e por linhas. Existem elétrons secundários pela amostra que são detetados por detetores próprios de elétrons, responsáveis por emitir uma imagem pixelizada num ecrã (Denk & Horstmann, 2004).

Alguns MEV, como o utilizado nesta investigação, necessitam de um alto vácuo de forma a que a amostra esteja completamente desidratada e permita a correta propagação dos elétrons, sem que ocorra dispersão ao longo do MEV (Zhou & Wang, 2007). No entanto, já existem MEV que suportam certos níveis de humidade, indicados em estudos do ambiente, por apresentarem um meio mais aproximado da realidade (Marshall et al., 2010).

Em Medicina Dentária, a microscopia eletrónica de varrimento tem variadas aplicações, pois é capaz de analisar tecidos duros e tecidos moles, nomeadamente: tecidos duros dentários, biomateriais e ligações entre tecidos duros dentários e biomateriais (Chomette et al., 1986). Através desta técnica, é possível identificar e avaliar alterações da interface adesiva entre o esmalte/dentina e um compósito dentário (Chomette et al., 1986). Por estas razões, a microscopia eletrónica de varrimento é uma técnica vastamente utilizada para caracterização morfológica da camada híbrida.

6. Enquadramento do Estudo

Durante o tratamento endodôntico, e quando existe a necessidade de restauração pré-endodôntica, esta é frequentemente sujeita à irrigação com NaOCl (Prada et al., 2019). Consequentemente, a camada híbrida destas restaurações é afetada, levando a uma diminuição significativa da resistência adesiva entre a dentina e o material restaurador (Abuhaimed & Neel, 2017; Frassetto et al., 2016). Não existe consenso quanto ao manter a restauração pré-endodôntica – que pode ou não ter resistência adesiva diminuída – como definitiva e apenas restaurar o acesso endodôntico, ou removê-la e restaurar de novo o dente para garantir o correto selamento das margens do mesmo.

Pretende-se desta forma avaliar se o uso de antioxidantes previne estas alterações, e também que tipo de antioxidante, segundo a sua origem, sintética ou natural, será mais eficaz (Carvalho et al., 2016; Fine, 2000). Vão ser utilizados dois agentes antioxidantes em forma de solução logo após a irrigação com NaOCl de forma a concluir se estes

agentes conseguem de alguma forma inibir a oxidação provocada pelo NaOCl na camada híbrida de restaurações pré-endodônticas.

O objetivo desta intervenção é poder facilitar a prática clínica – se o agente antioxidante inibir a degradação da camada híbrida provocada pelo NaOCl, pode assim ser incorporado num protocolo final de irrigação de modo a preservar a restauração pré-endodôntica. Os resultados da investigação serão avaliados através de Microscopia Eletrônica de Varrimento.

II) OBJETIVOS DO ESTUDO

Avaliar a influência dos dois agentes antioxidantes, Ascorbato de Sódio a 10% e Proantocianidina a 5%, na interface resina/dentina de restaurações pré-endodônticas sujeitas a irrigação com NaOCl a 1%, com recurso a análise qualitativa de MEV.

III) HIPÓTESES DE ESTUDO

Hipótese nula 1 (H_{10}): A análise qualitativa com recurso ao MEV não evidencia alterações na camada híbrida decorrentes do uso de antioxidante após hipoclorito de sódio

Hipótese alternativa (H_{11}): A análise qualitativa com recurso ao MEV evidencia alterações na camada híbrida decorrentes do uso de antioxidante após hipoclorito de sódio.

Hipótese nula 2 (H_{20}): Não existem diferenças entre a influência dos dois agentes antioxidantes usados.

Hipótese alternativa (H_{21}): Existem diferenças entre a influência dos dois agentes antioxidantes usados.

IV) MATERIAIS E MÉTODOS

1. Amostra de Estudo

O presente estudo obteve aprovação pela Comissão de Ética do Instituto Universitário Egas Moniz (processo nº 952). Foram selecionados 15 molares humanos extraídos há menos de 6 meses, sem lesões de cárie, fraturas ou restaurações do Banco de Dentes da Clínica Dentária Egas Moniz. Após a sua extração, foram lavados com água corrente de modo a eliminar o sangue e possíveis tecidos aderidos aos mesmos, e de seguida foi realizada a remoção de resíduos orgânicos com curetas periodontais. Posteriormente, os dentes foram armazenados para desinfecção em solução de cloramina T a 1%, a 4°C durante uma semana, de acordo com a norma ISO/TS 11405:2015. Após a desinfecção, os dentes foram colocados em água destilada a 4°C até ao início da fase experimental. Todos os procedimentos foram executados pelo mesmo operador, num ambiente de temperatura e humidade controladas $[(23 \pm 2)^{\circ}\text{C} + \text{HR } (50 \pm 10)]$ (Armstrong et al., 2017).

2. Materiais

Todos os materiais utilizados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Materiais utilizados – Composição e especificações técnicas

Material	Composição	Imagem
Ácido Ortofosfórico	37%	
Ascorbato de Sódio	10%	

Proantocianidina	5%	
Hipoclorito de Sódio	1%	
Optibond FL™ (Kerr, USA)	<i>Primer:</i> HEMA, GPDM, MMEP, PAMM, água, etanol, CQ, BHT. <i>Bond:</i> BisGMA, HEMA, GDMA, CQ, EDMAB, matriz inorgânica (SiO₂, bário, aluminoborosilicato, NaSiF₆), agente de união A174.	
Resina Composta GrandioSO (Voco, Germany)	Matriz orgânica: BisGMA, BisEMA, TEGDMA. Matriz inorgânica: partículas de cerâmica de vidro com 1µm, nano-partículas de dióxido de sílica com 20-40nm, pigmentos (óxido de ferro, dióxido de titânio). CQ, BHT.	

3. Preparação das Amostras

Primeiro, os dentes foram seccionados a 2/3 mm da junção amelo-cimentária (JAC) nas raízes, num micrótomo de tecidos duros (Accutom-50, Struers A/S, Ballerup, Denmark) com um disco diamantado sob refrigeração de água e a baixa temperatura, a uma velocidade de 0,125mm/min. De seguida, as coroas dentárias foram seccionadas perpendicularmente ao longo eixo do dente, com recurso ao disco diamantado no micrótomo de tecidos duros (Accutom-50, Struers A/S, Ballerup, Denmark), a 4 mm da superfície oclusal com o intuito de expor dentina (Figura 3).

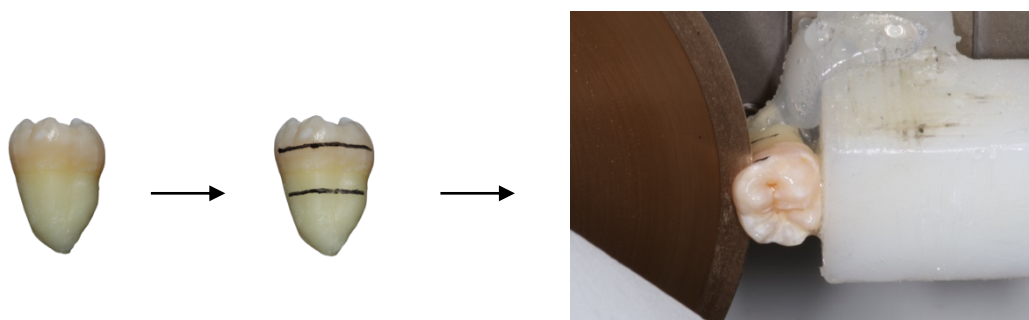


Figura 3 - Corte dos dentes no micrótomo de tecidos duros – Accutom-50, Struers A/S, Ballerup, Denmark

De forma a simular a *smear layer*, foi efetuado o polimento da superfície com um disco de papel de carbetto de silício de grão médio (SiC 600 grit) com água (Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, USA) (Figura 4).



Figura 4 - LaboPol-4, Struers A/S, Ballerup, Denmark

Sobre a dentina de cada dente foi simulada uma restauração pré-endodôntica (Figura 5). Em todos os dentes foi utilizado o sistema adesivo Optibond FL™ (Kerr, USA) segundo as instruções do fabricante referidas na Tabela 3. As restaurações foram realizadas com a resina GrandioSO (Voco, Alemanha) numa matriz composta de 6 mm de altura, medida com uma régua e marcada de 2 em 2 mm. As restaurações foram executadas em incrementos de 2 mm, sendo que foram feitos dois incrementos, dando a altura final de 4 mm, segundo as instruções do fabricante referidas na Tabela 4. De modo a fotopolimerizar as restaurações, foi utilizado um aparelho de luz durante 20s. O fotopolimerizador utilizado foi o Elipar™ Deep Cure S (3M, St. Paul, MN, USA), que de acordo com o fabricante, apresenta uma luz LED com potência de 1,470 mW/cm² (-10%/+20%) e um comprimento de onda entre os 430 nm e os 480 nm (Figura 6). A luz foi calibrada com um radiômetro de 5 em 5 utilizações.

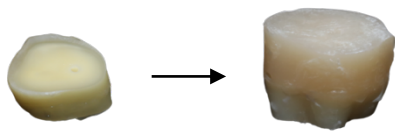


Figura 5 - Restauração pré-endodôntica



Figura 6 - Elipar™ Deep Cure S (3M, St. Paul, MN, USA)

Foi simulada uma abertura endodôntica com 3 mm no sentido vestibulo-lingual e 3 mm no sentido mesio-distal com uma broca esférica diamantada de grão médio (ISO 524) com irrigação ar/água (Figuras 7 e 8). Foi utilizada a mesma broca para os 15 dentes e a profundidade da abertura endodôntica foi de aproximadamente 6 mm para todos os dentes, medida com uma sonda periodontal. De forma a que o irrigante não extravasasse durante a irrigação, a entrada dos canais foi selada com cola de cianocrilato.



Figura 7 - Simulação da abertura endodôntica

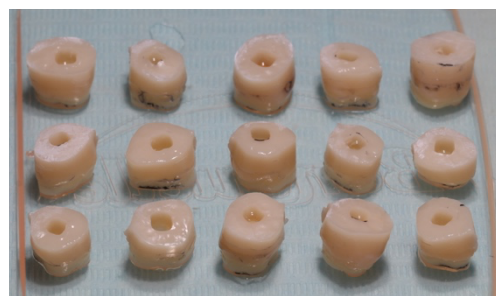


Figura 8 - Aberturas endodônticas

Todas as amostras foram irrigadas com hipoclorito de sódio a 1% segundo o protocolo de irrigação de Endodontia do IUEM referido na Tabela 5 (Figura 9). Posteriormente, as amostras foram distribuídas por 3 grupos experimentais (Tabela 2).

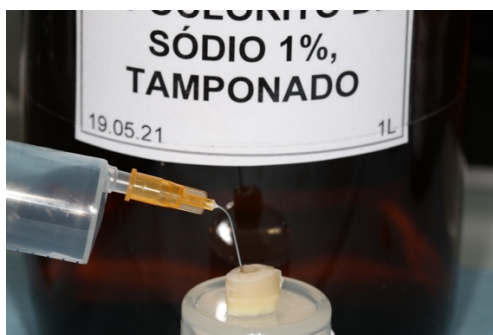


Figura 7 - Irrigação das amostras com hipoclorito de sódio

Tabela 2 - Grupos de estudo

Grupo 0: controle, irrigação com NaOCl (n=5)	Grupo 1: irrigados com NaOCl + irrigados com AS (n=5)	Grupo 2: irrigados com NaOCl + irrigados com PA (n=5)
• Aplicação de NaOCl durante 60 minutos trocando em períodos de 2 em 2 minutos • Armazenamento em saliva artificial durante 7 dias numa estufa a 37°C – saliva trocada a cada 24 horas	• Aplicação de NaOCl durante 60 minutos trocando em períodos de 2 em 2 minutos • Aplicação imediata de AS durante 10 minutos • Armazenamento em saliva artificial durante 7 dias numa estufa a 37°C – saliva trocada a cada 24 horas	• Aplicação de NaOCl durante 60 minutos trocando em períodos de 2 em 2 minutos • Aplicação imediata de PA durante 10 minutos • Armazenamento em saliva artificial durante 7 dias numa estufa a 37°C – saliva trocada a cada 24 horas

O grupo 0 representa o grupo controle, em que as amostras foram apenas sujeitas a irrigação, segundo o protocolo de irrigação, com hipoclorito de sódio a 1%; o grupo 1 representa as amostras sujeitas a irrigação, segundo o protocolo de irrigação, com hipoclorito de sódio a 1% e posterior irrigação com solução de ascorbato de sódio a 10% (Figura 10); e o grupo 2 representa as amostras sujeitas a irrigação, segundo o protocolo de irrigação, com hipoclorito de sódio a 1% e posterior irrigação com solução de proantocianidina a 5% (Figura 11).



Figura 8 - Irrigação das amostras do Grupo 1 com ascorbato de sódio 10%



Figura 9 - Irrigação das amostras do Grupo 2 com proantocianidina 5%

Com um disco diamantado no micrótomo de tecidos duros (Accutom-50, Struers A/S, Ballerup, Denmark) sob refrigeração constante de água e a baixa rotação, cada um dos 15 dentes foi cortado ao meio paralelamente ao longo eixo do dente (Figura 12).

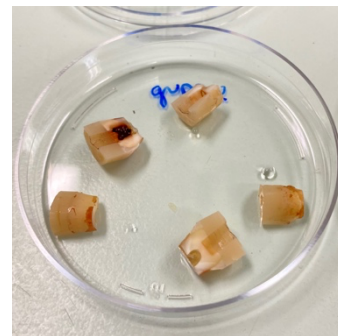
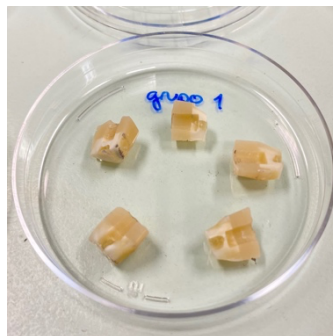
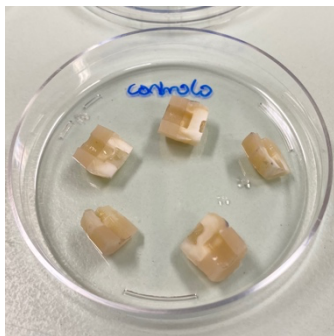


Figura 10 - Dentes cortados e divididos pelos respectivos grupos de estudo

Em cada grupo foram avaliadas 5 amostras e em cada uma das amostras foi avaliada a sua interface adesiva, dando um total de 15 interfaces adesivas para observação em MEV. De cada amostra foram recolhidas 3 imagens, uma a 500x, uma a 1000x e uma a 1500x.

Tabela 3 – Protocolo de utilização Etch-and-Rinse – Optibond FLTM

Técnica de Aplicação

- 1) Aplicar ácido fosfórico a 37% no esmalte e na dentina por 15 segundos; lavar abundantemente por 15 segundos e secar sem desidratar;
 - 2) Aplicar o *primer* (frasco 1) na dentina durante 15 segundos; secar 5 segundos;
 - 3) Aplicar o *bond* (frasco 2) sobre dentina durante 15 segundos e aplicar levemente ar por 3 segundos;
 - 4) Fotopolimerizar 10 segundos.
-

Tabela 4 – Instruções do fabricante para a Resina Composta GrandioSo

Técnica de Aplicação

- 1) Colocar o material restaurador por incrementos até 2mm;
 - 2) Fotopolimerizar durante 20 segundos.
-

Tabela 5 – Protocolo de irrigação com Hipoclorito de Sódio IUEM

Técnica de Aplicação

- 1) Utilização de 10 a 20 ml de NaOCl por canal;
 - 2) NaOCl a 1% de 2 em 2 minutos durante 60 minutos (de modo a simular a instrumentação);
 - 3) Protocolo de irrigação final - Agitação sónica ou ultrassónica do NaOCl durante 30 segundos;
 - 4) Irrigação com NaOCl a 1% durante 30 segundos.
-

4. Preparação das Amostras para Análise no MEV

Posteriormente aos cortes, cada amostra foi submetida a um protocolo de preparação, descrito na Tabela 6, com o objetivo de desidratar a dentina ao máximo para tornar possível a sua visualização no microscópio eletrônico de varrimento.

Tabela 6 – Protocolo de preparação das amostras para visualização do MEV (Machado, 2020)

Técnica de Aplicação

- 1) Lavar as amostras em água destilada durante 1 minuto;
 - 2) Imergir as amostras em etanol a 25% durante 15 minutos;
 - 3) Imergir as amostras em etanol a 50% durante 15 minutos;
 - 4) Imergir as amostras em etanol a 75% durante 15 minutos;
 - 5) Imergir as amostras em etanol a 95% durante 30 minutos;
 - 6) Imergir as amostras em etanol a 100% durante 60 segundos;
 - 7) Imergir as amostras em 1,1,1,3,3,3-hexametildisilizano durante 15 minutos dentro de uma HOTTE;
 - 8) Deixar as amostras a secar num papel.
-

Após a preparação das amostras, estas foram colocadas num suporte metálico para ser efetuado o recobrimento metálico próprio para visualização no MEV. As amostras foram colocadas no interior de uma máquina de evaporação a vácuo (JEE-400, Jeol, Japan), onde foram recobertas com partículas de ouro (Figura 13).

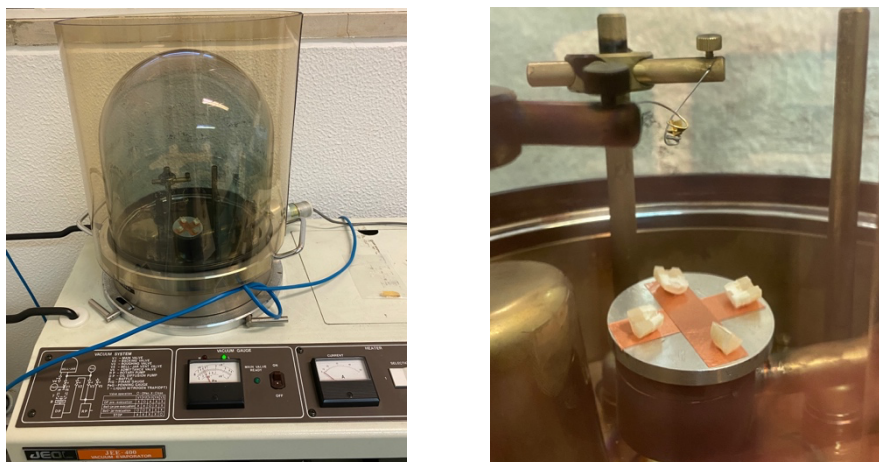


Figura 11 - Amostras dentro da máquina de evaporação a vácuo JEE-400

Uma vez recobertas, as amostras estão prontas para observação no MEV – JSM-5400 18 (Jeol, Japan) (Figura 14). As amostras foram observadas com uma magnificação de 500x, 1000x e 1500x com uma distância de trabalho de 30mm e com alta voltagem de 25Kv.

Na Figura 15 pode observar-se toda a metodologia executada em cada amostra.



Figura 12 - MEV – JSM-5400 18 (Jeol, Japan)

As fotografias foram extraídas através do programa QUANTAX EDS (Bruker, USA).

5. Análise Elementar por Difração de Raio-X

Foi realizada uma análise elementar com o espectrofotômetro do MEV em todas as amostras para a correta identificação das estruturas a analisar. Através dos elementos identificados foi possível fazer um *mapping* da localização exata dos mesmos nas amostras.

A análise elementar foi realizada com o X-ray Diffraction & Elemental Analysis do programa QUANTEX EDS (Bruker, USA).

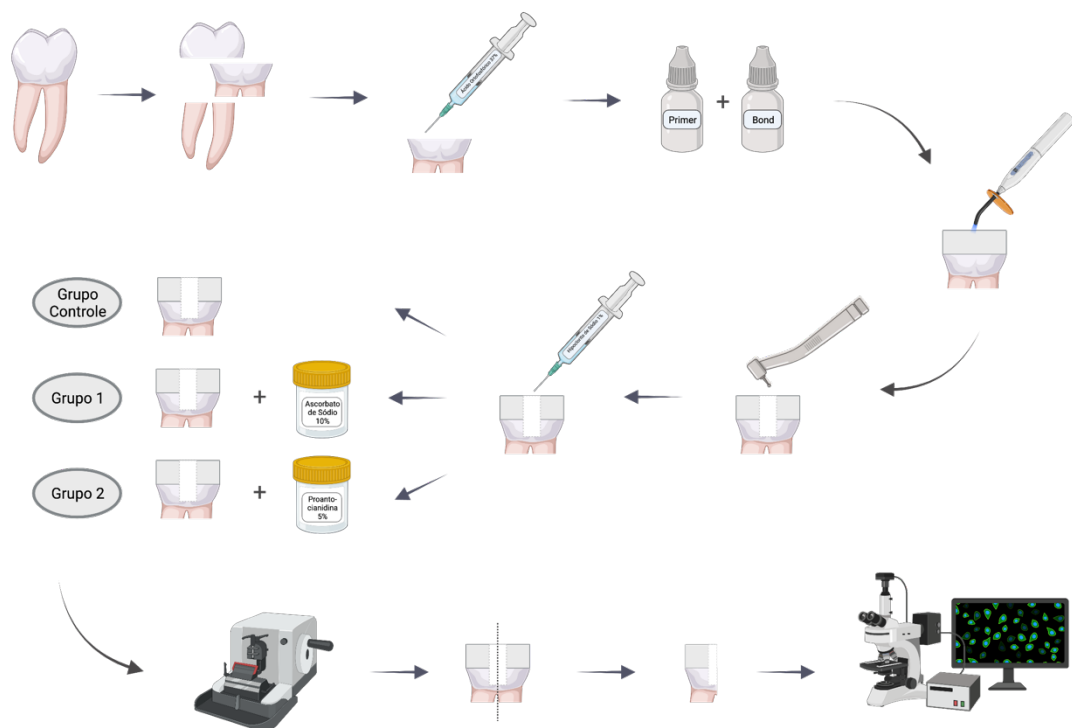


Figura 13 - Metodologia de preparação das amostras em estudo para análise em MEV

V) RESULTADOS

1. Microscopia Eletrônica de Varrimento

Foram obtidas imagens através do microscópio eletrônico de varrimento (MEV) das amostras dos respectivos grupos de estudo (Tabela 6).

Tabela 7 - Grupos de estudo

Grupo 0: controle, irrigação com NaOCl (n=5)	Grupo 1: irrigados com NaOCl + irrigados com AS (n=5)	Grupo 2: irrigados com NaOCl + irrigados com PA (n=5)
• Aplicação de NaOCl durante 60 minutos trocando em períodos de 2 em 2 minutos	• Aplicação de NaOCl durante 60 minutos trocando em períodos de 2 em 2 minutos • Aplicação de AS durante 10 minutos	• Aplicação de NaOCl durante 60 minutos trocando em períodos de 2 em 2 minutos • Aplicação de PA durante 10 minutos

Na Figura 16 podemos observar uma das amostras do Grupo Controle com uma ampliação de 500x. Este grupo apenas foi sujeito a irrigação com NaOCl. Nesta figura é possível observar a interface adesiva e identificando as estruturas representadas de cima para baixo vemos a dentina, a camada híbrida, o sistema adesivo e a resina composta. Na Figura 17 podemos observar as mesmas estruturas referidas, mas em ampliação de 1500x. Na dentina estão visíveis os túbulos dentinários e avaliando pela imagem a camada híbrida apresenta um desarranjo molecular do colagénio.

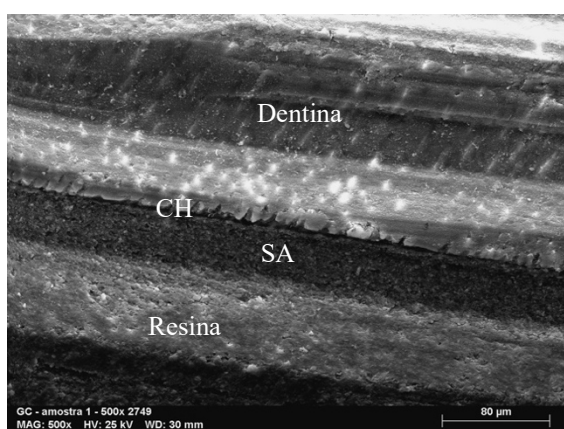


Figura 16 - Grupo controle (500x)

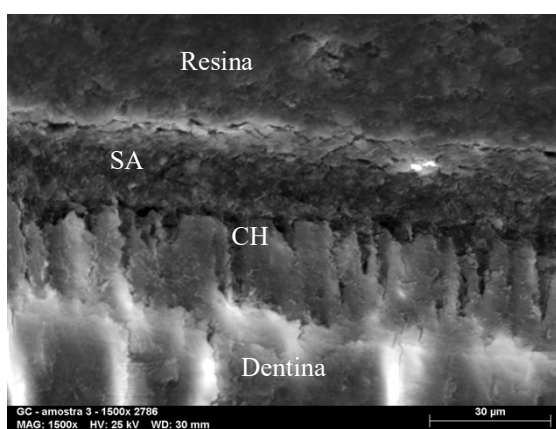


Figura 17 - Grupo controle (1500x)

Na Figura 18 podemos observar uma das amostras do Grupo 1 com uma ampliação de 500x. Este grupo foi sujeito a irrigação com NaOCl e com AS. Nesta figura é possível observar a interface adesiva e identificando as estruturas representadas da esquerda para a direita vemos a resina composta, o sistema adesivo, a camada híbrida e a dentina. Na Figura 19 podemos observar as mesmas estruturas, mas em ampliação de 1500x. Avaliando pela imagem, parece haver um fenômeno de remineralização da camada híbrida.

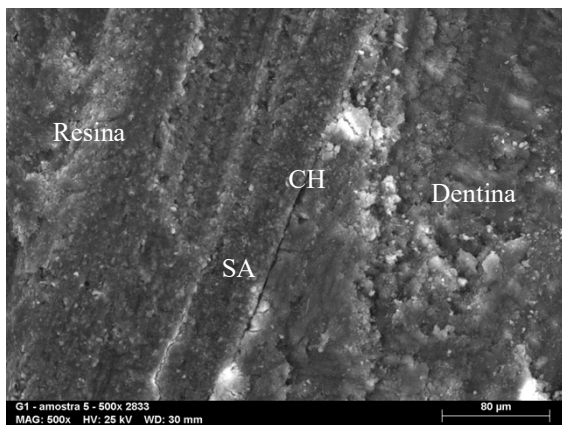


Figura 18 - Grupo irrigados com NaOCl e AS (500x)

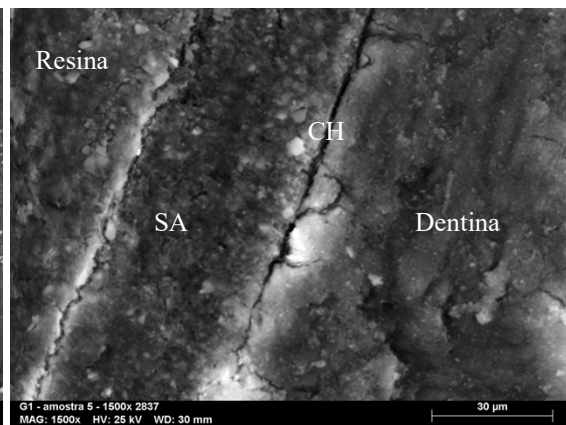


Figura 19 - Grupo irrigados com NaOCl e AS (1500x)

Na Figura 20 podemos observar uma das amostras do Grupo 2 com uma ampliação de 500x. Este grupo foi sujeito a irrigação com NaOCl e com PA. Nesta figura é possível observar a interface adesiva e identificando as estruturas representadas de cima para baixo vemos a dentina, a camada híbrida, o sistema adesivo e a resina composta. Na Figura 21 podemos observar as mesmas estruturas, mas em ampliação de 1500x. Avaliando pela imagem parece haver um fenômeno de remineralização da camada híbrida mais evidente quando comparado ao Grupo 1.

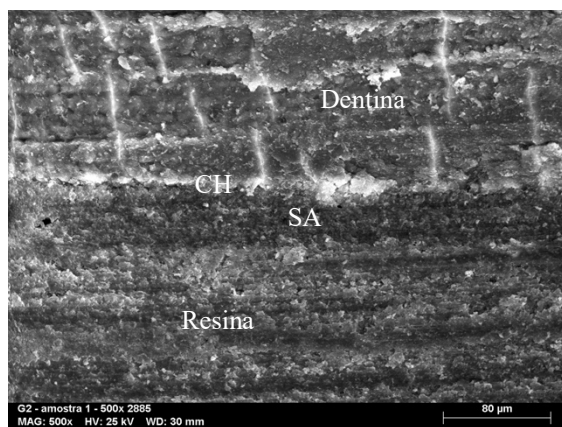


Figura 20 - Grupo irrigados com NaOCl e PA (500x)

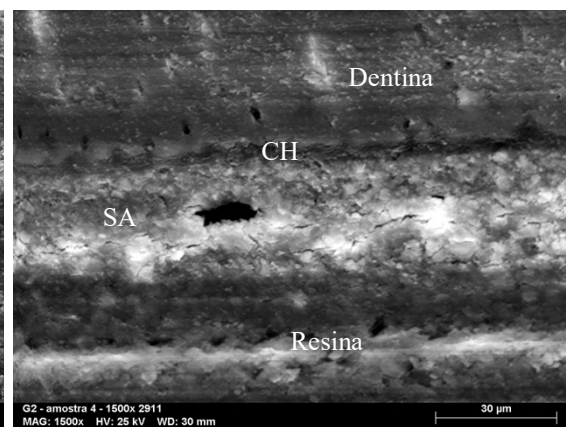
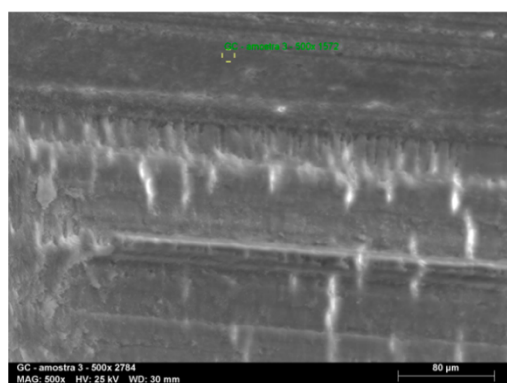


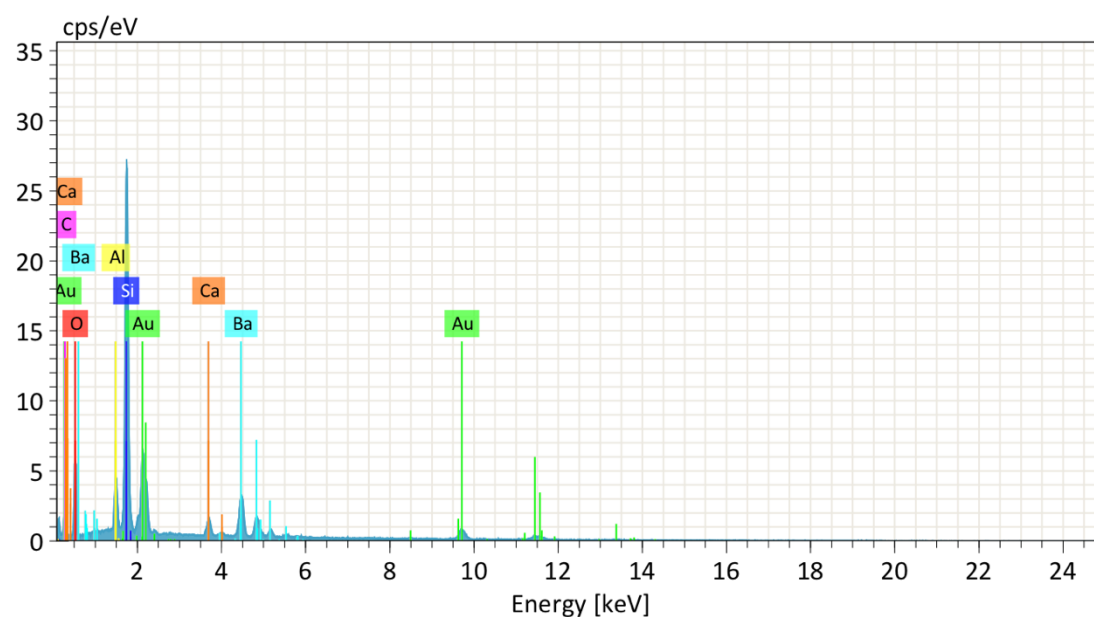
Figura 21 - Grupo irrigados com NaOCl e PA (1500x)

2. Análise Elementar por Difração de Raio-X

No dente do Grupo Controlo, na zona da resina composta foram detetados os seguintes elementos: Carbono (C), Oxigénio (O), Alumínio (Al), Silício (Si), Cálcio (Ca), Bário (Ba) e Ouro (Au) – Figura 22. Estes elementos são constituintes dos monómeros e partículas de carga presentes na resina composta utilizada – GrandioSO (Voco, Alemanha).



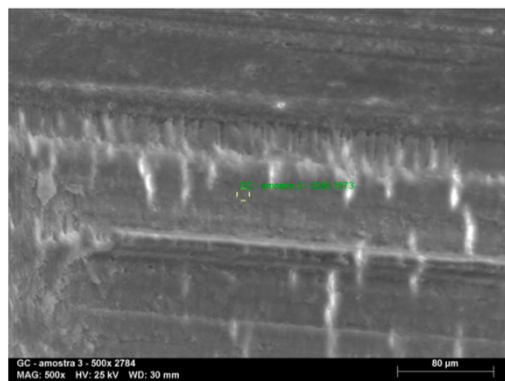
Name	Date	Time	HV [kV]	Mag	WD [mm]
GC - amostra 3 - 500x 2784	02/09/2021	13:25:44	25,0 keV	500x	30,0 mm



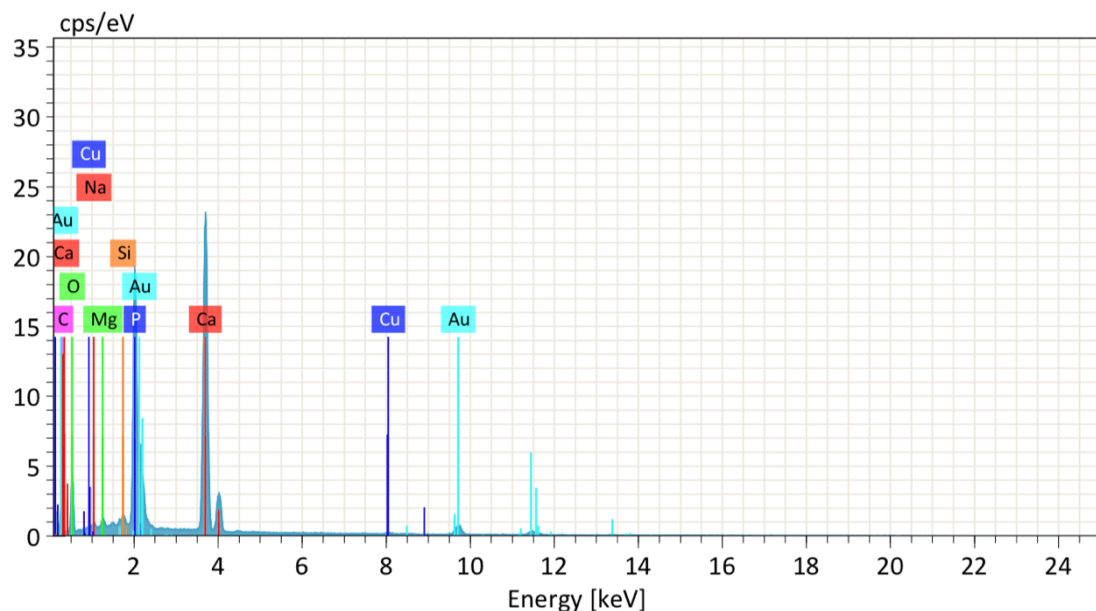
Spectrum	C	O	Al	Si	Ca	Ba	Au
GC - amostra 3 - 500x 1572	14,28	24,99	3,10	15,79	2,75	19,05	20,04

Figura 22 - Análise elementar da resina composta do grupo irrigados com NaOCl (500x)

No dente do Grupo Controlo, na zona da camada híbrida foram detetados os seguintes elementos: Carbono (C), Oxigénio (O), Sódio (Na), Magnésio (Mg), Silício (Si), Fósforo (P), Cálcio (Ca), Cobre (Cu) e Ouro (Au) – Figura 23. Estes elementos são constituintes da dentina, dos monómeros e partículas de carga presentes na resina composta utilizada – GrandioSO (Voco, Alemanha) – e dos monómeros e partículas de carga presentes no sistema adesivo utilizado – Optibond FL™ (Kerr, USA). O ouro deve-se à preparação da amostra para análise em MEV.



Name	Date	Time	HV [kV]	Mag	WD [mm]
GC - amostra 3 - 500x 2784	02/09/2021	13:25:44	25,0 keV	500x	30,0 mm



Spectrum	C	O	Na	Mg	Si	P	Ca	Cu	Au
GC - amostra 3 - 500x 1573	12,28	26,68	1,05	0,92	0,38	12,71	30,53	0,50	14,94

Figura 23 - Análise elemental da camada híbrida do grupo irrigados com NaOCl (500x)

Resultados

No dente do Grupo Controlo, na zona da dentina foram detetados os seguintes elementos: Carbono (C), Oxigénio (O), Flúor (F), Sódio (Na), Magnésio (Mg), Fosfato (P), Cálcio (Ca) e Ouro (Au) – Figura 24. Estes elementos são constituintes da dentina.

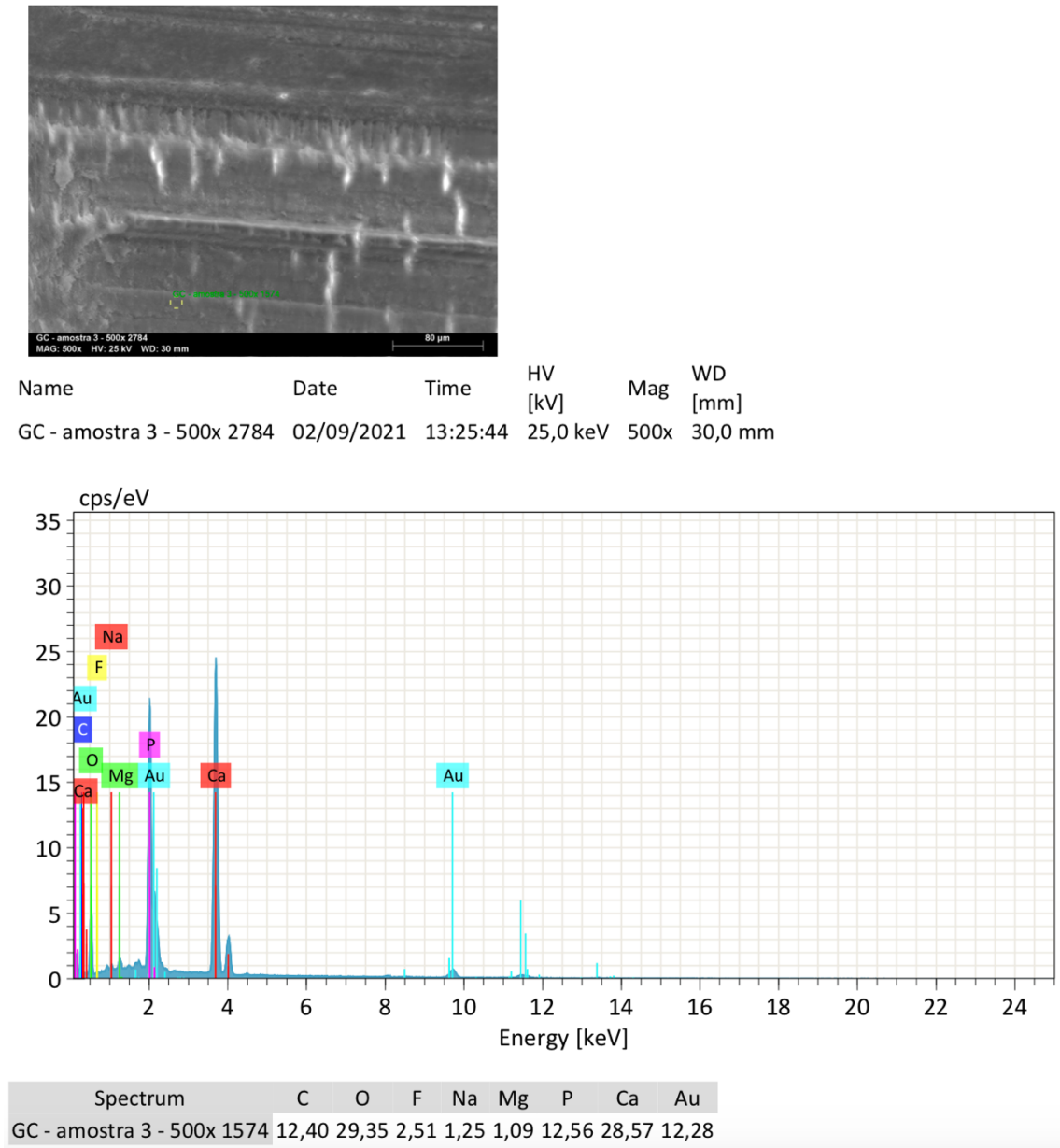


Figura 24 - Análise elementar da dentina do grupo irrigados com NaOCl (500x)

De forma a ser possível identificar corretamente as estruturas presentes na interface dentina/resina do Grupo Controlo, foi feito um *mapping* da amostra que indica por cores exatamente onde se encontra cada elemento presente na imagem – Figura 25.

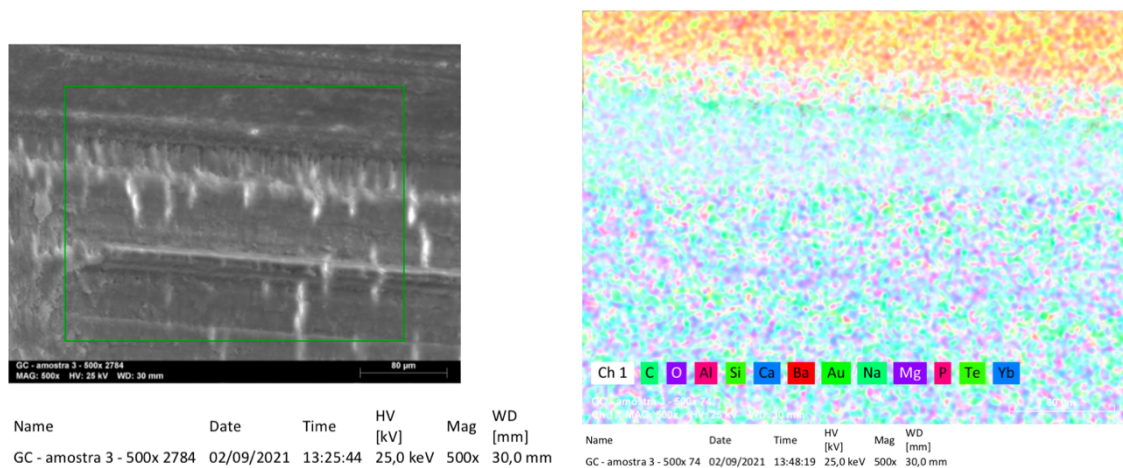


Figura 25 - Mapping dos elementos presentes no grupo irrigados com NaOCl (500x)

Foram selecionados apenas dois elementos: o Cálcio que representa a dentina, e o Silício que representa a resina. Desta forma foi possível concluir de forma exata a localização da interface adesiva para ser corretamente analisada em MEV – Figura 26.

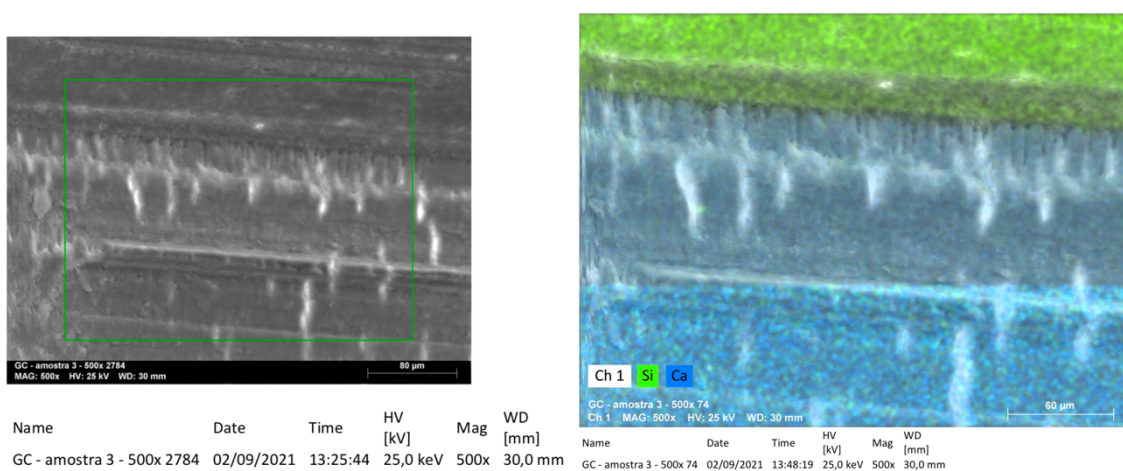


Figura 26 - Mapping dos dois elementos que caracterização a interface adesiva no grupo irrigados com NaOCl (500x)

Resultados

No dente do Grupo 1, na zona da resina composta foram detetados os seguintes elementos: Carbono (C), Oxigénio (O), Alumínio (Al), Silício (Si), Cálcio (Ca), Bário (Ba) e Ouro (Au) – Figura 27. Estes elementos são constituintes dos monómeros e partículas de carga presentes na resina composta utilizada – GrandioSO (Voco, Alemanha).

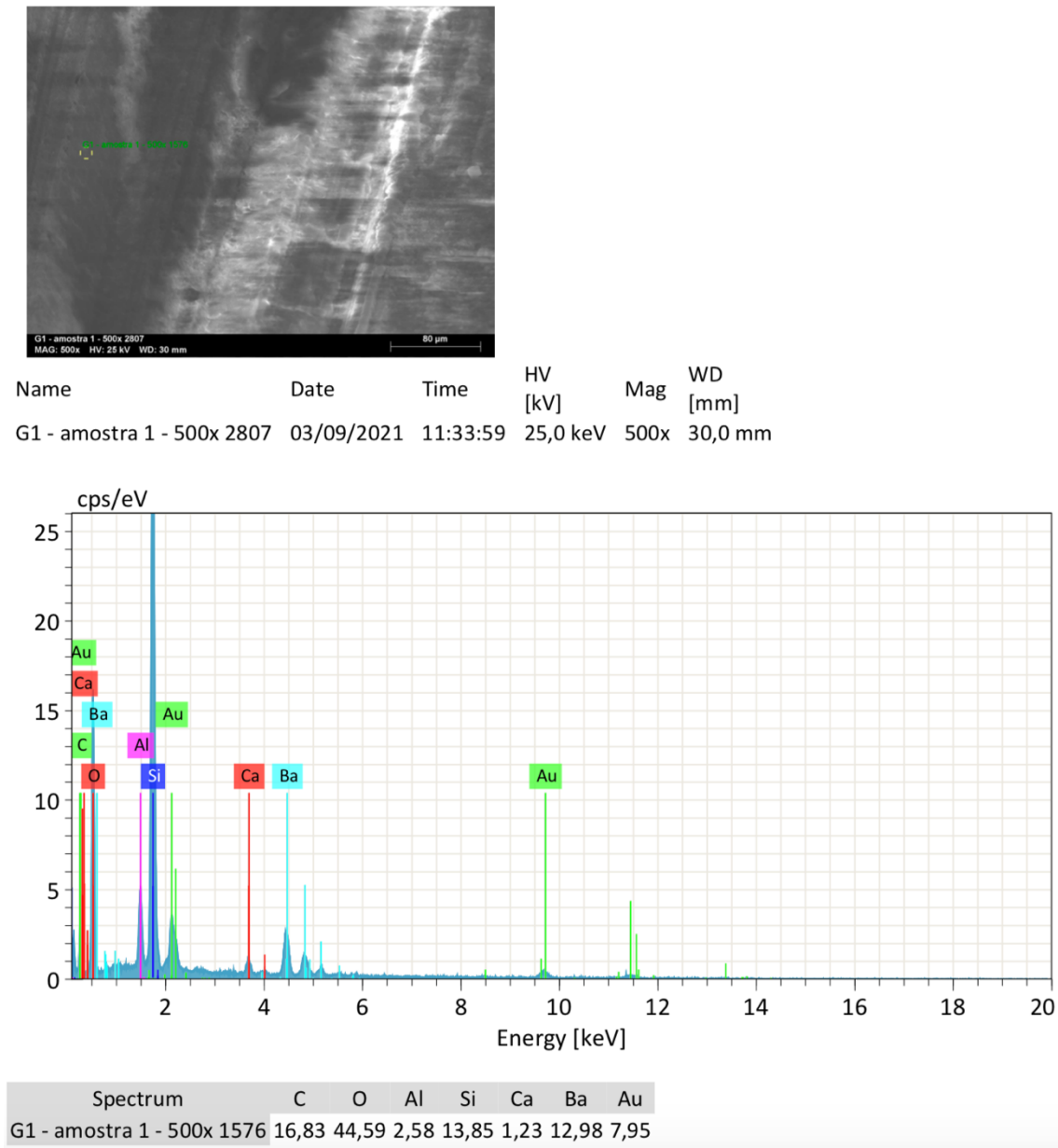


Figura 27 - Análise elementar da resina composta do grupo irrigados com NaOCl e AS (500x)

No dente do Grupo 1, na zona da dentina foram detetados os seguintes elementos: Carbono (C), Oxigénio (O), Fósforo (P), Cálcio (Ca), Cobre (Cu) e Ouro (Au) – Figura 28. Estes elementos são constituintes da dentina.

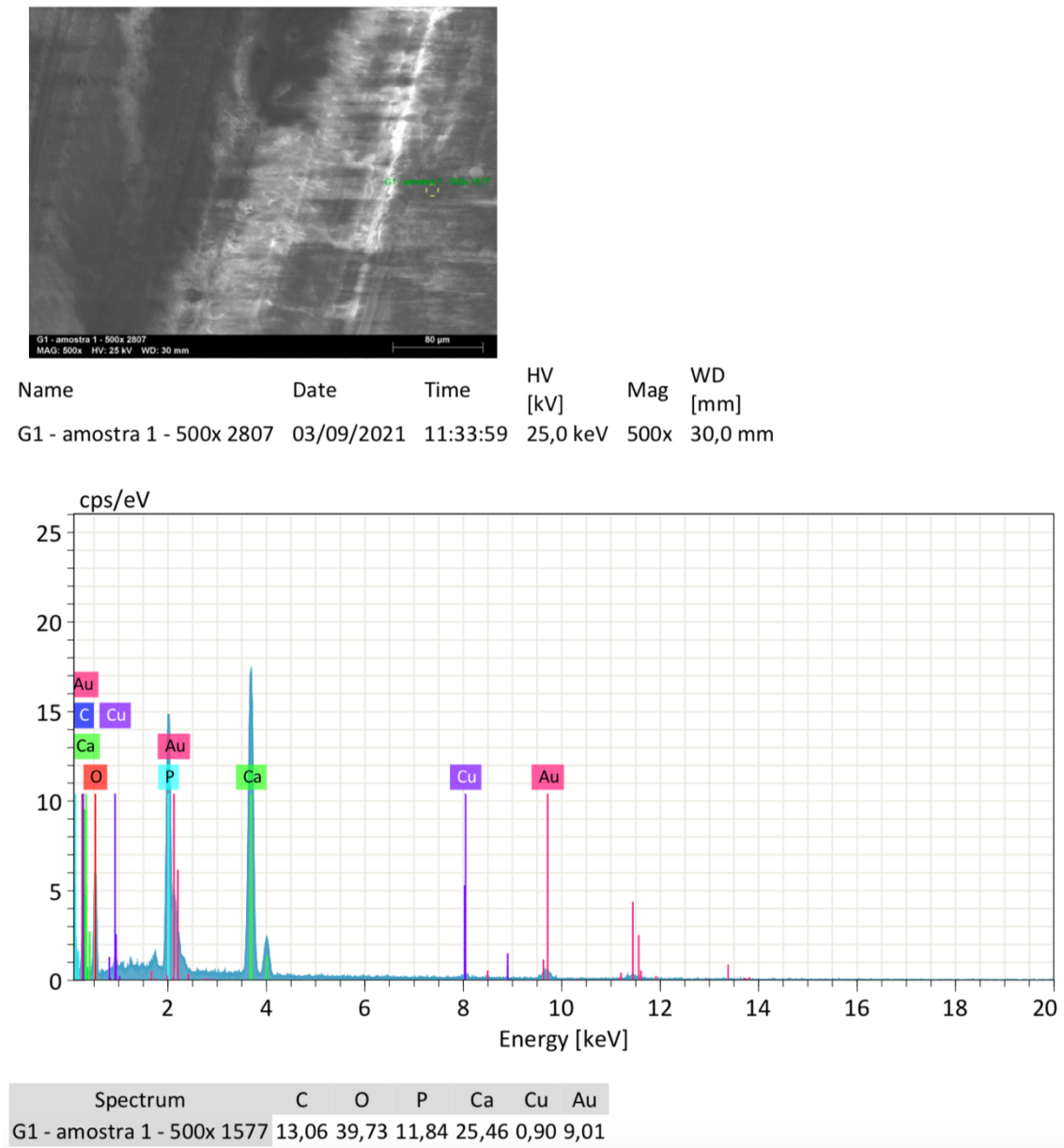


Figura 28 - Análise elementar da dentina do grupo irrigados com NaOCl e AS (500x)

Tal como foi feito para o Grupo Controlo, no Grupo 1 as amostras também foram submetidas a *mapping* dos elementos para facilitar a caracterização da interface adesiva – Figura 29. Durante o *mapping* foi identificado o novo elemento Itérbio (Yb), no entanto este elemento não é constituinte de nenhum dos materiais presentes na amostra, levando à conclusão que faz parte das peças de suporte metálicas das amostras.

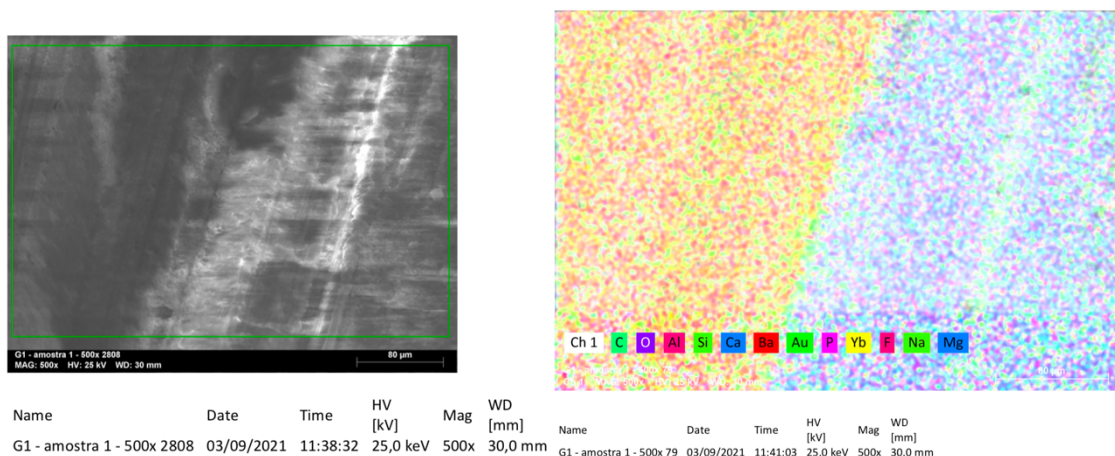


Figura 29 - Mapping dos elementos presentes no grupo irrigados com NaOCl e AS (500x)

No Grupo 1, foram novamente selecionados o Cálcio e o Silício como marcadores para concluir de forma exata a localização da interface adesiva para análise em MEV – Figura 30.

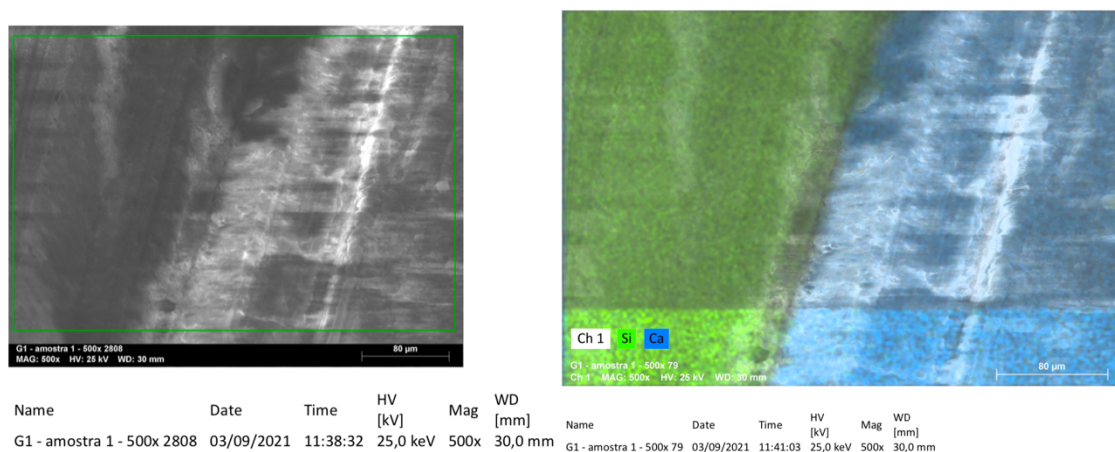


Figura 30 - Mapping dos dois elementos que caracterização a interface adesiva no grupo irrigados com NaOCl e AS (500x)

No dente do Grupo 2, na zona da dentina foram detetados os seguintes elementos: Carbono (C), Oxigénio (O), Fósforo (P), Cálcio (Ca) e Ouro (Au) – Figura 31. Estes elementos são constituintes da dentina.

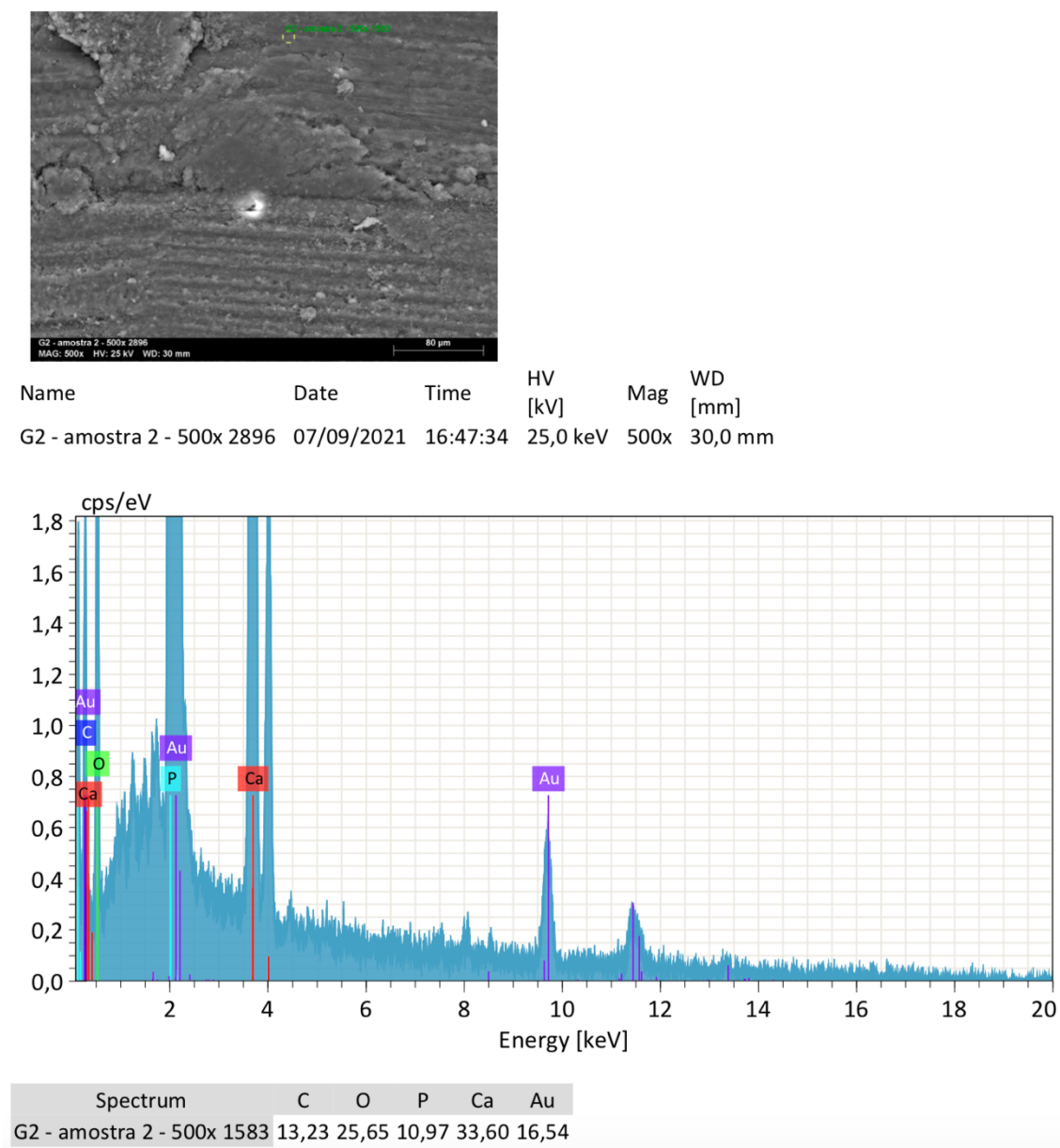


Figura 31 - Análise elementar da dentina do grupo irrigados com NaOCl e PA (500x)

No dente do Grupo 1, na zona da resina composta foram detetados os seguintes elementos: Carbono (C), Oxigénio (O), Alumínio (Al), Silício (Si), Bário (Ba) e Ouro (Au) – Figura 32. Estes elementos são constituintes dos monómeros e partículas de carga presentes na resina composta utilizada – GrandioSO (Voco, Alemanha).

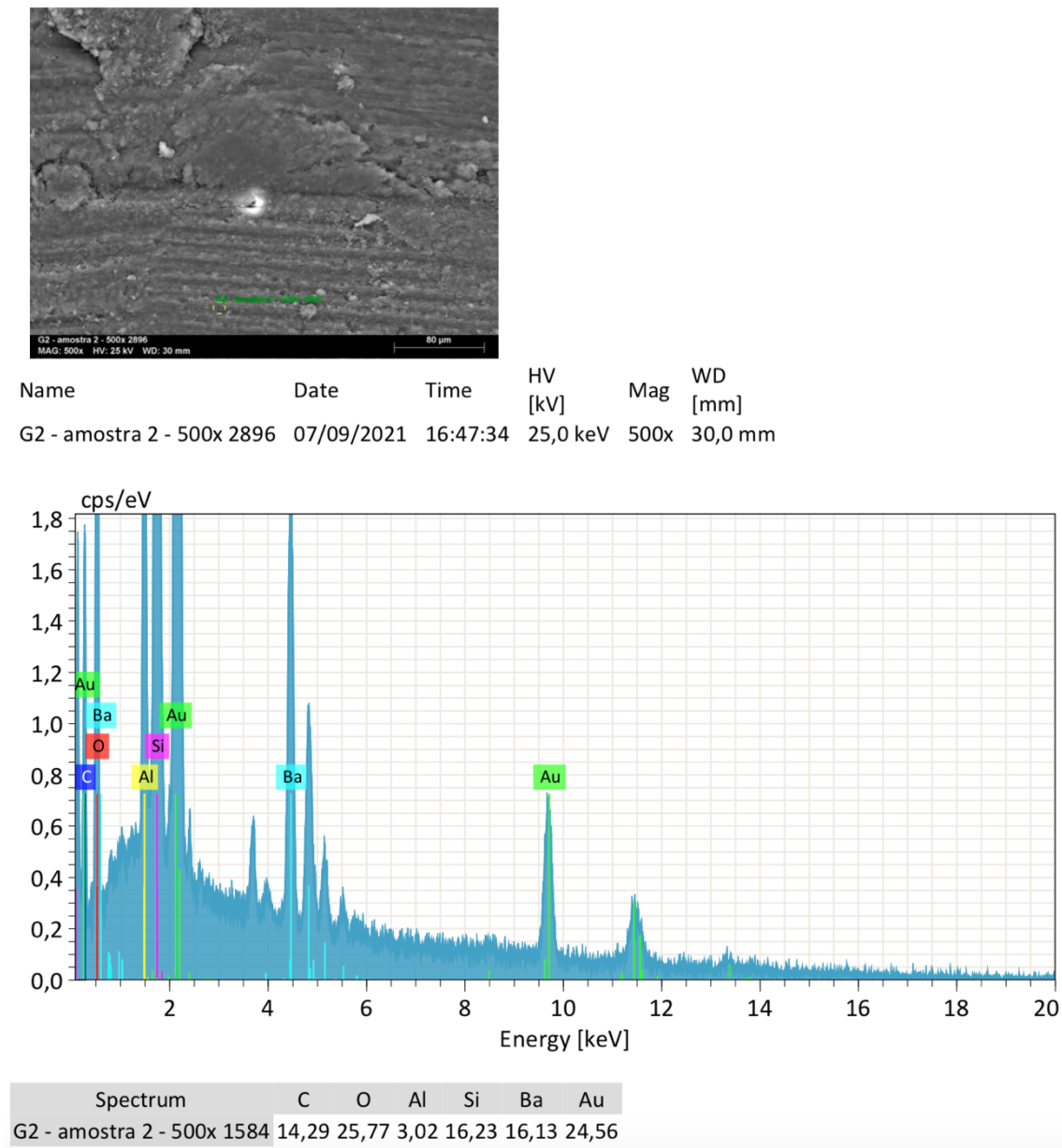


Figura 32 - Análise elementar da resina composta do grupo irrigados com NaOCl e PA (500x)

Como foi feito nos grupos anteriores, no Grupo 2 as amostras também foram submetidas a *mapping* dos elementos para facilitar a caracterização da interface adesiva – Figura 33.

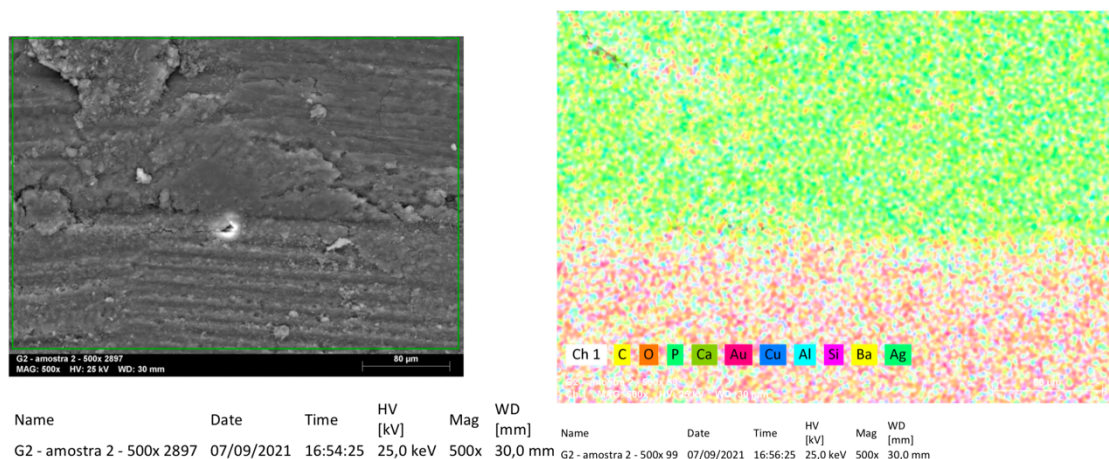


Figura 33 - Mapping dos elementos presentes no grupo irrigados com NaOCl e PA (500x)

No Grupo 2, foram novamente selecionados o Cálcio e o Silício como marcadores para concluir de forma exata a localização da interface adesiva para análise em MEV – Figura 34.

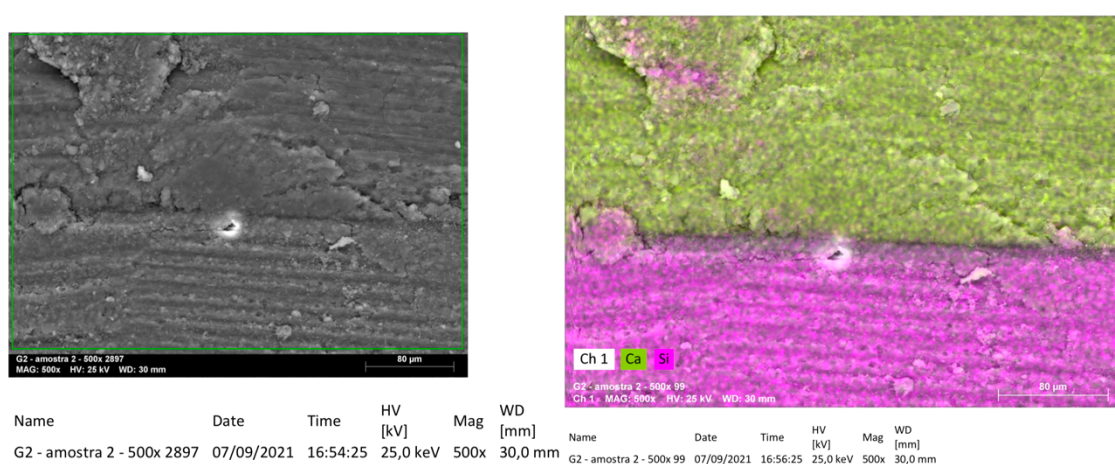


Figura 34 - Mapping dos dois elementos que caracterização a interface adesiva no grupo irrigados com NaOCl e PA (500x)

VI) DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência dos dois agentes antioxidantes, ascorbato de sódio e proantocianidina, na interface resina/dentina de restaurações pré-endodônticas sujeitas a irrigação com NaOCl durante o tratamento endodôntico, através de uma análise descritiva das imagens de MEV. Os resultados levam a que as hipóteses nulas sejam rejeitadas, visto que se observam diferenças na análise descritiva das imagens. Verificou-se que a irrigação com NaOCl realizada no Grupo Controlo parece afetar o conteúdo da camada híbrida, provocando dissolução da estrutura molecular do colagénio, criando um desarranjo evidente nas micrografias de MEV das restaurações pré-endodônticas, quando comparadas com o grupo de irrigados com o NaOCl e AS (Grupo 1) e com o grupo de irrigados com NaOCl e PA (Grupo 2). Além disso, parece haver um fenómeno de remineralização mais evidente no Grupo 2, quando comparado com o Grupo 1.

De forma a garantir a longevidade das restaurações pré-endodônticas é imperativo que a camada híbrida esteja íntegra e que a adesão seja eficaz. A degradação da interface adesiva leva à formação de *gaps* entre o dente e a restauração que consequentemente permitem a infiltração de microrganismos (Nima et al., 2019).

Para que seja viável manter-se uma restauração pré-endodôntica após o tratamento endodôntico, a irrigação com NaOCl não pode afetar a adesão da mesma ao dente, o que já foi referido por Breschi *et al.* (Breschi et al., 2008). A situação ideal em termos de hibridização ocorre pela penetração completa dos sistemas adesivos na dentina desmineralizada, substituindo o mineral previamente dissolvido pelo condicionamento ácido. No entanto, a hibridização raramente é perfeita, deixando fibras de colagénio desprotegidas e suscetíveis à degradação hidrolítica e enzimática (Breschi et al., 2018; Feitosa et al., 2019).

O NaOCl tem efeito proteolítico inespecífico capaz de dissolver componentes orgânicos como as fibras de colagénio (Abuhaimed & Neel, 2017) e apesar de ser amplamente estudado, existe pouca informação quanto aos seus efeitos a longo prazo na resistência adesiva (Nima et al., 2019). A presença de NaOCl pode interferir na adesão através de vários mecanismos conhecidos:

- promovendo a desproteinização da dentina, agindo como uma estratégia de adesão – aumentando a micro-retenção;

- envelhecendo a camada híbrida por remoção de fibras de colagénio desprotegidas;
- afetando a reação de polimerização dos monómeros do adesivo (Nima et al., 2019).

Em 2003, Yamauti *et al.* investigaram a resistência adesiva de dois sistemas adesivos submetidos a irrigação com NaOCl a 10% durante tempos variados, concluindo que existem diferenças significativas na resistência adesiva entre os diversos tempos de irrigação. Os autores verificaram que o aumento do tempo da irrigação com NaOCl é diretamente proporcional à diminuição da resistência adesiva. As imagens fratógráficas recolhidas de MEV revelaram a presença de uma camada híbrida em dissolução (Yamauti et al., 2003).

Arashiro *et al.* avaliaram a influência de diversos agentes irrigantes, entre eles o NaOCl a 1% e 2,5%, na resistência adesiva dentina/resina. A análise fratógráfica em MEV demonstrou a ocorrência de múltiplas fraturas envolvendo a camada híbrida, e fraturas envolvendo mais do que um substrato (Arashiro et al., 2010).

Em 2019, Nima *et al.* mostraram através da análise de imagens de MEV que após irrigação da interface resina/dentina com NaOCl os *tags* de resina tendem a parecer mais porosos e frágeis. Em alguns casos não houve formação de camada híbrida devido à remoção das fibras de colagénio da dentina pelo NaOCl. Já em espécimens armazenados após 1 ano, foram observados *gaps* entre a dentina e a resina. Os autores concluíram que houve comprometimento da resistência adesiva (Nima et al., 2019). No presente estudo verificou-se a existência de algumas falhas na camada híbrida sujeita a irrigação com NaOCl.

Por outro lado, um estudo de 2018 elaborado por Siqueira *et al.* demonstrou que quando aplicado NaOCl em interfaces resina/dentina erodida o NaOCl tem a capacidade de manter a estabilidade a longo prazo de adesivos *self-etch* e *etch-and-rinse*. O intuito deste estudo foi de avaliar se a irrigação com NaOCl seria uma opção para minimizar a degradação dos adesivos em interfaces resina/dentina. Contudo, a conclusão deste estudo vai contra os próprios resultados observados. Os resultados demonstraram que a presença de dentina erodida pode ter influenciado os mesmos devido à diferença entre uma superfície dentinária erodida e uma superfície dentinária sã. A erosão remove os *smear plugs* presentes nos túbulos dentinários, que contêm na sua composição NaOCl residual e matéria orgânica, o que origina um maior diâmetro tubular e consequentemente aumenta

a resistência adesiva. Esta melhoria dos valores da resistência adesiva deve-se não à presença de NaOCl, mas sim ao efeito da dentina erodida (Siqueira et al., 2018).

Alguns estudos demonstram que o efeito do NaOCl na adesão à dentina varia com a composição química dos sistemas adesivos (Pioch et al., 1999). Estas variações dependem diretamente da composição química de cada sistema adesivo, que determina a capacidade do condicionamento ácido em remover a dentina degenerada e remover o NaOCl residual, que como já explicado anteriormente, pode interferir com os radicais livres da reação de polimerização das resinas compostas (Ishizuka et al., 2001). Como sugerido por diversos autores, sistemas adesivos *self-etch* de 1 passo, por exemplo, têm a capacidade de remover a dentina degenerada e o NaOCl residual, o que não acontece com adesivos *self-etch* contendo um *primer* ácido em separado (Ishizuka et al., 2001). Esta diferença entre sistemas adesivos apenas demonstra que o efeito do NaOCl não é tão forte em sistemas adesivos *self-etch* 1 passo, mas não explica o porquê da redução da resistência adesiva. Assim sendo, podemos assumir que existem outros fatores que desempenham um papel principal na resistência adesiva à dentina previamente irrigada com NaOCl. Estes podem ser a forma (solução ou gel), a concentração, e a duração da irrigação com NaOCl (Zhang et al., 2010). No entanto, estas não devem ser as únicas variáveis a serem consideradas.

Em 2017, Abuhaimed & Neel, concluíram que fatores como a origem da amostra de dentina (animal ou humana), a idade do humano ou animal de onde a amostra de dentina é recolhida, as condições de armazenamento da amostra de dentina, a região do dente de onde é recolhida (coroa/raiz), a localização de onde é recolhida (superficial/parede do canal), a variação de técnicas utilizadas para preparar as amostras e os métodos utilizados para analisar a resistência adesiva das amostras, devem também ser equacionados (Abuhaimed & Neel, 2017).

Independentemente da ampla variedade de resultados, a maior parte dos estudos envolvendo a influência do NaOCl na resistência adesiva demonstram que efetivamente o NaOCl diminui a adesão dentina/resina. Desta forma foi necessário desenvolver alternativas que restabeleçam a resistência adesiva perdida ou que não permitam que o NaOCl tenha esse efeito. Foi assim que surgiu a aplicação de agentes antioxidantes que quando incorporados no sistema adesivo ou aplicados logo após a irrigação com NaOCl, evitam que o NaOCl afete a camada híbrida (Frassetto et al., 2016).

Existem variadas formas de incluir agentes antioxidantes de forma a melhorar a resistência adesiva dentina/resina. Alguns destes agentes, além de antioxidantes, têm ação

antibacteriana ou atuam como inibidores da matriz de metaloproteinases. Estas características conferem aos agentes antioxidantes a capacidade de aumentarem a resistência da dentina à biodegradação e, desta forma, estabilizar a interface resina/dentina ao eliminarem bactérias residuais ou inibindo a degradação da camada híbrida (Abuhaimed & Neel, 2017). A proantocianidina aumenta a resistência adesiva e a durabilidade de materiais restauradores com base de resina à dentina radicular, e aumenta a resistência da dentina desmineralizada à degradação (Kalra et al., 2013). Contudo, quando a proantocianidina é incorporada em sistemas adesivos, a resistência adesiva diminui, especialmente quando incorporada a elevadas concentrações (3%) (Epasinghe et al., 2012). Adicionalmente, a incorporação da proantocianidina no *bond* traduz-se numa resistência adesiva inferior comparativamente a quando incorporada no *primer* (Hechler et al., 2014). Assim, na presente investigação optou-se por desenvolver um protocolo que incluísse a proantocianidina, mas de forma que não interferisse mais com a resistência adesiva já diminuída pelo efeito do NaOCl, pelo que se optou por uma irrigação com proantocianidina após a restauração e irrigação com NaOCl.

O ascorbato de sódio, como já explicado anteriormente, é o sal do ácido ascórbico. Ambos são conhecidos pelo seu poder antioxidante, no entanto, o ascorbato de sódio é mais eficaz a aumentar a resistência adesiva, como provado por Pashley *et al.* ao avaliarem a diferença entre ácido ascórbico a 10% e ascorbato de sódio a 10% (Pashley et al., 2001). Em 2005, Vongphan *et al.* concluíram também que a irrigação com ascorbato de sódio a 10% durante 10 minutos em dentina previamente irrigada com NaOCl tem a capacidade de repor a resistência adesiva de sistemas adesivos *etch-and-rinse* (Vongphan et al., 2005). Com base nesta investigação, no presente estudo foi incorporado o ascorbato de sódio da mesma forma.

Um estudo desenvolvido por Aksakalli *et al.* demonstrou não haver diferença na ação antioxidante entre ascorbato de sódio a 10% e proantocianidina a 5%, no entanto os autores sugerem a utilização de proantocianidina quando necessário por ter menos efeitos secundários descritos na literatura (Aksakalli et al., 2013). Como já mencionado anteriormente, no presente estudo verifica-se de facto uma diferença entre os dois agentes antioxidantes, mostrando-se a PA mais eficaz a preservar a integridade e qualidade da camada híbrida.

O NaOCl é um composto químico instável que em solução se dissocia rapidamente (Nicoletti et al., 2009). Esta dissociação do NaOCl muitas vezes não é perceptível e apenas se consegue determinar por análise quantitativa dos componentes

presentes na solução. Através deste tipo de análise, existem estudos que comprovam que o cloro derivado do NaOCl é altamente instável e afetado por fatores como a presença de matéria orgânica, oxigênio e luz, e pelas diferenças de pH e temperatura (Nicoletti et al., 2009). De forma a preservar as condições ideais do NaOCl, o presente estudo reuniu condições de armazenamento do NaOCl numa temperatura ambiente controlada $[(23 \pm 2)^{\circ}\text{C}]$ durante a sua utilização, e armazenado numa temperatura de $[(4 \pm 2)^{\circ}\text{C}]$. Esta variação de temperaturas pode ter influenciado o comportamento e validade do NaOCl.

Segundo o presente estudo, quando analisadas as imagens fratógráficas retiradas do MEV, a aplicação de NaOCl apresenta ter efeito negativo na camada híbrida, resultando no desarranjo molecular do colagénio presente. No entanto, no Grupo 1 e no Grupo 2, em que as amostras além de irrigadas com NaOCl foram irrigadas com ascorbato de sódio e proantocianidina respetivamente, observamos que o NaOCl não afeta a camada híbrida da mesma forma. Isto deve-se à possível proteção da camada híbrida posterior ao uso de NaOCl, por eventual precipitação de sais de cálcio provenientes da saliva.

Sendo o efeito do NaOCl prejudicial para a interface adesiva de restaurações pré-endodônticas, o presente estudo demonstra que este efeito pode ser interrompido pela posterior irrigação com agentes antioxidantes, que inibem a degradação por oxidação da camada híbrida provocada pelo NaOCl.

VII) CONCLUSÃO

Segundo os resultados obtidos no presente estudo, é possível concluir que a irrigação com NaOCl influencia negativamente a camada híbrida, como é visível pelo desarranjo da rede de colagénio evidente.

Com o presente estudo é possível também afirmar que a integridade da camada híbrida não é tão afetada quando existe uma irrigação com o agente antioxidante ascorbato de sódio posteriormente à irrigação com NaOCl, e que com a irrigação com o agente antioxidante proantocianidina não foi observada qualquer degradação da camada híbrida.

Pode assim concluir-se que a aplicação de agentes antioxidantes após a irrigação com NaOCl poderá promover um efeito de remineralização e interromper o efeito do NaOCl na camada híbrida de restaurações pré-endodônticas, especialmente quando aplicada proantocianidina que se revelou mais eficaz que o ascorbato de sódio.

1. Relevância Clínica

O NaOCl é o irrigante mais utilizado em tratamentos endodônticos até ao presente, e a sua aplicação é constante ao longo dos mesmos. Muitas vezes para que seja possível a colocação do isolamento absoluto para se proceder à endodontia, é necessária uma restauração pré-endodôntica para colocar o retentor. Como observado em estudos semelhantes, o efeito negativo do NaOCl em restaurações é real, mas seguindo um protocolo que inclua uma posterior irrigação com agentes antioxidantes após a finalização da endodontia, parece tornar possível manter as restaurações pré-endodônticas, já que não se observam alterações na camada híbrida irrigada. Desta forma, a prática clínica é facilitada e o próprio paciente é submetido a menos horas de cadeira.

2. Perspetivas Futuras

Numa perspetiva futura seria interessante:

- Incorporar os agentes antioxidantes AS e PA no *bond* e no *primer*, e analisar os efeitos na camada híbrida das duas técnicas através de MEV;

- Incorporar os agentes antioxidantes AS e PA no *bond* e no *primer*, e analisar os efeitos na camada híbrida entre as duas técnicas através de testes de microtração;
- Avaliar a ação do NaOCl, AS e PA na microfiltração de restaurações pré-endodônticas após envelhecimento;
- Testar o efeito do NaOCl, AS e PA a diferentes concentrações na integridade da camada híbrida;
- Avaliar a eficácia de outros agentes antioxidantes a neutralizar o efeito negativo do NaOCl na camada híbrida;
- Comparar a ação do NaOCl em camadas híbridas formadas por adesivos com composições químicas distintas.

VIII) BIBLIOGRAFIA

- AAE. (2011). Root Canal Irrigants and Disinfectants. *Endodontics: Colleagues for Excellence*, 2–5.
- Abuhaimed, T. S., & Neel, E. A. A. (2017). Sodium Hypochlorite Irrigation and Its Effect on Bond Strength to Dentin. *BioMed Research International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1930360>
- Aksakalli, S., Ileri, Z., & Karacam, N. (2013). Effect of pine bark extract on bond strength of brackets bonded to bleached human tooth enamel. *Acta Odontologica Scandinavica*, 71(6), 1555–1559. <https://doi.org/10.3109/00016357.2013.776108>
- AAE. (2019). *Guide to Clinical Endodontics*. 3636, 1–40. www.aae.org
- Arashiro, F., Figueiredo, J., Guerisoli, D., Pereira, K., Silva, P., & Yoshinari, H. (2010). Avaliação da Influência das Soluções Irrigadoras Endodônticas na Resistência Adesiva Sobre a Dentina Superficial Coronária de Dentes Bovinos Analisadas em Microscópio Eletrônico de Varredura Evaluation the Influence of Endodontic Irrigants on Bond Strenght. *Rev Odontol Bras Central*, 8(1997), 314–318.
- Arcari, G. M., Araújo, E., Baratieri, L. N., & Lopes, G. C. (2007). Microtensile Bond Strength of a Nanofilled Composite Resin to Human Dentin after Nonvital Tooth Bleaching. *The Journal of Adhesive Dentistry*, 9(3), 333–340.
- 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>
- Basrani, B. (2011). Irrigation in endodontic treatment. *The Alpha Omegan*, 104(1-2), 18–25.
- Basrani, B., & Malkhassian, G. (2015). Update of Endodontic Irrigating Solutions. In *Endodontic Irrigation: Chemical Disinfection of the Root Canal System* (pp. 99–115). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-16456-4>
- 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>
- Breschi, L., Mazzoni, A., Ruggeri, A., Cadenaro, M., Di Lenarda, R., & De Stefano Dorigo, E. (2008a). Dental adhesion review: Aging and stability of the bonded interface. *Dental Materials*, 24(1), 90–101. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2007.02.009>
- Breschi, L., Mazzoni, A., Ruggeri, A., Cadenaro, M., Di Lenarda, R., & De Stefano Dorigo, E. (2008b). Dental adhesion review: Aging and stability of the bonded interface. *Dental Materials*, 24(1), 90–101. <https://doi.org/10.1016/J.DENTAL.2007.02.009>
- Buonocore, M. G. (1955). A SIMPLE METHOD OF INCREASING THE ADHESION OF ACRYLIC FILLING MATERIALS TO ENAMEL SURFACES. *J. D. Res.*, 34(10), 849–853.
- Carrilho, E., Cardoso, M., Ferreira, M. M., Marto, C. M., Paula, A., & Coelho, A. S. (2019). 10-MDP Based Dental Adhesives: Adhesive Interface Characterization and Adhesive Stability - A Systematic Review. *Materials*, 12, 1–18. <https://doi.org/10.3390/ma12050790>
- Carvalho, C., Fernandes, F. P., Freitas, V. da P., França, F. M. G., Basting, R. T., Turssi, C. P., & do Amaral, F. L. B. (2016). Effect of green tea extract on bonding durability of an etch-and-rinse adhesive system to caries-affected dentin. *Journal of Applied Oral Science*, 24(3), 211–217. <https://doi.org/10.1590/1678-775720150518>
- Carvalho, R. M., Chersoni, S., Frankenberger, R., Pashley, D. H., Prati, C., & Tay, F. R. (2005). A challenge to the conventional wisdom that simultaneous etching and resin infiltration always occurs in self-etch adhesives. *Biomaterials*, 26(9), 1035–1042. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2004.04.003>
- Chitrakar, R., Makita, Y., Hirotsu, T., & Sonoda, A. (2012). Montmorillonite modified with hexadecylpyridinium chloride as highly efficient anion exchanger for perchlorate ion. *Chemical Engineering Journal*, 191, 141–146. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.02.085>
- Chomette, G., Auriol, M., & Vaillant, J. M. (1986). Scanning electron microscopy in oral cytology. *Diagnostic Cytopathology*, 2(2), 110–117.

<https://doi.org/10.1002/dc.2840020204>

- Clarkson, R. M., & Moule, A. J. (1998). Sodium hypochlorite and its use as an endodontic irrigant. *Australian Dental Journal*, 43(4), 250–256. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.1998.tb00173.x>
- De Munck, J., Landuyt, K. Van, & Peumans, M. (2005). A Critical Review of the Durability of Adhesion to Tooth Tissue. *School of Dentistry, Oral Pathology and Maxilo-Facial Surgery*, 118–132.
- De Munck, J., Mine, A., Poitevin, A., Van Ende, A., Cardoso, M. V., Van Landuyt, K. L., Peumans, M., & Van Meerbeek, B. (2012). Meta-analytical review of parameters involved in dentin bonding. *Journal of Dental Research*, 91(4), 351–357. <https://doi.org/10.1177/0022034511431251>
- Denk, W., & Horstmann, H. (2004). Serial block-face scanning electron microscopy to reconstruct three-dimensional tissue nanostructure. *PLoS Biology*, 2(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020329>
- Dietschi, D., Monasevic, M., Krejci, I., & Davidson, C. (2002). Marginal and internal adaptation of class II restorations after immediate or delayed composite placement. *Journal of Dentistry*, 30(5–6), 259–269. [https://doi.org/10.1016/S0300-5712\(02\)00041-6](https://doi.org/10.1016/S0300-5712(02)00041-6)
- Eick, J. D., Gwinnett, A. J., Pashley, D. H., & Robinson, S. J. (1997). Current concepts on adhesion to dentin. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 8(3), 306–335. <https://doi.org/10.1177/10454411970080030501>
- Epasinghe, D. J., Yiu, C. K., Burrow, M. F., Tay, F. R., & King, N. M. (2012). Effect of proanthocyanidin incorporation into dental adhesive resin on resin-dentine bond strength. *Journal of Dentistry*, 40(3), 173–180.
- Feitosa, V. P., Sauro, S., Zenobi, W., Silva, J. C., Abuna, G., Van Meerbeek, B., Sinhoreti, M. A. C., Correr, A. B., & Yoshihara, K. (2019). Degradation of Adhesive-Dentin Interfaces Created Using Different Bonding Strategies after Five-year Simulated Pulpal Pressure. *The Journal of Adhesive Dentistry*, 21(3), 199–207. <https://doi.org/10.3290/j.jad.a42510>
- Ferracane, J. L. (2011). Resin composite - State of the art. *Dental Materials*, 27(1), 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2010.10.020>

- Fine, A. M. (2000). Oligomeric Proanthocyanidin Complexes : Applications Oligomeric Proanthocyanidins. *Alternative Medicine Review*, 5(2), 144–151.
- Frassetto, A., Breschi, L., Turco, G., Marchesi, G., Di Lenarda, R., Tay, F. R., Pashley, D. H., & Cadenaro, M. (2016). Mechanisms of degradation of the hybrid layer in adhesive dentistry and therapeutic agents to improve bond durability - A literature review. *Dental Materials*, 32(2), e41–e53. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.11.007>
- Fusayama, T. (1980). *New Concepts in Operative Dentistry*. Quintessence.
- Gwinnett, A. J., & Matsui, A. (1967). A study of enamel adhesives. The physical relationship between enamel and adhesive. *Archives of Oral Biology*, 12(12), 1615–1620. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(67\)90195-1](https://doi.org/10.1016/0003-9969(67)90195-1)
- Haapasalo, M., Shen, Y., Wang, Z., & Gao, Y. (2014). Irrigation in Endodontics. *BRITISH DENTAL JOURNAL*, 216, 299–303.
- Hashimoto, M., Ito, S., Tay, F. R., Svizero, N. R., Sano, H., Kaga, M., & Pashley, D. H. (2004). Fluid Movement across the resin dentin interface during and after bonding. *J Dent Res*, 83(11), 843–848.
- Hatibovic-Kofman, S., Wright, G. Z., & Braverman, I. (1998). Microleakage of sealants after conventional, bur, and air-abrasion preparation of pits and fissures. *Pediatric Dentistry*, 20(3), 173–176.
- Hechler, B., Yao, X., & Wang, Y. (2014). Proanthocyanidins alter adhesive/dentin bonding strengths when included in a bonding system. *Am J Dent*, 25(5), 276–280.
- Heydrich, R. W. (2005). Pre-endodontic treatment restorations: A modification of the “donut” technique. *Journal of the American Dental Association*, 136(5), 641–642. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2005.0236>
- Hilton, T. J., Ferracane, J. L., Broome, J. C., & Santos, J. dos. (2013). *Summitt's Fundamentals of Operative Dentistry: A Contemporary Approach* (B. Grisham, W. Jotzat, & S. Robinson (eds.); 4th editio). Quintessence Publishing Co Inc.
- Hülsmann, M., Rödiger, T., & Nordmeyer, S. (2009). Complications during root canal irrigation. *Endodontic Topics*, 16(1), 27–63. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2009.00237.x>

- Ikedo, T., De Munck, J., Shirai, K., Hikita, K., Inoue, S., Sano, H., Lambrechts, P., & Van Meerbeek, B. (2005). Effect of fracture strength of primer–adhesive mixture on bonding effectiveness. *Dental Materials*, 21(5), 413–420. <https://doi.org/10.1016/J.DENTAL.2004.07.006>
- Ishizuka, T., Kataoka, H., Yoshioka, T., Suda, H., Iwasaki, N., Takahashi, H., & Nishimura, F. (2001). Effect of NaOCl Treatment on Bonding to Root Canal Dentin Using a New Evaluation Method. *Dental Materials Journal*, 20(1), 24–33. <https://doi.org/10.4012/dmj.20.24>
- Jacobsen, T., & Söderholm, K. J. (1995). Some effects of water on dentin bonding. *Dental Materials*, 11(2), 132–136. [https://doi.org/10.1016/0109-5641\(95\)80048-4](https://doi.org/10.1016/0109-5641(95)80048-4)
- Kalra, M., Iqbal, K., Nitisusanta, L. I., Daood, U., Sum, C. P., & Fawzy, A. S. (2013). *The effect of proanthocyanidins on the bond strength and durability of resin sealer to root dentine*. 169–178. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2012.02106.x>
- Kameyama, A., Saito, A., Haruyama, A., Komada, T., Sugiyama, S., Takahasgi, T., & Muramatsu, T. (2020). Marginal Leakage of Endodontic Temporary Restorative Materials around Access Cavities. *Materials*, 13(7), 1–10.
- Karunanayake, G., Ng, Y. L., Knowles, J. C., Delgado, A. H. S., Young, A. M., Gulabivala, K., & Nazhat, S. N. (2019). The effect of NaOCl and heat treatment on static and dynamic mechanical properties and chemical changes of dentine. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 97(January), 330–338. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2019.05.042>
- Kharouf, N., Pedullà, E., La Rosa, G. R. M., Bukiet, F., Sauro, S., Haikel, Y., & Mancino, D. (2020). In Vitro Evaluation of Different Irrigation Protocols on Intracanal Smear Layer Removal in Teeth with or without Pre-Endodontic Proximal Wall Restoration. *Journal of Clinical Medicine*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/jcm9103325>
- Lai, S. C. N., Mak, Y. F., Cheung, G. S. P., Osorio, R., Toledano, M., Carvalho, R. M., Tay, F. R., & Pashley, D. H. (2001). Reversal of compromised bonding to oxidized etched dentin. *Journal of Dental Research*, 80(10), 1919–1924. <https://doi.org/10.1177/00220345010800101101>
- Lopes, M. B., Felizardo, K. R., Brigantini, L. C., Berger, S. B., Laxe, L. A. C., & Salvio, L. A. (2018). Influence of antioxidants on bond strength of bleached dental

- substrates. *HU Revista*, 44(1), 63–76.
- Ma, Z. F., & Zhang, H. (2017). Phytochemical constituents, health benefits, and industrial applications of grape seeds: Amini-review. *Antioxidants*, 6(3), 1–11. <https://doi.org/10.3390/antiox6030071>
- Machado, M. do M. S. (2020). *Avaliação do efeito da irrigação com hipoclorito de sódio na integridade da camada híbrida em restaurações pré- endodônticas com recurso a Microscopia Eletrônica de Varrimento (MEV) e Ressonância Magnética Nuclear (RNMN)*. Instituto Universitário Egas Moniz.
- Manimaran, V. S., Srinivasulu, S., Ebenezar, A. V. R., Mahalaxmi, S., & Srinivasan, N. (2011). Application of a proanthocyanidin agent to improve the bond strength of root dentin treated with sodium hypochlorite. *Journal of Conservative Dentistry*, 14(3), 306–308. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.85822>
- Marshall, S. J., Bayne, S. C., Baier, R., Tomsia, A. P., & Marshall, G. W. (2010). A review of adhesion science. *Dental Materials*, 26(2), 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2009.11.157>
- Miranda, T. A. M., Moura, S. K., Amorim, V. H. de O., Terada, R. S. S., & Pascotto, R. C. (2013). Influence of exposure time to saliva and antioxidant treatment on bond strength to enamel after tooth bleaching: an in situ study. *J Appl Oral Sci.*, 21(6), 567–574.
- Moszner, N., & Hirt, T. (2012). New polymer-chemical developments in clinical dental polymer materials: Enamel-dentin adhesives and restorative composites. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 50(21), 4369–4402. <https://doi.org/10.1002/pola.26260>
- Nakabayashi, N., Kojima, K., & Matsuhara, E. (1982). Promotion of adhesion by infiltration monomers into tooth substrates. *J Biomed Mat Res.*, 16, 265–273.
- Nascimento, G. C. R., Ribeiro, M. E. S., Guerreiro, M. Y. R., de Souza Cruz, E. L., Pinheiro, J. de J. V., & Loretto, S. C. (2019). Effect of sodium ascorbate on bond strength and metalloproteinases activity in bleached dentin. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry*, 11, 259–265. <https://doi.org/10.2147/CCIDE.S209278>
- Nicoletti, M. A., Siqueira, E. L., Bombana, A. C., & Guimarães de Oliveira, G. (2009). Shelf-life of a 2.5% sodium hypochlorite solution as determined by arrhenius

- equation. *Braz Dent J*, 20(1), 27–31.
- Nima, G., Cavalli, V., Bacelar-Sá, R., Ambrosano, G. M. B., & Giannini, M. (2019). Effects of sodium hypochlorite as dentin deproteinizing agent and aging media on bond strength of two conventional adhesives. In *Microscopy Research and Technique* (Vol. 83, Issue 2, pp. 186–195). <https://doi.org/10.1002/jemt.23401>
- Olmedo, D. E. R. P., Kury, M., Resende, B. A., & Cavalli, V. (2021). Use of antioxidants to restore bond strength after tooth bleaching with peroxides. *European Journal of Oral Sciences*, 129(2), 1–23. <https://doi.org/10.1111/eos.12773>
- Pashley, D. H. (1984). Smear layer: physiological considerations. *Operative Dentistry*, 3(supplement), 13–29.
- Pashley, D. H. (1992). The effects of acid etching on the pulpodentin complex. In *Operative dentistry* (pp. 229–242).
- Pashley, D. H., Livingston, M. J., Reeder, O. W., & Horner, J. (1978). Effects of the degree of tubule occlusion on the permeability of human dentine in vitro. *Archives of Oral Biology*, 23(12), 1127–1133. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(78\)90119-X](https://doi.org/10.1016/0003-9969(78)90119-X)
- Pashley, David H. (1990). Clinical considerations of microleakage. *Journal of Endodontics*, 16(2), 70–77. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(06\)81567-0](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(06)81567-0)
- Pashley, David H., Morris, M. D., Lee, K.-W., Agee, K. A., & Bouillaguet, S. (2001). Effects of sodium hypochlorite and RC-prep on bond strengths of resin cement to endodontic surfaces. *Journal of Endodontics*, 27(12), 753–757. <https://doi.org/10.1097/00004770-200112000-00010>
- Pashley, David H, Tay, F. R., Breschi, L., Tjäderhane, L., Carvalho, R. M., Carrilho, M., & Tezvergil-Mutluay, A. (2011). State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dental Materials*, 27(1), 1–34. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2010.10.016.State>
- Perdigão, J., Frankenberger, R., Rosa, B. T., & Breschi, L. (2000). New trends in dentin/enamel adhesion. *American Journal of Dentistry*, 13(special issue), 25D–30D.
- Perdigão, Jorge, Sezinando, A., & Monteiro, P. C. (2012). Laboratory bonding ability of a multi-purpose dentin adhesive. *American Journal of Dentistry*, 25(3), 153–158.

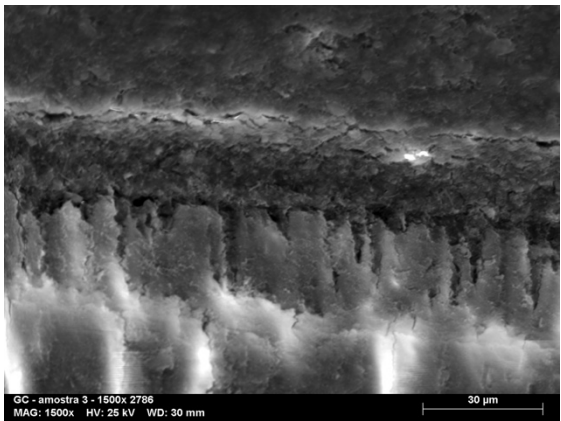
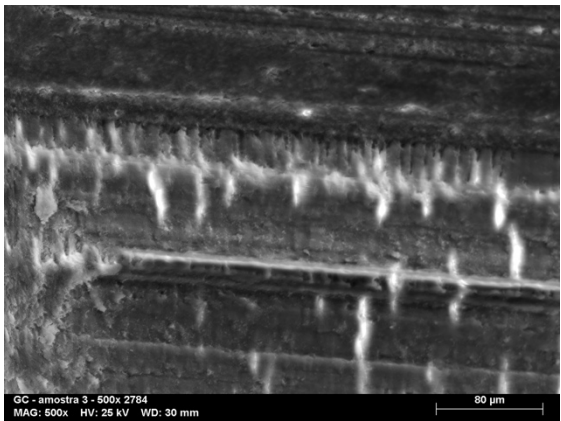
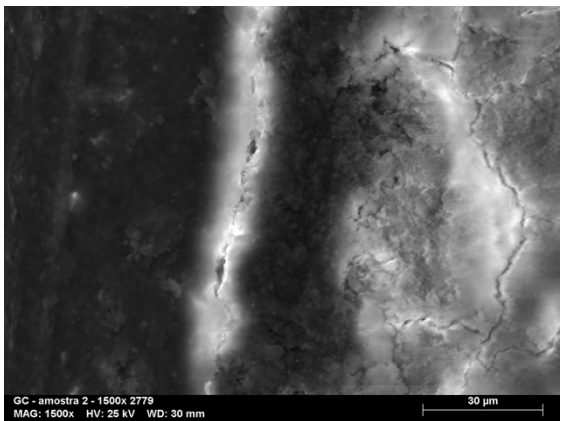
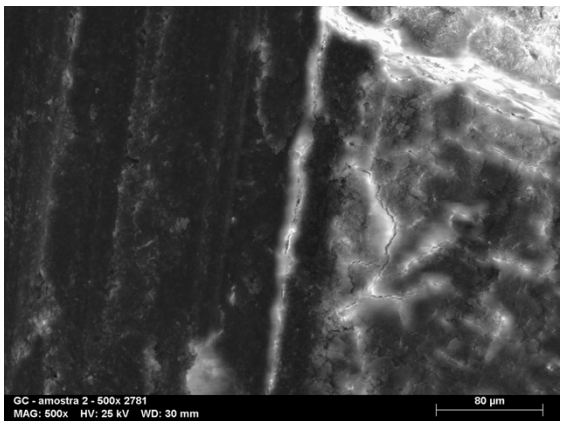
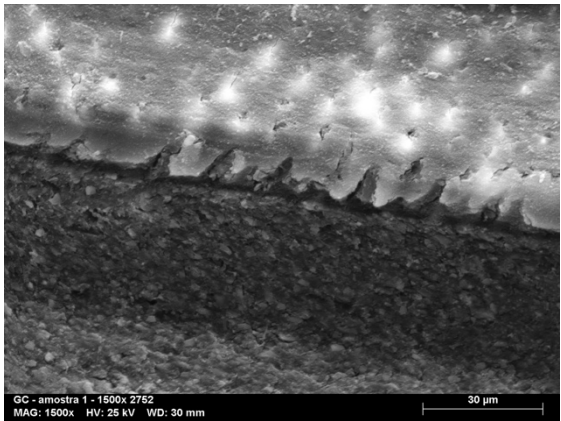
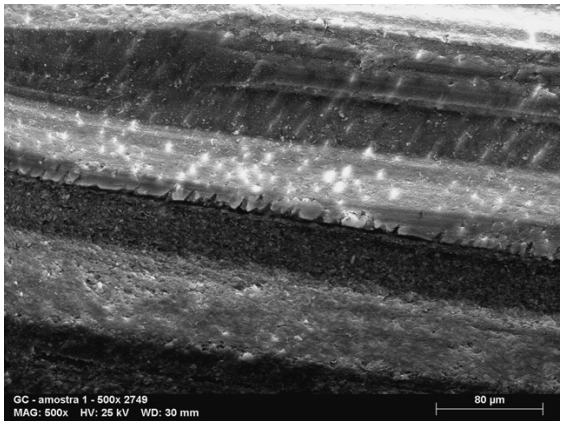
- Peumans, M., De Munck, J., Mine, A., & Van Meerbeek, B. (2014). Clinical effectiveness of contemporary adhesives for the restoration of non-carious cervical lesions. A systematic review. *Dental Materials*, 30(10), 1089–1103. <https://doi.org/10.1016/J.DENTAL.2014.07.007>
- Peumans, Marleen, De Munck, J., Van Landuyt, K. L., Poitevin, A., Lambrechts, P., & Meerbeek, B. Van. (2012). A 13-year clinical evaluation of two three-step etch-and-rinse adhesives in non-carious class-V lesions. *Clin Oral Invest*, 16, 129–137. <https://doi.org/10.1007/s00784-010-0481-z>
- Pioch, T., Kobaslija, S., Schagen, B., & Götz, H. (1999). Interfacial micromorphology and tensile bond strength of dentin bonding systems after NaOCl treatment. *The Journal of Adhesive Dentistry*, 1(2), 135–142.
- Prada, I., Micó-Muñoz, P., Giner-Lluesma, T., Micó-Martínez, P., Muwaquet-Rodríguez, S., & Alberio-Montegudo, A. (2019). Update of the therapeutic planning of irrigation and intracanal medication in root canal treatment. A literature review. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 11(2), e185–e193. <https://doi.org/10.4317/jced.55560>
- Qaw, M. S., Abushowmi, T. H., Almaskin, D. F., AlZaher, Z. A., Gad, M. M., Al-Harbi, F. A., Abualsaud, R., & Ammar, M. M. (2020). A Novel Approach to Improve Repair Bond Strength of Repaired Acrylic Resin: An in Vitro Study on the Shear Bond Strength. *Journal of Prosthodontics*, 29(4), 323–333. <https://doi.org/10.1111/jopr.12970>
- Reis, A., de Carvalho Cardoso, P., Vieira, L. C. C., Baratieri, L. N., Grande, R. H. M., & Loguercio, A. D. (2008). Effect of prolonged application times on the durability of resin-dentin bonds. *Dental Materials*, 24(5), 639–644. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2007.06.027>
- Rodríguez-Barragué, J., Vola-Gelmini, J., Skuras-Siedenburg, M., Rivera-Gonzaga, J. A., & Cuevas-Suarez, C. E. (2021). Natural antioxidants to restore immediate bond strength to bleached enamel: Systematic review and meta-analysis of in vitro studies. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, February, 1–11. <https://doi.org/10.1111/jerd.12743>
- Salz, U., Mücke, A., Zimmermann, J., Tay, F. R., & Pashley, D. H. (2006). pKa value

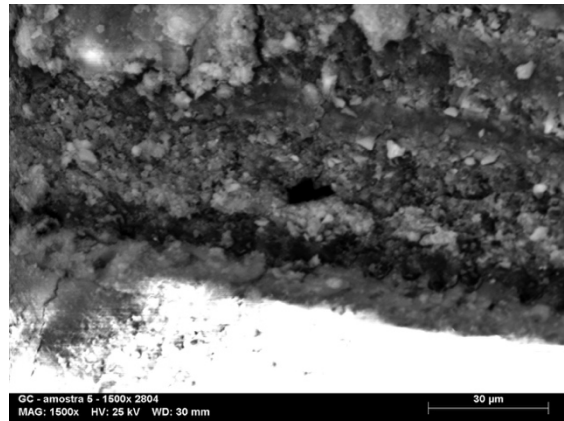
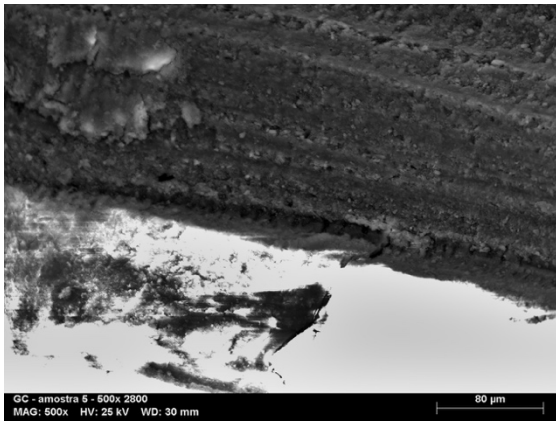
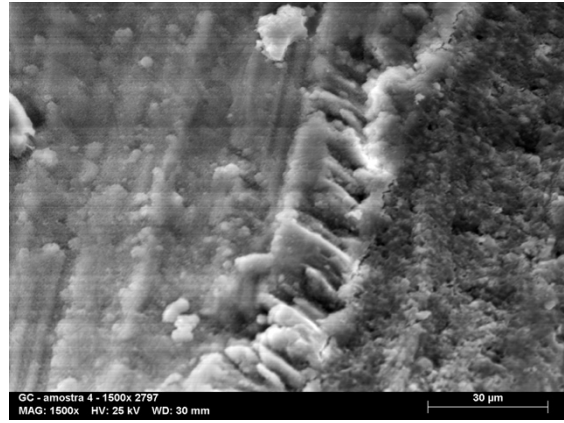
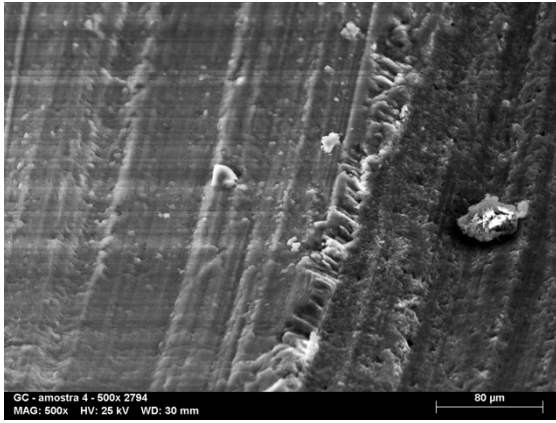
- and buffering capacity of acidic monomers commonly used in self-etching primers. *The Journal of Adhesive Dentistry*, 8(3), 143–150.
- Shalaby, E. A., & Shanab, S. M. M. (2013). Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7(10), 528–539. <https://doi.org/10.5897/AJPP2013>
- Simonsen, R. J., & Neal, R. C. (2011). A review of the clinical application and performance of pit and fissure sealants. *Australian Dental Journal*, 56(SUPPL. 1), 45–58. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2010.01295.x>
- Siqueira, F. S. F., Cardenas, A. F. M., Gomes, G. M., Chibinski, A. C., Gomes, O. M. M., Bandeca, M. C., Loguercio, A. D., & Gomes, J. C. (2018). Three-Year effects of deproteinization on the in vitro durability of resin/dentin-eroded interfaces. *Operative Dentistry*, 43(1), 60–70. <https://doi.org/10.2341/16-308-L>
- Stevens, C. D. (2014). Immediate shear bond strength of resin cements to sodium hypochlorite-treated dentin. *Journal of Endodontics*, 40(9), 1459–1462. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.02.022>
- Tay, F. R., & Pashley, D. H. (2002). Dental adhesives of the future. *The Journal of Adhesive Dentistry*, 4(2), 91–103.
- Torabinejad, M., & Walton, R. E. (2009). *Endodontics: Principles and Practice* (4th Editio). Saunders Elsevier.
- Van Landuyt, K. L., Snauwaert, J., De Munck, J., Peumans, M., Yoshida, Y., Poitevin, A., Coutinho, E., Suzuki, K., Lambrechts, P., & Van Meerbeek, B. (2007). Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials*, 28(26), 3757–3785. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2007.04.044>
- Van Meerbeek, B., Perdigão, J., Lambrechts, P., & Vanherle, G. (1998). The clinical performance of adhesives. *Journal of Dentistry*, 26(1), 1–20.
- Van Meerbeek, B., Yoshihara, K., Yoshida, Y., Mine, A., De Munck, J., & Van Landuyt, K. L. (2011). State of the art of self-etch adhesives. *Dental Materials*, 27(1), 17–28. <https://doi.org/10.1016/J.DENTAL.2010.10.023>
- Van Meerbeek, Bart, De Munck, J., Mattar, D., Van Landuyt, K., & Lambrechts, P. (2003). Microtensile bond strengths of an etch&rinse and self-etch adhesive to

- enamel and dentin as a function of surface treatment. *Operative Dentistry*, 28(5), 647–660.
- Van Meerbeek, Bart, Munck, J. De, Yoshida, Y., Inoue, S., Vargas, M., Vijay, P., Landuyt, K. Van, Lambrechts, P., & Vanherle, G. (2003). Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Operative Dentistry*, 28(3), 215–235.
- Van Meerbeek, Bart, 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. *Journal of Adhesive Dentistry*, 22(1), 7–34. <https://doi.org/10.3290/j.jad.a43994>
- Vongphan, N., Senawongse, P., Somsiri, W., & Harnirattisai, C. (2005). Effects of sodium ascorbate on microtensile bond strength of total-etching adhesive system to NaOCl treated dentine. *Journal of Dentistry*, 33(8), 689–695. <https://doi.org/10.1016/J.JDENT.2005.01.008>
- Yamauti, M., Hashimoto, M., Sano, H., Ohno, H., Carvalho, R. M., Kaga, M., Tagami, J., Oguchi, H., & Kubota, M. (2003). Degradation of resin–dentin bonds using NaOCl storage. *Dental Materials*, 19(5), 399–405. [https://doi.org/10.1016/S0109-5641\(02\)00083-0](https://doi.org/10.1016/S0109-5641(02)00083-0)
- Zhang, K., Kim, Y. K., Cadenaro, M., Bryan, T. E., Sidow, S. J., Loushine, R. J., Ling, J., Pashley, D. H., Tay, F. R., & Hons, B. (2010). Effects of Different Exposure Times and Concentrations of Sodium Hypochlorite / Ethylenediaminetetraacetic Acid on the Structural Integrity of Mineralized Dentin. *Journal of Endodontics*, 36(1), 105–109. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.10.020>
- Zhou, W., & Wang, Z. L. (2007). Scanning microscopy for nanotechnology: Techniques and applications. *Scanning Microscopy for Nanotechnology: Techniques and Applications*, 1–522. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-39620-0>
- Zhou, X., Huang, X., Li, M., Peng, X., Wang, S., Zhou, X., & Cheng, L. (2019). Development and status of resin composite as dental restorative materials. *Journal of Applied Polymer Science*, 136(44), 1–12. <https://doi.org/10.1002/app.48180>

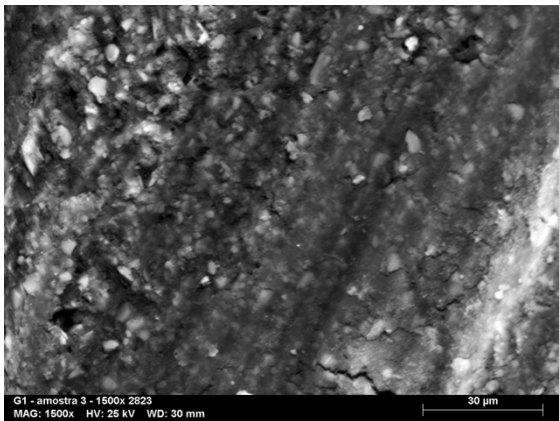
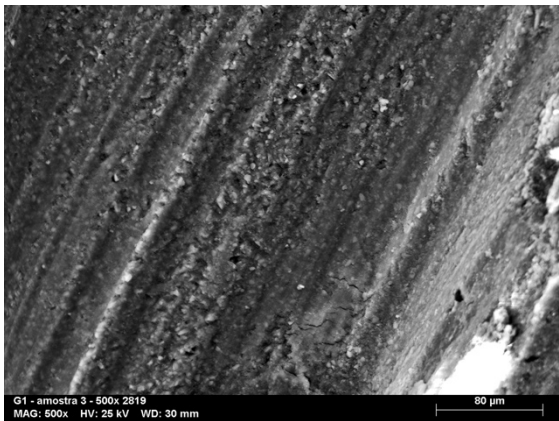
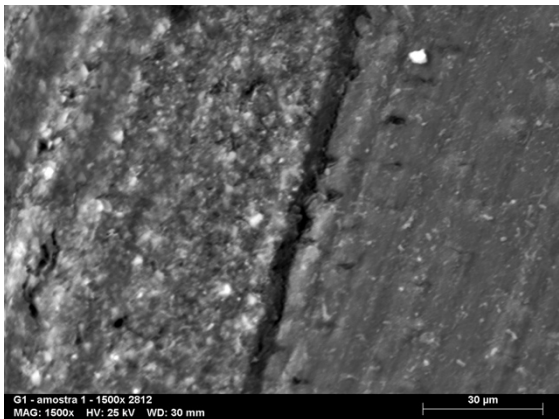
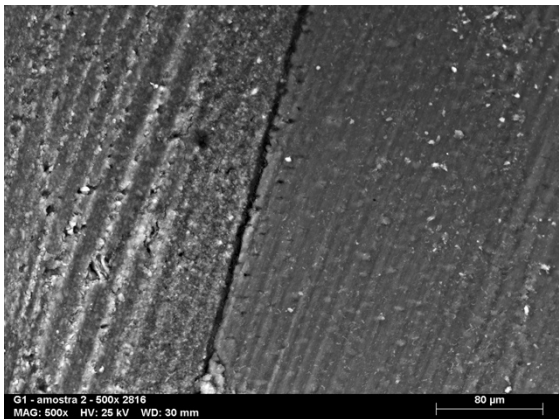
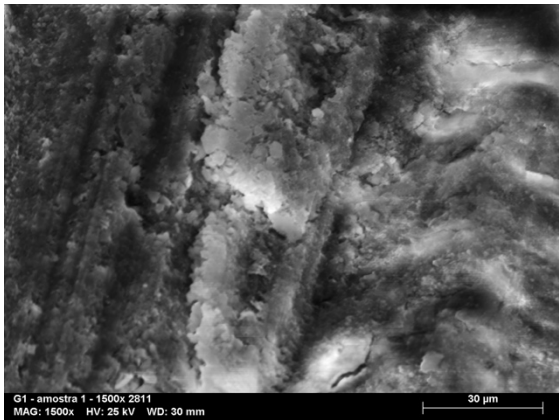
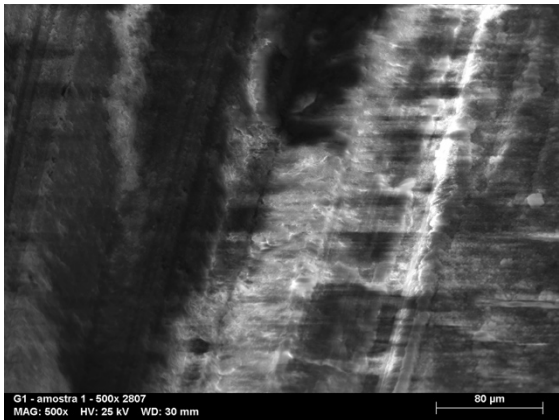
ANEXOS

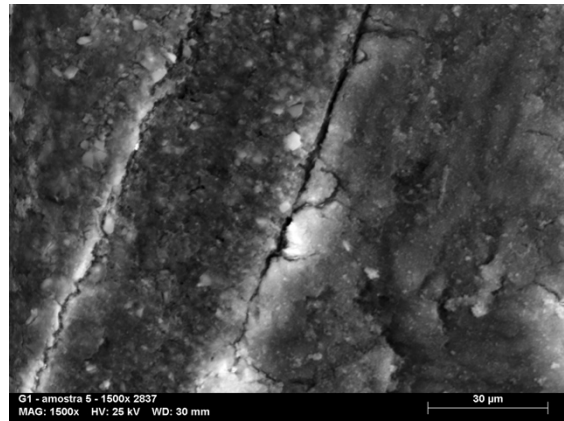
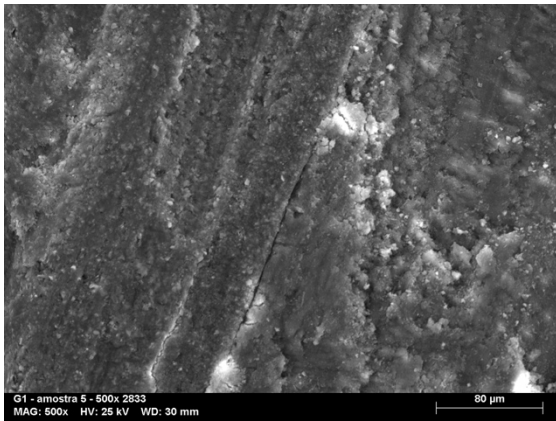
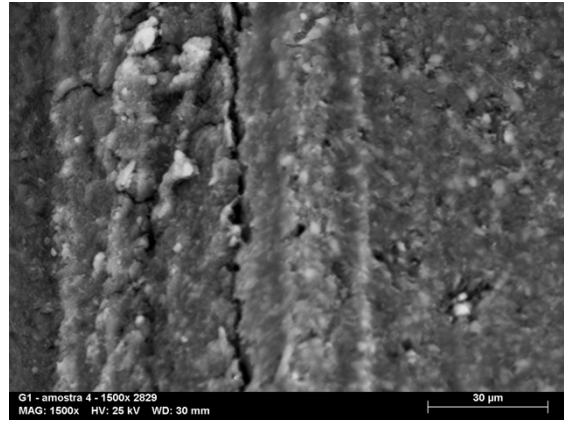
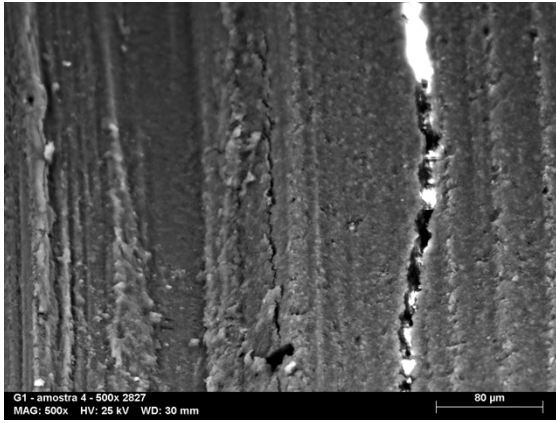
MEV – Fotografias do Grupo Controlo



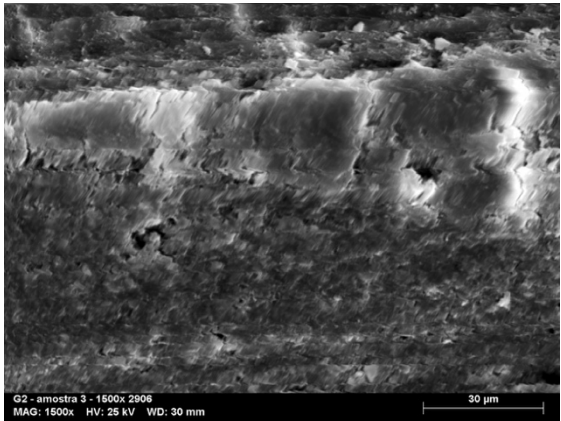
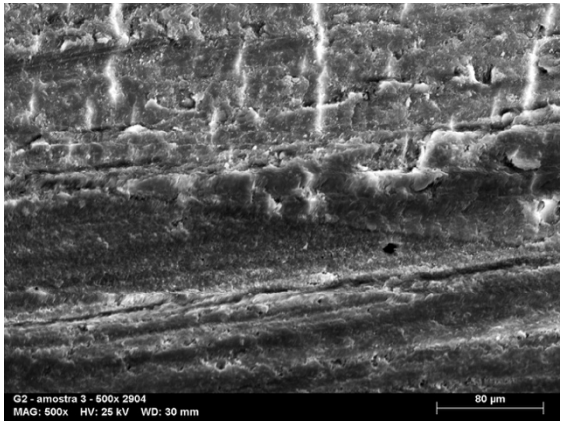
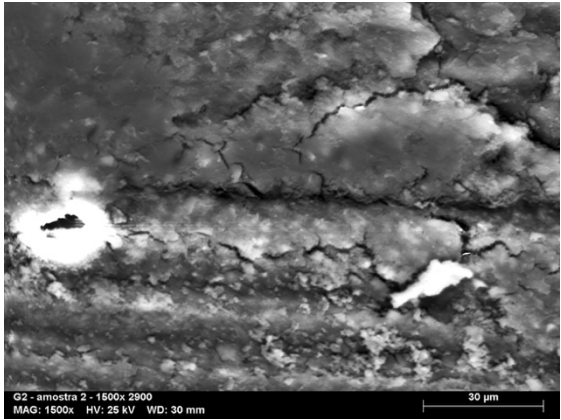
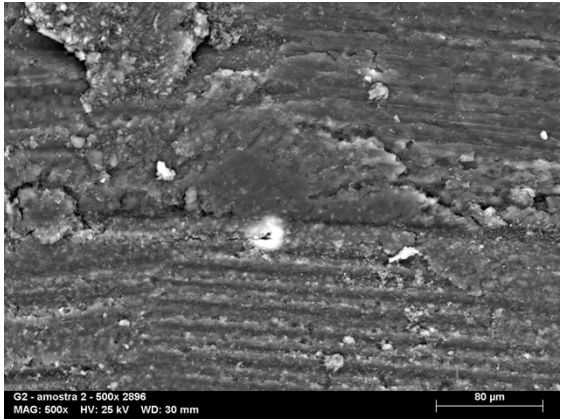
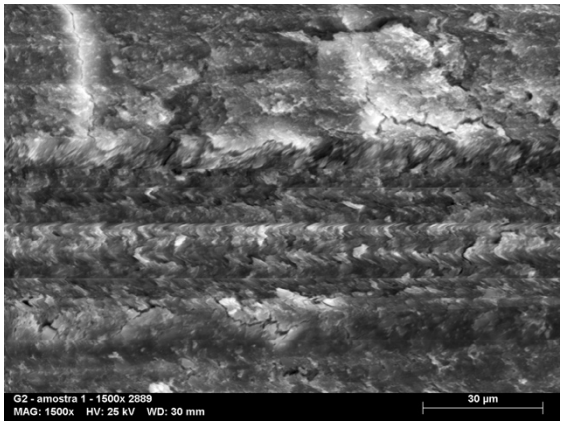
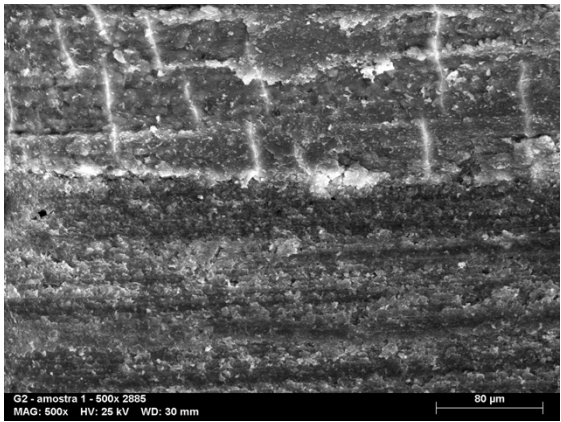


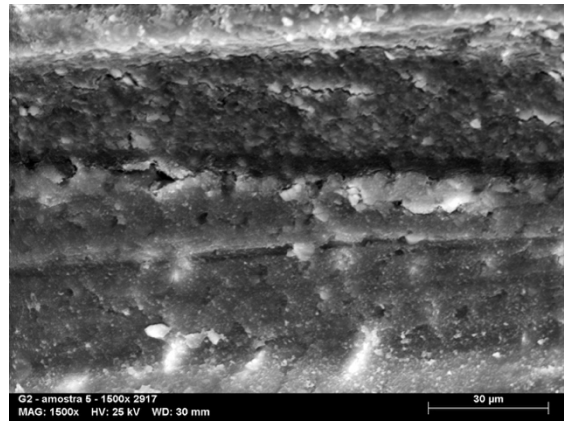
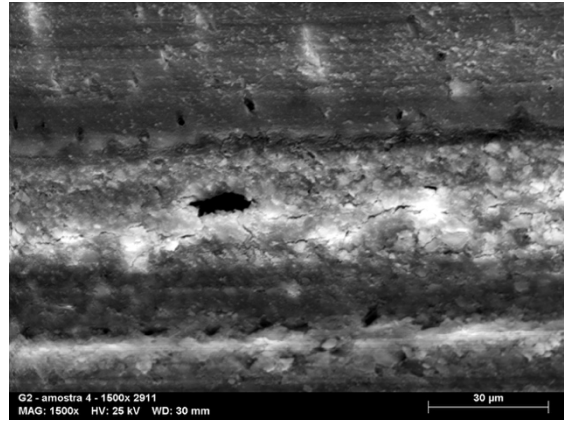
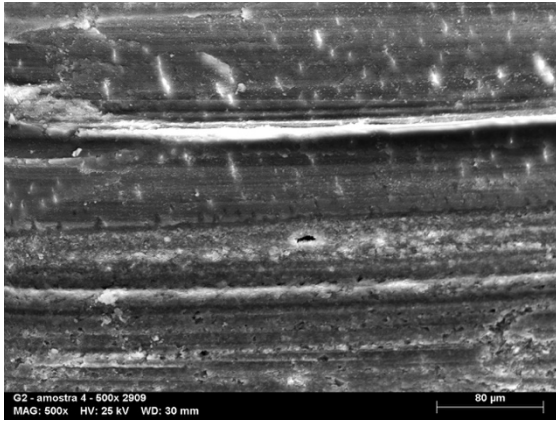
MEV – Fotografias do Grupo 1



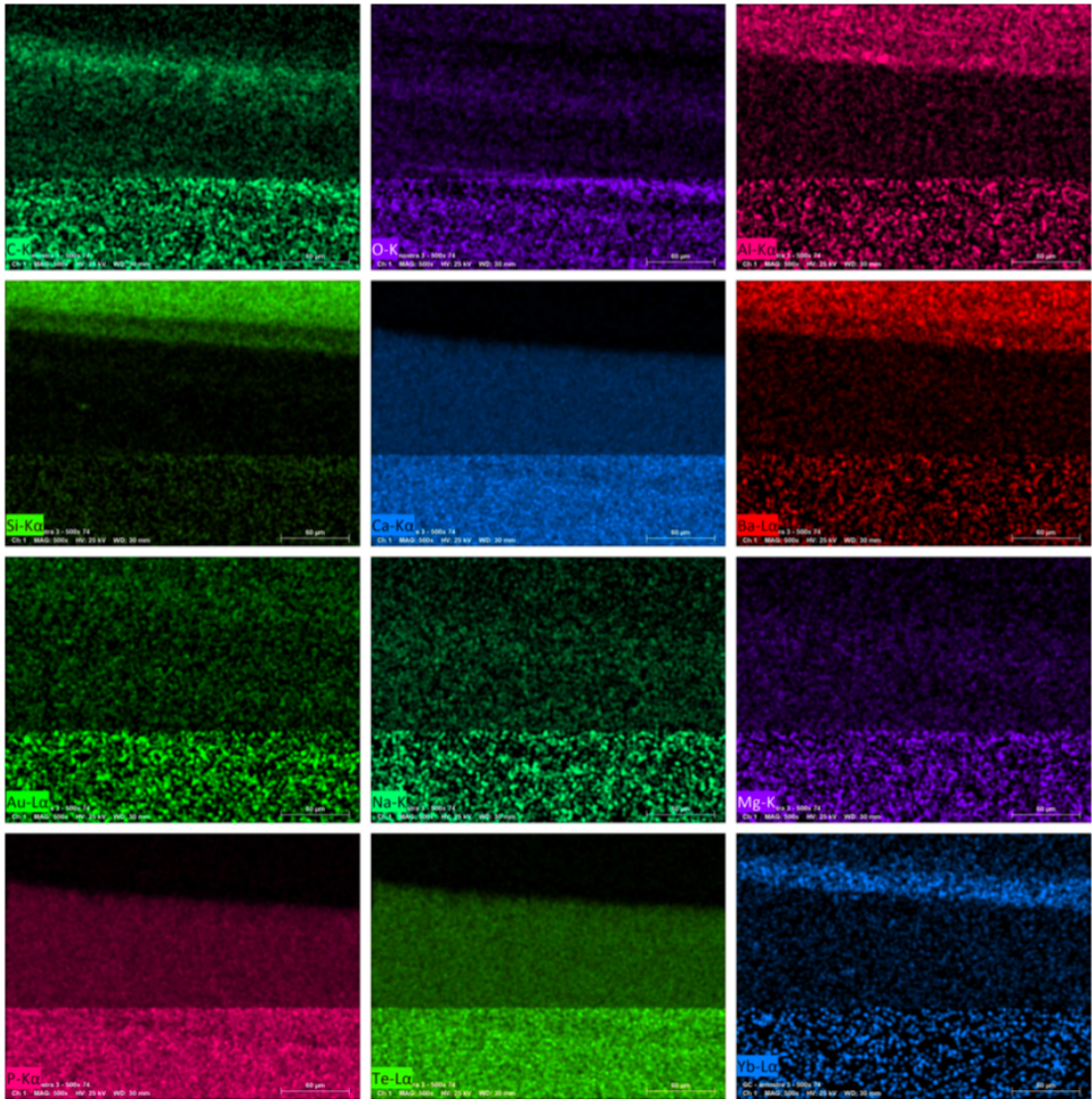


MEV – Fotografias do Grupo 2



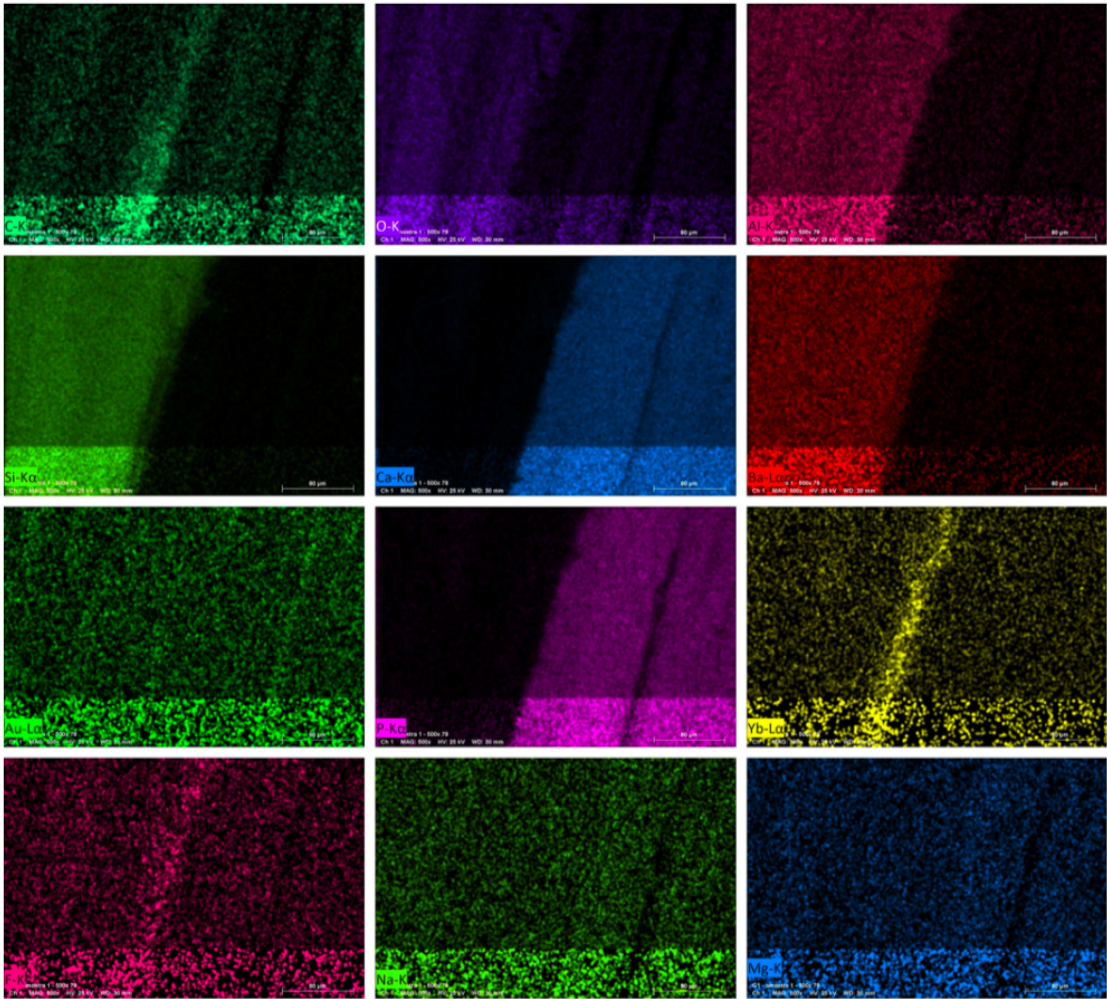


Mapping MEV – Fotografias do Grupo Controlo



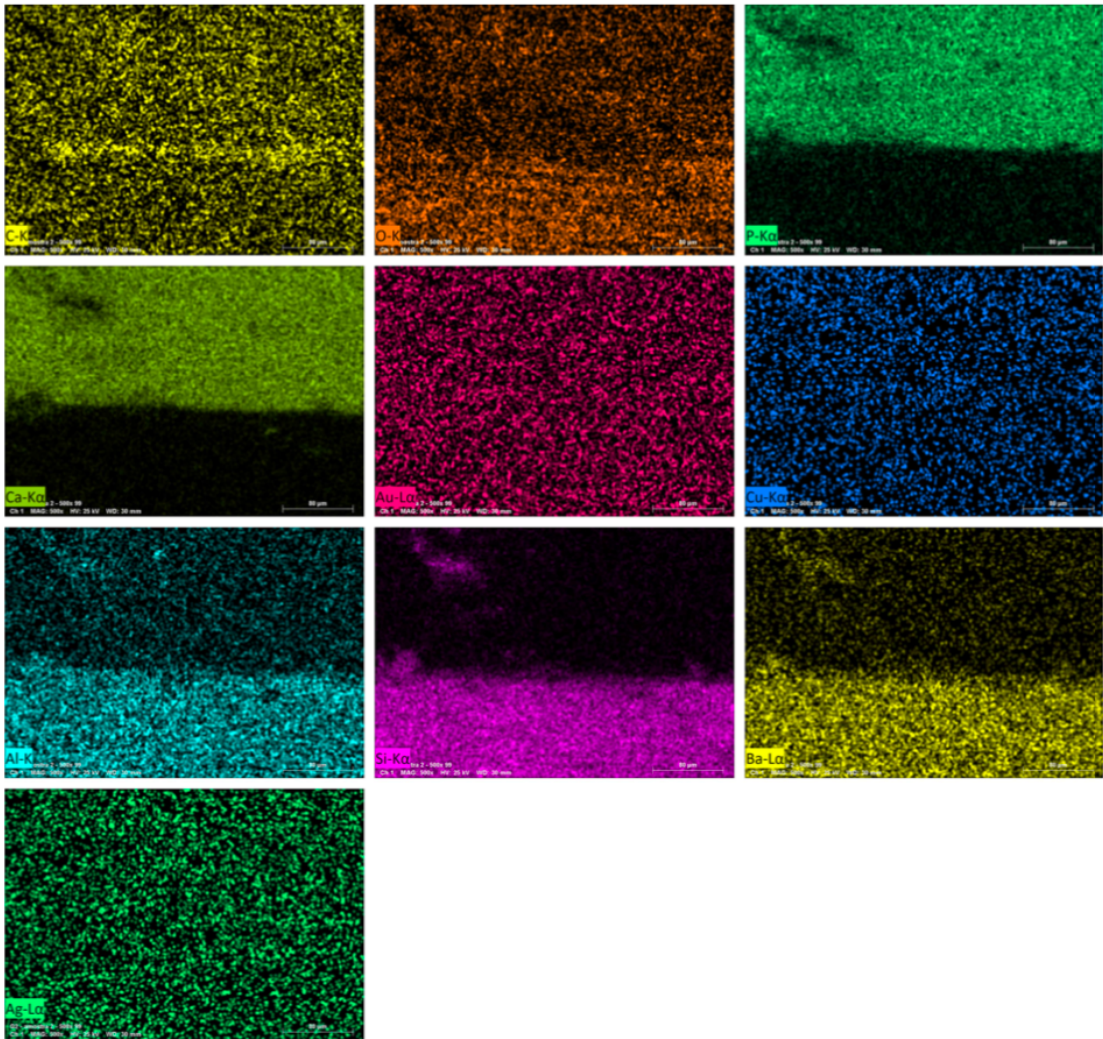
Date	Time	HV [kV]	Mag	WD [mm]
02/09/2021	13:53:01	25,0 keV	500x	30,0 mm

Mapping MEV – Fotografias do Grupo 1



Date	Time	HV [kV]	Mag	WD [mm]
03/09/2021	11:46:04	25,0 keV	500x	30,0 mm

Mapping MEV – Fotografias do Grupo 2



Date	Time	HV [kV]	Mag	WD [mm]
07/09/2021	16:59:52	25,0 keV	500x	30,0 mm



Proc. Interno nº 952

Ex.ma Senhora
Leonor Sá Pinto

Monte de Caparica, 23 de setembro de 2021.

Ex.ma Senhora,

Em resposta ao Pedido de Parecer que submeteu à apreciação da Comissão de Ética da Egas Moniz, com o tema denominado **"Influência de dois agentes antioxidantes na camada híbrida de restaurações sujeitas a irrigação endodôntica – caracterização morfológica com Microspia Eletrónica de Varrimento"**, foi aprovado por unanimidade.

A Presidente da Comissão de Ética da Egas Moniz


Profª. Doutora Maria Fernanda de Mesquita