

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE UM PNTA E SUA INFLUÊNCIA NA RESISTÊNCIA ADESIVA À DENTINA

Trabalho submetido por
Teresa Raposo Pedro Bragança Barroso
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Outubro de 2024

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE UM PNTA E SUA INFLUÊNCIA NA RESISTÊNCIA ADESIVA À DENTINA

Trabalho submetido por
Teresa Raposo Pedro Bragança Barroso
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Professora Doutora Ana Filipa Chasqueira

Outubro de 2024

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero expressar o meu profundo agradecimento à minha orientadora, Professora Doutora Ana Filipa Chasqueira, pelo apoio constante que me proporcionou ao longo deste projeto. Sem a sua imensa disponibilidade, positivismo e acessibilidade para esclarecer qualquer dúvida, este trabalho não teria sido possível. A sua motivação incansável incentivou-me sempre a ir mais além e a dar o meu melhor.

À Egas Moniz, um instituto de referência, que me acolheu durante 5 anos e foi fundamental para a concretização deste grande objetivo de vida, sempre garantindo todas as ferramentas e recursos necessários para um desempenho de excelência e qualidade.

Quero também expressar a minha gratidão às Professoras Doutoradas Susana Sério e Sofia Pessanha, da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, que me acolheram e disponibilizaram o seu tempo com uma dedicação inestimável, tornando-se elementos essenciais para a concretização deste projeto.

Aos meus pais e avós, e a toda a minha família incrível, que sempre me apoiou nos momentos difíceis e me motivou a ser mais e melhor, um enorme obrigado! Por tudo o que fizeram para que este momento chegasse, agradeço e espero poder retribuir um dia!

A todas as grandes amigas que a Egas Moniz me deu, e que ficarão para a vida, um enorme obrigada por tornarem o meu percurso mais leve e feliz, e por todo o companheirismo e amizade. Foram 5 anos de bons momentos que ainda agora começaram!

À Maria, ao Pedro, à Madalena e aos meus amigos de sempre, com quem partilhei todas as conquistas ao longo deste percurso, um grande obrigado por estarem sempre ao meu lado!

Ao João, um agradecimento especial por todo o apoio e carinho ao longo desta jornada, obrigada por acreditares em mim.

Por último agradeço a Deus que guiou todos os meus passos até aqui.

RESUMO

Objetivo: Otimização dos parâmetros de aplicação de um dispositivo de PNTA na dentina. Avaliação da resistência adesiva da interface resina-dentina integrando a aplicação do PNTA previamente a um sistema adesivo universal;

Materiais e Métodos: Foram utilizados 34 molares humanos, dos quais 14 foram utilizados para otimização dos parâmetros do PNTA. Os dentes foram seccionados em discos de dentina de 2 mm e distribuídos em 9 grupos experimentais (n=3), variando a "distância de aplicação do PNTA" (2 mm, 4 mm, 6 mm) e o "tempo de aplicação" (10 s, 20 s, 30 s). O ângulo de contacto entre cada espécime e uma gota de água destilada foi medido antes e depois da exposição ao plasma, através de um goniómetro.

Os 20 dentes restantes foram divididos em dois grupos (n=10), um sem PNTA e outro com aplicação de PNTA previamente ao sistema adesivo *Prime&Bond Active*. A criação de *smear layer* foi feita com lixa de carbetto de silício 600. Foram realizadas restaurações com resina composta e os espécimes armazenados a 37 °C. Após 24 horas, foram testados sob forças de microtração, numa máquina de testes universal. Os resultados foram tratados estatisticamente através do software SPSS.

Resultados: O ângulo de contacto apresentou diferenças estatisticamente significativas entre as condições com e sem plasma ($p < 0,001$) e entre as distâncias de 4 mm e 6 mm ($p = 0,015$). Não existiram diferenças significativas em relação ao tempo de aplicação ($p > 0,05$). Quanto à resistência adesiva, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos com e sem PNTA ($p > 0,05$).

Conclusões: A aplicação do PNTA estudado reduziu o ângulo de contacto na dentina, sendo 10 s e 4 mm distância a condição de aplicação mais vantajosa. No entanto, não demonstrou influenciar na resistência adesiva sob forças de microtração.

Palavras-chave: PNTA, Ângulo de contacto, Dentina, Adesivo universal

ABSTRACT

Purpose: Optimisation of the application parameters of a NTAP device in dentin. Evaluation of the adhesive strength of the resin-dentin interface by integrating the application of NTAP prior to a universal adhesive system;

Materials and Methods: Thirty-four human molars were used, 14 of which were used to optimise the PNTA parameters. The teeth were sectioned into 2 mm dentin discs and distributed into 9 experimental groups (n=3), varying the 'PNTA application distance' (2 mm, 4 mm, 6 mm) and the 'application time' (10 s, 20 s, 30 s). The contact angle between each specimen and a drop of distilled water was measured before and after exposure to plasma using a goniometer.

The remaining 20 teeth were divided into two groups (n=10), one without PNTA and the other with PNTA applied before the Prime&Bond Active adhesive system. The smear layer was created using 600 silicon carbide sandpaper. Restorations were made with composite resin and the specimens were stored at 37°C. After 24 hours, they were tested under microtensile forces in a universal testing machine. The results were statistically analysed using SPSS software.

Results: The contact angle showed statistically significant differences between the conditions with and without plasma ($p < 0.001$) and between the distances of 4 mm and 6 mm ($p = 0.015$). There were no significant differences in relation to application time ($p > 0.05$). As for adhesive strength, no significant differences were found between the groups with and without PNTA ($p > 0.05$).

Conclusions: The application of the PNTA studied reduced the contact angle in the dentin, with 10 s and 4 mm distance being the most advantageous application condition. However, it did not prove to influence adhesive strength under microtensile forces.

Keywords: NTAP, Contact angle, Dentin, Universal adhesive.

Índice

1. Introdução.....	9
1.1 O Substrato dentário	9
1.1.2 A Dentina.....	10
1.1.2.1 Adesão à dentina.....	12
1.1.2.2 <i>Smear layer</i>	12
1.1.2.3 Camada híbrida.....	12
1.2. Sistemas Adesivos	13
1.3.1 Sistemas adesivos ER.....	15
1.3.2. Sistemas adesivos SE	16
1.3.3. Sistemas adesivos Universais	17
1.4. O Plasma não-térmico atmosférico (PNTA)	18
1.4.1 Características do PNTA	19
1.4.2 O PNTA aplicado à Dentina	20
3. Materiais e Métodos	25
3.1 Seleção e armazenamento das amostras.....	25
3.2 Dispositivo de PNTA.....	25
3.3 Métodos.....	26
3.3.1 Definição de parâmetros de aplicação do PNTA no substrato dentinário	26
3.3.2 Estudo da resistência adesiva sob forças de microtração após aplicação de PNTA.....	27
4. Resultados.....	33
4.1. Otimização de parâmetros de aplicação do PNTA à dentina	33
4.1.1 Estatística descritiva.....	33
4.1.2 Estatística inferencial	34
4.2. Estudo da resistência adesiva sob forças de microtração após aplicação de PNTA	36
4.2.1 Estatística descritiva.....	37
4.2.2 Estatística inferencial	37
5. Discussão.....	39
6. Conclusões	43
7. Bibliografia	45

Índice de Tabelas

Tabela 1- Efeito de cada componente adesivo no substrato dentinário segundo a estratégia adesiva aplicada [Adaptado de (Meerbeek et al., 2020)]	14
Tabela 2- Valores dos ângulos de contacto medidos no espectro-goniómetro, antes da aplicação de plasma (N_PNTA: cinza) e após a aplicação de plasma (PNTA: branco) segundo os parâmetros em estudo (distância de aplicação e tempo de aplicação).....	33
Tabela 3- Análise descritiva dos valores dos ângulos obtidos com e sem a aplicação de PNTA:	33
Tabela 4 - Análise ANOVA para a variável aplicação de plasma (PNTA e N_PNTA)	34
Tabela 5 - Análise ANOVA para a variável distância de aplicação (d).....	35
Tabela 6- <i>Post-hoc</i> de <i>Tukey</i> para a variável distância de aplicação (d).....	35
Tabela 7- Análise ANOVA para variável de tempo de aplicação (t).....	36
Tabela 8- Análise descritiva dos resultados do ensaio de microtração	37
Tabela 9- Análise estatística dos valores de resistência adesiva (<i>T-test</i>)	37

Índice de Figuras

Figura 1- Dispositivo de PNTA utilizado no estudo	26
Figura 2- Espécime de dentina com gota de água destilada para medição do ângulo de contacto, no especto-goniómetro	27
Figura 3- Dente após secção com dentina exposta (d- dentina; e- esmalte).....	28
Figura 4- Adesivo <i>Prime&Bond Active</i> (Dentsply Sirona, Konstanz, Alemanha)	29
Figura 5- Espécime após protocolo adesivo e restauração em resina composta	29
Figura 6- Espécime no suporte de corte após secção em palitos	30
Figura 7- Palitos em água destilada para armazenamento a 37 °C durante 24 h	30
Figura 8- Palito fixado a jig de Geraldeli para teste na máquina de testes universal.....	31
Figura 9- Máquina de testes universal (Shimadzu Autograph AG-IS, Tóquio, Japão).....	31
Figura 10- Máquina de testes universal a tracionar palito.....	31

Lista de siglas:

AU- Adesivos Universais

SE - *Self-Etch*

SEE – *Selective Enamel Etching*

ER - *Etch and Rinse*

HEMA- 2- Hidroxietil metacrilato

10-MDP- Dihidrogenofosfato de 10-metacriloiloxidecil

MMP - Metaloproteinases da matriz

NTAP- *Non-thermal atmospheric plasma*

PNTA- Plasma não térmico atmosférico

EROs- Espécies reativas de oxigênio

ERNs- Espécies reativas de nitrogênio

JAC- Junção amelo-cementária

JAD- Junção amelo-dentinária

slm- *standard litres per minute*

μm- Micrómetro

mm²- Milímetros quadrados

mm Hg - Milímetros de mercúrio

MPa - Megapascal

N- Newton

1. Introdução

Atualmente, a dentisteria restauradora baseia-se numa abordagem minimamente invasiva, promovendo preparos cavitários cada vez mais conservadores cuja retenção depende quase exclusivamente da eficácia adesiva (M. V. Cardoso et al., 2011a). Assim, a qualidade e durabilidade da adesão são fatores determinantes no sucesso de um tratamento restaurador. Para tal, contribuem diversos fatores, nomeadamente o substrato, o adesivo, a técnica adesiva, a experiência do clínico, entre outros. (Perdigão, 2020)

1.1 O Substrato dentário

A estrutura anatómica do dente consiste na raiz, sendo esta a estrutura através da qual o dente está inserido no alvéolo, e a coroa, a porção mais superior do dente, visível na cavidade oral até à margem cervical, localização onde converge a raiz e de onde emerge a coroa. Existe alguma variabilidade na forma e tamanho de cada dente, no entanto a sua estrutura histológica é bastante semelhante entre si (Galler et al., 2021; “Structure of the Oral Tissues,” 2013).

A coroa do dente é constituída mais superficialmente por uma camada dura, inerte e acelular, o esmalte, que por sua vez é suportado pela dentina, um substrato menos mineralizado, mais orgânico e mais resiliente, recobrando o tecido vital do dente, a polpa. A raiz é constituída mais superficialmente pelo cimento, ao qual se fixam as fibras do ligamento periodontal, recoberta pelo cimento está a dentina que constitui os canais radiculares contendo no seu interior a porção radicular da polpa dentária (Galler et al., 2021; “Structure of the Oral Tissues,” 2013).

Considerando os diferentes tipos de substrato com os quais mais frequentemente lidamos, esmalte e dentina, cada um tem composição, estrutura, propriedades físicas e químicas diferentes que levam a uma interação diferente com o procedimento adesivo (“Structure of the Oral Tissues,” 2013).

1.1.1 O Esmalte

O esmalte é o tecido mais superficial do dente, altamente mineralizado, com cerca de 92% de composição inorgânica constituída por hidroxiapatite, cujos cristais se organizam paralela e regularmente num padrão bem organizado e uniforme, tornando-o num excelente substrato para obter uma adesão fácil, previsível e duradoura (Perdigão, 2020).

Por ser um dos tecidos mais duros do corpo humano protege a polpa contra agressões físicas, como a mastigação, e químicas como os ácidos provenientes do metabolismo bacteriano (Lacruz et al., 2017). No entanto a estrutura acelular e avascular do esmalte não permite reparação e regeneração face a estas agressões, podendo pela diminuição da sua espessura e/ou comprometimento da sua estrutura causar sensibilidade dentária ao longo do tempo, pela exposição da dentina subjacente (Arola et al., n.d.; Lacruz et al., 2017).

1.1.2 A Dentina

A dentina é o suporte fundamental estrutural do esmalte, com uma componente orgânica significativa, bem como um considerável conteúdo aquoso, é uma camada mais resiliente e flexível devido à sua matriz tubular rica em colagénio, suportando melhor forças compressivas e tensões mecânicas (“Structure of the Oral Tissues,” 2013).

Os odontoblastos são as células formadoras de dentina, encontram-se alinhados com a superfície da polpa dentária. Algumas das funções principais destas células são a mediação de processos inflamatórios e reparadores, modulando e sintetizando o colagénio que forma grande parte da matriz (Galler et al., 2021; Goldberg et al., 2011).

Quimicamente, 45% da constituição da dentina é mineral, consistindo em cristais de hidroxiapatite pequenos, organizados num padrão irregular inseridos em 33% de matriz orgânica, constituída maioritariamente por colagénio tipo 1, e os restantes 22% são água. Fisicamente, existem diferentes tipos de dentina conforme as suas características: a dentina intertubular, rica em colagénio tipo 1 e água, é perfurada por um conjunto de microtúbulos conóides transversais à dentina e permeabilizados por fluido, cujo maior diâmetro se encontra junto à polpa. Em torno do lúmen destes microtúbulos situa-se a dentina peritubular, menos rica em colagénio. O diâmetro e número de microtúbulos

aumenta com a profundidade, em direção à polpa (M. V. Cardoso et al., 2011a; Goldberg et al., 2011; Marshall et al., 1997; Pashley, 1989; Perdigão, 2020; Perdigão et al., 2021). Assim, segundo um estudo de Perdigão et. al (2020) na porção coronal o volume tubular corresponde em média a 10% do volume dentinário total, diminuindo para cerca de 4% próximo da junção amelo-dentinária (JAD), já nas imediações da polpa o volume de microtúbulos dentinários ocupa cerca de 28% do volume dentinário total (Perdigão, 2020).

O fluido que circula dentro dos túbulos dentinários encontra-se a uma pressão constante estimada de 25-30 mmHg, para além disso também existe circulação de fluido na matriz interna da dentina inter-tubular, tornando-a num tecido duro e húmido (Perdigão, 2020).

Em profundidade, estes microtúbulos contém os processos alongados dos odontoblastos e fibras de colagénio. Os odontoblastos conferem uma capacidade de resposta à dentina perante estímulos fisiológicos ou patológicos, resultando na alteração da micro e macroestrutura dentinária e originando a dentina terciária, que pode ser reacionária ou reparadora (Carvalho et al., 2012; Marshall et al., 1997; Pashley, 1989; Perdigão, 2020). A formação de dentina reacionária resulta do aumento da atividade secretória dos odontoblastos, tipicamente em resposta a um estímulo suave. Os túbulos dentinários são gradualmente ocluídos através da deposição de cristais de fosfato de cálcio, levando à esclerose dos túbulos e diminuição da permeabilidade da dentina. A dentina reparadora é formada através de um processo mais complexo. É necessário um estímulo mais forte e intenso que leva à morte dos odontoblastos, no entanto vão ocorrendo depósitos minerais derivados de outras células, como os osteoblastos, cementócitos, ou células mesenquimatosas da polpa, que têm um potencial de diferenciação, formando uma dentina atubular e com uma estrutura amorfa (Galler et al., 2021).

É, assim, evidente a heterogeneidade do substrato dentinário, que se torna menos favorável à adesão, sobretudo se considerarmos uma dentina mais profunda (Marshall et al., 1997; Perdigão, 2020).

1.1.2.1 Adesão à dentina

Apesar dos tratamentos restauradores atuais terem como principais características a estética e a possibilidade de preparos mais conservadores, apresentam ainda algumas limitações, sendo uma das mais relevantes a sua longevidade, ainda insatisfatória, pela degradação da interface adesiva. Desde cedo que o desafio de adesão ao substrato dentinário é evidente, e tem sido amplamente estudada qual a razão por que difere tanto da qualidade e estabilidade que a adesão ao esmalte apresenta (Carvalho et al., 2012). É necessário considerar a heterogeneidade dos substratos dentários, as características dos mesmos após o preparo cavitário, e a sua interação com os diferentes tipos de sistemas adesivos (M. V. Cardoso et al., 2011a).

1.1.2.2 *Smear layer*

A *smear layer* é uma camada de detritos inorgânicos, orgânicos e bactérias que resulta da instrumentação da dentina por ação de instrumentos rotativos. Usualmente tem entre 0,5 a 2 μm de espessura e recobre o esmalte ou dentina intertubular, e ainda penetra nos túbulos dentinários, após instrumentação mecânica da dentina. Esta camada deve ser removida ou a sua permeabilidade alterada de modo que a matriz de colagénio seja penetrada e hibridizada pelos componentes do sistema adesivo, formando uma camada intermédia íntegra e coesa, a camada híbrida (Meerbeek et al., 2020; Mokeem et al., 2023; Sofan et al., 2017) .

1.1.2.3 Camada híbrida

A camada híbrida consiste numa camada de interdifusão entre a dentina e a resina, onde ocorre a infiltração do adesivo entre as fibras de colagénio dentinárias, formando uma camada íntegra e coesa com os monómeros de resina (M. V. Cardoso et al., 2011b; G. C. de Cardoso et al., 2019a; Marshall et al., 1997).

A degradação da interface dentina-adesivo é das principais causas de falha dos tratamentos restauradores, quer pela perda de adaptação marginal e micro infiltração bacteriana, quer pela nanoinfiltração sob a camada híbrida, o que leva ao desenvolvimento de cárie secundária e perda da restauração (M. V. Cardoso et al., 2011a; Mokeem et al., 2023).

1.2. Sistemas Adesivos

Em 1955, Buonocore introduziu o condicionamento ácido do esmalte com ácido ortofosfórico a 37%, na tentativa de tornar a adesão mais eficiente (M. V. Cardoso et al., 2011a; Meerbeek et al., 2020).

Fusayama utilizou pela primeira vez, em 1979, o ácido ortofosfórico para dissolver a *smear layer* e desobstruir os túbulos dentinários, permitindo uma união micromecânica e a formação da camada híbrida (Meerbeek et al., 2020; Mokeem et al., 2023).

No entanto, o condicionamento com ácido ortofosfórico numa estratégia *total-etch* dificilmente conduz a total infiltração do adesivo nas fibras de colagénio da dentina, resultando na exposição de uma zona de colagénio, abaixo da camada híbrida, suscetível a degradação enzimática pelas metaloproteinases da matriz (MMPs) e por hidrólise (Mokeem et al., 2023).

Além disso, esta abordagem leva à desmineralização excessiva do substrato dentinário, formando-se uma camada com 30% do seu volume constituído por fibras de colagénio suspensas em água, que compõe o restante volume de substrato. Uma vez seca com o jato de ar comprimido, as fibras de colagénio têm maior probabilidade de colapsar, dificultando a impregnação do adesivo e comprometendo a adesão (Meerbeek et al., 2020; Mokeem et al., 2023).

Ao longo dos tempos, têm sido desenvolvidas abordagens adesivas que permitam um melhor desempenho e longevidade das restaurações. Assim, existem atualmente vários sistemas adesivos, classificados de acordo com a estratégia adesiva, *etch-and-rinse* (ER) e *self-etch* (SE) e o número de passos que compõem o sistema (Tabela 1) (Dong et al., 2015; Meerbeek et al., 2020; Sofan et al., 2017).

Tabela 1- Efeito de cada componente adesivo no substrato dentinário segundo a estratégia adesiva aplicada [Adaptado de (Meerbeek et al., 2020)]

Componente	Estratégia ER	Estratégia SE
Componente ácido	Desmineraliza hidroxiapatite da dentina	Modifica a <i>smear-layer</i> , e estabelece uma ligação
<i>Primer</i>	Ligação química entre grupo carboxilo ou fosfato do <i>primer</i> com o colagénio da dentina	química entre o grupo carboxilo ou fosfato do <i>primer</i> com os cristais de hidroxiapatite da dentina
Adesivo	Após polimerização forma a camada híbrida ligando-se ao colagénio e hidroxiapatite da dentina	Após polimerização forma a camada híbrida através de ligações com a hidroxiapatite da dentina
Número de passos	3 ou 2	1 ou 2

Uma boa adesão é atingida através de diversos fatores, como a molhabilidade do substrato, a retenção micromecânica e a interação química entre o adesivo e o substrato (Meerbeek et al., 2020).

Uma molhabilidade adequada é adquirida através de uma boa difusão do adesivo sobre o substrato, ocorrendo um contacto íntimo na interface destes. Este contacto é avaliado pelo ângulo de contacto, que deve ser o mais próximo de zero possível (Meerbeek et al., 2020).

A retenção micromecânica é conseguida através da preparação mecânica do substrato e do condicionamento deste. A preparação dos tecidos através da utilização de brocas cria a *smear layer* que é dissolvida pelo ácido ortofosfórico (no caso dos sistemas ER) ou modificada por monómeros ácidos (no caso dos sistemas SE), dando origem a um substrato poroso, onde o adesivo impregna e fica retido (M. V. Cardoso et al., 2011a; Mokeem et al., 2023; Perdigão, 2020).

1.3.1 Sistemas adesivos ER

A estratégia ER é caracterizada por um passo inicial em que ocorre o condicionamento ácido do substrato (G. C. de Cardoso et al., 2019a; Meerbeek et al., 2020; Perdigão, 2020; Perdigão et al., 2021).

Quando aplicado ao esmalte, o condicionamento ácido é realizado durante 15 s, criando microporosidades estreitas e profundas na matriz mineralizada, permitindo a infiltração do adesivo por capilaridade e formando microprolongamentos de resina, que promovem, no final, a retenção da restauração (Meerbeek et al., 2020).

Da mesma forma, na dentina, o ácido ortofosfórico remove a *smear layer*, e cria uma camada desmineralizada com as fibras de colagénio suspensas em água, o que dificulta a penetração do adesivo no substrato dentinário, surgindo zonas em que essa impregnação fica então incompleta, como atrás referido. O ácido é lavado durante o mesmo tempo de aplicação de forma a remover na totalidade todos os seus componentes (Mokeem et al., 2023).

Após este passo, seca-se o substrato. No entanto, relativamente à dentina, não é benéfico secar excessivamente pois o colagénio tende a colapsar, obstruindo os túbulos dentinários e dificultando a posterior impregnação dos restantes componentes do sistema adesivo. Procede-se à aplicação e secagem do *primer* durante o intervalo de tempo indicado pelo fabricante, a fim de evaporar os solventes, e fotopolimeriza-se. O *primer* contém monómeros com propriedades hidrofílicas, como o 2- Hidroxietil Metacrilato (HEMA) dissolvidos em solventes como água, acetona ou etanol. O HEMA é responsável por homogeneizar as fases hidrofílica e hidrofóbica do adesivo, bem como melhorar a sua molhabilidade e promover a re-distribuição da rede de colagénio. Os solventes deslocam as partículas de água para facilitar a impregnação do adesivo (M. V. Cardoso et al., 2011a; Meerbeek et al., 2020; Pashley et al., 2011).

Finalmente, aplica-se o adesivo, de acordo com as indicações do fabricante, e fotopolimeriza-se. Os monómeros vão infiltrar nos espaços interfibrilares e nos túbulos dentinários da dentina e, após polimerização *in situ*, forma-se a camada híbrida (M. V. Cardoso et al., 2011a).

A estratégia acima descrita corresponde a uma abordagem ER de 3 passos, no entanto, o *primer* e adesivo podem aparecer combinados num só frasco, no caso dos sistemas ER de 2 passos (M. V. Cardoso et al., 2011a; Meerbeek et al., 2020).

1.3.2. Sistemas adesivos SE

A estratégia SE consiste na aplicação de um *primer* ácido que integra em simultâneo a desmineralização e a impregnação de monómeros funcionais no substrato, e a aplicação do adesivo, dispensando o passo inicial de condicionamento ácido. Ao combinar a desmineralização e a impregnação de monómeros num único passo, é eliminada a necessidade do protocolo de três passos: condicionamento ácido, lavagem e secagem. Este método não só simplifica o procedimento clínico, como também reduz o risco de erros técnicos, como a desidratação excessiva da dentina, que pode ocorrer após a lavagem do condicionamento ácido convencional (M. V. Cardoso et al., 2011a; Meerbeek et al., 2020).

Os adesivos SE são classificados pela sua acidez em fortes ($\text{pH} \leq 1$), intermédios ($\text{pH} \approx 1,5$) e suaves ($\text{pH} \geq 2$). Os adesivos fortes promovem uma desmineralização profunda, enquanto os suaves proporcionam uma desmineralização mais superficial (M. V. Cardoso et al., 2011b).

No entanto, devido à estrutura altamente mineralizada do esmalte, o *primer* ácido muitas vezes não consegue infiltrar-se de maneira eficaz nas microporosidades criadas pela leve desmineralização que provoca, limitando a capacidade dos monómeros adesivos penetrarem profundamente, resultando numa interface adesiva mais superficial. Como consequência, a resistência adesiva ao esmalte pode ser significativamente reduzida, afetando a durabilidade da restauração, por um insatisfatório selamento da restauração na sua margem (Carrilho et al., 2019; G. C. de Cardoso et al., 2019a; Meerbeek et al., 2020).

1.3.3. Sistemas adesivos Universais

A procura pela simplicidade na aplicação clínica das estratégias adesivas levou ao desenvolvimento de novas formulações. Os adesivos universais são a mais recente geração de adesivos, que combina o *primer* e o adesivo no mesmo gesto, providenciando a tão procurada simplicidade na adesão de restaurações. A universalidade desta geração de adesivos provém do facto de que podem ser utilizados numa estratégia ER, SE ou *selective enamel etching* (SEE) (Hardan et al., 2021; Meerbeek et al., 2020).

A estratégia SE, atualmente a mais indicada para aderir à dentina, emprega a utilização dos monómeros funcionais que desmineralizam e impregnam o substrato simultaneamente, criando também um potencial de ligação química entre os substratos adesivos. De todos os monómeros funcionais, o dihidrogenofosfato de 10-metacriloiloxidecil (10-MDP) é o mais eficiente, uma vez que o seu grupo metacrilato permite a interação com os polímeros do adesivo por co-polimerização. Na sua constituição molecular também existe um grupo éster que se liga aos iões Ca^{2+} da hidroxiapatite e o seu grupo carbono aumenta a hidrofobicidade da camada híbrida reduzindo a infiltração de humidade. Apesar destas características, o 10-MDP é um monómero sensível à degradação hidrolítica, tornando-se instável em água (Carrilho et al., 2019; G. C. de Cardoso et al., 2019a; Meerbeek et al., 2020). Esta estratégia é insuficiente para uma correta adesão ao esmalte, pelo que, para ultrapassar essa limitação, pode ser realizado um condicionamento ácido seletivo do esmalte, SEE. Desta forma, obtêm-se as microporosidades necessárias no esmalte, garantindo uma adesão mais eficaz, enquanto se mantém a simplicidade do procedimento SE na dentina (M. V. Cardoso et al., 2011b; Da Rosa et al., 2015; Meerbeek et al., 2020).

Também o HEMA integra a formulação dos adesivos universais, no entanto, devido à sua grande hidrofiliabilidade pode enfraquecer a interface adesiva uma vez que tende a atrair moléculas de água por osmose, tornando-a mais suscetível a degradação hidrolítica. A grande fluidez dos adesivos universais não permite uma camada de adesivo espessa, o que pode resultar na inibição da polimerização pelo oxigénio em profundidade. Os ésteres da molécula química do 10-MDP são também sensíveis à degradação hidrolítica (Carrilho et al., 2019; G. C. de Cardoso et al., 2019b; Meerbeek et al., 2020; Nagarkar et al., 2019).

1.4. O Plasma não-térmico atmosférico (PNTA)

O plasma, frequentemente referido como o quarto estado da matéria, é uma forma altamente energética e reativa que constitui a esmagadora maioria do universo, cerca de 99%. Embora este estado seja menos comum na Terra, está presente em fenómenos como relâmpagos, auroras boreais e em tecnologias como lâmpadas fluorescentes (Lata et al., 2021).

Foi descoberto em 1879 por um físico britânico, William Crookes, e foi denominado pelo termo “plasma” por Irving Langmuir, em 1929. Desde então, o plasma tem sido extensamente estudado devido às suas propriedades únicas e ao vasto leque de aplicações tecnológicas e científicas (Lata et al., 2021; Liu et al., 2016; Suresh et al., 2022).

Em termos físicos, o plasma é um gás parcialmente ionizado, composto por uma mistura de partículas carregadas, como prótons e eletrões altamente energéticos, juntamente com fotões ultravioleta e radicais livres (Ritts et al., n.d.; Suresh et al., 2022). Estas partículas estão em constante interação, criando um ambiente dinâmico e altamente reativo. O plasma é formado pela aplicação de energia a gases inertes, como hélio, argon, oxigénio ou nitrogénio, que são expostos a campos elétricos e radiação de alta frequência, incluindo radiação ultravioleta. A energia aplicada dissocia as moléculas dos gases, separando os eletrões dos núcleos, o que dá origem a um estado de ionização. Este processo gera um campo elétrico instável dentro do gás, entre os polos positivo e negativo das moléculas ionizadas (Lata et al., 2021; Suresh et al., 2022).

À medida que os eletrões ionizados tentam regressar às suas posições originais para neutralizar a carga elétrica da molécula, libertam energia sob a forma de radiação. Este ciclo contínuo de ionização e neutralização torna o plasma num estado altamente energético e muito reativo, com potencial para alterar as superfícies e materiais com os quais interage (Liu et al., 2016).

O PNTA é uma ferramenta versátil na biomedicina, tendo também múltiplas aplicações nas diferentes áreas da Medicina Dentária, como a biologia oral, oncologia, periodontologia, implantologia, e dentisteria restauradora (Awad et al., 2021a, 2021b; Dong et al., 2015; Han et al., 2019; Koban et al., 2011; Meerbeek et al., 2020; Nima et al., 2021; Stasic et al., 2019, 2021; Strazzi-Sahyon et al., 2021; Suresh et al., 2022).

Neste caso, a exploração das propriedades do PNTA aplicadas à melhoria da adesão de materiais restauradores é um dos grandes focos de estudo da sua utilização (Awad et al., 2021a, 2021b; Dong et al., 2015; Han et al., 2019; Meerbeek et al., 2020; Stasic et al., 2019, 2021; Strazzi-Sahyon et al., 2021; Suresh et al., 2022).

1.4.1 Características do PNTA

O plasma apresenta-se num intervalo de temperatura e densidade relativamente abrangente, sem que o seu estado fundamental se altere (Suresh et al., 2022). Esta característica permite que seja categorizado em dois tipos principais, de acordo com as condições de temperatura a que é formado e aplicado: plasma térmico e plasma não-térmico, também conhecido como plasma frio ou plasma atmosférico. O plasma térmico é gerado a altas temperaturas, enquanto o plasma não-térmico opera em condições próximas à temperatura ambiente (Awad et al., 2021b; Suresh et al., 2022).

O plasma térmico tem vindo a ser utilizado há vários anos no campo médico, sobretudo em procedimentos cirúrgicos. As suas propriedades de alta temperatura tornam-no particularmente eficaz em aplicações que requerem a coagulação de tecidos, como na eletrocirurgia, onde a energia do plasma térmico é usada para incisões em tecidos altamente vascularizados controlando a hemorragia pela indução da coagulação. No entanto, devido à alta energia libertada pelo plasma térmico, este pode causar danos consideráveis aos tecidos circundantes, resultando em necrose celular. Esta destruição tecidual compromete a viabilidade dos tecidos adjacentes à área de aplicação, o que pode ser uma limitação significativa em determinadas situações médicas, especialmente quando é fundamental preservar o tecido saudável (Kong et al., 2009; Suresh et al., 2022).

Em contrapartida, o plasma não-térmico atmosférico (PNTA) é gerado a temperaturas muito mais baixas, geralmente inferiores a 40°C, o que o torna consideravelmente mais seguro para uso em aplicações biomédicas que requerem a preservação dos tecidos saudáveis. Ao funcionar em temperaturas próximas à temperatura ambiente, o PNTA pode ser aplicado diretamente sobre a pele ou mucosas sem causar danos térmicos, como queimaduras ou necrose, sendo por isso uma ferramenta valiosa

em áreas como a Dermatologia ou a Medicina Dentária (Kong et al., 2009; Ritts et al., n.d.; Suresh et al., 2022).

Um dos fatores que contribui para o crescente uso do PNTA na biomedicina é a facilidade das condições necessárias para a sua formação. Enquanto o plasma térmico requer fontes de energia intensas e ambientes controlados para manter a sua alta temperatura, o PNTA pode ser gerado em condições relativamente simples, muitas vezes utilizando fontes de radiação como micro-ondas, radiação ultravioleta ou descargas elétricas controladas. Esta versatilidade na produção de PNTA tem permitido o desenvolvimento de uma variedade de dispositivos geradores e aplicadores, que podem ser ajustados para diferentes usos clínicos. Estes dispositivos podem ser compactos, portáteis e altamente adaptáveis, o que facilita a sua integração em consultórios médicos, dentários e laboratórios (Lata et al., 2021; Suresh et al., 2022).

Assim, o PNTA oferece uma alternativa viável e segura ao plasma térmico em diversas aplicações. A capacidade de aplicar o plasma a temperaturas seguras, combinada com a facilidade de gerar e controlar estas condições, continua a impulsionar o desenvolvimento de novas aplicações na biomedicina, promovendo avanços significativos em tratamentos que exigem uma abordagem menos invasiva e mais focada na preservação dos tecidos saudáveis (Lata et al., 2021; Suresh et al., 2022).

1.4.2 O PNTA aplicado à Dentina

O PNTA tem ganho destaque na Medicina Dentária como uma técnica promissora para melhorar as propriedades da dentina, tornando-a um substrato mais adequado para a adesão de materiais restauradores. Uma das principais limitações da dentina no protocolo adesivo é a sua baixa energia de superfície, que reduz a capacidade de penetração e ligação dos monômeros presentes nos sistemas adesivos. Além disso, a sua baixa molhabilidade conferida pela deposição da *smear-layer* é um dos grandes fatores de falha na impregnação de adesivo no substrato dentinário (Awad et al., 2021a). No entanto segundo um estudo de Dong. et al. (2013) a aplicação de plasma sobre o substrato dentinário conduziu a um aumento da resistência adesiva à dentina, melhorando em cerca de 60% a adesão. Consequentemente, esta melhoria na interface adesiva contribui para uma maior resistência, durabilidade e longevidade das restaurações, oferecendo um caminho inovador para superar os constantes desafios da adesão dentária.

A aplicação do PNTA permite a modificação dessas características, potencializando a eficiência da adesão (Ayres et al., 2018; Bolla et al., 2023).

Algumas das características da dentina são incompatíveis com uma interface adesiva estável e duradoura, pela sua maior componente orgânica e heterogeneidade. (Dong et al., 2013).

Estudos na literatura demonstram que o tratamento da dentina com PNTA aumenta significativamente a energia de superfície, o que se reflete numa maior molhabilidade. Esse efeito é geralmente avaliado através da medição do ângulo de contato da superfície dentinária com uma gota de água destilada, sendo que uma redução do ângulo indica uma maior molhabilidade. Esse aumento na molhabilidade é crucial para a adesão, pois permite que os monômeros hidrofílicos dos adesivos penetrem de maneira mais eficaz nas microestruturas da dentina, promovendo uma impregnação mais profunda. Com isso, há uma melhoria na formação da camada híbrida, que é essencial para a resistência adesiva a longo prazo (Ayres et al., 2018; Bolla et al., 2023; Dong et al., 2015; Hirata et al., 2015; Y. Zhang et al., 2014).

Além da melhoria na molhabilidade, o PNTA apresenta outros benefícios importantes. Um dos mais notáveis é a redução da microinfiltração, como relatado por Ayres et al. (2018). A microinfiltração é um problema comum nas restaurações dentárias, especialmente quando a adesão entre o material restaurador e a dentina não é ideal, permitindo a penetração de fluidos e bactérias ao longo da interface adesiva, o que pode levar à falha da restauração. O tratamento com PNTA reduz essa infiltração, o que pode contribuir para a longevidade das restaurações e preservação da saúde pulpar (Ayres et al., 2018).

Outro dos mecanismos de modificação de superfície dentinária pelo PNTA é a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), que são radicais livres formados durante o tratamento da superfície dentinária com o plasma. Essas espécies reativas interagem com a superfície dentinária, criando novos grupos funcionais que melhoram a interação química entre a dentina e o sistema adesivo (Ayres et al., 2018).

Portanto, a aplicação do PNTA à dentina não apenas modifica suas características físicas, como também promove uma interação mais favorável com os adesivos dentários, resultando em restaurações mais previsíveis. A combinação desses efeitos sugere que o

PNTA tenha um grande potencial para superar as limitações dos métodos convencionais, oferecendo uma abordagem inovadora para melhores resultados clínicos (Ayres et al., 2018; Bolla et al., 2023; Hirata et al., 2015; Liu et al., 2016).

2. Objetivo e hipóteses de estudo:

O presente estudo tem como objetivos otimizar os parâmetros de aplicação de um dispositivo de PNTA na dentina, bem como avaliar a resistência adesiva à dentina integrando a aplicação do PNTA segundo esses parâmetros. Para isto põem-se as seguintes hipóteses:

Hipótese 0₁: A aplicação do PNTA não altera o ângulo de contacto entre uma gota de água e a superfície dentinária.

Hipótese 1₁: A aplicação do PNTA altera o ângulo de contacto entre uma gota de água e a superfície dentinária.

Hipótese nula 0₂: A distância de aplicação do PNTA não influencia o ângulo de contacto entre uma gota de água e a superfície dentinária.

Hipótese 1₂: A distância de aplicação do PNTA influencia o ângulo de contacto entre uma gota de água e a superfície dentinária.

Hipótese nula 0₃: O tempo de aplicação do PNTA não influencia o ângulo de contacto entre uma gota de água e a superfície dentinária.

Hipótese 1₃: O tempo de aplicação do PNTA influencia o ângulo de contacto entre uma gota de água e a superfície dentinária.

Hipótese nula 0₄: A resistência adesiva à dentina sob forças de microtração, não é influenciada pela aplicação de PNTA segundo os parâmetros definidos.

Hipótese 1₄: A resistência adesiva à dentina sob forças de microtração é influenciada pela aplicação de PNTA segundo os parâmetros definidos.

3. Materiais e Métodos

Este estudo laboratorial foi realizado entre o Laboratório de Biomateriais do Instituto Universitário Egas Moniz (IUEM), e o Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa (FCT-UNL).

3.1 Seleção e armazenamento das amostras

Para este estudo laboratorial foram utilizados 34 molares humanos permanentes hígidos retirados do banco de dentes da clínica dentária universitária Egas Moniz e extraídos há menos de 6 meses. Os dentes foram armazenados em cloramina 1% durante 1 semana a 4 °C, e, posteriormente, transferidos para água destilada, mudada semanalmente para evitar a proliferação de microrganismos.

Para o estudo de otimização dos parâmetros de aplicação do dispositivo de PNTA usaram-se 14 dentes e os restantes 20 foram utilizados para o estudo de resistência adesiva sob tensões de corte.

3.2 Dispositivo de PNTA

No âmbito de um projeto de doutoramento em Engenharia Biomédica da FCT-UNL foi desenvolvido um dispositivo na forma de caneta para aplicação de PNTA, alimentado por uma fonte geradora de energia de alta frequência com uma tensão de 2 kV. A caneta consiste num cabo de borossilicato que reveste um eletrodo, que juntamente com dois outros eletrodos metálicos e uma fonte de alimentação de argon a 99% e a 3 slm (*standard litres per minute*), gera um jato de PNTA de 7 mm de comprimento, do qual é possível visualizar apenas cerca de 3 mm da pluma de plasma expostos pelo orifício inferior da caneta (Figura 1).



Figura 1- Dispositivo de PNTA utilizado no estudo

3.3 Métodos

3.3.1 Definição de parâmetros de aplicação do PNTA no substrato dentinário

Os 14 dentes selecionados para este estudo laboratorial foram seccionados usando o micrótomo de tecidos duros *Accutom 50* (*Struers, Ballerup, Dinamarca*). Cada dente foi fixado num suporte de resina com cera colante e, com recurso ao micrótomo foram feitos 3 cortes, o primeiro alinhado com a JAD, descartando a porção mais coronal de esmalte, o segundo corte foi programado 2 mm abaixo daquele e o terceiro 2 mm abaixo novamente. Obtiveram-se dois discos de dentina com cerca de 2 mm de espessura, perfazendo um total de 28 espécimes.

Para cada espécime foi medido o ângulo de contacto, entre uma gota de água destilada e a superfície da dentina, através de um espectro-goniómetro antes e depois da exposição ao plasma (Figura 2). Os grupos experimentais ($n=3$) foram obtidos das conjugações possíveis entre as variáveis distância de aplicação (2 mm, 4 mm e 6 mm) e tempo de aplicação (10 s, 20 s e 30 s) do PNTA na superfície da dentina. Os resultados obtidos foram analisados no *software* estatístico SPSS 29.0 (*Armonk, Nova Iorque, EUA*), sendo as variáveis independentes a aplicação, ou não, de PNTA, a distância de aplicação e o tempo de aplicação do plasma sobre a dentina.

Para a realização do segundo estudo deste trabalho, foi selecionada a combinação de variáveis mais favoráveis à diminuição do ângulo de contacto entre o substrato dentinário e a gota de água.

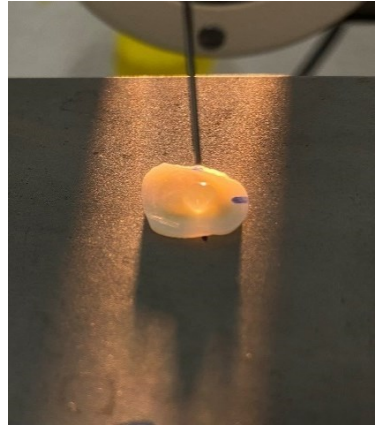


Figura 2- Espécime de dentina com gota de água destilada para medição do ângulo de contacto, no especto-goniómetro

3.3.2 Estudo da resistência adesiva sob forças de microtração após aplicação de PNTA

Para preparar os espécimes deste estudo, foi utilizado novamente o micrótomo de tecidos duros *Accutom 50*. Foram programados dois cortes, um ao nível da JAC e o segundo cerca de 5 mm acima desta referência. Obteve-se, assim, um disco de dentina de aproximadamente 5 mm de espessura, por dente, num total de 20 fatias. Foram criados 2 grupos experimentais (n=10), de acordo com a aplicação, ou não, do PNTA previamente à realização do protocolo adesivo (Figura 3).

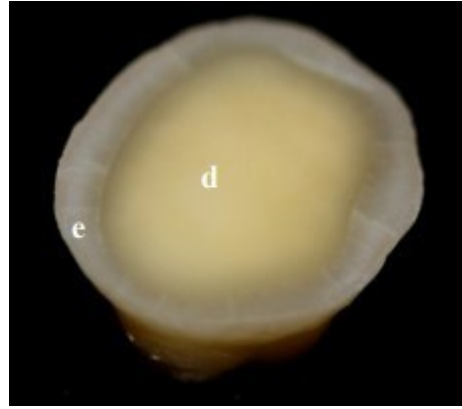


Figura 3- Dente após secção com dentina exposta (d- dentina; e- esmalte)

Em todas as fatias de dentina foi simulada a criação de *smear layer*, durante 60 s, com uma lixa de carbetto de silício de granulometria 600 (Buehler Ltd, Lago Bluff, IL, EUA). De seguida, a superfície foi lavada com água corrente e seca com o spray de ar comprimido.

Num dos grupos, foi aplicado o PNTA sobre a superfície da dentina, a uma distância de 7 mm, assumindo o comprimento da porção de pluma visível (3 mm) e a distância de aplicação selecionada após estudo anterior para otimização dos parâmetros distância (4 mm), bem como tempo de aplicação também previamente definido (10 s). Durante este procedimento, os espécimes foram movimentados de modo a garantir que toda a superfície dentinária era exposta ao plasma.

Posteriormente, foi realizado o protocolo adesivo nos dois grupos, utilizando o adesivo universal *Prime&Bond Active* (Dentsply Sirona, Konstanz, Alemanha) na estratégia SE (Figura 4). De acordo com as instruções do fabricante, o adesivo foi aplicado friccionando ativamente durante 20 s, seguidamente secou-se com o spray de ar comprimido durante 5 s para evaporar os solventes, e fotopolimerizou-se durante 20 s utilizando o fotopolimerizador (COXO DB686, Froshan COXO Medical Instruments, Guangdong, China) com uma intensidade mínima de 900 W/cm², a intensidade da luz foi monitorizada num radiómetro (Curing Radiometer P/N 10503, EUA) de 10 em 10 utilizações.



Figura 4-Adesivo *Prime&Bond Active* (Dentsply Sirona, Konstanz, Alemanha)

Após a aplicação do adesivo, em cada um dos espécimes foram contruídos blocos de resina composta universal utilizando a *Ceram.X Spectra ST* na cor A3 (*Dentsply Sirona*, Konstanz, Alemanha), em 2 incrementos de 2 mm, cada um deles fotopolimerizado durante 20 s (Figura 4). Os espécimes foram armazenados em água destilada, na estufa (*Memmert* INE 400, *Schwabach*, Alemanha) a 37 °C durante 24 h.



Figura 5- Espécime após protocolo adesivo e restauração em resina composta

Os dentes restaurados foram seccionados, no micrótomo de tecidos duros, segundo os eixos do xx e do yy, a uma velocidade de 2000 rpm, produzindo-se paralelepípedos com cerca de 1x1 mm², os palitos da periferia foram descartados por terem esmalte como substrato. Os espécimes foram armazenados em água destilada na incubadora a 37 °C, durante 24 h.



Figura 6- Espécime no suporte de corte após secção em palitos



Figura 7- Palitos em água destilada para armazenamento a 37 °C durante 24 h

Cada palito foi medido em ambos os eixos x e y com um paquímetro digital (*Velleman NV, Legen Heirweg*, Bélgica) e de seguida fixado na ranhura de um *jig* de Geraldeli, com cola de cianoacrilato (*Universal Cyanoacrylate Superglue, Wurth, Kunzlsau*, Alemanha) e sujeitos a tensões de microtração na máquina de testes universal (*Shimadzu Autograph AG-IS*, Tóquio, Japão) (Figura 9). O ensaio foi realizado a uma velocidade de 0,5 mm/min, até à falha.



Figura 8- Palito fixado a jig de Geraldeli para teste na máquina de testes universal

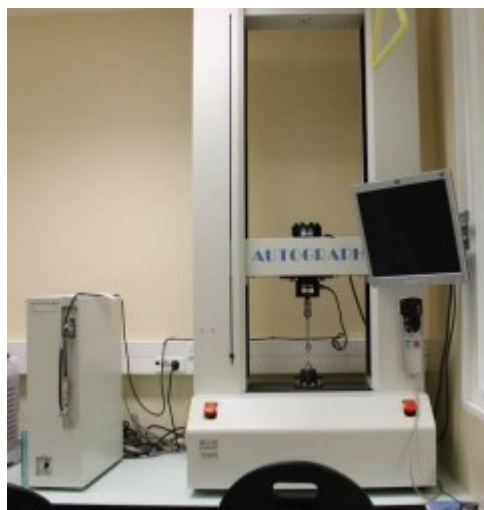


Figura 9- Máquina de testes universal (Shimadzu Autograph AG-IS, Tóquio, Japão)



Figura 10- Máquina de testes universal a tracionar palito

O valor da resistência adesiva de cada dente foi obtido da média dos valores de resistência adesiva de todos os palitos desse dente.

Os resultados foram analisados estatisticamente através do *software* SPSS 29.0 (*Armonk*, Nova Iorque, EUA), sendo a variável independente a aplicação, ou não, de PNTA.

4. Resultados

4.1. Otimização de parâmetros de aplicação do PNTA à dentina

Os valores dos ângulos de contacto medidos entre a superfície da dentina e uma gota de água, antes e após a aplicação do PNTA, encontram-se apresentados na Tabela 2.

Tabela 2-Valores dos ângulos de contacto medidos no espectro-goniómetro, antes da aplicação de plasma (N_PNTA: cinza) e após a aplicação de plasma (PNTA: branco) segundo os parâmetros em estudo (distância de aplicação e tempo de aplicação)

		Distância de aplicação (d)								
		2 mm			4 mm			6 mm		
Tempo de aplicação (t)	10 s	46°	59°	66°	35°	51°	33°	53°	54°	75°
		46°	40°	45°	35°	42°	33°	42°	31°	53°
	20 s	53°	50°	37°	51°	44°	51°	51°	35°	67°
		42°	27°	25°	42°	37°	35°	33°	30°	42°
	30 s	60°	43°	45°	40°	37°	47°	67°	76°	78°
		37°	22°	33°	25°	18°	41°	46°	32°	50°

4.1.1 Estatística descritiva

A análise descritiva dos resultados acima apresentados encontra-se exposta na tabela 3.

Tabela 3-Análise descritiva dos valores dos ângulos obtidos com e sem a aplicação de PNTA:

N_PNTA	Distância de aplicação (d)	Tempo de aplicação (t)	Mínimo	Máximo	Média (desvio padrão)
N_PNTA	2 mm	10 s	46.00	66.00	54.25 (9.946)
		20 s	37.00	53.00	46.67 (8.505)
		30 s	43.00	60.00	49.33 (9.292)
	4 mm	10 s	33.00	51.00	39.67 (9.866)
		20 s	44.00	51.00	48.67 (4.041)
		30 s	37.00	47.00	41.33 (5.132)
	6 mm	10 s	53.00	75.00	60.67 (12.423)
		20 s	35.00	67.00	51.00 (16.000)
		30 s	67.00	78.00	73.67 (5.859)
PNTA	2 mm	10 s	40.00	46.00	43.67 (3.215)
		20 s	25.00	42.00	31.33 (9.292)
		30 s	22.00	37.00	30.67 (7.767)
	4 mm	10 s	33.00	42.00	36.67 (4.726)
		20 s	35.00	42.00	38.00 (3.606)

	6 mm	30 s	18.00	41.00	28.00 (11.790)
		10 s	31.00	53.00	42.00 (11.000)
		20 s	30.00	42.00	35.00 (6.245)
		30 s	32.00	50.00	42.67 (9.452)

Os valores médios dos ângulos de contacto encontram-se entre 28° e 73.67°, nos grupos PNTA-4 mm-30 s e N_PNTA-6 mm-30 s, respetivamente.

4.1.2 Estatística inferencial

Após verificada a normalidade da distribuição das variáveis da amostra com o teste de *Shapiro-Wilk* ($p \geq 0,05$) procedeu-se à análise dos resultados utilizando o teste paramétrico ANOVA de 3 vias, seguido do *Post Hoc* de *Tuckey*, fixando-se a significância estatística em 0,05.

Relativamente à variável aplicação de plasma, esta teve uma influência estatisticamente muito significativa ($p < 0.001$) nos valores dos ângulos de contacto medidos, sendo estes inferiores para o grupo em que se aplicou o PNTA (Tabela 4).

Tabela 4 - Análise ANOVA para a variável aplicação de plasma (PNTA e N_PNTA)

	Soma dos Quadrados (SQ)	Graus de Liberdade (df)	Quadrado Médio (QM)	F	Sig.
Entre Grupos	3235,055	1	3235,055	27,175	<0,001
Dentro dos Grupos	6309,381	53	119,045	-	-
Total	9544,436	54	-	-	-

Quanto à influência da distância de aplicação (2 mm, 4 mm e 6 mm), detetaram-se diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,019$) (Tabela 5). Segundo o teste *post-hoc* de Tukey, essa diferença encontra-se entre as distâncias de 4 mm e 6 mm ($p = 0,015$) (Tabela 6):

Tabela 5 - Análise ANOVA para a variável distância de aplicação (d)

	Soma dos Quadrados (SQ)	Graus de Liberdade (df)	Quadrado Médio (QM)	F	Sig.
Entre Grupos	1348.641	2	674.321	4.278	.019
Dentro dos Grupos	1348.641	52	157.611	-	-
Total	9544,436	54	-	-	-

Tabela 6- *Post-hoc* de Tukey para a variável distância de aplicação (d)

Distância	N	Subconjunto 1	Subconjunto 2
4 mm	18	38.72	
2 mm	19	43.26	43.26
6 mm	18		50.83
Sig.		0.522	0.171

Para a variável tempo de aplicação (10 s, 20 s, 30 s) não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre os 3 tempos estudados (Tabela 7).

Tabela 7- Análise ANOVA para variável de tempo de aplicação (t)

	Soma dos Quadrados (SQ)	Graus de Liberdade (df)	Quadrado Médio (QM)	F	Sig.
Entre Grupos	213.083	2	106.541	.594	.556
Dentro dos Grupos	9331.354	52	179.449	-	-
Total	9544,436	54	-	-	-

Uma vez que não se verificaram diferença entre os tempos avaliados, foi selecionado o menor tempo de aplicação (10 s). No que diz respeito à distância, apenas foram demonstradas diferenças entre os 4 mm e 6 mm, sendo que o grupo de 4 mm demonstrou uma maior diminuição média do ângulo de contacto. Posto isto, a combinação de parâmetros selecionados para o estudo da resistência adesiva sob forças de microtração após aplicação do PNTA na dentina foi uma distância de 4 mm, durante 10 s.

4.2. Estudo da resistência adesiva sob forças de microtração após aplicação de PNTA

Os valores de tensão foram obtidos através do quociente entre a força máxima (N) aplicada no momento da fratura e a área (mm²) de aplicação dessa força. Os valores de tensão máxima foram registados em MPa (Tabela 8).

4.2.1 Estatística descritiva

Os resultados do ensaio de microtração encontram-se apresentados na tabela 8:

O grupo PNTA apresentou o valor médio de resistência adesiva mais elevado (34.99 ± 15.10 MPa).

Tabela 8-Análise descritiva dos resultados do ensaio de microtração

	Média (Desvio padrão) (MPa)	Mínimo (MPa)	Máximo (MPa)
N_PNTA	29.1717 (17.33415)	4.93	56.08
PNTA	34.9925 (15.09880)	5.26	53.88

4.2.2 Estatística inferencial

A comparação entre os valores de resistência adesiva obtidos nos dois grupos (PNTA e N_PNTA) foi realizada através da aplicação do *T-test* para amostras independentes, não tendo sido detetadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre os grupos (Tabela 9).

Tabela 9- Análise estatística dos valores de resistência adesiva (*T-test*)

	Teste de Levene (F)	Teste de Levene (Sig.)	t	df
Variâncias iguais assumidas	0,141	0,712	- 0,801	18
Variâncias iguais não assumidas	-	-	- 0,801	17,667

5. Discussão

Na Medicina Dentária conservadora a qualidade e estabilidade da adesão é um dos principais fatores para o sucesso do tratamento restaurador. Assim, o contínuo estudo da adesão, sistemas e técnicas adesivas é fundamental para ultrapassar as barreiras e dificuldades ainda patentes nas estratégias atualmente utilizadas (M. V. Cardoso et al., 2011a; Perdigão, 2020; Perdigão et al., 2021; Van Meerbeek et al., 1998).

As limitações dos adesivos consistem maioritariamente na suscetibilidade que apresentam à degradação hidrolítica e enzimática e na própria sensibilidade da técnica, o que a longo prazo compromete a integridade da interface adesiva (Fronza et al., 2022a, 2022b; Spencer et al., 2010; S.-C. Zhang & Kern, 2009). Por outro lado, a composição, estrutura e humidade, da dentina torna-a num substrato desfavorável à adesão (Fronza et al., 2022a; Rathí et al., 2020). Para transpor estes obstáculos relacionados com o substrato, têm sido estudadas técnicas que podem alterar a superfície da dentina, como o uso de ácidos e *primers*, que a desmineralizam parcialmente, preparando a matriz de colágeno para a penetração dos adesivos (M. V. Cardoso et al., 2011b). Também se têm desenvolvido protocolos de inibição das MMPs prevenindo a degradação hidrolítica (Fronza et al., 2022b). A utilização de lasers de alta e baixa energia para modificação da superfície dentinária tem sido uma prática também estudada. No presente trabalho, pretende-se intervir nas condições da superfície do substrato dentinário, através da interação deste com um PNTA (Ayres et al., 2018; Bolla et al., 2023; Elsahn et al., 2021; Hirata et al., 2015; Kong et al., 2009; Ritts et al., n.d.; Sun et al., 2023).

Neste estudo foi utilizado um dispositivo de plasma de árgon desenhado e desenvolvido pelo departamento de física da FCT-UNL. Não tendo sido desenvolvido industrialmente, este dispositivo não dispõe de qualquer protocolo de utilização na Medicina Dentária, assim tornou-se importante otimizar alguns parâmetros de aplicação para, neste caso, melhorar a eficiência adesiva através da alteração das condições do substrato dentinário. Cada parâmetro foi selecionado com o objetivo de tornar a superfície da dentina mais recetiva à aplicação de um adesivo universal, o que seria conseguido através do aumento da energia de superfície da dentina conduzindo a uma melhor interface adesiva do que a formada com os protocolos adesivos atualmente preconizados.

Verificou-se, de facto, uma diminuição do ângulo de contacto após aplicação do plasma na superfície da dentina, rejeitando-se a primeira hipótese nula. Possivelmente este efeito será

devido à alteração da superfície dentinária através da formação de EROs e ERNs, que aumentam a sua energia de superfície.

Tornou-se assim importante determinar qual o tempo e distância de aplicação mais eficaz para o dispositivo de PNTA utilizado no estudo.

A distância de aplicação do plasma influenciou o valor dos ângulos de contacto obtidos, pelo que se rejeita a segunda hipótese nula. Contudo, o tempo de aplicação não conduziu a diferenças nos ângulos de contacto medidos, pelo que não estamos em condições de rejeitar a terceira hipótese nula. Tal pode dever-se ao facto de que as espécies reativas são formadas à superfície no instante em que o substrato é exposto à pluma de plasma, não sendo relevante a duração da exposição para obter um efeito apreciável. Quanto à distância de aplicação observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre 4 mm e 6 mm, sendo os 4 mm a distância que permitiu obter maior redução dos ângulos de contacto. Tal é justificável se se considerar que a distância de 6 mm é insuficiente para o efeito da pluma de plasma alcançar eficazmente a superfície do substrato. Outra justificação poderá ser o formato da pluma, por ser progressivamente mais afunilado em direção à ponta, uma distância de aplicação menor beneficia de uma maior área de interação com a pluma do que uma distância maior, consequentemente, uma maior área de interação torna a aplicação do PNTA mais eficiente ao longo da superfície dentinária.

Relativamente ao segundo estudo deste trabalho, foram criados dois grupos experimentais, num dos quais as superfícies da dentina foram expostas ao PNTA a uma distância de 4 mm durante 10 s, seguindo-se a adesão de uma resina composta utilizando o sistema adesivo universal *Prime&Bond Active*; no outro grupo foi realizado o protocolo adesivo sem a exposição do substrato ao PNTA.

Apesar do aumento da molhabilidade observado após a aplicação do PNTA, os ensaios de microtração não mostraram qualquer influência nos valores de resistência adesiva obtidos. Tal pode ter acontecido devido a limitações relacionadas com a sensibilidade da técnica adesiva, impregnação insuficiente do adesivo ou a manipulação inadequada dos espécimes durante os ensaios de microtração. O número reduzido de espécimes na primeira fase de estudo também pode ter induzido um viés estatístico na seleção dos parâmetros de aplicação do PNTA. Relativamente ao efeito deste dispositivo de PNTA, pode ter ainda ocorrido algum tipo de incompatibilidade com determinados componentes do adesivo utilizado, comprometendo a polimerização ou ligação com o substrato. Existe ainda a hipótese da exposição ao plasma ter

alterado a microestrutura da superfície dentinária, com prejuízo para a interação do adesivo. Não se pode, desta forma, rejeitar a quarta hipótese nula.

Futuramente, a investigação deve continuar com a identificação das condições ideais para aplicação do PNTA, alterando outros parâmetros, como o fluxo da corrente, por exemplo. É essencial encontrar um protocolo que maximize os benefícios do plasma, assegurando a criação de uma superfície dentinária mais recetiva ao adesivo e, ao mesmo tempo, evitando quaisquer efeitos adversos que possam resultar de uma aplicação menos adequada. A otimização dos parâmetros de aplicação poderá permitir diminuir a degradação da interface adesiva e aumentar a longevidade das restaurações, o que representaria um avanço significativo para a dentisteria restauradora.

A escassez de protocolos bem definidos para a aplicação de PNTA à dentina é uma realidade que destaca a necessidade urgente de investigação acerca deste tema. A otimização dos parâmetros de aplicação é crucial para maximizar a eficácia do PNTA na modificação da superfície dentinária, particularmente em relação à adesão de materiais restauradores. De facto, variáveis como a distância de aplicação, o tempo de exposição, a intensidade da energia aplicada e o próprio dispositivo de plasma são fatores que podem afetar de forma significativa os resultados, influenciando desde a alteração superficial da dentina até à penetração dos monómeros do adesivo. Diferentes intensidades de energia podem ter efeitos variados na modificação da dentina, por exemplo, com impacto direto na qualidade da interface adesiva formada entre o dente e o material restaurador. Este aspeto ainda se encontra pouco explorado na literatura e merece relevância, pois poderá revelar a necessidade de calibrações específicas em função dos diferentes estratos dentários.

Também seria interessante comparar este dispositivo com outros já comercializados.

A possibilidade de aplicar os parâmetros definidos a partir deste estudo noutros dispositivos industriais abre também uma perspetiva interessante de pesquisa futura. Comparar o efeito de diferentes abordagens e dispositivos pode fornecer uma compreensão valiosa sobre práticas mais inovadoras. Também a medição dos ângulos de contacto formados entre uma gota de diferentes adesivos com a superfície da dentina, antes e após a aplicação de plasma, ou a comparação do efeito do ácido ortofosfórico sobre a dentina com o efeito do plasma sobre a mesma, ou até a análise do efeito das duas abordagens em simultâneo, são ideias e caminhos a explorar em futuras investigações.

Adicionalmente, a análise da topografia da dentina após aplicação do PNTA, bem como a análise química da camada híbrida formada são de extrema importância. A compreensão detalhada da composição química e das alterações estruturais que ocorrem na dentina pode oferecer novos conhecimentos sobre o processo de adesão integrando a aplicação de plasma. A formação da camada híbrida, que é fundamental para a resistência adesiva, pode ser influenciada pela modificação química da superfície do substrato, induzida pelas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio presentes no plasma. Investigar a composição e a resistência dessa camada, especialmente em comparação com protocolos tradicionais de adesão à dentina, permitirá validar o impacto da aplicação de PNTA na qualidade e longevidade da interface adesiva.

6. Conclusões

A aplicação do PNTA na dentina apresentou um efeito relevante, diminuindo, o ângulo de contacto, tornando-a num substrato mais recetivo à infiltração adesiva.

A aplicação do PNTA a 4 mm de distância, durante 10 s, revelou ser a combinação mais eficiente de entre os parâmetros investigados para o dispositivo utilizado

No entanto, não se verificou uma influência significativa na resistência adesiva sob forças de microtração com a aplicação do PNTA, segundo os parâmetros otimizados.

7. Bibliografia

Aparecida Delben, J., Evelin Zago, C., Tyhovych, N., Duarte, S., & Eduardo Vergani, C. (2016).

Effect of Atmospheric-Pressure Cold Plasma on Pathogenic Oral Biofilms and In Vitro

Reconstituted Oral Epithelium. *PloS One*, 11(5).

<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0155427>

Arola, D., Gao, S., Zhang, H., & Masri, R. (n.d.). *The Tooth: Its Structure and Properties*.

<https://doi.org/10.1016/j.cden.2017.05.001>

Awad, M. M., Alhalabi, F., Alshehri, A., Aljeaidi, Z., Alrahlah, A., Özcan, M., & Hamama, H. H.

(2021a). Effect of Non-Thermal Atmospheric Plasma on Micro-Tensile Bond Strength at

Adhesive/Dentin Interface: A Systematic Review. *Materials (Basel, Switzerland)*, 14(4), 1–13.

<https://doi.org/10.3390/MA14041026>

Awad, M. M., Alhalabi, F., Alshehri, A., Aljeaidi, Z., Alrahlah, A., Özcan, M., & Hamama, H. H.

(2021b). Effect of Non-Thermal Atmospheric Plasma on Micro-Tensile Bond Strength at

Adhesive/Dentin Interface: A Systematic Review. *Materials (Basel, Switzerland)*, 14(4), 1–13.

<https://doi.org/10.3390/MA14041026>

Ayres, A. P., Freitas, P. H., De Munck, J., Vananroye, A., Clasen, C., Dos Santos Dias, C. T.,

Giannini, M., & Van Meerbeek, B. (2018). Benefits of Nonthermal Atmospheric Plasma

Treatment on Dentin Adhesion. *Operative Dentistry*, 43(6), E288–E299.

<https://doi.org/10.2341/17-123-L>

Bolla, N., Mayana, A., Gali, P., Vemuri, S., Garlapati, R., & Kamal, S. (2023). Effect of nonthermal atmospheric plasma on bond strength of composite resin using total-etch and self-etch adhesive systems. *Journal of Conservative Dentistry*, 26(3), 292–298.

https://doi.org/10.4103/JCD.JCD_33_23

Cardoso, M. V., De Almeida Neves, A., Mine, A., Coutinho, E., Van Landuyt, K., De Munck, J., &

Van Meerbeek, B. (2011a). Current aspects on bonding effectiveness and stability in adhesive

dentistry. *Australian Dental Journal*, 56(SUPPL. 1), 31–44. [https://doi.org/10.1111/j.1834-](https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2011.01294.x)

[7819.2011.01294.x](https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2011.01294.x)

Cardoso, M. V., De Almeida Neves, A., Mine, A., Coutinho, E., Van Landuyt, K., De Munck, J., &

Van Meerbeek, B. (2011b). Current aspects on bonding effectiveness and stability in adhesive

dentistry. *Australian Dental Journal*, 56(SUPPL. 1), 31–44. [https://doi.org/10.1111/J.1834-](https://doi.org/10.1111/J.1834-7819.2011.01294.X)

[7819.2011.01294.X](https://doi.org/10.1111/J.1834-7819.2011.01294.X)

- 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* 2019, Vol. 12, Page 790, 12(5), 790. <https://doi.org/10.3390/MA12050790>
- Carvalho, R. M., Manso, A. P., Geraldeli, S., Tay, F. R., & Pashley, D. H. (2012). Durability of bonds and clinical success of adhesive restorations. *Dental Materials*, 28(1), 72–86. <https://doi.org/10.1016/J.DENTAL.2011.09.011>
- Da Rosa, W. L. D. O., Piva, E., & Da Silva, A. F. (2015). Bond strength of universal adhesives: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Dentistry*, 43(7), 765–776. <https://doi.org/10.1016/J.JDENT.2015.04.003>
- de Cardoso, G. C., Nakanishi, L., Isolan, C. P., Jardim, P. D. S., & de Moraes, R. R. (2019a). Bond Stability of Universal Adhesives Applied To Dentin Using Etch-And-Rinse or Self-Etch Strategies. *Brazilian Dental Journal*, 30(5), 467–475. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201902578>
- de Cardoso, G. C., Nakanishi, L., Isolan, C. P., Jardim, P. D. S., & de Moraes, R. R. (2019b). Bond Stability of Universal Adhesives Applied To Dentin Using Etch-And-Rinse or Self-Etch Strategies. *Brazilian Dental Journal*, 30(5), 467–475. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201902578>
- Dong, X., Li, H., Chen, M., Wang, Y., & Yu, Q. (2015). Plasma treatment of dentin surfaces for improving self-etching adhesive/dentin interface bonding. *Clinical Plasma Medicine*, 3(1), 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.cpme.2015.05.002>
- Dong, X., Ritts, A. C., Staller, C., Yu, Q., Chen, M., & Wang, Y. (2013). Evaluation of plasma treatment effects on improving adhesive/dentin bonding by using the same tooth controls and varying cross-sectional surface areas. *European Journal of Oral Sciences*, 121(4), 355. <https://doi.org/10.1111/EOS.12052>
- Elsahn, N. A., El-Damanhoury, H. M., & Elkassas, D. W. (2021). Influence of Low-Level Laser Modification and Adhesive Application Mode on the Bonding Efficiency of Universal Adhesives to Er:YAG Laser-Ablated Dentin. *Journal of Lasers in Medical Sciences*, 12, 1–9. <https://doi.org/10.34172/JLMS.2021.07>
- Fronza, B. M., Braga, R. R., & Cadenaro, M. (2022a). Dental Adhesives—Surface Modifications of Dentin Structure for Stable Bonding. *Dental Clinics of North America*, 66(4), 503–515. <https://doi.org/10.1016/J.CDEN.2022.05.002>

- Fronza, B. M., Braga, R. R., & Cadenaro, M. (2022b). Dental Adhesives—Surface Modifications of Dentin Structure for Stable Bonding. *Dental Clinics of North America*, 66(4), 503–515. <https://doi.org/10.1016/J.CDEN.2022.05.002>
- Galler, K. M., Weber, M., Korkmaz, Y., Widbiller, M., & Feuerer, M. (2021). Inflammatory Response Mechanisms of the Dentine–Pulp Complex and the Periapical Tissues. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 1480, 22(3), 1480. <https://doi.org/10.3390/IJMS22031480>
- Goldberg, M., Kulkarni, A. B., Young, M., & Boskey, A. (2011). Dentin: Structure, Composition and Mineralization: The role of dentin ECM in dentin formation and mineralization. *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)*, 3(2), 711. <https://doi.org/10.2741/E281>
- Han, G., Kim, J., Cho, B., Hwang, Y., & Kim, H. (2019). Improved resin-to-dentin bond strength and durability via non-thermal atmospheric pressure plasma drying of etched dentin. *European Journal of Oral Sciences*, 127(2), 170–178. <https://doi.org/10.1111/eos.12599>
- Hardan, L., Bourgi, R., Kharouf, N., Mancino, D., Zarow, M., Jakubowicz, N., Haikel, Y., & Cuevas-Suárez, C. E. (2021). Bond Strength of Universal Adhesives to Dentin: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Polymers*, 13(5), 1–35. <https://doi.org/10.3390/POLYM13050814>
- Hirata, R., Teixeira, H., Ayres, A. P. A., Machado, L. S., Coelho, P. G., Thompson, V. P., & Giannini, M. (2015). Long-term Adhesion Study of Self-etching Systems to Plasma-treated Dentin. *The Journal of Adhesive Dentistry*, 17(3), 227–233. <https://doi.org/10.3290/J.JAD.A34138>
- Koban, I., Holtfreter, B., Hübner, N. O., Matthes, R., Sietmann, R., Kindel, E., Weltmann, K. D., Welk, A., Kramer, A., & Kocher, T. (2011). Antimicrobial efficacy of non-thermal plasma in comparison to chlorhexidine against dental biofilms on titanium discs in vitro - proof of principle experiment. *Journal of Clinical Periodontology*, 38(10), 956–965. <https://doi.org/10.1111/J.1600-051X.2011.01740.X>
- Kong, M. G., Kroesen, G., Morfill, G., Nosenko, T., Shimizu, T., Van Dijk, J., & Zimmermann, J. L. (2009). Plasma medicine: An introductory review. In *New Journal of Physics* (Vol. 11). <https://doi.org/10.1088/1367-2630/11/11/115012>
- Lacruz, R. S., Habelitz, S., Wright, J. T., & Paine, M. L. (2017). Dental Enamel Formation and Implications for Oral Health and Disease *Physiol Rev*, 97, 939–993. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2016.-Dental>
- Lata, S., Chakravorty, S., Mitra, T., Pradhan, P. K., Mohanty, S., Patel, P., Jha, E., Panda, P. K., Verma, S. K., & Suar, M. (2021). Aurora Borealis in dentistry: The applications of cold plasma in biomedicine. *Materials Today. Bio*, 13. <https://doi.org/10.1016/J.MTBIO.2021.100200>

- Liu, Y., Liu, Q., Yu, Q. S., & Wang, Y. (2016). Nonthermal Atmospheric Plasmas in Dental Restoration. *Journal of Dental Research*, 95(5), 496. <https://doi.org/10.1177/0022034516629425>
- Marshall, G. W., Marshall, S. J., Kinney, J. H., & Balooch, M. (1997). The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *Journal of Dentistry*, 25(6), 441–458. [https://doi.org/10.1016/S0300-5712\(96\)00065-6](https://doi.org/10.1016/S0300-5712(96)00065-6)
- Meerbeek, B. Van, Yoshihara, K., Kirsten, /, Landuyt, V., 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. *J Adhes Dent*, 22(1), 7–34. <https://doi.org/10.3290/j.jad.a43994>
- Mokeem, L. S., Garcia, I. M., & Melo, M. A. (2023). Degradation and Failure Phenomena at the Dentin Bonding Interface. *Biomedicines* 2023, Vol. 11, Page 1256, 11(5), 1256. <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES11051256>
- Nagarkar, S., Theis-Mahon, N., & Perdigão, J. (2019). Universal dental adhesives: Current status, laboratory testing, and clinical performance. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 107(6), 2121–2131. <https://doi.org/10.1002/JBM.B.34305>
- Nima, G., Harth-Chu, E., Hiers, R. D., Pecorari, V. G. A., Dyer, D. W., Khajotia, S. S., Giannini, M., & Florez, F. L. E. (2021). Antibacterial efficacy of non-thermal atmospheric plasma against *Streptococcus mutans* biofilm grown on the surfaces of restorative resin composites. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-021-03192-0>
- Pashley, D. H. (1989). Dentin: a dynamic substrate--a review. *Scanning Microscopy*, 3(1), 161–176. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2662395/>
- Pashley, D. 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 : Official Publication of the Academy of Dental Materials*, 27(1), 1–16. <https://doi.org/10.1016/J.DENTAL.2010.10.016>
- Perdigão, J. (2020). Current perspectives on dental adhesion: (1) Dentin adhesion – not there yet. *Japanese Dental Science Review*, 56(1), 190–207. <https://doi.org/10.1016/J.JDSR.2020.08.004>
- Perdigão, J., Araujo, E., Ramos, R. Q., Gomes, G., & Pizzolotto, L. (2021). Adhesive dentistry: Current concepts and clinical considerations. In *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry* (Vol. 33, Issue 1, pp. 51–68). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jerd.12692>

- Rathi, S. D., Nikhade, P., Chandak, M., Motwani, N., Rathi, C., & Chandak, M. (2020). Microleakage in Composite Resin Restoration- A Review Article. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences*, 9(12), 1006–1011. <https://doi.org/10.14260/jemds/2020/216>
- Ritts, A. C., Li, H., Yu, Q., Xu, C., Yao, X., Liang, H., & Wang, Y. (n.d.). *Dentin surface treatment using a non-thermal argon plasma brush for interfacial bonding improvement in composite restoration*. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2010.00761.x>
- Sofan, E., Sofan, A., Palaia, G., Tenore, G., Romeo, U., & Migliau, G. (2017). Classification review of dental adhesive systems: from the IV generation to the universal type. *Annali Di Stomatologia*, 8(1), 1. <https://doi.org/10.11138/ADS/2017.8.1.001>
- Spencer, P., Ye, Q., Park, J., Topp, E. M., Misra, A., Marangos, O., Wang, Y., Bohaty, B. S., Singh, V., Sene, F., Eslick, J., Camarda, K., & Katz, J. L. (2010). Adhesive/Dentin Interface: The Weak Link in the Composite Restoration. *Annals of Biomedical Engineering*, 38(6), 1989. <https://doi.org/10.1007/S10439-010-9969-6>
- Stasic, J. N., Pfcir, J. K., Milicic, B., Puač, N., & Miletic, V. (2021). Effects of non-thermal atmospheric plasma on dentin wetting and adhesive bonding efficiency: Systematic review and meta-analysis. *Journal of Dentistry*, 112, 103765. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2021.103765>
- Stasic, J. N., Selaković, N., Puač, N., Miletić, M., Malović, G., Petrović, Z. Lj., Veljovic, D. N., & Miletic, V. (2019). Effects of non-thermal atmospheric plasma treatment on dentin wetting and surface free energy for application of universal adhesives. *Clinical Oral Investigations*, 23(3), 1383–1396. <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2563-2>
- Strazzi-Sahyon, H. B., Suzuki, T. Y. U., Lima, G. Q., Delben, J. A., Cadorin, B. M., Nascimento, V. do, Duarte, S., & Santos, P. H. dos. (2021). In vitro study on how cold plasma affects dentin surface characteristics. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 123, 104762. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2021.104762>
- Structure of the Oral Tissues. (2013). *Ten Cates Oral Histology: Development, Structure, and Function, Eighth Edition*, 1–13. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-07846-7.00001-X>
- Sun, G., Chen, X., Wei, F., Bai, T., & Zhu, S. (2023). Effects of Er: YAG, Er,Cr: YSGG, and Nd: YAG laser irradiation and adhesive systems on the immediate and long-term bond strength of dentin: a systematic review and meta-analysis. *Lasers in Medical Science*, 38(1). <https://doi.org/10.1007/s10103-022-03699-6>
- Suresh, M., Hemalatha, V. T., Sundar, N. M., & Nisha, A. (2022). Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma in Dentistry- A Review. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 45–55. <https://doi.org/10.9734/jpri/2022/v34i11a35533>

- Van Meerbeek, B., Perdigão, J., Lambrechts, P., & Vanherle, G. (1998). The clinical performance of adhesives. *Journal of Dentistry*, 26(1), 1–20. [https://doi.org/10.1016/S0300-5712\(96\)00070-X](https://doi.org/10.1016/S0300-5712(96)00070-X)
- Zhang, S.-C., & Kern, M. (2009). Bonding of Resin Adhesives. *International Journal of Oral Science*, 1(4), 163–176. <https://doi.org/10.4248/IJOS.09044>
- Zhang, Y., Yu, Q., & Wang, Y. (2014). Non-thermal atmospheric plasmas in dental restoration: improved resin adhesive penetration. *Journal of Dentistry*, 42(8), 1033–1042. <https://doi.org/10.1016/J.JDENT.2014.05.005>