

# **INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

### **ESTUDO DA CAMADA HÍBRIDA FORMADA COM ADESIVOS UNIVERSAIS SOBRE DENTINA PREPARADA COM PLASMA NÃO TÉRMICO ATMOSFÉRICO**

Trabalho submetido por

**Inês de Oliveira Ramalho**

para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

**outubro de 2025**





EGAS MONIZ SCHOOL  
of HEALTH & SCIENCE

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO  
EGAS MONIZ

# **INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

### **ESTUDO DA CAMADA HÍBRIDA FORMADA COM ADESIVOS UNIVERSAIS SOBRE DENTINA PREPARADA COM PLASMA NÃO TÉRMICO ATMOSFÉRICO**

Trabalho submetido por

**Inês de Oliveira Ramalho**

para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por

**Professora Doutora Ana Filipa Chasqueira**

**outubro de 2025**



## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Ana Filipa Chasqueira, por todo o apoio, disponibilidade e por ter acreditado em mim e neste projeto. Sem si, nada disto seria possível, muito obrigada, por tudo.

À Egas Moniz, a universidade que me acolheu durante 5 anos, e tão bonitos e felizes que foram, uma obrigada especial. Será sempre a minha segunda casa, a que eu sempre voltarei.

Aos meus Pais, porque sem eles nada disto teria sido possível, obrigada especial por me apoiarem sempre, e por me motivarem a ser cada vez melhor. Ao meu irmão que mesmo estando a 3 mil km a estudar, sempre me ouviu e ajudou, és o melhor do mundo, e desta vez não precisas de me obrigar a dizer. As minhas conquistas são também as vossas. À minha avó, Fernandosca, o amor da minha vida, a mulher mais forte que eu conheço, obrigada por garantires que eu estava sempre bem, e que era muito feliz. A ti, te dedico todas as minhas vitórias. Aos meus Tios e à minha pipoquinha, obrigada.

À Judite, avó Bia, avô Arménio e avô Zé, que ainda conseguiram ver-me a entrar nesta instituição, e que infelizmente não me viram a sair, fazem muita falta, mas sei que estão sempre a olhar por mim daí de cima, muitas saudades.

Às minhas PINIS: Catarina, Carolina, Rita c. e Rita a., as minhas melhores amigas, amigas desde que me lembro, não tenho palavras para vocês, estão sempre disponíveis para mim, são o meu apoio incondicional. Obrigada por todos os anos de me ouvirem a queixar, de parvoíces, felicidade e muita cumplicidade. Obrigada, também por toda a ajuda que me conseguiram dar, individualmente, a ser uma pessoa melhor e mais forte.

Ao meu trio, dente do siso: Marta e Inês, a minha companhia 24/7 desde 2020, obrigada por tanto, por me ouvirem, são o melhor que levo da faculdade. São as pessoas que fazem sentirmo-nos em casa, e vocês fizeram sentir-me assim ao longo destes 5 anos. WE DID IT.

À minha Clarita, a minha roommate desde o início até ao fim, colega de box, e a espanhola com o coração mais bonito. Obrigada por me aturares sempre, és especial. À minha Ema, Charequinha, Pratas, Tomás, Zé, Megui, Carlota, Prazeres, João e todas as pessoas que estiveram ao meu lado: obrigada por terem sido meus amigos e por terem feito parte deste percurso tão bonito, que ainda agora começou.



## RESUMO

**Objetivo:** Estudar a ultramorfologia da camada híbrida formada entre dois sistemas adesivos universais e a dentina, com e sem aplicação prévia de plasma não térmico atmosférico (PNTA) de árgon, antes do sistema adesivo.

**Materiais e Métodos:** Foram utilizados 8 molares humanos íntegros do banco de dentes da Egas Moniz School of Health and Science. De cada dente obteve-se uma fatia de dentina média com micrótomo de tecidos duros (Accutom-50, Struers, Ballerup, Dinamarca), posteriormente dividida em duas metades para a realização do procedimento restaurador com mesmo sistema adesivo, mas diferindo na prévia ou não aplicação de PNTA. Os sistemas adesivos estudados foram Scotchbond Universal Plus – SU (3M ESPE, 12290131, 29-07-2028, Neuss, Alemanha) e o Futurabond M+ – FM (VOCO, 2530433, 2027-07, Cuxhaven, Alemanha). Após o procedimento adesivo realizou-se a restauração com resina composta (grandioSO – VOCO, VC 52 002612 E1, 2028-02). Todos os materiais foram fotopolimerizados com o fotopolimerizador (COXO, DB-686, Guangdong, China). Os espécimes foram preparados para visualização da interface adesiva por microscopia eletrónica de varrimento. As fotomicrografias foram obtidas a 15 kV, distância de trabalho 13 mm, com ampliações 500 X e 1500 X.

**Resultados:** No SU sem PNTA observou-se camada híbrida contínua e homogénea, com prolongamentos de resina finos e túbulos dentinários bem definidos; com a aplicação de PNTA verificou-se aumento do número e do comprimento dos prolongamentos. No FM, com e sem PNTA, a camada híbrida foi mais fina e moderadamente uniforme, com discretas variações de espessura.

**Conclusões:** O PNTA não provocou alterações morfológicas relevantes na formação da camada híbrida. As diferenças dependeram sobretudo do adesivo, sendo o SU o que apresentou interface mais homogénea e melhor integração com a dentina, sugerindo maior influência do sistema adesivo na qualidade da interface adesiva do que a utilização do PNTA.

**Palavras-chave:** Dentina, Camada Híbrida, Plasma não Térmico Atmosférico, Microscopia Eletrónica de Varrimento.



## ABSTRACT

**Objective:** To study the ultrastructure of the hybrid layer formed between two universal adhesive systems and dentin, with and without prior application of argon non-thermal atmospheric plasma (NTAP), before adhesive application.

**Materials and Methods:** Eight intact human molars from the tooth bank of Egas Moniz School of Health and Science were used. From each tooth, a mid-coronal dentin slice was obtained using a hard-tissue microtome (Accutom-50, Struers, Ballerup, Denmark) and then divided into two halves to perform the restorative procedure with the same adhesive system, differing only in whether NTAP was applied beforehand. The adhesive systems evaluated were Scotchbond Universal Plus – SU (3M ESPE, 12290131, 29-07-2028, Neuss, Germany) and Futurabond M+ – FM (VOCO, 2530433, 2027-07, Cuxhaven, Germany). After the adhesive procedure, restoration was performed with a resin composite (grandioSO – VOCO, VC 52 002612 E1, 2028-02). All materials were light-cured using a curing unit (COXO, DB-686, Guangdong, China). Specimens were prepared for evaluation of the adhesive interface by scanning electron microscopy (SEM). Photomicrographs were obtained at 15 kV, with a working distance of 13 mm, at 500× and 1500× magnifications.

**Results:** In SU without NTAP, a continuous and homogeneous hybrid layer was observed, with thin resin tags and well-defined dentinal tubules; with NTAP application, an increase in the number and length of resin tags was noted. In FM, with and without NTAP, the hybrid layer was thinner and moderately uniform, showing slight variations in thickness.

**Conclusions:** NTAP did not produce relevant morphological changes in hybrid layer formation. Differences were mainly related to the adhesive system, with SU showing a more homogeneous interface and better integration with dentin, suggesting that the adhesive system has a greater influence on adhesive interface quality than NTAP use.

**Keywords:** Dentin; Hybrid layer; Non-thermal atmospheric plasma; Scanning electron microscopy.



## Índice

|                                                |    |
|------------------------------------------------|----|
| <b>1. Introdução</b>                           | 13 |
| 1.1. Substrato dentário                        | 13 |
| 1.1.1. Esmalte                                 | 14 |
| 1.1.2. Dentina                                 | 15 |
| 1.1.2.1. Dentina e a sua adesão                | 16 |
| 1.1.2.2. <i>Smear layer</i>                    | 17 |
| 1.1.2.3. Camada híbrida                        | 17 |
| 1.2. Sistemas adesivos                         | 19 |
| 1.2.1. Sistemas adesivos <i>Etch-and-Rinse</i> | 20 |
| 1.2.2. Sistemas adesivos <i>Self-Etch</i>      | 21 |
| 1.2.3. Sistemas adesivos universais            | 22 |
| 1.3. O plasma não-térmico atmosférico          | 23 |
| 1.3.1. Características do PNTA                 | 25 |
| 1.3.2. Aplicação do PNTA na estrutura dentária | 26 |
| <b>2. Objetivo</b>                             | 29 |
| <b>3. Materiais e Métodos</b>                  | 31 |
| 3.1. Seleção e armazenamento das amostras      | 31 |
| 3.2. Materiais                                 | 31 |
| 3.2.1. Dispositivo de PNTA                     | 35 |
| <b>3.3. Métodos</b>                            | 37 |
| 3.3.1. Preparação das amostras                 | 37 |
| 3.3.2. Protocolo de adesão                     | 39 |
| 3.3.3. Microscopia eletrónica de varrimento    | 41 |
| <b>4. Resultados</b>                           | 45 |
| 4.1. SU sem/com PNTA                           | 45 |
| 4.2. FM sem/com PNTA                           | 47 |
| <b>5. Discussão</b>                            | 51 |
| 5.1. Limitações e Perspetivas Futuras          | 53 |
| <b>6. Conclusão</b>                            | 55 |
| <b>7. Bibliografia</b>                         | 57 |



## Índice de Figuras

|                                                                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1- Sistema adesivo Scotchbond Universal Plus.....                                                                                                                 | 32 |
| Figura 2- Sistema adesivo Futurabond M+ .....                                                                                                                            | 32 |
| Figura 3- Resina restauradora nano-híbrida (grandioSO).....                                                                                                              | 32 |
| Figura 4- Grupos experimentais em estudo.....                                                                                                                            | 33 |
| Figura 5- Fotopolimerizador .....                                                                                                                                        | 35 |
| Figura 6- Dispositivo de PNTA .....                                                                                                                                      | 36 |
| Figura 7- Dente hígido fixado no suporte de acrílico.....                                                                                                                | 38 |
| Figura 8- Dente montado no micrótomo de tecidos duros para obtenção de fatia de dentina.....                                                                             | 38 |
| Figura 9- Fatia de dentina.....                                                                                                                                          | 38 |
| Figura 10- Hemi-disco de dentina.....                                                                                                                                    | 38 |
| Figura 11- Protocolo de adesão de acordo com o grupo experimental.....                                                                                                   | 40 |
| Figura 12- Microscópio eletrónico de varrimento (JEOL, JSM-5400). A) Painel de controlo e sistema de visualização do microscópio; b) Coluna e câmara do microscópio..... | 42 |
| Figura 13- Discos de alumínio.....                                                                                                                                       | 43 |
| Figura 14- Amostra de dentina com sistema adesivo SU sem PNTA.....                                                                                                       | 45 |
| Figura 15- Amostra de dentina com sistema adesivo SU com PNTA.....                                                                                                       | 46 |
| Figura 16- Amostra de dentina com sistema adesivo FM sem PNTA.....                                                                                                       | 47 |
| Figura 17- Amostra de dentina com sistema adesivo FM com PNTA.....                                                                                                       | 48 |



## **Índice de Tabelas**

|                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1-</b> Materiais utilizados no estudo, respetiva estratégia de aplicação e composição principal..... | 34 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|



## Lista de siglas

SE- *self-etch*

SEE- *selective enamel etching*

ER- *etch-and-rinse*

PNTA- Plasma não-térmico atmosférico

HEMA- 2- Hidroxietil metacrilato

10-MDP- Dihidrogenofosfato de 10-metacriloiloxidecil

Bis-GMA- *Bisfenol A Glicidil Metacrilato*

UDMA- *Urenato Dimetacrilato*

TEGDMA- *Trietileno Glicol Dimetacrilato*

JAC- Junção amelo-cementária

$\mu\text{m}$ - micrómetro

nm- nanómetro

mm- milímetro

kV- kilovolt

cm- centímetro

slm- *standard litres per minute*

$\text{cm}^2$ - centímetro ao quadrado

$\text{mm}^2$ - milímetro ao quadrado

mm Hg- milímetros de mercúrio

$\text{mW}/\text{cm}^2$ - miliwatt por centímetro quadrado

HCL- Ácido clorídrico

NaOCL- Cloreto de sódio

HMDS- Hexametildisilazano



## 1. Introdução

Ao longo das décadas, tem havido avanços significativos na Medicina Dentária restauradora. (Van Meerbeek et al., 2020).

A adesão em medicina dentária começou a ser estudada em 1951, com a tentativa de unir resina acrílica aos dentes através do monómero *glycerol phosphate dimethacrylate* (GPDM). Em 1955, *Buonocore* introduziu o condicionamento ácido, cuja técnica utiliza o ácido fosfórico para dissolver os cristais de hidroxiapatita, formando uma superfície adequada à penetração dos monómeros de resina. (Ahmed, et al., 2020; Van Meerbeek, et al., 2020; Perdigão, et al., 2020).

Um dos objetivos principais de qualquer restauração adesiva é garantir que o material restaurador tenha uma adaptação estável e duradoura ao substrato. Para alcançar este propósito, diversos fatores desempenham um papel essencial, tais como, o substrato em si, o adesivo, a técnica adesiva e a experiência do médico dentista, influenciando diretamente a eficácia e a longevidade do procedimento restaurador (Perdigão, 2020).

### 1.1. Substrato dentário

Os dentes são estruturas complexas compostas por diferentes tecidos com funções específicas. A coroa e a raiz, unidas pela margem cervical, são compostas por tecidos mineralizados: esmalte, dentina e cemento, que envolvem a polpa dentária (Galler et al., 2021).

A coroa do dente, que se trata da parte mais visível deste, é constituída superficialmente por uma camada dura, inerte e acelular denominada esmalte, cuja principal função é revestir e proteger a dentina. Esta, menos mineralizada e mais flexível, apresenta uma composição predominantemente orgânica e envolve o tecido vital do dente - a polpa dentária (“Structure of the Oral Tissues,” 2013).

A raiz constitui a porção do dente responsável pela sua fixação no alvéolo. É revestida externamente por cemento, tecido onde se inserem as fibras de ligamento periodontal, que está recoberto pela dentina, no interior da qual se localizam os canais radiculares que contém no seu interior a porção radicular da polpa (Galler et al., 2021; “Structure of the Oral Tissues,” 2013).

Considerando os dois principais substratos com que se trabalha em Medicina Dentária restauradora, o esmalte e a dentina, importa destacar que cada um apresenta composição, estrutura e propriedades físico-químicas próprias, o que condiciona a forma como interagem com os materiais restauradores (“Structure of the Oral Tissues,” 2013).

#### 1.1.1. Esmalte

A superfície mais externa do dente denomina-se por esmalte dentário, sendo considerada a maior matriz calcificada do corpo humano. Atua como uma barreira protetora para a dentina e a polpa dentária, sendo uma camada extremamente resistente ao desgaste e essencial para suportar as forças mastigatórias (Hilton et al., 2013; Nanci, 2018; Yahyazadehfar et al., 2014).

As células que formam o esmalte, denominadas ameloblastos, revestem toda a superfície do dente enquanto o esmalte está a ser produzido, mas desaparecem assim que o dente irrompe na cavidade oral (“Structure of the Oral Tissues,” 2013).

O esmalte dentário é um tecido altamente mineralizado, não vital e insensível, que, após a perda das células que o formam (ameloblastos), não possui capacidade regenerativa nem de substituição. Para compensar esta limitação, apresenta uma estrutura complexa e um elevado grau de mineralização, conferindo-lhe resistência e durabilidade (“Structure of the Oral Tissues,” 2013). É composto aproximadamente por 92% de material inorgânico, predominantemente cristais de hidroxiapatite, que apresentam maiores dimensões e organizam-se mais paralela e regularmente, o torna um substrato ideal para obter uma adesão mais previsível e duradoura (Perdigão, 2020).

### 1.1.2. Dentina

O tecido subjacente ao esmalte denomina-se dentina e está relacionado com o esmalte através da junção amelodentinária (JAD) (Imbeni et al., 2005). Trata-se de um substrato mais elástico, mais húmido e mais orgânico, sendo que o seu conteúdo mineral varia de 50% a 70%, enquanto a sua componente orgânica varia de 20% a 30% (90% colagénio tipo I e 10% proteínas não colágenas), 10% a 20% é composto por água (Imbeni et al., 2005).

A dentina é o principal suporte estrutural do esmalte e constitui a maior parte do dente (“Structure of the Oral Tissues,” 2013).

Devido à sua composição orgânica, rica em colagénio, e ao elevado conteúdo aquoso, apresenta uma estrutura tubular que lhe confere resiliência e flexibilidade. Esta matriz permite-lhe absorver melhor as forças compressivas e tensões mecânicas, funcionando como uma base elástica que compensa a fragilidade do esmalte e protege a polpa dentária, o tecido mais interno do dente (“Structure of the Oral Tissues,” 2013).

A dentina é uma estrutura complexa, composta por diferentes tipos, mesmo considerando o mesmo dente. Estudos indicam que, ao longo da evolução, as primeiras formas de dentina eram semelhantes ao osso, com células localizadas em alvéolos, tal como os osteócitos no osso (osteodentina), como ainda se observa em roedores e na dentina reparadora em humanos. Os odontoblastos, células responsáveis pela formação e secreção da dentina, estão alinhados junto à superfície da polpa dentária. Para além de produzirem colagénio, que compõe grande parte da matriz dentinária, também desempenham um papel importante na resposta inflamatória e nos processos de reparação do dente (Goldberg et al., 2011).

Do ponto de vista físico, a dentina apresenta diferentes tipos conforme a sua estrutura: a dentina intertubular, composta principalmente por colagénio tipo I e água, é atravessada por microtúbulos cónicos preenchidos por fluido, cujo diâmetro é maior junto à polpa dentária, enquanto a dentina peritubular, que os rodeia, é menos rica em colagénio (Perdigão, 2020).

O número e diâmetro dos túbulos aumentam com a profundidade da dentina, perto da polpa atingem cerca de 45.000/mm<sup>2</sup> com 2,5 µm de diâmetro, diminuindo para

29.500/mm<sup>2</sup> na dentina média (1,2 µm) e 20.000/mm<sup>2</sup> na dentina superficial (0,9 µm) (Perdigão, 2020).

De acordo com Perdigão et al. (2020), o volume tubular na dentina varia conforme a profundidade. Junto à JAD, os túbulos representam cerca de 4% do volume total da dentina, aumentando para aproximadamente 10% na região coronária e pode atingir até 28% do total da estrutura dentinária nas zonas mais próximas da polpa. Este aumento do volume tubular está também associado a um acréscimo significativo no conteúdo de água à medida que se aproxima da polpa dentária (Perdigão, 2020).

Os túbulos dentinários contêm fluido sob uma pressão constante da polpa, estimada entre 25 a 30 mm Hg, e para além disso há fluido na área da dentina intertubular, o que torna a dentina um tecido duro, mas intrinsecamente húmido em toda a sua estrutura interna (Perdigão, 2020).

A dentina profunda apresenta processos alongados dos odontoblastos e fibras de colagénio dentro dos túbulos, elementos menos comuns na dentina média e superficial. Estas características aumentam a complexidade da adesão em dentina profunda, tornando-a mais desafiante do que em zonas mais superficiais (Perdigão, 2020).

Fica, portanto, evidente que a heterogeneidade do substrato dentinário dificulta a adesão, particularmente quando se trata da dentina mais profunda (Perdigão, 2020).

#### 1.1.2.1. Dentina e a sua adesão

A adesão à dentina é um dos maiores desafios da dentisteria adesiva devido à sua composição variável e histologia complexa. A eficácia da adesão é influenciada por vários fatores, incluindo idade do paciente, localização do dente, profundidade da dentina, presença de dentina esclerótica, tipo de material restaurador, técnica utilizada, isolamento e experiência do médico dentista. Estes fatores tornam a adesão menos previsível e afetam a durabilidade dos tratamentos restauradores (Marshall et al., 1997; Perdigão, 2010; Perdigão et al., 2013; Laske et al., 2016; Perdigão, 2020).

Os tratamentos restauradores atuais destacam-se pela sua estética e pela possibilidade de preparos minimamente invasivos, mas ainda enfrentam alguns desafios, especialmente quanto à sua longevidade, devido à degradação da interface adesiva. A adesão à dentina

continua a ser um obstáculo, pois difere significativamente da adesão ao esmalte, que é mais estável e resistente (Perdigão, 2010; Perdigão et al., 2013).

#### 1.1.2.2. *Smear layer*

A *smear layer* corresponde a uma fina camada de detritos microscópios que se forma sobre a superfície do esmalte e da dentina após a instrumentação mecânica com instrumentos rotativos. Apresenta uma espessura variável entre 0,5 e 2  $\mu\text{m}$  e é constituída por partículas de hidroxiapatite, colagénio, detritos orgânicos e inorgânicos e bactérias. Para além de recobrir a superfície dentinária, esta camada pode penetrar nos túbulos, formando *smear plugs*, que reduzem a permeabilidade dentinária até 86%, no entanto, ainda permitem passagem de fluido devido à sua estrutura microporosa (Van Meerbeek et al., 2020; Migliau, et al., 2017; Saikaew et al., 2022).

Para garantir uma adesão eficaz, a *smear layer* pode ser removida ou modificada. No sistema *etch-and-rinse*, o ácido fosfórico dissolve e elimina completamente a camada por enxaguamento. No sistema *self-etch*, os *primers* acídicos modificam a *smear layer* sem a remover totalmente, permitindo a interação adesiva direta com a dentina (Migliau et al., 2017; Saikaew et al., 2022).

A modificação ou remoção da *smear layer* é essencial para que os componentes do adesivo penetrem e hibridizam a matriz de colagénio, formando uma camada híbrida coesa e resistente, a camada híbrida (Van Meerbeek et al., 2020; Migliau, et al., 2017; Saikaew et al., 2022).

#### 1.1.2.3. Camada híbrida

A adesão ao esmalte é considerada mais simples devido à sua composição mineral, onde o condicionamento ácido forma microporosidades que aumentam a retenção mecânica. No entanto, na dentina, além de desmineralizar, o ácido remove a *smear layer* e expõe a rede de fibras de colagénio, havendo necessidade da formação da camada híbrida, descrita em 1982 por Nakabayashi (Matos, et al., 2017; Van Meerbeek, et al., 2020; Perdigão, et al., 2021).

A camada híbrida trata-se de uma zona de transição entre a dentina e o material restaurador, que resulta da infiltração e polimerização de monómeros de resina nas fibras de colagénio expostas após o condicionamento ácido. Esta camada é essencial para a adesão eficaz entre o dente e a restauração, assegurando a retenção desta e a sua longevidade (Rodrigues *et al.*, 2015; Spencer *et al.*, 2010).

A degradação da interface adesiva constitui uma das principais causas de insucesso dos tratamentos restauradores. Entre os fatores que contribuem para este processo, destaca-se a desidratação excessiva da dentina durante o procedimento adesivo, que compromete a integridade da camada híbrida. Esta deterioração pode resultar em perda de adaptação marginal, infiltração bacteriana e, conseqüentemente, no desenvolvimento de cáries secundárias e falhas na restauração (M. V. Cardoso *et al.*, 2011; Mokeem *et al.*, 2023).

## 1.2. Sistemas adesivos

Atualmente, os adesivos dentários utilizam duas estratégias principais classificadas em: “*etch-and-rinse*” (ER) e “*self-etch*” (SE) onde o primeiro poderá ser um sistema adesivo de dois ou três passos e o segundo um sistema de um ou dois passos (Cardoso et al., 2011).

A eficácia da adesão depende de múltiplos fatores, entre os quais se destacam a molhabilidade do substrato, a retenção micromecânica e a interação química estabelecida entre o adesivo e o substrato dentário (Van Meerbeek et al., 2020).

Uma molhabilidade eficaz é adquirida através de uma boa difusão do adesivo sobre o substrato, estabelecendo um contacto íntimo na interface entre ambos. Este comportamento é avaliado pelo ângulo de contacto, que deve idealmente aproximar-se de zero (Van Meerbeek et al., 2020).

A retenção micromecânica é obtida 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 posteriormente removida pelo ácido ortofosfórico nos sistemas ER ou alterada pela ação dos monómeros acídicos nos sistemas SE. Este processo origina um substrato poroso onde o adesivo impregna e fica retido (Cardoso et al., 2011; Perdigão, 2020).

Apesar da popularidade dos adesivos, surgiram algumas preocupações sobre a sua durabilidade, que varia conforme o material usado. Para integrar todos os componentes numa única solução, os sistemas adesivos de apenas um passo tornaram-se mais ácidos e hidrofílicos, o que pode comprometer a adesão ao dente e consequentemente, a sua durabilidade. A maior absorção da água favorece a nanoinfiltração, o que vai acelerar a degradação da ligação e aumentar o risco de falha em comparação com o sistema de múltiplos passos (Cardoso et al., 2011).

O mecanismo fundamental da adesão ao esmalte e dentina baseia-se na substituição dos minerais removidos dos tecidos dentários por monómeros de resina, que ao polimerizar, interligam-se mecanicamente nas microporosidades (Cardoso et al., 2011).

Apesar da elevada capacidade de adesão ao esmalte, a adesão à dentina é mais complexa e menos previsível devido à sua estrutura heterogênea, composta por hidroxiapatite e fibras de colagénio (Cardoso et al., 2011).

A dentina contém túbulos ligados à polpa dentária, preenchidos por fluido sob pressão constante, tornando a sua superfície naturalmente húmida e hidrofílica. Esta característica representa um dos maiores desafios para a adesão e levou ao desenvolvimento de diferentes estratégias de sistemas adesivos (Cardoso et al., 2011).

### 1.2.1 Sistemas adesivos *Etch-and-Rinse*

O principal mecanismo de adesão dos sistemas ER consiste numa ligação micro-mecânica por difusão. A técnica envolve o condicionamento com ácido fosfórico a 37% na superfície de esmalte e dentina, seguida de uma lavagem com água para a sua remoção. Este ácido elimina a *smear layer*, desmineralizando a superfície do esmalte e a dentina e expondo os seus primas (Breschi et al., 2008; Pashley et al., 2011).

Esta técnica produz microporosidades profundas no esmalte, com 4–6 µm de profundidade, permitindo a infiltração da resina e a formação de micro e macroprolongamentos que garantem uma longevidade na sua adesão (Van Meerbeek et al., 2020).

Na dentina, o ácido fosfórico remove a *smear layer* e cria uma camada desmineralizada onde as fibras de colagénio permanecem suspensas em água. É essencial manter o substrato húmido para evitar o colapso da rede colagénica e assegurar a penetração do adesivo. O ácido deve ser lavado durante o mesmo período da aplicação e a superfície ligeiramente seca, evitando desidratação excessiva, que poderia obstruir os túbulos dentinários e comprometer a adesão (Van Meerbeek et al., 2020; Mokeem et al., 2023).

De seguida, aplica-se o *primer*, que contém propriedades hidrofílicas, como o HEMA (2-hidroxietil metacrilato), dissolvidos em solventes como água, etanol ou acetona. Estes componentes aumentam a molhabilidade e ajudam a expandir a rede colagénica, promovendo uma melhor infiltração da resina (Carvalho et al., 2003; Cardoso et al., 2011).

Após a evaporação dos solventes, o adesivo é aplicado e fotopolimerizado, permitindo a penetração dos monómeros nos túbulos e espaços interfibrilares, originando a camada híbrida e os prolongamentos de resina responsáveis pela retenção micromecânica (Carvalho et al., 2003; Cardoso et al., 2011).

Os sistemas ER podem apresentar três passos, nas quais o *primer* é aplicado separadamente, facilitando a penetração da resina hidrofóbica e a formação de uma camada híbrida, ou dois passos, que combinam *primer* e adesivo numa única aplicação, simplificando o procedimento clínico (Pashley et al., 2011).

### 1.2.2. Sistemas adesivos *Self-Etch*

A estratégia SE trata-se de uma estratégia que consiste na aplicação de um *primer* ácido, que desmineraliza e permite a impregnação de monómeros funcionais no substrato, seguida da aplicação do adesivo (Van Meerbeek et al., 2020). Este *primer* não remove a *smear layer*, no entanto, integra os resíduos da *smear layer* à camada híbrida, promovendo uma desmineralização superficial da dentina (Caldas, et al., 2019; Perdigão, et al., 2021).

Ao unir num único passo a desmineralização e a penetração dos monómeros, evita-se o protocolo de três etapas, que inclui o condicionamento ácido, a lavagem e secagem. Além de tornar o procedimento mais simples, este método minimiza o risco de erros técnicos, como a desidratação excessiva da dentina após a lavagem do ácido (Van Meerbeek et al., 2020).

Com o objetivo de simplificar o processo adesivo, surgiu a abordagem SE que apenas dissolve a "*smear layer*" sem a remover. Apesar da diferença no processo de condicionamento ácido, os passos de "*primer*" e "*bond*" podem ser separados ou combinados (Perdigão, et al., 2021).

Existem duas estratégias: o sistema de dois passos, com *primer* e adesivo em separado, e o sistema de um passo, em que ambos se encontram combinados num único frasco. Quando usado no esmalte, recomenda-se o condicionamento seletivo com ácido fosfórico para melhorar a adesão e o selamento marginal (Caldas et al., 2019; Perdigão et al., 2021).

### 1.2.3. Sistemas adesivos universais

A estratégia do sistema adesivo universal trata-se de uma estratégia que permite a sua aplicação tanto em sistema ER, SE, *selective enamel etching* (SEE) ou *selective dentin etching* (SDE) de acordo com a escolha pessoal do médico dentista (Van Meerbeek *et al.*, 2020).

A qualidade da adesão varia consoante o sistema adesivo usado: SE ou ER. Os adesivos universais surgiram como uma alternativa mais simples, permitindo uma aplicação mais rápida e menos sensível. Combinam o *primer* e adesivo num único frasco e podem ser usados tanto em restaurações diretas como indiretas, promovendo assim a simplicidade e versatilidade desta técnica (Hardan *et al.*, 2021).

No entanto, a sua durabilidade continua a ser o maior desafio, uma vez que a nanoinfiltração tende a aumentar com o tempo, comprometendo a estabilidade da ligação. Até aos dias de hoje, não existe um protocolo ideal que assegure a adesão eficaz e duradoura para estes sistemas (Hardan *et al.*, 2021).

A estratégia SE é atualmente abordagem mais recomendada para a adesão à dentina, pois utiliza monómeros funcionais que desmineralizam e penetram no substrato ao mesmo tempo, promovendo também uma ligação química entre os materiais adesivos (Carrilho *et al.*, 2019; Van Meerbeek *et al.*, 2020).

O 10-MDP (dihidrogenofosfato de 10-metacriloiloxidecil) é o monómero funcional mais eficiente devido à sua capacidade de co-polimerização com os polímeros do adesivo através do grupo metacrilato. Além disso, o grupo éster liga-se aos iões  $\text{Ca}^{2+}$  da hidroxiapatite, e a sua estrutura química contribui para uma maior hidrofobicidade, reduzindo a absorção de humidade na camada híbrida. No entanto, apesar das suas vantagens, o 10-MDP é sensível à degradação hidrolítica, tornando-se instável em ambientes aquosos, e pode comprometer a durabilidade da adesão (Carrilho *et al.*, 2019; Van Meerbeek *et al.*, 2020).

A estratégia SE não garante uma adesão eficaz ao esmalte, sendo por isso aconselhado a técnica de SEE, que cria microporosidades a fim de melhorar a adesão sem comprometer a simplicidade do SE na dentina (Carrilho *et al.*, 2019; Van Meerbeek *et al.*, 2020).

Nos adesivos universais, o HEMA pode fragilizar a interface adesiva, pois a sua elevada hidrofilicidade atrai água e favorece a degradação hidrolítica. Além disso, a sua fluidez reduz a espessura da camada adesiva, aumentando o risco de inibição da polimerização pelo oxigénio (Carrilho *et al.*, 2019; Van Meerbeek *et al.*, 2020).

### 1.3. O plasma não-térmico atmosférico

O plasma é referido como a quarta forma da matéria. É um gás ionizado, composto por eletrões livres, iões e diversas espécies reativas, como os radicais hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ) (Lata et al., 2022).

Além disso, o plasma contém fotões energéticos (luz ultravioleta) e campos elétricos transitórios intensos, ambos fundamentais para a quebra de ligações químicas e formação de espécies reativas, devido ao forte campo eletrónico nas descargas pulsadas. De facto, o plasma é a forma de matéria mais abundante no universo, representando cerca de 99% de matéria visível (Lata et al., 2022).

O plasma foi descoberto em 1879 por um físico britânico, *William Crookes*, e recebeu a designação de “plasma” em 1929, atribuída por *Irving Langmuir*, em 1929. Desde então, tem sido amplamente investigado pelas suas propriedades distintas e pela sua vasta gama de aplicações tecnológicas e científicas (Lata et al., 2022).

O plasma é classificado como térmico ou não-térmico, com base nas temperaturas relativas dos eletrões e neutrões. No plasma térmico, os eletrões e as partículas pesadas estão em equilíbrio térmico, resultando em temperaturas altas e a sua aplicação é especialmente vantajosa em procedimentos que requerem coagulação tecidual. No plasma não-térmico (PNT), também conhecido como plasma atmosférico frio (CAP) os eletrões estão mais quentes, mas os iões e os neutrões estão à temperatura ambiente, sendo frequentemente utilizado para a modificação de superfícies de biomateriais (Lata et al., 2022).

O plasma atmosférico não térmico (PNTA) tem demonstrado melhorar a resistência da ligação envelhecida, embora não tenha impacto na resistência imediata da adesão à dentina. Este plasma é composto por gases parcialmente ionizados, contendo átomos,

moléculas, iões e radicais livres eletronicamente excitados, que atuam como reticuladores reativos, formando grupos químicos funcionais na superfície da dentina (Liu et al., 2016).

A sua formação ocorre através da aplicação de energia a gases inertes, como hélio, árgon, oxigénio ou nitrogénio, que são submetidos a campos elétricos e radiações de alta frequência, incluindo radiação ultravioleta e micro-ondas. Esta energia provoca a dissociação das moléculas gasosas, separando os eletrões dos seus núcleos e induzindo um estado de ionização. Como resultado, forma-se um campo elétrico instável entre as cargas positivas e negativas presentes no gás (Lata et al., 2021; Suresh et al., 2022).

À medida que os eletrões ionizados retornam às suas posições de equilíbrio, restabelecendo a neutralidade elétrica das moléculas, ocorre a libertação de energia sob a forma de radiação. Este processo contínuo de ionização e recombinação mantém o plasma num estado altamente energético, conferindo-lhe um elevado potencial de reatividade e capacidade de modificar as superfícies ou materiais com que entra em contacto (Lata et al., 2021; Suresh et al., 2022).

Estudos indicam que o PNTA aumenta a molhabilidade da dentina, melhora a polimerização da resina e favorece a infiltração dos monómeros adesivos, fortalecendo assim a adesão. Além disso, evidências apontam que este plasma estimula a dentina, libertando radicais livres e peróxidos, que intensificam a interação entre as fibras de colagénio e os monómeros de resina, otimizando a formação da camada híbrida (Chen et al., 2014).

Outro benefício potencial do PNTA é a capacidade de reduzir a expressão e atividade das metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9), enzimas responsáveis pela degradação da matriz extracelular. Esta inibição pode conduzir à preservação da integridade da camada híbrida, prolongando a durabilidade da adesão. Assim, o PNTA surge como uma tecnologia promissora na medicina dentária, com potencial para melhorar a longevidade das restaurações adesivas (Sampaio et al., 2017).

### 1.3.1. Características do PNTA

O plasma, gerado através do aquecimento de moléculas gasosas ou pela exposição a campos eletromagnéticos intensos, resulta da passagem de radiações de elevada intensidade, como raios ultravioleta e micro-ondas, por gases como oxigénio, azoto, hélio e árgon, na presença de um campo elétrico. Esta tecnologia tem ampla aplicação em diversos dispositivos eletrónicos e mais recentemente em contextos biomédicos (Suresh et al., 2022).

Pode existir numa ampla gama de temperaturas e densidades sem que a sua natureza fundamental se modifique. Esta versatilidade permite classificá-lo em dois grandes grupos, consoante as condições térmicas em que é produzido e utilizado: plasma térmico e plasma não-térmico. O plasma térmico caracteriza-se por ser gerado a temperaturas elevadas e tradicionalmente utilizado em procedimentos cirúrgicos, e o plasma não térmico é produzido e aplicado em ambientes com temperaturas próximas do ambiente (Suresh et al., 2022).

O PNTA trata-se de um tipo de plasma caracterizado pelo equilíbrio térmico entre eletrões, iões, e partículas neutras, resultando em temperaturas elevadas. Na medicina dentária, a sua aplicação é especialmente vantajosa em procedimentos que requerem coagulação tecidual, como é o caso da eletrocirurgia. Nesse procedimento, a energia gerada pelo plasma térmico permite realizar incisões em tecidos altamente vascularizados, promovendo a hemostasia por meio da coagulação. No entanto, a elevada energia envolvida nesse processo pode comprometer os tecidos adjacentes, provocando necrose celular. Esse efeito destrutivo nos tecidos periféricos representa uma limitação importante, sobretudo em intervenções onde a preservação do tecido saudável é essencial (Suresh et al., 2022).

No entanto, o PNTA é caracterizado por temperaturas mais baixas, normalmente inferiores a 40°C, o que o torna uma alternativa mais segura para aplicações biomédicas que exigem a preservação dos tecidos íntegros. Por operar a temperaturas próximas à ambiente, pode ser aplicado sobre a pele ou mucosas sem causar efeitos térmicos indesejáveis, como por exemplo, queimaduras ou necrose. Este tipo de plasma é frequentemente utilizado para a modificação de superfícies de biomateriais, sendo

produzido através da conversão de uma substância num gás a baixa temperatura, à qual é aplicada energia de ionização, seja sob a forma de calor, corrente elétrica (contínua ou alternada), radiação ou luz laser. Os gases habitualmente utilizados para a geração de plasma incluem: oxigénio, azoto, hidrogénio e árgon (Lata et al., 2022; Sanito et al., 2021; Suresh et al., 2022).

Um dos principais fatores que explica o crescente interesse pelo PNTA na área biomédica é a simplicidade das condições necessárias para a sua produção. Diferentemente do plasma térmico, que requer fontes de energia elevadas e controlo rigoroso de temperatura, o PNTA pode ser gerado de forma mais acessível, através de radiação de micro-ondas, luz ultravioleta ou descargas elétricas controladas. Esta versatilidade de geração tem possibilitado o desenvolvimento de diversos dispositivos emissores, ajustáveis a diferentes aplicações clínicas. Adicionalmente, estes equipamentos são geralmente compactos, portáteis e de fácil adaptação, o que facilita a sua integração em contextos clínicos, como consultórios médicos, clínicas dentárias e laboratórios (Lata et al., 2021; Suresh et al., 2022).

Desta forma, o PNTA representa uma alternativa eficaz e segura ao plasma térmico em diversas áreas da biomedicina. A sua capacidade de atuar a temperaturas seguras compatíveis com tecidos vivos aliada à facilidade de manuseamento e controlo, tem estimulado o desenvolvimento contínuo de novas aplicações terapêuticas, promovendo avanços importantes em procedimentos que priorizam abordagens minimamente invasivas e a preservação dos tecidos saudáveis (Suresh et al., 2022).

### 1.3.2. Aplicação do PNTA na estrutura dentária

O PNTA tem vindo a destacar-se na Medicina Dentária como uma abordagem inovadora a fim de otimizar as características da dentina, tornando-a mais favorável à adesão de materiais restauradores. Um dos principais desafios da dentina no contexto adesivo reside na sua baixa energia de superfície, o que limita a penetração e a ligação eficaz dos monómeros dos sistemas adesivos. A presença da *smear layer* reduz a molhabilidade da dentina, comprometendo a impregnação adequada do adesivo (Awad et al., 2021).

O PNTA tem vindo a ganhar destaque nas aplicações biomédicas, nomeadamente na medicina dentária adesiva, por permitir um tratamento de superfície não invasivo, reduzindo o risco de erros técnicos e melhorando a energia superficial e molhabilidade da dentina (Hirata et al., 2015; Liu et al., 2016). A aplicação do PNTA permite alterar essas propriedades da dentina, promovendo uma adesão mais eficaz (Liu et al., 2016).

As aplicações terapêuticas do plasma na medicina dentária podem ser classificadas em duas grandes categorias: por um lado, a utilização da tecnologia de plasma para a modificação e tratamento de superfícies, materiais dentários ou dispositivos médicos; por outro, a aplicação direta do plasma sobre os tecidos humanos com objetivos terapêuticos, como é o caso do branqueamento dentário, da desinfecção de canais radiculares (Suresh et al., 2022).

Diversos estudos indicam que o tratamento da dentina com o PNTA resulta num aumento significativo da energia de superfície, refletindo-se no aumento da molhabilidade. Este efeito é normalmente quantificado através da medição do ângulo de contacto entre a superfície dentinária e uma gota de água destilada (quanto menor o ângulo, maior a molhabilidade). Esta melhoria é fundamental para o sucesso da adesão, uma vez que facilita a penetração dos monómeros hidrofílicos dos sistemas adesivos nas microestruturas da dentina. Como consequência, há uma impregnação mais eficiente e profunda, promovendo uma interface adesiva mais estável e uma camada híbrida mais homogénea, resistente e duradoura, essencial para uma resistência adesiva consistente a longo prazo (Hirata et al., 2015; Stasic et al., 2021).

Para além de melhorar a molhabilidade do substrato dentário, o PNTA apresenta benefícios adicionais relevantes, nomeadamente a redução da microinfiltração. Este fenómeno é um dos principais problemas das restaurações dentárias, ocorrendo quando a adesão entre o material restaurador e a dentina é insuficiente, permitindo a passagem de fluídos e microrganismos através da interface adesiva. Este fenómeno pode comprometer a integridade da restauração e levar ao insucesso do tratamento. A aplicação do PNTA tem mostrado reduzir essa infiltração, contribuindo assim para aumentar a durabilidade das restaurações e preservar a saúde da polpa dentária (Ayres et al., 2018).

Um dos mecanismos através dos quais o PNTA modifica a superfície da dentina é a produção de espécies reativas de oxigénio (EROSs) e de nitrogénio (ERNs), radicais livres gerados durante o tratamento com plasma. Estas espécies interagem com a

superfície dentinária, promovendo a formação de novos grupos funcionais que favorecem a ligação química entre a dentina e os sistemas adesivos (Ayres et al., 2018).

Deste modo, o PNTA não só altera as propriedades físicas da dentina, bem como potência uma interação química mais eficaz com os adesivos dentários, o que se traduz em restaurações mais consistentes e duradouras. A combinação destes efeitos reforça o potencial do PNTA como uma alternativa promissora aos métodos tradicionais, oferecendo uma abordagem inovadora com melhores perspectivas clínicas (Ayres et al., 2018).

## **2. Objetivo**

A presente investigação tem como objetivo estudar a ultramorfologia da camada híbrida formada entre dois sistemas adesivos universais e a dentina, com e sem aplicação de PNTA previamente à aplicação do sistema adesivo.



### **3. Materiais e Métodos**

Este estudo laboratorial foi realizado no Laboratório de Biomateriais e na sala de Microscopia Eletrónica de Varrimento da *Egas Moniz School of Health and Science*, após aprovação pela Comissão de Ética da mesma Instituição.

#### **3.1. Seleção e armazenamento das amostras**

Foram utilizados 8 molares humanos íntegros, recolhidos do banco de dentes. Os respetivos dentes foram extraídos, lavados com água corrente, com o propósito de remover sangue e outros resíduos, e armazenados em solução de Cloramina T-hidratada a 1%. Ao fim de uma semana foram transportados para uma solução de água destilada, trocada quinzenalmente, até à sua utilização (Armstrong et al. 2017).

#### **3.2. Materiais**

Foram utilizados dois sistemas adesivos universais: o Scotchbond Universal Plus - **SU** (3M ESPE, 12290131, 29-07-2028, Neuss, Alemanha) e o Futurabond M+ - **FM** (VOCO, 2530433, 2027-07, Cuxhaven, Alemanha) e uma resina restauradora nano-híbrida (grandioSO – VOCO, VC 52 002612 E1, 2028-02) (Figuras 1-3) (Tabela 1).

Foram criados 4 grupos experimentais de acordo com as combinações possíveis entre as duas variáveis em estudo ( $n=2$ ), sistema adesivo (SU e FM) e aplicação, ou não, de PNTA (Figura 4).

O estudo da camada híbrida foi realizado recorrendo à microscopia eletrónica de varrimento (MEV).



Figura 1- Sistema adesivo Scotchbond Universal Plus



Figura 2- Sistema adesivo Futurabond M+



Figura 3- Resina restauradora nano-híbrida (grandioSO)



Figura 4- Grupos experimentais em estudo

**Tabela 1-** Materiais utilizados no estudo, respetiva estratégia de aplicação e composição principal

| Material                                                                                                              | Tipo                                      | Fabricante                        | Estratégia de Aplicação                                   | Composição                                                                                                                              |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Scotchbond Universal Plus</i><br> | Adesivo universal monocomponente          | 3M ESPE<br>(Neuss, Alemanha)      | SE<br>(estratégia utilizada no estudo)                    | Bis-GMA, 10-MDP, Dimetacrilatos, HEMA (15-25%), Copolímero de <i>vitrebond</i> , Etanol, Água, Iniciadores, Silano, Carga (pH 2.7)      |
| <i>Futurabond M+</i><br>           | Adesivo universal monocomponente          | VOCO GmbH<br>(Cuxhaven, Alemanha) | SE<br>(estratégia utilizada no estudo)                    | Monómero funcional 10- MDP, monómeros hidrófilos e hidrófobos, solvente acetona/água, iniciadores de polimerização, carga inorgânica    |
| Resina (GrandioSO)<br>             | Resina restauradora composta nano-híbrida | 3M ESPE<br>(Cuxhaven, Alemanha)   | Aplicação sobre a camada adesiva e fotopolimerização 20 s | Matriz orgânica (Bis-GMA, UDMA, Bis-EMA); carga inorgânica de sílica/zircónia (~82% em peso); tamanho médio de partículas 0,02 – 1,5 µm |

A fotopolimerização dos materiais foi efetuada de acordo com as instruções fornecidas pelos respectivos fabricantes, recorrendo a uma unidade de fotopolimerização *Light Emitting Diode* (LED) de alta intensidade (COXO, DB-686, Guangdong, China) (Figura 5). Este equipamento opera com um espectro de emissão entre 420 e 480 nm, adequado à ativação do fotoiniciador canforoquinona presente nos sistemas adesivos e na resina utilizada.

Durante a sua aplicação, a ponta da fibra ótica do fotopolimerizador foi mantida aproximadamente a 1 mm de distância da amostra, posicionada perpendicularmente à área irradiada, de modo a garantir uma distribuição uniforme da intensidade luminosa. O dispositivo foi utilizado no modo de alta intensidade, com uma potência aproximada de 1200-1300 mW/cm<sup>2</sup>.



Figura 5- Fotopolimerizador

### 3.2.1. Dispositivo de PNTA

No âmbito de um projeto de doutoramento em Engenharia Biomédica da FCT-UNL, foi desenvolvido um dispositivo portátil em formato de caneta destinado à aplicação de PNTA, acoplado a uma fonte geradora de alta frequência com uma tensão de 2 kV, responsável pela ionização do gás e consequentemente formação do plasma.

O dispositivo é constituído por um cabo de borossilicato que envolve um elétrodo interno, o qual, em conjunto com dois elétrodos metálicos adicionais e uma fonte de alimentação de gás árgon com pureza de 99% e fluxo de 3 slm (*standard litres per minute*), permite gerar um jato de PNTA com 7 mm de comprimento.

Da totalidade desse jato, apenas cerca de 3 mm da pluma de plasma são visíveis através do orifício inferior da caneta, por onde ocorre a missão do plasma durante a aplicação (Figura 6).

Durante a aplicação, o dispositivo foi mantido a uma distância de aproximadamente 4 mm da superfície dentinária, com movimentos lineares e contínuos, cobrindo toda a área exposta de dentina durante 10 s, de acordo com os parâmetros definidos num estudo anterior, realizado por uma aluna do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da *Egas Moniz School of Health and Science*.



Figura 6- Dispositivo de PNTA

### **3.3. Métodos**

#### **3.3.1. Preparação das amostras**

Cada dente hígido foi fixado num suporte de resina acrílica, através de cera colante (Figura 7), de forma a permitir a sua estabilização durante o processo de corte (Figura 8). Os dentes assim preparados, foram colocados no micrótopo de tecidos duros (Accutom-50, Struers, Ballerup, Dinamarca), do laboratório de Biomateriais da Egas Moniz School of Health and Science. O micrótopo possui um disco diamantado de precisão sob refrigeração contínua com água, com o qual se realizou um primeiro corte (**corte único, “single cut”**) horizontal na região cervical, ao nível da junção amelo-cementária (JAC), com o objetivo de separar as raízes da coroa, ficando apenas com a coroa, facilitando assim o segundo corte. Posteriormente, efetuou-se um segundo corte na porção coronária, obtendo-se uma fatia de dentina média com cerca de 2 mm de espessura (Figura 9).

Cada fatia foi então, cuidadosamente dividida em duas metades através do mesmo equipamento, originando hemi-discos dentinários (Figura 10) provenientes do mesmo dente de forma que cada hemi-disco de dentina do mesmo dente fosse utilizado como substrato para o procedimento adesivo com o mesmo sistema adesivo, diferindo apenas na prévia aplicação, ou não, de PNTA.

Durante todas as etapas de corte e manipulação, as amostras foram armazenadas em água destilada, de modo a preservar a integridade da matriz colagénica dentinária e evitar a desidratação.

Procedeu-se de seguida à fase de restauração dos hemi-discos de dentina, de acordo com cada grupo experimental.



Figura 7- Dente hígido fixado no suporte de acrílico



Figura 8- Dente montado no micróto de tecidos duros para obtenção de fatia de dentina



Figura 9- Fatia de dentina



Figura 10- Hemi-disco de dentina

### 3.3.2. Protocolo de adesão

Em relação ao protocolo de adesão (Figura 11), este iniciou-se com a aplicação ou não do PNTA sobre a superfície dentinária, de acordo com o grupo experimental correspondente.

De seguida, procedeu-se à aplicação do sistema adesivo universal (SU ou FM), utilizando o modo de aplicação SE. O adesivo foi aplicado com um *microbrush*, de acordo com as indicações do fabricante. Após a aplicação, procedeu-se à secagem com jato de ar proveniente de seringa tripla, mantida a uma distância de 1 cm, durante 5 s, com o objetivo de eliminar solventes residuais.

De seguida, o adesivo foi fotopolimerizado de acordo com as indicações do fabricante e posteriormente aplicou-se a resina restauradora nano-híbrida cobrindo toda a superfície adesiva, seguida de fotopolimerização, também de acordo com as indicações do fabricante.

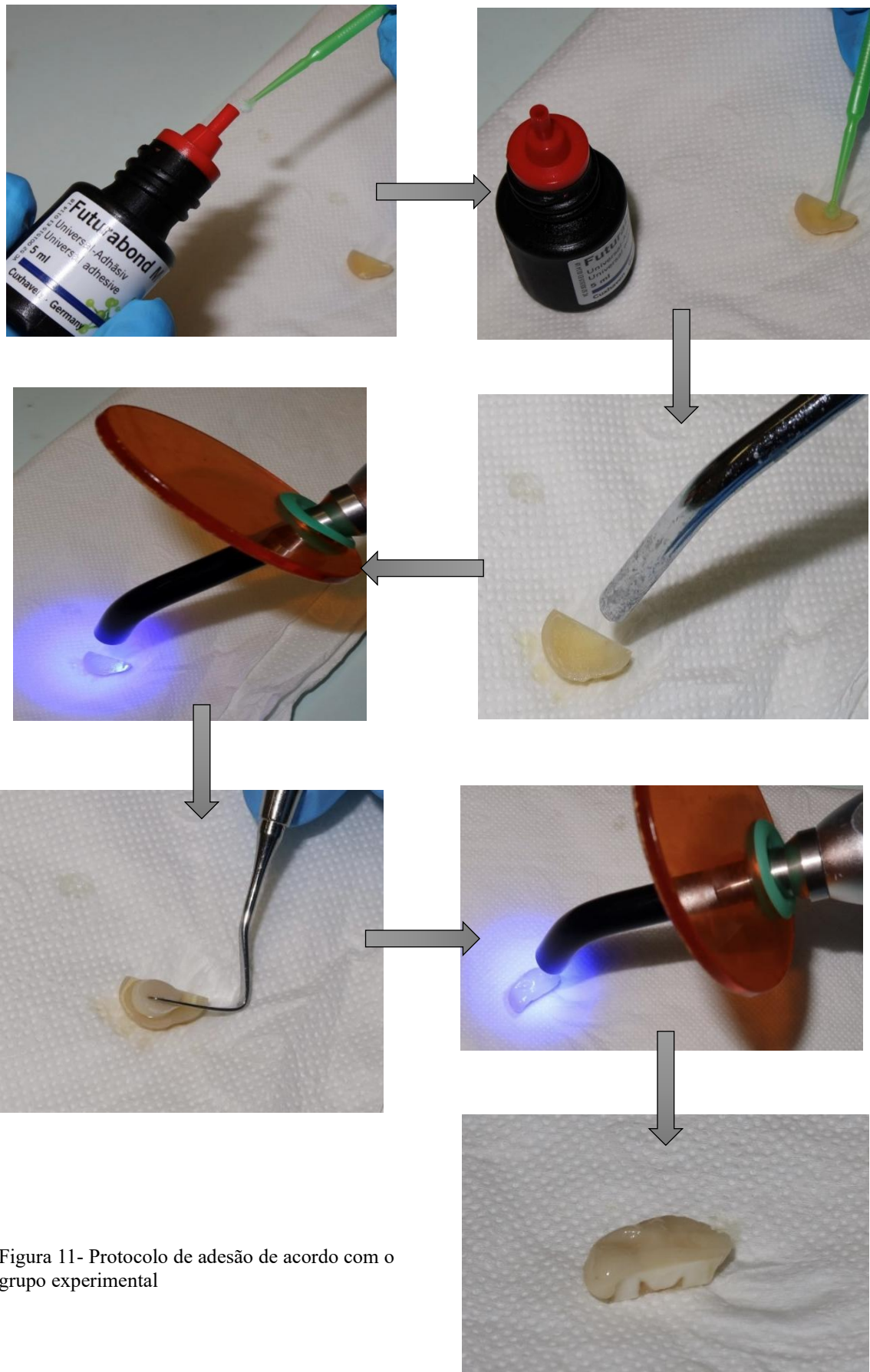


Figura 11- Protocolo de adesão de acordo com o grupo experimental

### 3.3.3. Microscopia eletrônica de varrimento

A microscopia eletrônica de varrimento (MEV) foi utilizada com o objetivo de analisar a morfologia e integridade da camada híbrida, formada entre a dentina e os sistemas adesivos universais em estudo.

O estudo foi realizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varrimento da *Egas Moniz School of Health and Science*, utilizando o MEV (JEOL JDM-5400, JEOL LTd., Tóquio, Japão) (Figura 12).

Os espécimes foram processados para visualização em MEV, começando-se pelo **polimento da superfície a visualizar com lixas de carbeto de silício, de granulometria 1200 e 2500 (Buehler ref 30-5218-012 e 30-5218-025 – Struers, Copenhaga, Dinamarca)**. De seguida realizou-se o protocolo de fixação e desidratação, através da imersão dos espécimes em solução de glutaraldeído 2,3%, tamponada em cacodilato de sódio 0,1M (pH~7.2), durante 24 h, a 4°C. Após esse período, foram realizadas 3 imersões de 20 min cada, em solução de cacodilato de sódio. Seguiu-se a descalcificação e desproteinização pela imersão em HCL 0,1M durante 2 min e NaOCL 13% durante 1 min, respetivamente. Por último, os espécimes foram desidratados em concentrações ascendentes de etanol (50% durante 20 min, 75% durante 20 min, 95% durante 30 min e 100% durante 1 h), seguindo-se a imersão em HMDS durante 10 min. Ficaram, então, a secar ao ar, sobre um papel de filtro, durante a noite, na hote (Perdigão et al., 1995).

As amostras foram coladas em discos de alumínio (Figura 13) através de fita de carbono de dupla face assegurando a estabilidade dos espécimes e mantendo a superfície a observar voltada para cima. Posteriormente, procedeu-se à metalização das superfícies através da técnica de pulverização catódica (*sputter coating*), com deposição de uma camada fina de ouro/paládio (Au/Pd), realizada num metalizador JEOL JEE-400 *Vaccum Evaporator* (JEOL Ltd., Tóquio, Japão). Este processo visou conferir condutividade elétrica às amostras e evitar o carregamento superficial durante a análise com subsequente aparecimento de artefactos de imagem durante a observação ao MEV. As amostras foram analisadas com o objetivo de avaliar a morfologia, integridade e homogeneidade da camada híbrida e a penetração dos prolongamentos de resina na dentina, nos espécimes de cada grupo experimental.

O MEV foi operado em modo de elétrons secundários, com uma tensão de 15 kV, uma distância de trabalho de 13 mm e ampliações de 500 X e 1500 X. As imagens foram adquiridas digitalmente através do software associado ao equipamento (Bruker Espirit Compact).

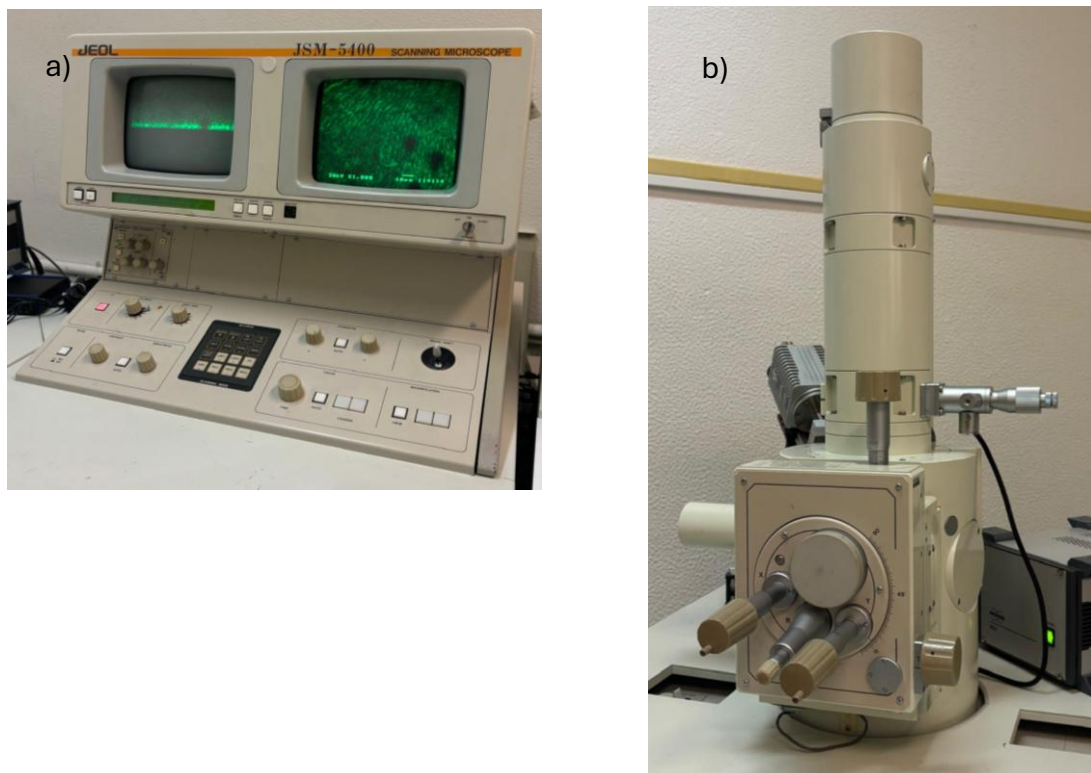


Figura 12- Microscópio eletrônico de varrimento (JEOL, JSM-5400). a) Painel de controlo e sistema de visualização do microscópio; b) coluna e câmara do microscópio



Figura 13- Discos de alumínio



## 4. Resultados

A análise da ultramorfologia da camada híbrida é uma análise qualitativa e centra-se na continuidade e uniformidade desta.

### 4.1.SU sem/com PNTA

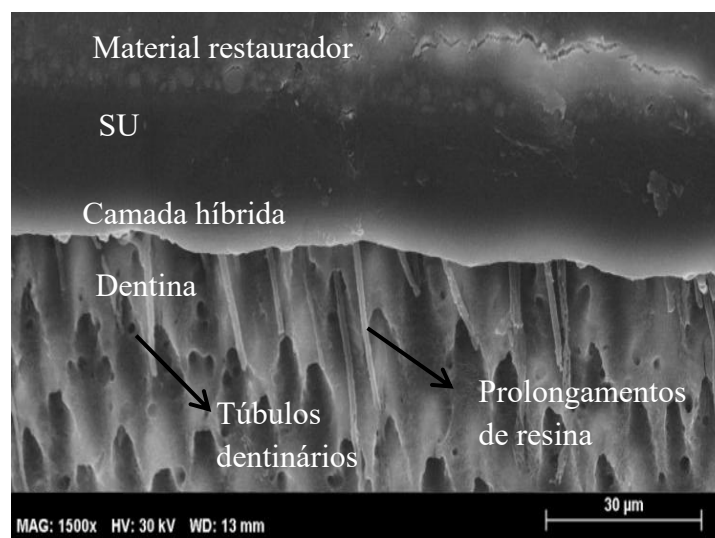


Figura 14- Amostra de dentina com sistema adesivo SU sem PNTA

Da observação da micrografia (figura 14), correspondente à amostra de hemidisco de dentina com sistema adesivo SU sem PNTA, identifica-se de cima para baixo, uma camada com material restaurador, seguida de uma camada com o sistema adesivo SU, camada híbrida, e dentina. Na dentina, consegue-se distinguir os prolongamentos de resina e os túbulos dentinários.

A camada híbrida presente nesta imagem aparenta ser uma camada contínua, e homogénea, sem descontinuidades ao longo do campo de visão do MEV (sem microfissuras ou áreas pobres em resina), o que indica uma interface íntegra.

Ao nível da dentina, identificam-se os prolongamentos de resina, os quais apresentam um calibre predominante fino, sendo pouco numerosos, e de comprimento variável.

Não se observaram lacunas entre a dentina e a camada adesiva, apenas pequenas irregularidades do contorno.

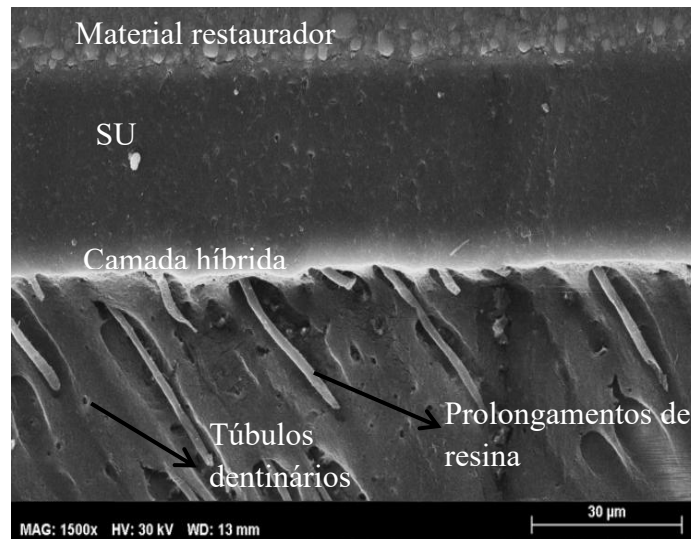


Figura 15- Amostra de dentina com sistema adesivo SU com PNTA

A micrografia (figura 15), corresponde à amostra de hemi-disco de dentina com sistema adesivo SU com PNTA.

A transição entre camada híbrida e a camada de dentina não apresenta qualquer tipo de fenda, aparentando assim, uma continuidade entre as mesmas ao longo do campo, sem lacunas evidentes, embora com espessura reduzida. A camada adesiva mostra-se relativamente uniforme e de espessura aumentada.

A camada híbrida nesta amostra, aparenta ser homogênea e íntegra, sem descontinuidades entre dentina e adesivo. Pequenas ondulações na linha de transição podem refletir a topografia da dentina e/ou artefactos de preparação (corte/polimento), mais do que falhas interfaciais reais.

Ao nível da dentina, temos os túbulos dentinários e os prolongamentos de resina. Em relação aos prolongamentos de resina, nesta amostra, apresentam-se em maior quantidade e mais longos.

Os túbulos dentinários nesta amostra aparentam estar parcialmente obstruídos por *smear plugs* e/ou resina, e outros com o lúmen mais aberto e contorno mais nítido, com distribuição irregular e comprimento mais longo.

#### 4.2. FM sem/com PNTA

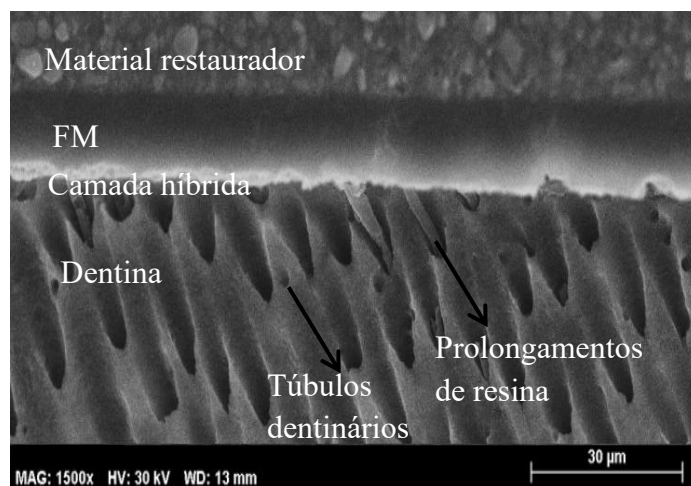


Figura 16- Amostra de dentina com sistema adesivo FM sem PNTA

Esta micrografia (Figura 16) corresponde à amostra de hemi-disco de dentina com sistema adesivo FM sem PNTA.

À primeira observação, é possível identificar que a linha de transição entre as camadas aparenta ser contínua, apresentando ondulações e pequenos desníveis localizados mais na camada híbrida. Este aspeto pode indicar uma continuidade interfacial menos regular e/ou artefactos de corte ou polimento.

A camada adesiva com FM, mostra-se relativamente homogénea, fina, e com micro-irregularidades pontuais.

A camada híbrida nesta amostra parece ser uma faixa muito fina e com uniformidade moderada, se bem que contínua na maior parte do campo.

Na camada de dentina, temos os túbulos dentinários e os prolongamentos de resina, identificados na figura.

Os prolongamentos de resina apresentam um calibre mais robusto, em menor quantidade e distribuição mais dispersa.

Os túbulos apresentam-se bem definidos, alguns com preenchimento parcial e outros com o lúmen mais aberto, com o seu contorno mais nítido.

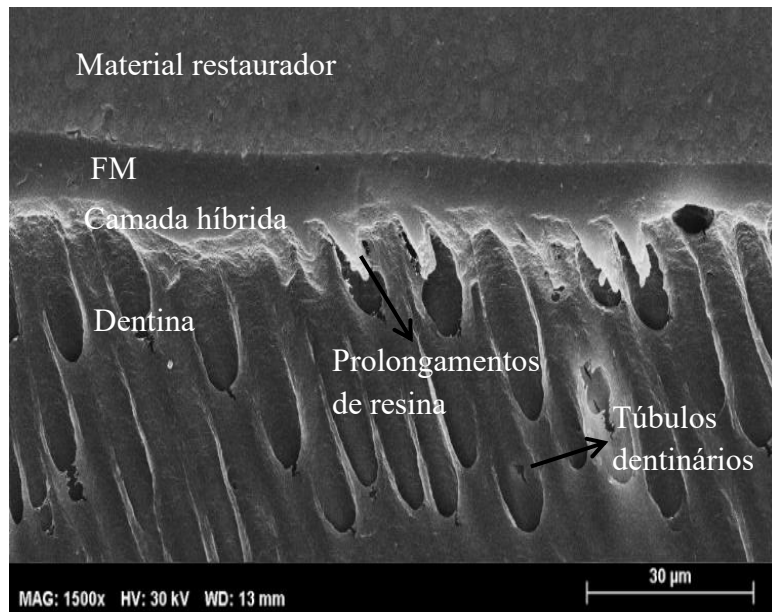


Figura 17 - Amostra de dentina com sistema adesivo FM com PNTA

A micrografia (figura 17) corresponde a amostra de hemi-disco de dentina com sistema adesivo FM com PNTA.

É possível identificar que a linha de transição entre a camada híbrida e a dentina aparenta ser contínua, embora com algumas ondulações e desníveis ao longo da transição dentina-adesivo, padrão que pode refletir topografia do substrato ou artefactos de preparação.

A camada adesiva com FM apresenta-se homogênea, com uma espessura muito fina e micro-irregularidades pontuais. A transição para o material restaurador é nítida e sem separações.

A camada híbrida apresenta-se numa faixa fina e de uniformidade moderada: mantém-se contínua no campo observado, mas com variações de espessura. Não se evidenciam fendas entre dentina e camada híbrida.

Na camada de dentina, como estão identificados, há presença de prolongamentos da resina e túbulos dentinários. Os prolongamentos de resina, nesta amostra, apresentam-se robustos, e em número reduzido.

Os túbulos dentinários estão bem definidos, com áreas com lúmen aberto e áreas com obstrução parcial.



## 5. Discussão

A estabilidade e a qualidade da adesão são determinantes para o sucesso clínico na Medicina Dentária conservadora a longo prazo, mas permanecem condicionadas por limitações intrínsecas ao sistema adesivo, à técnica adesiva e ao substrato dentinário. A dentina, pela sua composição mineral e matriz orgânica, e pela presença de *smear layer* resultante da instrumentação mecânica com instrumentos rotativos, dificulta a infiltração homogênea dos monómeros e favorece fenómenos de degradação ao longo do tempo. Neste contexto, a investigação de estratégias de preparação do substrato e a seleção do sistema adesivo universal mantêm-se centrais para a otimização da qualidade da camada híbrida e a durabilidade da interface adesiva.

O presente estudo avaliou, por ultramorfologia, a camada híbrida formada entre a dentina e dois sistemas adesivos universais, avaliando também a influência da aplicação prévia de PNTA.

Neste estudo foi utilizado um dispositivo de plasma de argon desenvolvido pelo departamento de física da FCT-UNL e não industrialmente. Os parâmetros de utilização do PNTA (distância a tempo de aplicação sobre o substrato dentinário) foram previamente definidos de forma a otimizar as propriedades de superfície do substrato, nomeadamente a molhabilidade, tornando-o mais favorável à interação com o sistema adesivo. Pretendeu-se, assim, aumentar a energia de superfície da superfície da dentina, promovendo uma melhor interação e adaptação do adesivo e, conseqüentemente, uma interface adesiva potencialmente superior à obtida com os protocolos convencionais atualmente utilizados.

Os prolongamentos de resina formados com e sem PNTA são pouco numerosos, de calibre fino e elevado comprimento, o que demonstra que nas amostras de dentina com sistema adesivo SU, a aplicação prévia de PNTA aparentemente não modificou a morfologia da interface adesiva.

Nas amostras de dentina restauradas com sistema adesivo FM, a camada híbrida formada foi muito fina e contínua, no entanto, contrariamente ao SU, apresentou uma transição com micro-irregularidades pontuais. A presença de PNTA não gerou uma

melhoria morfológica consistente: tanto com como sem plasma, a camada adesiva apresentou-se fina, com pequenos desníveis locais, atribuíveis à topografia do substrato, em parte resultante da presença da *smear layer*, não traduzindo necessariamente uma descontinuidade adesiva. Os prolongamentos de resina formados foram menos abundantes, mais robustos e de comprimento mais pequeno, independentemente da aplicação prévia do PNTA, o que confirmou que a sua aplicação não evidenciou nenhuma melhoria nos espécimes restaurados com o sistema adesivo FM.

Em termos comparativos, o SU mostrou uma interface adesiva mais regular e uma camada adesiva mais ampla que o FM, cujo padrão foi mais ondulado e com a camada adesiva mais irregular e mais reduzida.

Em vários campos, o SU mostrou prolongamentos de resina um pouco mais definidos e em maior quantidade que o FM.

Estas diferenças são compatíveis com a composição e protocolo de cada sistema. Em SE, o condicionamento é suave: a *smear layer* e os *smear plugs* não são removidos, apenas a sua permeabilidade é ligeiramente modificada. Como muitos túbulos dentinários ficam parcialmente obstruídos, os prolongamentos de resina que entram nesses túbulos tendem a ser menos numerosos, mais curtos e mais finos, o que impossibilita a visão de uma maior quantidade dos prolongamentos de resina.

A ausência de diferenças morfológicas nas interfaces adesivas criadas com a prévia aplicação de PNTA sugere que, nas condições experimentais utilizadas, este tratamento do substrato não foi suficiente para alterar a formação da camada híbrida. Tal facto, pode estar associado a fatores como o tempo de exposição ao PNTA, a distância de aplicação da pluma à superfície da dentina, ou ainda a resiliência natural da *smear layer*, que poderá ter limitado a ação do plasma sobre a superfície dentinária.

Além disso, a estratégia adesiva SE pode atenuar o impacto do PNTA na alteração da camada híbrida, limitando a sua capacidade de facilitar a infiltração do adesivo. No entanto, a sua escolha deveu-se ao objetivo de preservar a *smear layer*, não condicionando com ácido ortofosfórico a dentina, uma vez que este procedimento remove a hidroxiapatite intrafibrilar e extrafibrilar, ativando o processo de degradação do colagénio por ação das metalo-proteinases da matriz.

Em contrapartida, observaram-se diferenças mais evidentes entre os dois sistemas adesivos universais testados. O SU promoveu a formação de uma interface adesiva mais uniforme e mais coesa, quando comparado com o FM. Estas diferenças podem ser atribuídas às propriedades químicas específicas de cada adesivo, nomeadamente à presença do monómero funcional 10-MDP no SU, que favorece a formação de ligações químicas estáveis com a hidroxiapatite remanescente, e ao seu sistema de solventes à base de etanol e água, que pode proporcionar a sua infiltração mais eficiente na rede colagénica exposta. O FM, embora também contenha monómeros acídicos, apresenta uma formulação monocomponente de aplicação rápida, o que poderá reduzir o tempo de interação com o substrato e, consequentemente, limitar a difusão dos monómeros na matriz dentinária.

Assim, de acordo com os resultados obtidos a aplicação do PNTA sobre a superfície dentinária, previamente à aplicação do sistema adesivo, não promoveu a formação de uma camada híbrida mais coesa e íntegra. No entanto, observou-se diferenças claras entre os sistemas adesivos estudados, pelo que o tipo de sistema adesivo universal utilizado no procedimento restaurador sobre a dentina, influenciou a qualidade da camada híbrida formada, refletindo o impacto da sua composição e estratégia de aplicação.

### 5.1. Limitações e Perspetivas Futuras

Apesar dos resultados obtidos, algumas limitações metodológicas devem ser consideradas na interpretação dos dados. A amostra relativamente reduzida e a variabilidade natural entre substratos dentinários podem ter influenciado os resultados. Além disso, os parâmetros de aplicação do PNTA — nomeadamente o tempo de exposição, a distância entre a pluma de plasma e a superfície dentinária, a potência de descarga e o tipo de gás utilizado — poderão não ter sido os ideais para promover alterações químicas e morfológicas suficientemente significativas na dentina. É importante salientar que a análise morfológica realizada por MEV fornece informações descritivas e qualitativas, mas não permite quantificar diretamente a resistência adesiva ou a degradação da interface adesiva ao longo do tempo.

Considerando os resultados obtidos e as limitações identificadas, futuras investigações deverão concentrar-se na alteração dos parâmetros operacionais do PNTA, testando novos tempos de exposição, potências e tipos de gás, de modo a maximizar o seu potencial efeito na modificação da superfície dentinária.

Adicionalmente, a aplicação do PNTA poderá ser explorada sobre outros substratos dentários, como o esmalte ou a dentina afetada por cárie, para avaliar o seu impacto em diferentes condições clínicas. Seria também importante analisar o efeito do envelhecimento térmico, do armazenamento prolongado em água ou variação de pH, a fim de compreender a estabilidade a longo prazo da adesão obtida com e sem tratamento de plasma.

A integração destas abordagens permitirá aprofundar o conhecimento sobre o papel do PNTA na adesão dentinária e contribuir para o desenvolvimento de estratégias adesivas que permitam a criação de restaurações adesivas mais previsíveis, duráveis e clinicamente eficazes

## **6. Conclusão**

Com base nos resultados obtidos e nas condições experimentais aplicadas, conclui-se que a aplicação prévia do PNTA sobre a dentina não promoveu alterações significativas na morfologia da interface adesiva, não influenciando de forma relevante a formação da camada híbrida.

Por outro lado, verificaram-se diferenças na morfologia da camada híbrida criada entre os sistemas adesivos utilizados neste estudo e a dentina, sendo o adesivo SU o que permitiu a criação de uma interface mais homogênea e uma melhor integração com a dentina, quando comparado com o adesivo FM. Estas diferenças refletem a influência da composição química e da estratégia de aplicação de cada sistema na qualidade de adesão dentinária.

Para concluir, os resultados sugerem que o tipo de adesivo tem um papel mais determinante do que a aplicação de PNTA na formação da interface adesiva.



## 7. Bibliografia

- Abdalla de Oliveira Cardoso, T., Bueno de Azevedo Neto, F. de P., Cynamon Cohen, S., & Chein Bueno de Azevedo, D. (2019). Biosafety in autopsy room: a systematic review. *Revista de Salud Pública*, 21(6), 1–5. <https://doi.org/10.15446/rsap.v21n6.81593>
- Ahmed, M. H., Yoshihara, K., Mercelis, B., Van Landuyt, K., Peumans, M., & Van Meerbeek, B. (2020). Quick bonding using a universal adhesive. *Clinical Oral Investigations*, 24(8), 2837–2851. <https://doi.org/10.1007/s00784-019-03149-8>
- Ana Bessa Muniz, Raquel, M., Daiane, L., Morais, D., Moreira, V., Konstantin Georgiev Kostov, & Cristiane Yumi Koga-Ito. (2023). Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma Application in Endodontics. *Biomedicines*, 11(5), 1401–1401. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11051401>
- Armstrong, F., Rourke, J., Overton, T., & Weller, M. (2017). *Química Inorgânica*. Google Books. [https://books.google.pt/books?hl=pt-PT&lr=&id=HnM7DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR1&dq=Armstrong+et+al.+2017&ots=zryA2n4BZ\\_&sig=3zrFVnC92nUE\\_l5ppGsS2TT5etE&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.pt/books?hl=pt-PT&lr=&id=HnM7DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR1&dq=Armstrong+et+al.+2017&ots=zryA2n4BZ_&sig=3zrFVnC92nUE_l5ppGsS2TT5etE&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)
- Awad, M. M., Feras Alhalabi, Abdullah Alshehri, Zaid Aljeaidi, Alrahlah, A., Mutlu Özcan, & Hamama, H. H. (2021). Effect of Non-Thermal Atmospheric Plasma on Micro-Tensile Bond Strength at Adhesive/Dentin Interface: A Systematic Review. *Materials*, 14(4), 1026–1026. <https://doi.org/10.3390/ma14041026>
- Ayres, A., Freitas, P., De Munck, J., Vananroye, A., Clasen, C., Dias, C. dos S., Giannini, M., & Van Meerbeek, B. (2018). Benefits of Nonthermal Atmospheric Plasma Treatment on Dentin Adhesion. *Operative Dentistry*, 43(6), E288–E299. <https://doi.org/10.2341/17-123-1>
- Breschi, L., Maravic, T., Comba, A., Cunha, S. R., Loguercio, A. D., Reis, A., Hass, V., Cadenaro, M., Mancuso, E., Mayer-Santos, E., Niu, L., Pashley, D. H., Tay, F. R., & Mazzoni, A. (2020). Chlorhexidine preserves the hybrid layer in vitro after 10-years aging. *Dental Materials: Official Publication of the Academy of Dental Materials*, 36(5), 672–680. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2020.03.009>

- Breschi, L., Mazzoni, A., Ruggeri, A., Cadenaro, M., Di Lenarda, R., & De Stefano Dorigo, E. (2008). 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>
- Cardoso, G. C. de, Nakanishi, L., Isolani, C. P., Jardim, P. dos S., & Moraes, R. R. de. (2019). 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>
- Cardoso, M., de Almeida Neves, A., Mine, A., Coutinho, E., Van Landuyt, K., De Munck, J., & Van Meerbeek, B. (2011). Current aspects on bonding effectiveness and stability in adhesive dentistry. *Australian Dental Journal*, 56, 31–44. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2011.01294.x>
- Carrilho, E., Cardoso, M., Marques Ferreira, M., Marto, C., Paula, A., & Coelho, A. (2019). 10-MDP Based Dental Adhesives: Adhesive Interface Characterization and Adhesive Stability—A Systematic Review. *Materials*, 12(5), 790. <https://doi.org/10.3390/ma12050790>.
- Carvalho, F. M., Palomo, V., Widmer, M. R., Cruz, M., & Cruz, C. (2015). Diagnóstico clínico versus autópsia. *Boletín de La Oficina Sanitaria Panamericana (OSP)*;110(3),Mar. 1991. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/16646>
- Carvalho, R. M., Mendonça, J. S., Santiago, S. L., Silveira, R. R., Garcia, F. C. P., Tay, F. R., & Pashley, D. H. (2003). Effects of HEMA/Solvent Combinations on Bond Strength to Dentin. *Journal of Dental Research*, 82(8), 597–601. <https://doi.org/10.1177/154405910308200805>
- Cha, S., & Park, Y.-S. (2014). Plasma in dentistry. *Clinical Plasma Medicine*, 2(1), 4–10. <https://doi.org/10.1016/j.cpme.2014.04.002>
- Chen, M., Zhang, Y., Vladimir Dusevich, Liu, Y., Yu, Q., & Wang, Y. (2014). Non-thermal atmospheric plasma brush induces HEMA grafting onto dentin collagen. *Dental Materials*, 30(12), 1369–1377. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2014.10.004>
- Chen, M., Zhang, Y., Yao, X., Li, H., Yu, Q., & Wang, Y. (2012). *Effect of a non-thermal, atmospheric-pressure, plasma brush on conversion of model self-etch adhesive*

- formulations compared to conventional photo-polymerization*. 28(12), 1232–1239. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2012.09.005>
- 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*, 22(3), 1480. <https://doi.org/10.3390/ijms22031480>
- Goldberg, M., Kulkarni, A. B., Young, M., & Boskey, A. (2011). Dentin: structure, composition and mineralization. *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)*, 3, 711–735. <https://doi.org/10.2741/e281>
- 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), 814. <https://doi.org/10.3390/polym13050814>
- Hirata, R., Teixeira, H., Paula, A., Ayres, A., Lucas, Machado, S., Coelho, P., Van, Thompson, P., & Giannini, M. (2015). Long-term Adhesion Study of Self-etching Systems to Plasma-treated Dentin. *J Adhes Dent*, 17(3), 227–233. <https://doi.org/10.3290/j.jad.a34138>
- Imbeni, V., Kruzic, J. J., Marshall, G. W., Marshall, S. J., & Ritchie, R. O. (2005). The dentin–enamel junction and the fracture of human teeth. *Nature Materials*, 4(3), 229–232. <https://doi.org/10.1038/nmat1323>
- Laske, M., Opdam, N. J. M., Bronkhorst, E. M., Braspenning, J. C. C., & Huysmans, M. C. D. N. J. M. (2016). Longevity of direct restorations in Dutch dental practices. Descriptive study out of a practice based research network. *Journal of Dentistry*, 46, 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2016.01.002>
- Lata, S., Chakravorty, S., Mitra, T., Pradhan, P. K., Mohanty, S., Patel, P., Jha, E., Panda, P. K., Verma, S. K., & Suar, M. (2022). Aurora Borealis in dentistry: The applications of cold plasma in biomedicine. *Materials Today Bio*, 13, 100200. <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), 496–505. <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)
- Migliau, G., Sofan, E., Sofan, A., Palaia, G., Tenore, G., & Romeo, U. (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>
- Nakabayashi, N. (1992). The hybrid layer: a resin-dentin composite. *Proceedings of the Finnish Dental Society. Suomen Hammaslaakariseuran Toimituksia*, 88 Suppl 1, 321–329. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1508888/>
- Nakabayashi, N., & Takarada, K. (1992). Effect of HEMA on bonding to dentin. *Dental Materials*, 8(2), 125–130. [https://doi.org/10.1016/0109-5641\(92\)90067-m](https://doi.org/10.1016/0109-5641(92)90067-m)
- 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*, 27(1), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2010.10.016>
- Perdigão, J. (2010). Dentin bonding—Variables related to the clinical situation and the substrate treatment. *Dental Materials*, 26(2), e24–e37. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2009.11.149>
- Perdigão, J. (2020). Current perspectives on dental adhesion: (1) Dentin adhesion – not there yet. *Japanese Dental Science Review*, 56(1). <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2020.08.004>
- Perdigão, J., Araujo, E., Ramos, R. Q., Gomes, G., & Pizzolotto, L. (2020). Adhesive dentistry: Current concepts and clinical considerations. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, 33(1). <https://doi.org/10.1111/jerd.12692>
- Perdigao, J., Lambrechts, P., Van Meerbeek, B., Vanherle, G., & Lopes, A. L. B. (1995). Field emission SEM comparison of four postfixation drying techniques for human dentin. *Journal of Biomedical Materials Research*, 29(9), 1111–1120. <https://doi.org/10.1002/jbm.820290911>
- Perdigão, J., Sezinando, A., & Monteiro, P. (2013). Effect of Substrate Age and Adhesive Composition on Dentin Bonding. *Operative Dentistry*, 38(3), 267–274.

- <https://doi.org/10.2341/12-307-1>
- Qi, X., Zhu, X.-M., Liu, X., Li, J., Zhao, L.-X., Li, H.-P., & Tan, J. (2022). Effects of a helium cold atmospheric plasma on bonding to artificial caries-affected dentin. *Dental Materials Journal*, 41(1), 101–109. <https://doi.org/10.4012/dmj.2021-091>
- Rodrigues, S., Oliveira, N., Chasqueira, F., Portugal, J., & Arantes-Oliveira, S. (2015). Permeabilidade dentinária e morfologia da interface adesiva de diferentes sistemas adesivos. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária E Cirurgia Maxilofacial*, 56(1), 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.rpemd.2015.01.001>
- Rosin, M., Veridiana Camilotti, Márcio José Mendonça, & Júlio Katuhide Ueda. (2023). Qualidade da camada híbrida dos adesivos universais: uma revisão sistemática da literatura. *Research, Society and Development*, 12(5), e8612541489-e8612541489. <https://doi.org/10.33448/rsd-v12i5.41489>
- Saikaew, P., Sattabanasuk, V., Harnirattisai, C., Chowdhury, A. F. M. A., Carvalho, R., & Sano, H. (2022). Role of the smear layer in adhesive dentistry and the clinical applications to improve bonding performance. *Japanese Dental Science Review*, 58, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2021.12.001>
- Sampaio, P. C. P., Kruly, P. de C., Ribeiro, C. C., Hilgert, L. A., Pereira, P. N. R., Scaffa, P. M. C., Di Hipólito, V., D’Alpino, P. H. P., & Garcia, F. C. P. (2017). Comparative bonding ability to dentin of a universal adhesive system and monomer conversion as functions of extended light curing times and storage. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 75, 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2017.06.033>
- Sanito, R. C., You, S.-J., & Wang, Y.-F. (2021). Application of plasma technology for treating e-waste: A review. *Journal of Environmental Management*, 288, 112380. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112380>
- 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), 1989–2003. <https://doi.org/10.1007/s10439-010-9969-6>

- Spencer, P., Ye, Q., Song, L., Parthasarathy, R., Boone, K., Misra, A., & Tamerler, C. (2019). Threats to adhesive/dentin interfacial integrity and next generation bio-enabled multifunctional adhesives. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 107(8), 2673–2683. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34358>
- Stasic, J. N., Pficer, 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>
- 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>
- 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., Yoshihara, K., Van Landuyt, K., Yoshida, Y., & Peumans, M. (2020). From Buonocore's Pioneering Acid-Etch Technique to Self-Adhering Restoratives. A Status Perspective of Rapidly Advancing Dental Adhesive Technology. *The Journal of Adhesive Dentistry*, 22(1), 7–34. <https://doi.org/10.3290/j.jad.a43994>
- Yahyazadehfard, M., Ivancik, J., Majd, H., An, B., Zhang, D., & Arola, D. (2014). On the Mechanics of Fatigue and Fracture in Teeth. *Applied Mechanics Reviews*, 66(3). <https://doi.org/10.1115/1.4027431>