

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

EFEITO DO PNTA NA INTERFACE ADESIVA PROMOVIDA POR UM SISTEMA ADESIVO UNIVERSAL: ANÁLISE EM MICROESPECTROSCOPIA DE RAMAN

Trabalho submetido por
Beatriz Pires Salgueiro
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

setembro de 2024

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

EFEITO DO PNTA NA INTERFACE ADESIVA PROMOVIDA POR UM SISTEMA ADESIVO UNIVERSAL: ANÁLISE EM MICROESPECTROSCOPIA DE RAMAN

Trabalho submetido por
Beatriz Pires Salgueiro
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Professora Doutora Ana Filipa Marques Chasqueira

e coorientado por
Professora Doutora Alda Sofia Pessanha de Sousa Moreno

setembro de 2024

AGRADECIMENTOS

Queria primeiramente agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Ana Filipa Chasqueira, cuja paixão pela ciência e dedicação à pesquisa foram uma constante fonte de inspiração. Será sempre uma referência na minha vida!

Destaco o seu entusiasmo constante, a sua prontidão em esclarecer todas as minhas dúvidas e o apoio incondicional. Sou imensamente grata.

À minha coorientadora, Professora Doutora Sofia Pessanha, o meu profundo agradecimento por partilhar o seu conhecimento, bem como pelo seu incentivo e confiança em mim ao longo deste percurso.

À Egas Moniz, que se tornou o meu lar académico durante cinco longos anos, proporcionando-me oportunidades valiosas de aprendizagem e amizades para a vida.

Ao Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, por terem permitido a utilização do Plasma e do Microespetómetro de Raman.

Aos meus amigos e colegas, pelo apoio e companheirismo durante estes anos.

À minha “chica” e companheira de box Jacinta, um agradecimento especial pela amizade e apoio. Sem ti, esta jornada teria sido mais difícil. Espero que continuemos sempre a caminhar juntas!

Um sincero agradecimento à Tatiana, cuja disponibilidade, conhecimento e apoio foram imprescindíveis para a concretização deste trabalho.

Ao João, por caminhar sempre a meu lado, pelo seu carinho e paciência constantes e por me fazer acreditar que tudo é possível.

À minha família, pelo amor incondicional, apoio e incentivo que me permitiram chegar até aqui.

A todos, o meu mais sincero agradecimento!

RESUMO

Objetivos:

Avaliar a interface adesiva resina-dentina criada com sistemas adesivos universais, após a aplicação de PNTA, através de Microespectroscopia Raman.

Materiais e Métodos:

Foram preparados 14 molares humanos permanentes hígidos, extraídos nos últimos seis meses e divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais de acordo com as combinações possíveis entre sistema adesivo (Prime&Bond active® e Scotchbond™ Universal Plus) e aplicação, ou não, de plasma. Após obtenção de uma fatia de dentina de cada dente e simulação da *smear layer*, realizou-se o procedimento adesivo de acordo com o grupo experimental, terminando com aplicação de resina composta restauradora. Todas as fatias de dentina foram seccionadas ao meio, com recurso a um micrótomo de tecidos duros, para posterior análise da interface adesiva com Microespectroscopia Raman. Foi avaliada a espessura da camada híbrida (CH) e determinado o grau de conversão. Os resultados foram analisados qualitativamente.

Resultados:

Relativamente à espessura da CH, verificou-se que o grupo em que foi aplicado o PNTA previamente ao sistema adesivo Prime&Bond active® apresentou CH ligeiramente mais espessas. O mesmo não se verificou com o adesivo Scotchbond™ Universal Plus, onde aparentemente foram semelhantes.

Quanto ao grau de conversão, não foi possível determinar este em nenhum dos espécimes preparados com o sistema adesivo Prime&Bond active®, por evolução anómala da relação entre os picos reativos e de referência no espectro Raman. No entanto, para os espécimes preparados com o sistema adesivo Scotchbond™ Universal Plus, o grau de conversão demonstrou ser ligeiramente superior nos casos em que o PNTA foi aplicado.

Conclusões:

O PNTA aparenta ser benéfico para a dentisteria adesiva para validar o método.

Palavras-chaves: plasma não térmico atmosférico, microespectroscopia Raman, grau de conversão, camada híbrida.

ABSTRACT

Purpose:

To evaluate the resin-dentin adhesive interface created with universal adhesive systems, after the application of PNTA, using Raman microspectroscopy.

Materials and Methods:

14 healthy permanent human molars, extracted within the last six months, were prepared and randomly divided into four experimental groups according to the possible combinations of adhesive system (Prime&Bond active® and Scotchbond™ Universal Plus) and plasma application or not. After obtaining a slice of dentin from each tooth and simulating the *smear layer*, the adhesive procedure was carried out according to the experimental group, ending with the application of restorative composite resin. All the dentin slices were sectioned in half using a hard tissue microtome to analyse the adhesive interface using Raman microscopy. The thickness of the hybrid layer (CH) was assessed, and the degree of conversion determined. The results were analysed qualitatively.

Results:

With regard to CH thickness, the group in which PNTA was applied before the Prime&Bond active® adhesive system had slightly thicker CH. This was not the case with the Scotchbond™ Universal Plus adhesive, where they appeared to be similar.

As for the degree of conversion, it was not possible to determine this in any of the specimens prepared with the Prime&Bond active® adhesive system, due to the anomalous evolution of the relationship between the reactive and reference peaks in the Raman spectrum. However, for the specimens prepared with the Scotchbond™ Universal Plus adhesive system, the degree of conversion proved to be slightly higher in the cases where PNTA was applied.

Conclusions:

PNTA appears to be beneficial for adhesive dentistry to validate the method.

Keywords: atmospheric non-thermal plasma, Raman micro-spectroscopy, degree of conversion, hybrid layer.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO.....	13
1. Substrato dentário	14
1.1 Esmalte.....	14
1.2 Dentina	15
2. Adesão	17
2.1 Adesão ao esmalte versus dentina	19
3. Sistemas Adesivos	21
3.1 Evolução e Classificação dos Sistemas Adesivos.....	21
4. Degradação da interface resina-dentina	24
5. Plasma	25
5.1 Produção de PNTA	26
5.2 Efeito do PNTA na dentina	27
6. Microespectroscopia Raman.....	28
II. OBJETIVO.....	31
III. MATERIAIS E MÉTODOS	33
1. Seleção e armazenamento das amostras	33
2. Grupos Experimentais	33
3. Materiais.....	34
3.1 Dispositivo PNTA	34
4. Métodos	35
5. Microespectroscopia Raman.....	40
5.1 Configuração da μ -Raman confocal	40
IV. RESULTADOS.....	41
V. DISCUSSÃO.....	49
VI. CONCLUSÃO	53
VII. BIBLIOGRAFIA.....	55
VIII. ANEXOS	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática de uma caneta de PNTA.....	26
Figura 2. HEMA e Bis-GMA: picos característicos em espectro de Raman (Adaptado de Zou, Armstrong, & Jessop, 2010).....	30
Figura 3. Dentes utilizados para o estudo.....	35
Figura 4. Dentes fixados num suporte de acrílico com indicação das secções a cortar	35
Figura 5. Micrótomo.....	36
Figura 7. Corte de dentina intermédia	36
Figura 6. Corte para remover o esmalte oclusal.....	36
Figura 8. Fatias de dentina intermédia	36
Figura 10. Imagem representativa de uma fatia de dentina tratada com PNTA.....	37
Figura 9. Caneta de PNTA utilizada neste estudo.....	37
Figura 11. Adesivo Universal Prime&Bond active®	37
Figura 12. Adesivo Universal 3M™ Scotchbond™ Universal Plus	37
Figura 13. Restauração com incremento de 2mm	38
Figura 14. Unidade de polimerização Otilux 501 (Kerr, Midleton, WI, EUA)	38
Figura 15. Incubadora a 37°.....	38
Figura 17. Meio disco de dentina	39
Figura 16. Meio disco de dentina	39
Figura 18. Diagrama de preparação do espécime	39
Figura 19. Microscópio de Raman	40
Figura 20. Espectros obtidos da análise em μ -Raman da CH criada com o adesivo Prime&Bond active®, com aplicação prévia de PNTA	42
Figura 21. Espectros obtidos da análise em μ -Raman da CH criada com o adesivo Prime&Bond active®, sem aplicação prévia de PNTA	43
Figura 22. Espectros obtidos da análise em μ -Raman da gota de Prime&Bond active® (seta azul identifica relação de intensidade entre picos reativos e de referência)	43
Figura 23. Espectros obtidos da análise em μ -Raman da gota de adesivo Scotchbond Universal 3M Plus.....	46
Figura 24. Espectros obtidos da análise em μ -Raman da CH criada com o adesivo 3M™ Scotchbond™ Universal Plus, sem aplicação prévia de PNTA.....	46

Figura 25. *Espetros obtidos da análise em μ -Raman da CH criada com o adesivo 3MTM ScotchbondTM Universal Plus, com aplicação prévia de PNTA..... 47*

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. <i>Materiais dentários utilizados</i>	34
Tabela 2. <i>Espessura da camada híbrida medida nos espécimes preparados com Prime&Bond active®, sem aplicação prévia de PNTA. (C-espécime sem PNTA; L-linha de espectros)</i>	41
Tabela 3. <i>Espessura da camada híbrida medida nos espécimes preparados com Prime&Bond active®, com aplicação prévia de PNTA. (P-espécime com PNTA; L-linha de espectros)</i>	41
Tabela 4. <i>Espessura da camada híbrida medida nos espécimes preparados com 3M™ Scotchbond™ Universal Plus, sem aplicação prévia de PNTA (C-espécime sem PNTA; L-linha de espectros)</i>	41
Tabela 5. <i>Espessura da camada híbrida medida nos espécimes preparados com 3M™ Scotchbond™ Universal Plus, com aplicação prévia de PNTA (P-espécime com PNTA; L-linha de espectros)</i>	42
Tabela 6. <i>Grau de conversão dos espécimes preparados com 3M™ Scotchbond™ Universal Plus, sem aplicação prévia de PNTA (C-espécime sem PNTA; L-linha de espectros)</i>	44
Tabela 7. <i>Grau de conversão dos espécimes preparados com 3M™ Scotchbond™ Universal Plus, com aplicação prévia de PNTA (P-espécime com PNTA; L-linha de espectros)</i>	45

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

10-MDP - 10-metacriloiloxidecil di-hidrogenofosfato

ASTM - American Society for Testing and Materials

Bis-GMA - Bisfenol A glicidil metacrilato

CH- Camada Híbrida

DBD - Descarga por barreira dielétrica

EDS - Espetroscopia de Energia Dispersiva

EDX- Espetroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier

EF - Eléctrodo flutuante

ER - Etch-And-Rinse

FTIR- Espetroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier

HAp – Hidroxiapatite

HEMA - Metacrilato de 2-hidroxietilo

JAD – Junção amelodentinária

MMPs - Metaloproteinases

PNTA - Plasma não térmico atmosférico

SE - Self-Etch

SEE- Selective enamel etching

μ-Raman - Micro Raman

I. INTRODUÇÃO

A evolução da tecnologia dos adesivos dentários revolucionou a medicina dentária restauradora, impulsionando a transição da filosofia de "extensão para prevenção" para a abordagem de "medicina dentária minimamente invasiva" (Cardoso et al., 2011). Este paradigma, iniciado com a introdução da técnica de condicionamento ácido do esmalte por Buonocore (1955), prioriza a preservação da estrutura dentária e possibilitou o desenvolvimento de sistemas adesivos como alternativa aos métodos mecânicos de retenção, facilitando a remoção completa do tecido cariado e contribuindo para um preparo cavitário mais conservador (Buonocore, 1955; Cardoso et al., 2011).

Embora as restaurações adesivas tenham alcançado avanços significativos em termos de estética e conservação, a degradação da interface adesiva ao longo do tempo e a infiltração marginal representam desafios consideráveis para a durabilidade clínica das restaurações adesivas (Cardoso et al., 2011). A busca por adesivos que proporcionem uma adesão duradoura e eficaz, tanto ao esmalte quanto à dentina, dois substratos com características distintas, tem sido um dos principais focos de investigação em medicina dentária (Perdigão, 2020).

A simplificação dos procedimentos clínicos, com a redução do número de etapas e a introdução de adesivos de aplicação mais rápida, tem sido uma constante na prática clínica. No entanto, a procura pela praticidade clínica muitas vezes leva a que o desempenho e a longevidade das restaurações dentárias sejam frequentemente ignorados, suscitando questões sobre o equilíbrio entre a simplificação dos procedimentos e a obtenção de bons resultados clínicos a longo prazo (Perdigão, 2020).

1. Substrato dentário

Os substratos dentários, esmalte e dentina, apresentam características distintas que influenciam diretamente o sucesso das restaurações. O esmalte, tecido altamente mineralizado e acelular que reveste a coroa dentária, confere resistência e translucidez ao dente. A sua composição rica em hidroxiapatite (HAp) garante alta resistência mecânica, mas também o torna suscetível à desmineralização em ambientes ácidos (Shahmoradi et al., 2014).

A dentina, por sua vez, constitui a maior parte da estrutura dentária e oferece suporte ao esmalte (Shahmoradi et al., 2014). É um tecido vivo, dinâmico e complexo, composto por túbulos dentinários preenchidos por fluidos e prolongamentos odontoblásticos (Marshall et al., 1997). A presença destes túbulos e a sua permeabilidade representam um desafio significativo para a adesão, uma vez que a humidade e os componentes orgânicos da dentina podem interferir na formação de uma interface adesiva estável e duradoura (Linde, 1989).

Além do esmalte e da dentina, outros dois tecidos desempenham papéis essenciais na estrutura e função do dente: o cemento, um tecido mineralizado que reveste a raiz, e a polpa, um tecido mole que ocupa a cavidade pulpar (Shahmoradi et al., 2014). Embora histologicamente semelhantes, os dentes apresentam diferenças significativas na forma e tamanho, adaptadas às suas funções específicas na cavidade oral (Nanci, 2017).

1.1 Esmalte

O esmalte dentário, tecido mais externo da coroa do dente, destaca-se como o tecido mais mineralizado do corpo humano, desempenhando um papel crucial na preservação da integridade e da estética dentária (Nanci, 2017; Pereira et al., 2005). A sua espessura varia ao longo da coroa, sendo maior nas regiões oclusal e incisal, onde as forças mastigatórias são maiores, e diminuindo progressivamente em direção à região cervical (Ritter, 2019; Nanci, 2017).

O esmalte apresenta-se como um tecido translúcido e pode variar de amarelo pálido a branco acinzentado (Nanci, 2017). A sua estrutura acelular e avascular impede a regeneração ou auto-reparação após sofrer lesões, como o desgaste dentário, que resulta da combinação de processos mecânicos e químicos, como atrito, abrasão e abfração (Shafer et al., 1983).

A formação do esmalte (amelogénese) ocorre em três fases principais: citodiferenciação, secreção da matriz e maturação (Nanci, 2017). A fase de maturação, etapa final da amelogénese, é responsável pela mineralização completa dos cristais de HAp, conferindo ao esmalte a sua dureza e rigidez características (Nanci, 2017).

A composição química do esmalte maduro consiste em 90-92% de matriz inorgânica (composta principalmente por cálcio e fósforo na forma de HAp, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, com quantidades residuais de sódio, magnésio, cloro, carbonato, potássio e flúor), 1-2% de matriz orgânica, que atua como agente de ligação para os cristalitos de apatite, e o restante é constituído por água (Shahmoradi et al., 2014).

A resistência mecânica do esmalte é atribuída à organização tridimensional dos cristais HAp numa estrutura hierárquica complexa. Em nível macroscópico, feixes de dezenas de prismas de esmalte formam as bandas de Hunter-Schreger, que conferem um padrão característico ao esmalte, visível devido às diferentes direções em que as bandas de prismas adjacentes refletem ou transmitem a luz (Park et al., 2008). Na escala microscópica, as unidades estruturais básicas do esmalte são os prismas e a substância interprismática. Os prismas, estruturas cilíndricas que se estendem da junção amelodentinária (JAD) até à superfície do esmalte, são mantidos coesos por proteínas não colagénicas (Park et al., 2008).

1.2 Dentina

A dentina constitui a maior parte da estrutura mineralizada do dente e desempenha um papel fundamental na função e vitalidade do mesmo (Goldberg et al., 2011).

Localizada abaixo do esmalte, na coroa, e do cimento, na raiz, a dentina envolve e protege a polpa dentária, tecido conjuntivo responsável pela sensibilidade, nutrição e formação da dentina (Nanci, 2003).

Ao contrário do esmalte, a dentina é um tecido heterogêneo e dinâmico, constituído por aproximadamente 50% de material inorgânico (cristais de HAp), 30% de matéria orgânica (principalmente colagénio tipo I) e 20% de fluido dentinário. Os cristalitos de HAp na dentina são mais pequenos e estão dispostos num padrão cruzado dentro da matriz orgânica, o que complica ainda mais o estabelecimento de uma ligação micromecânica com a dentina (Nanci, 2003; Spencer et al., 2012).

Esta combinação única de componentes confere à dentina propriedades mecânicas importantes, como elasticidade e resiliência, que lhe permitem suportar as forças mastigatórias e proteger o esmalte, mais rígido, contra fraturas (Nanci, 2003).

A estrutura tubular da dentina, composta por milhares de túbulos dentinários que se estendem desde a câmara pulpar até à JAD conferem-lhe características únicas (Perdigão, 2010). Esses túbulos, preenchidos por fluído dentinário e prolongamentos de odontoblastos, apresentam variações em número e diâmetro ao longo do seu trajeto (Berkovitz et al., 2009; Nanci, 2003; Perdigão, 2010). Próximo à polpa, os túbulos são mais numerosos e de maior calibre, diminuindo em quantidade e diâmetro em direção à periferia do dente. Essa variação estrutural resulta em duas zonas distintas na dentina: a dentina peritubular, altamente mineralizada e pobre em colagénio, que predomina na região próxima à JAD, e a dentina intertubular, rica em colagénio e com menor grau de mineralização, mais abundante na região próxima à polpa (Goldberg et al., 2011; Nanci, 2003).

A dentina é considerada um substrato vital e dinâmico, que sofre alterações ao longo da vida do indivíduo, resultando na formação de diferentes tipos de dentina com características distintas (Nanci, 2003). A dentina primária, formada durante o desenvolvimento do dente, é secretada pelos odontoblastos até ao momento em que o dente completa a formação da raiz e apresenta uma estrutura tubular regular (Nanci, 2003). A dentina secundária, depositada após a formação completa da raiz, apresenta características semelhantes à dentina primária, mas com menor número de túbulos por área de superfície (Murray et al., 2002; Perdigão, 2010). Em resposta a estímulos

externos, como cárie, desgaste ou procedimentos restauradores, a dentina reage formando dentina terciária (Katchburian & Arana, 2004). Depositada pelos odontoblastos ou por células odontoblastoides recém-diferenciadas, a dentina terciária atua como uma barreira protetora, isolando a polpa de agentes agressores (Duke & Lindemuth, 1991; Katchburian & Arana, 2004). A dentina também pode sofrer um processo de esclerose, caracterizado pela deposição de minerais no interior dos túbulos dentinários, o que reduz a sua permeabilidade e dificulta a adesão de materiais restauradores (Mixon et al., 1995; Tagami et al., 1992).

A permeabilidade dentinária, definida como o movimento de fluidos através dos túbulos dentinários, é um fator crítico na adesão e na sensibilidade dentinária pós-operatória (Pashley, 1996; Perdigão, 2010). A permeabilidade não é uniforme em toda a dentina, variando de acordo com a idade do indivíduo, localização no dente e presença de dentina esclerótica ou terciária (Mjör, 2009; Perdigão, 2010). A dentina jovem, com túbulos mais amplos, é mais permeável do que a dentina envelhecida, e a dentina próxima à polpa é mais permeável do que a dentina próxima à JAD (Mjör, 2009; Pashley, 1996). A permeabilidade dentinária também é influenciada pela pressão pulpar, que pode variar em diferentes situações clínicas e fisiológicas (Pashley, 1996). O aumento da pressão pulpar pode aumentar o fluxo de fluido dentinário, enquanto a diminuição da pressão pulpar pode reduzi-lo. Essa variação na permeabilidade influencia a capacidade dos adesivos penetrarem nos túbulos dentinários e formarem uma interface adesiva estável e duradoura.

2. Adesão

A adesão, fundamental no sucesso da medicina dentária restauradora, pode ser definida como: “o estado em que duas superfícies são mantidas juntas por forças interatômicas que podem consistir em forças de valência ou forças de interação ou ambas”, conforme estabelecido pela American Society for Testing and Materials (ASTM D 907) (Ritter, 2019).

Tradicionalmente, a preparação dos substratos dentários envolvia a remoção mecânica de tecido dentário para assegurar a retenção das restaurações. Este paradigma foi desafiado pela descoberta de Buonocore (1955), que demonstrou que o condicionamento ácido do

esmalte com ácido fosfórico melhorava significativamente a adesão, marcando o início de uma nova era na medicina dentária restauradora, permitindo a adesão direta de materiais restauradores ao esmalte. A realização de uma restauração em resina composta ao nível do esmalte é um procedimento simples, previsível e estável ao longo do tempo. A condição essencial para uma adesão eficaz é a criação de uma superfície retentiva, obtida com a aplicação de ácido que dissolve seletivamente os cristais de HAp constituintes dos prismas de esmalte e/ou a zona interprismática, aumentando a área e, consequentemente, energia de superfície do esmalte, permitindo a retenção micromecânica da resina fluida após a polimerização (Van Meerbeek et al., 2003a).

Nos anos seguintes, a pesquisa concentrou-se na adesão à dentina, um substrato mais complexo devido à sua composição heterogênea e natureza hidrofílica. Fusayama, no final dos anos 70, foi pioneiro ao descrever o condicionamento ácido da dentina com a técnica de *total-etch*, que envolve o condicionamento simultâneo do esmalte e da dentina (Fusayama et al., 1979). Na década de 90, esta técnica foi reconhecida como segura e eficaz para a adesão à dentina (Inoue et al., 2003).

O condicionamento ácido neste substrato remove a *smear layer* e o material inorgânico superficial, expondo as fibras de colagénio para a infiltração do adesivo (Pashley et al., 2011). Contudo, a remoção da *smear layer* resulta num aumento da permeabilidade do substrato dentinário. Este aumento na permeabilidade pode comprometer o processo de adesão devido à presença do fluido dentinário (Bowen et al., 1984; Pashley & Carvalho, 1997). A *smear layer* é, uma camada de resíduos orgânicos e inorgânicos formada sobre a dentina após procedimentos que expõem os túbulos dentinários, como o preparo cavitário com instrumentos rotatórios (Bowen et al., 1984).

A aplicação do ácido ortofosfórico, com concentrações entre 35% e 37%, é o mais utilizado para o condicionamento tanto do esmalte como da dentina e deve ser aplicado por um período de 15 segundos, promovendo a remoção seletiva dos cristais de HAp, que ocorre através da formação de um precipitado de fosfato monocálcico mono-hidratado, altamente solúvel em água e, portanto, facilmente removível durante a lavagem (Perdigão et al., 1996; Swift et al., 1995).

Em relação ao substrato dentinário, a utilização da concentração e do tempo de aplicação corretos do ácido ortofosfórico não só promove a desmineralização desejada, mas

também previne a desnaturação do colagénio (Van Meerbeek et al., 2003b). Posteriormente, o ácido é cuidadosamente removido com um jato de água por um período igual ou superior ao tempo de aplicação. Assim, garante-se a eliminação completa de todos os resíduos da desmineralização, bem como dos componentes do próprio ácido (Sonis, 2015).

Em 1962, Bowen (U.S. Patent No. 3,066,112) desenvolveu o primeiro material para restaurações dentárias diretas com características superiores aos materiais disponíveis na época, nomeadamente, menor solubilidade em comparação aos cimentos de silicato e menor contração de polimerização em relação aos materiais à base de metilmetacrilato, usados até então. Este novo material, conhecido como Bisfenol A glicidil metacrilato (Bis-GMA), foi obtido pela adição de grupos metilmetacrilato às extremidades de moléculas de bisfenol A diglicidil éter (resina epoxy), juntamente com partículas de sílica e um agente de união (Bowen, U.S. Patent No. 3,179,623, 1965). Com algumas modificações ao longo do tempo, esta resina estabeleceu o padrão para a composição genérica das resinas compostas e adesivos dentários atuais.

A compreensão da interface dentina/adesivo evoluiu consideravelmente no final dos anos 90, quando a microespectroscopia de Raman (μ -Raman), utilizada por Spencer et al. (2000) e Wang e Spencer (2002), permitiu investigar a composição e a penetração dos adesivos a nível molecular, indo além da análise morfológica e da resistência adesiva, que até então predominavam nos estudos.

2.1 Adesão ao esmalte versus dentina

A adesão ao esmalte e à dentina, embora ambas cruciais para o sucesso da restauração, exigem abordagens distintas devido às suas características únicas. A literatura reconhece a adesão ao esmalte como aquela que apresenta mais confiança e longevidade, pelo que não tem sofrido grandes alterações ao longo dos anos. Esta adesão, fundamentalmente micromecânica, depende da criação de uma superfície retentiva no esmalte, alcançada através do condicionamento ácido com ácido fosfórico, técnica estabelecida como padrão desde 1955 (Ritter, 2019; Tezvergil-Mutluay et al., 2015).

A dentina, com a sua complexa estrutura e composição, apresenta desafios consideráveis para a adesão. (Tezvergil-Mutluay et al., 2015). A sua heterogeneidade, incluindo a variação na permeabilidade da dentina dependendo da localização, influencia diretamente a qualidade da interface adesiva criada (Perdigão, 2010).

O condicionamento ácido visa remover ou modificar a *smear layer* e expor a rede de colagénio subjacente, permitindo a infiltração dos monómeros hidrofílicos do adesivo criando uma zona de interdifusão resina-dentina, também conhecida como camada híbrida (CH). Descrita em 1982 por Nakabayashi e colaboradores, é definida como “a estrutura formada em tecidos duros dentários (esmalte, dentina, cimento) pela desmineralização da superfície e subsuperfície, seguida pela infiltração de monómeros e subsequente polimerização”. Essa camada é composta por fibras de colagénio envolvidas pela resina adesiva e cristais de HAp residuais (Nakabayashi et al., 1982; Van Meerbeek et al., 1994).

Para que a resina de restauração se assemelhe ao tecido dentinário perdido, é fundamental que ocorra uma troca eficaz entre a fase mineral, removida durante o condicionamento ácido, e a resina. O controlo da humidade da dentina é crucial para o sucesso deste processo. Se a dentina estiver excessivamente seca, a rede de colagénio exposta pelo condicionamento ácido pode colapsar, comprometendo a infiltração do adesivo. Por outro lado, se a dentina estiver excessivamente húmida, pode ocorrer a solubilização da mistura de monómeros adesivos, a polimerização e a formação de uma CH coesa e estável. A composição dos sistemas adesivos, incluindo o tipo e a concentração de monómeros, a hidrofiliidade, o peso molecular e a reatividade, também influenciam a qualidade da adesão (Bae et al., 2005; Faltermeyer et al., 2007).

Um elevado grau de conversão dos monómeros é também desejável para um melhor desempenho adesivo (Navarra et al., 2009). O aumento do teor de monómeros, como o Bis-GMA, que é altamente viscoso, afeta a reatividade global, resultando num menor grau de conversão, o que afeta a qualidade da união (Bae et al., 2005).

A longevidade da adesão à dentina está intrinsecamente ligada à qualidade da hibridização e à integridade da interface adesiva (Breschi et al., 2008; Nakabayashi et al., 1982; Spencer et al., 2010).

3. Sistemas Adesivos

3.1 Evolução e Classificação dos Sistemas Adesivos

A complexidade da adesão à dentina impulsionou a constante evolução dos sistemas adesivos, visando alcançar maior resistência e estabilidade da união adesiva ao longo do tempo. Inicialmente, a ideia de condicionamento ácido da dentina não foi bem aceite devido a receios de inflamação pulpar (Buonocore, 1973). Os primeiros sistemas adesivos agiam por quelação com o cálcio da superfície dentária, apresentando baixa resistência adesiva e rápida hidrólise (Buonocore, 1973).

No final da década de 70, a adesão à dentina ainda era um desafio, e os sistemas adesivos procuravam ligação através da *smear layer*, estabelecendo uma ligação iônica entre grupos fosforilados da resina e o cálcio da *smear layer* dentinária (Cheung et al., 1991).

Simultaneamente ao condicionamento ácido, apareceu o *primer*, um agente de união à dentina composto por solventes e monómeros hidrofílicos, como o metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA) (Nakabayashi & Saimi, 1996). O HEMA pode atuar como solvente, estabilizando soluções com componentes hidrofílicos e hidrofóbicos, quanto como promotor de adesão, difundindo-se pela rede de colagénio exposta e interagindo com a resina fluida (Cavalheiro et al., 2006; Hitmi et al., 2002).

O *primer* tem como principal função promover a remoção da água do substrato, preparando-o para posterior impregnação do adesivo. Após a sua aplicação, uma resina hidrófoba, maioritariamente composta por Bis-GMA, era aplicada. Esta resina penetrava na dentina, envolvendo as fibras de colagénio e estabelecendo ligações com o *primer* e a resina restauradora, consolidando a adesão (Nakabayashi & Takarada, 1992).

Surgiram assim os primeiros sistemas adesivos *etch-and-rinse* (ER) de três passos: condicionamento ácido com ácido fosfórico (30% a 40%), aplicação do *primer* hidrofílico e, por fim, da resina hidrofóbica (Swift et al., 1995). A simplificação destes sistemas levou ao desenvolvimento dos adesivos ER de dois passos, combinando o *primer* e o adesivo em um único frasco (De Munck et al., 2005). Os sistemas ER removem completamente a *smear layer* através do condicionamento ácido prévio, expondo a rede de colagénio dentinária para a infiltração da resina adesiva (Pashley et al., 2011).

No entanto, a técnica ER apresenta algumas desvantagens. A necessidade de múltiplas etapas e a sensibilidade da técnica de aplicação podem aumentar o risco de erros e comprometer a qualidade da adesão. Além disso, o condicionamento ácido pode causar sensibilidade pós-operatória em alguns pacientes (Pashley & Tay, 2001).

Os ER, apesar de exigirem uma técnica mais rigorosa, oferecem uma adesão confiável e duradoura à dentina e ao esmalte. O conhecimento dos seus princípios e a aplicação cuidadosa da técnica são fundamentais para o sucesso do tratamento restaurador (De Munck et al., 2005; Marchesi et al., 2014).

No início dos anos 90, surgiram os sistemas adesivos autocondicionantes ou *self-etch* (SE), que incorporavam monómeros acídicos no *primer*, eliminando a necessidade de lavagem. Nestes sistemas, a *smear layer* não é removida, mas modificada e incorporada na CH, juntamente com os cristais de HAp dissolvidos (De Munck et al., 2005; Yiu et al., 2002). Desenvolveram-se na tentativa de ultrapassar algumas das dificuldades constatadas até à data, tais como, sensibilidade pós-operatória e sensibilidade da própria técnica, especialmente no momento de secagem da dentina com o jato de ar (Van Meerbeek et al., 2011; Zhang & Wang, 2012).

Os SE oferecem vantagens como a simplificação do procedimento e a redução da sensibilidade pós-operatória. No entanto, a adesão promovida pelos sistemas SE tem sido descrita como menos previsível de ser alcançada em comparação com os sistemas ER, particularmente no esmalte. Os sistemas adesivos SE, por apresentarem um padrão de desmineralização menos retentivo, os valores de resistência adesiva ao esmalte são inferiores (Kugel & Ferrari, 2000). A escolha do sistema SE ideal deve considerar o seu pH e as características do substrato dentinário (Breschi et al., 2008; Van Landuyt et al., 2005; Van Meerbeek et al., 2003b).

Posteriormente, os sistemas SE de um passo ou *all-in-one* combinaram todas as etapas em um único frasco (Frankenberg et al., 2001).

Os adesivos universais, introduzidos no mercado em 2011, revolucionaram a prática clínica pela sua versatilidade. Estes permitem ao médico dentista escolher a estratégia de adesão mais adequada para cada situação clínica (ER, SE e *selective enamel etching* – SEE) (Hanabusa et al., 2012; Perdigão et al., 2014). Essa versatilidade torna os adesivos

universais uma opção atraente para diferentes situações clínicas, simplificando o procedimento e reduzindo o risco de erros. A evolução dos sistemas adesivos tem sido fundamental para o desenvolvimento de procedimentos restauradores menos invasivos, mais eficazes e duradouros (Van Meerbeek et al., 2003b).

Atualmente, a classificação dos sistemas adesivos baseia-se na estratégia de adesão e no número de passos clínicos envolvidos (Van Meerbeek et al., 2003b).

A busca por uma adesão à dentina mais eficaz e duradoura impulsionou o desenvolvimento de monómeros funcionais como o 10-metacriloiloxidecil di-hidrogenofosfato (10-MDP), que visam complementar a adesão micromecânica, estabelecendo uma interação química com os componentes da dentina (Feitosa et al., 2014; Vaidyanathan & Vaidyanathan, 2009). Embora o 10-MDP já estivesse presente no sistema adesivo *self-etch* Clearfil SE Bond (Kuraray) desde 1981, o vencimento da sua patente em 2011 permitiu a sua livre utilização em adesivos universais, como o pioneiro Scotchbond Universal (3M ESPE) (Perdigão et al., 2014).

O 10-MDP destaca-se pela capacidade de estabelecer ligações químicas com a HAp da dentina, sendo considerado o sistema de eleição atual devido à superior estabilidade da interface adesiva criada (Feitosa et al., 2014; Van Meerbeek & Yoshihara, 2014; Van Meerbeek et al., 2020). A sua estrutura química, com um grupo metacrilato e um grupo fosfato funcional separados por uma cadeia de dez carbonos, permite a copolimerização com outros monómeros e a formação de um sal de cálcio estável e resistente à hidrólise (Van Meerbeek et al., 2020). O 10-MDP é capaz de desmineralizar a dentina e interagir com o cálcio da HAp, formando uma camada de nano-revestimento que contribui para a força e estabilidade da adesão (Yoshida et al., 2012; Yoshihara et al., 2019). Essa nanocamada, com cerca de 3,5 a 4 nm de espessura, é constituída por duas moléculas de 10-MDP, com os grupos metacrilato voltados um para o outro e os grupos funcionais fosfatados voltados para a superfície do substrato e para os iões de cálcio em solução (Perdigão et al., 2012; Van Meerbeek et al., 2003b). Este processo de adesão química tem sido descrito como fundamental para a qualidade da interface adesiva, conferindo-lhe maior estabilidade e durabilidade a longo prazo (Breschi et al., 2008; Yoshida et al., 2012; Yoshihara et al., 2011).

A escolha do sistema adesivo ideal depende de diversos fatores, como o tipo de substrato dentário, a extensão da cavidade, a experiência do clínico e as preferências individuais (Perdigão, 2010; Pashley et al., 2011; Van Meerbeek et al., 2003b). O conhecimento das características e propriedades de cada sistema adesivo, bem como das suas interações com a estrutura dentária, é fundamental para garantir uma adesão eficaz e duradoura, contribuindo para o sucesso do tratamento restaurador.

4. Degradação da interface resina-dentina

A durabilidade e a estabilidade da adesão à dentina em restaurações adesivas têm sido objeto de crescente preocupação na medicina dentária (Alfaro-Mayorga et al., 2018; Valizadeh et al., 2021). A interface resina-dentina, está sujeita a um processo de degradação ao longo do tempo, devido a uma combinação de fatores, incluindo a carga mecânica, a hidrólise de componentes da resina e a atividade enzimática (Breschi et al., 2008).

A CH, zona de interação entre a resina adesiva e a dentina, é particularmente suscetível à degradação (Breschi et al., 2008). A infiltração incompleta da resina na dentina desmineralizada pode deixar áreas de colagénio expostas à ação de enzimas, como as metaloproteinases (MMPs), que degradam o colagénio e fragilizam a interface adesiva (Pashley et al., 2011).

Além disso, a presença de água na CH, proveniente do fluido dentinário ou da própria composição dos sistemas adesivos, pode levar à hidrólise dos componentes resinosos, especialmente aqueles mais hidrofílicos, como o HEMA (Tay et al., 2002).

Na tentativa de criar interfaces adesivas mais estáveis ao longo do tempo, várias alterações têm sido propostas, quer em termos de composição dos sistemas adesivos, quer em termos de protocolos de aplicação ou tratamento do substrato previamente à aplicação do adesivo. Um destes tratamentos, mais recentemente abordados na literatura, consiste na aplicação de plasma sobre o substrato, de modo a aumentar a molhabilidade deste pelo adesivo.

5. Plasma

Embora sólido, líquido e gasoso sejam os estados da matéria mais conhecidos, existe um quarto estado denominado plasma, descoberto em 1879 pelo físico britânico Sir William Crookes e posteriormente nomeado, em 1929, por Irving Langmuir. Constituindo cerca de 99% do universo visível, o plasma é o estado da matéria mais abundante e encontra-se presente em diversos fenômenos, desde a aurora boreal até ao centro de uma estrela (Lata et al., 2021; Temel et al., 2023; Ranjan et al., 2017).

O plasma é um gás ionizado composto por átomos, moléculas, elétrons livres e iões. A sua formação ocorre quando energia suficiente é fornecida para remover elétrons dos átomos e moléculas, resultando num gás parcialmente ionizado com alta reatividade química (Nair et al., 2016). Esta capacidade de quebrar ligações moleculares, excitar átomos e gerar radicais livres, como os radicais hidroxilo, torna o plasma uma ferramenta poderosa para modificar superfícies e criar novos grupos funcionais em substratos (Ayres et al., 2018; Lata et al., 2022; Lehmann et al., 2013)

O plasma é classificado em térmico e não térmico com base na temperatura relativa dos seus componentes. No plasma térmico, elétrons e partículas mais pesadas possuem a mesma temperatura, indicando equilíbrio térmico. Em contraste, o plasma não térmico, comumente conhecido por Plasma Não Térmico Atmosférico (PNTA), não apresenta um equilíbrio térmico, visto que os elétrons apresentam temperaturas muito mais elevadas do que os restantes constituintes (Valizadeh et al., 2021; Lata et al., 2021).

O PNTA, gerado a partir de gases como argon, nitrogénio, oxigénio e hidrogénio, atua à pressão atmosférica ou a baixa pressão e caracteriza-se por baixos níveis de ionização (Alfaro-Mayorga et al., 2018). A sua natureza não destrutiva, aliada à elevada reatividade química, torna-o uma ferramenta eficaz e segura para modificar as características da superfície dos substratos dentários (Ritts et al., 2010). A utilização do argon, um gás nobre inerte, na geração do PNTA, minimiza ainda mais o risco de danos aos tecidos dentários, reforçando a sua segurança e aplicabilidade em tratamentos dentários (Strazzi-Sahyon et al., 2021).

A relevância das aplicações de plasma na medicina dentária deve-se às muitas vantagens que apresenta em relação às abordagens convencionais, incluindo a capacidade de

penetrar em canais radiculares pequenos e irregulares e assegurar a descontaminação bacteriana. Também tem sido descrita uma melhoria na adesão de compósitos à dentina, com obtenção de restaurações mais duradouras (Zhang, et al., 2014).

5.1 Produção de PNTA

Para aplicações na medicina dentária, o PNTA é frequentemente aplicado através de dispositivos como escovas de plasma, jatos, chamas e agulhas (Stasic et al., 2021).

Laroussi et al. (2006) desenvolveram um jato de plasma compacto, como se pode ver na Figura 1. Este dispositivo tem um tubo dielétrico cilíndrico de 2,5 cm de diâmetro que contém dois elétrodos de disco de igual diâmetro. Um intervalo de 0,3-1cm separa os dois elétrodos e um fino anel de cobre é ligado ao disco dielétrico através deste intervalo. Para produzir plasma, são aplicados impulsos de alta tensão de sub-microssegundos entre os dois elétrodos e o gás é injetado através dos orifícios nos elétrodos. Quando a descarga ocorre, é libertada uma pluma de plasma através da abertura do eléctrodo exterior para o ambiente. Este jato de plasma pode ser manuseado de forma segura, atingindo um comprimento máximo de 5 cm e mantendo uma temperatura baixa segura. Para os elétrodos, um gerador de impulsos de alta tensão fornece energia elétrica. O gerador de impulsos é alimentado com uma alta tensão de saída variável a partir de uma fonte de tensão contínua. A caneta de plasma demonstrou ser eficaz no tratamento de *Escherichia coli*, células de leucemia e *Porphyromonas Gingivalis* (Lata et al., 2021; Nair et al., 2016; Laroussi et al., 2006).

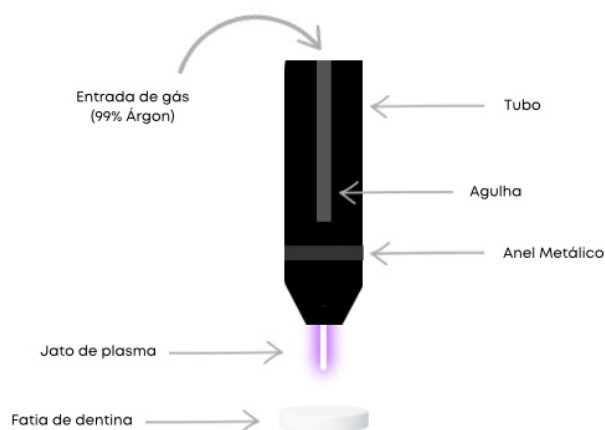


Figura 1. Representação esquemática de uma caneta de PNTA

5.2 Efeito do PNTA na dentina

Em virtude da sua composição química e estrutural mais homogênea, o esmalte é menos propenso a falhas na adesão, em comparação com a dentina (Cardoso et al., 2011). Consequentemente, a maioria dos estudos sobre a influência do PNTA na hibridização resina-substrato tem-se centrado no substrato dentinário. A obtenção de uma boa hibridização dentina-adesivo depende da otimização da penetração do adesivo e do estabelecimento de uma ligação físico-química estável entre os dois (Liu et al., 2016).

O estabelecimento de um contacto preciso entre o adesivo e a superfície aderente é crucial para conseguir uma adesão dentária eficaz. Nesse sentido, o material adesivo tem de se dispersar eficazmente por toda a superfície do substrato, ou seja, o substrato tem de apresentar uma molhabilidade ideal para o adesivo.

Um potencial método alternativo para melhorar a adesão é estimular a superfície da dentina com PNTA, levando à acumulação de radicais livres que aumentam a interação entre os monómeros do adesivo e o colagénio dentinário (Lata et al., 2021; Ayres et al., 2018). A sua aplicação tornou-se mais desejável devido a melhorias documentadas na resistência mecânica e durabilidade da união adesiva (Lata et al., 2021).

O estudo realizado por Dong et al. (2015) mostrou que a aplicação de PNTA foi bem sucedida no aumento da penetração de um sistema adesivo SE suave. Isto levou à formação de CH mais espessas e prolongamentos de resina mais longos e robustos (Dong et al., 2013; Lata et al., 2021; Valizadeh et al., 2021).

De acordo com Ritts et al. (2010), o PNTA aumenta a quantidade de grupos carbonilo presentes nas superfícies da dentina, o que pode levar a melhores interações químicas com os adesivos. No entanto, é importante referir que o contacto prolongado com o plasma pode levar à degradação das fibras de colagénio (Ritts et al., 2010).

Stasic et al. (2021) analisaram os efeitos do PNTA em restaurações dentárias e determinaram que aumentou a molhabilidade da dentina ao bombardear a sua superfície com substâncias reativas; melhorou a hibridização da dentina ao promover uma maior

penetração do adesivo e melhorou a polimerização dos adesivos, mesmo em condições de humidade (Stasic et al., 2021).

6. Microespectroscopia Raman

Apesar da sua espessura de apenas alguns micrómetros, a CH desempenha um papel importante em assegurar a estabilidade da ligação.

Uma análise química abrangente da resina adesiva na CH pode melhorar significativamente o nosso conhecimento da ligação dentina-adesivo e, em última análise, o seu desempenho (Zou et al., 2006).

No ano 2000, Spencer e a sua equipa deram início à análise molecular da interface adesiva, com o objetivo de estudar as variações quantitativas e qualitativas presentes nas interfaces formadas por diferentes sistemas e protocolos de adesão (Spencer et al., 2000).

A microespectroscopia Raman ou (μ -Raman), é uma técnica analítica que estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria. Essa interação pode manifestar-se de diversas formas, incluindo a dispersão elástica (efeito Rayleigh), em que a maior parte da radiação é dispersa na mesma frequência que a radiação incidente e a dispersão inelástica (efeito Raman) (McCreery, 2000). No efeito Raman, uma pequena fração da radiação incidente é difundida com frequência diferente da radiação incidente (Wang & Spencer, 2002).

Nesta situação, a radiação recebida polariza a nuvem de eletrões que envolve o núcleo, resultando num nível intermédio conhecido como “estado de energia virtual” (10^{-15} s).

O “estado virtual” para o qual os fotões transitam após a exposição à radiação não é um estado quântico real, mas sim uma manifestação da distorção da nuvem de eletrões da molécula provocada pela vibração molecular. A instabilidade deste estado e a rápida libertação do fotão resultam em três estados de energia distintos para cada tipo de ligação química (C-H, C=C, C-N, C-O, C=O, C-O-C, P-O). Um espectro Raman é uma representação gráfica do processo vibracional de cada tipo de ligação química. Este espectro apresenta um gráfico que mostra a intensidade da radiação dispersa em função do

Raman shift (diferença entre a energia do fóton incidente e do fóton disperso) expressa em unidades de número de onda (Wang & Spencer, 2002).

A μ -Raman, utiliza um feixe de laser monocromático, que geralmente é um laser de diodo, proveniente de uma fonte de excitação para irradiar as amostras. Este método oferece uma resolução espacial sub-micrométrica permitindo a análise de áreas extremamente pequenas (Tsuda & Arends, 1997).

Trata-se de uma técnica analítica não destrutiva devido aos requisitos mínimos de preparação da amostra. Através do controlo da intensidade do laser, os espécimes não são danificados, podendo a análise ser realizada em ambiente seco ou húmido. Esta versatilidade permite o estudo de espécimes reais de dentes em condições que mimetizam o ambiente *in vivo* (Wang & Spencer, 2002; Zou et al., 2006)

Surgiu como uma ferramenta altamente promissora para determinar a espessura da CH e aferir quantitativamente sobre a relação entre a quantidade de monómeros ligados na cadeia polimérica e os que ficaram livres, após a reação de polimerização, ou seja, permite calcular o grau de conversão do adesivo.

Este cálculo baseia-se na relação entre a intensidade de bandas específicas do espectro Raman. Nos adesivos com monómeros à base de metacrilato, essas bandas encontram-se a 1640 cm^{-1} (banda “reativa” - I_r), que identifica a presença de ligações duplas $C=C$, e a 1610 cm^{-1} (banda de “referência” - I_{ref}) que corresponde ao anel aromático (Figura 2) (Zou et al., 2010). O grau de conversão é calculado pela seguinte equação:

$$\text{Grau de conversão} = \left(1 - \frac{\frac{Ir(p)}{Iref(p)}}{\frac{Ir(n)}{Iref(n)}} \right) \times 100\%,$$

Onde n e p representam o adesivo não polimerizado e polimerizado, respetivamente (Navarra et al., 2009).

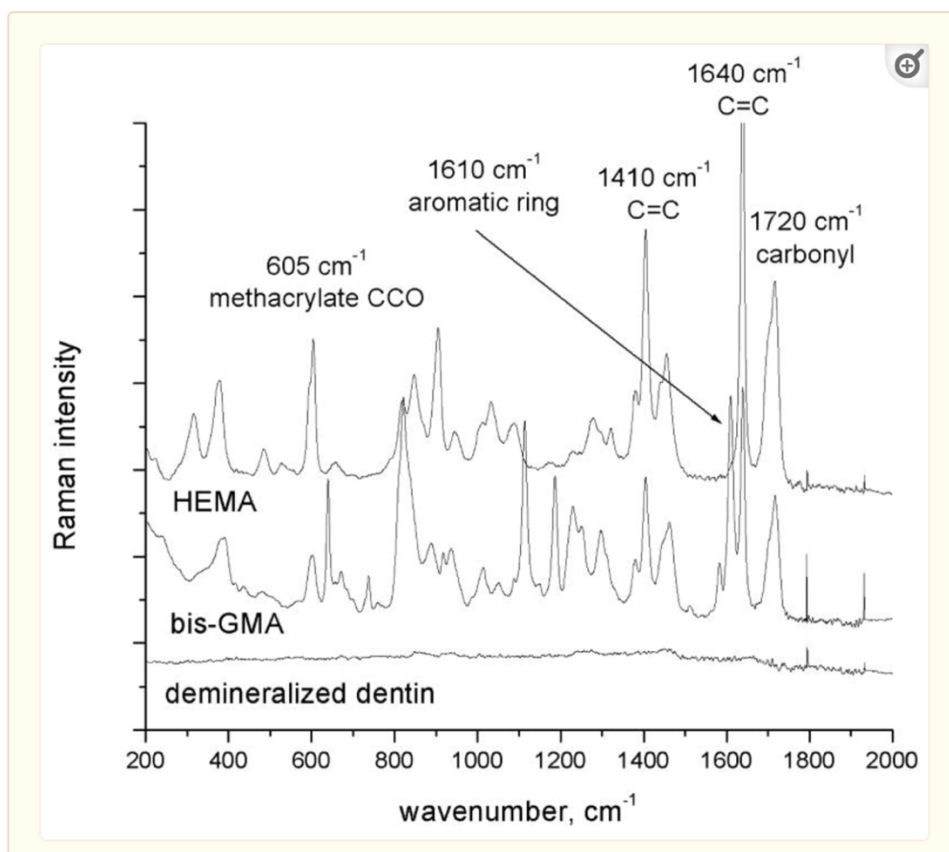


Figura 2. HEMA e Bis-GMA: picos característicos em espectro de Raman (Adaptado de Zou, Armstrong, & Jessop, 2010)

Na análise espectral, a transição entre a CH e o substrato dentinário é caracterizada pelo aumento gradual da banda correspondente ao modo vibracional de alongamento simétrico do fosfato PO_4^{3-} ($\sim 960 \text{ cm}^{-1}$) acompanhada pela diminuição gradual das bandas de interesse do sistema adesivo (~ 1610 e $\sim 1640 \text{ cm}^{-1}$, correspondentes ao modo vibracional de alongamento de C=C nos grupos aromáticos e alifáticos, respetivamente) (Santini & Miletic, 2008).

II. OBJETIVO

O presente estudo *in vitro* pretende avaliar, através de μ -Raman, a interface adesiva resina-dentina criada com sistemas adesivos universais, após a aplicação do PNTA.

Como objetivos específicos, pretende-se medir a espessura da CH formada e determinar o grau de conversão do adesivo.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

Esta investigação foi realizada no Laboratório de Biomateriais da Egas Moniz School of Health & Science e no Laboratório de Física Atómica e Molecular, LIBPhys, da NOVA School of Science and Technology (FCT-UNL).

1. Seleção e armazenamento das amostras

Foram seleccionados 14 molares humanos permanentes hígidos, extraídos nos últimos seis meses, nas consultas de Cirurgia Oral da Clínica Universitária Egas Moniz.

A superfície dos dentes seleccionados foi limpa com curetas antes de serem armazenados numa solução de Cloramina-T a 1%. Os dentes permaneceram nesta solução durante uma semana antes de serem transferidos para água desionizada a 4 °C. A água desionizada de armazenamento foi trocada semanalmente para minimizar a deterioração e o crescimento bacteriano ao longo do tempo (Armstrong et al., 2017).

2. Grupos Experimentais

Os dentes foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais, de acordo com as combinações possíveis entre sistema adesivo (Tabela 1) e aplicação, ou não, de plasma.

3. Materiais

Tabela 1. Materiais dentários utilizados

Material	Classificação	Lote	Composição	Fabricante	pH
Prime&Bond active®	Adesivo Universal	2310000791 Data de validade: 30/09/2025	Acrilato multifuncional, Água, Isopropanol, Acrilato ácido, Resina acrílica modificada com ácido fosfórico (PENTA), Acrilato bifuncional, Canforquinona (fotoiniciador), Iniciador, 4-(dimetilamino)benzonitrilo (fotoacelerador), Estabilizador	Dentsply DeTrey	2,5
3M™ Scotchbond™ Universal Plus	Adesivo universal	10042332 Data de validade: 30/05/2026	Monómero de fosfato MDP, HEMA, Copolímero Vitrebond™ 3M, Carga de sílica, Etanol/água (solvente), Iniciadores fotoiniciadores à base de canforquinona, Silano, Resinas dimetacrilato contendo um monômero radiopaco reticulado livre de derivados de BPA	3M Oral Care	2,7

3.1 Dispositivo PNTA

A FCT-UNL desenvolveu um protótipo de caneta de plasma biomédica, versátil, para funcionamento ao ar livre, tal como utilizado neste estudo. Este gerador de PNTA consiste num dispositivo portátil ligado a uma fonte de alimentação de alta frequência que funciona a 2 kV para criar um jato de plasma de 7 mm de comprimento e 1 mm de diâmetro, à pressão atmosférica. A unidade portátil possui um eletrodo do tipo pino com um diâmetro de 1 mm, contido num capilar de borossilicato, com dois eletrodos metálicos e uma entrada de fornecimento de gás. O borossilicato foi selecionado pelas suas

propriedades de resistência ao calor e aos produtos químicos, combinadas com um baixo coeficiente de expansão. O gás é árgon (99%) e foi fornecido com um fluxo de 3 slm (litros por minuto em condições padrão).

4. Métodos

Os dentes foram fixados individualmente em suportes de acrílico (Figuras 3 e 4). Cada dente foi seccionado utilizando um micrótomo de tecidos duros Accutom 50 (Struers, Ballerup, Dinamarca) (Figura 5). O micrótomo foi programado para efetuar um único corte, a uma velocidade de 1,125 mm/min. Inicialmente, realizou-se um corte abaixo da JAD para remover o esmalte oclusal e expor a dentina superficial. Em seguida, um segundo corte foi realizado 2 mm abaixo do primeiro, obtendo-se uma superfície de dentina intermédia, a qual foi utilizada para o presente estudo (Figuras 6 e 7).



Figura 3. Dentes utilizados para o estudo



Figura 4. Dentes fixados num suporte de acrílico com indicação das secções a cortar



Figura 5. *Micrótomo*



Figura 7. *Corte para remover o esmalte oclusal*



Figura 6. *Corte de dentina intermédia*

Nas superfícies de dentina intermédia (Figura 8) foi simulada a formação de *smear layer* com uma lixa de carboneto de silício de granulometria 600 (Buehler® Ltd, Lake Bluff, IL, EUA) durante 60 s, seguindo-se lavagem com água corrente (Perdigão et al., 1996; Sabatini et al., 2013).

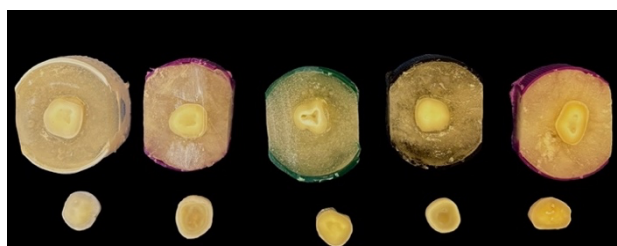


Figura 8. *Fatias de dentina intermédia*

A superfície da dentina foi cuidadosamente lavada e levemente seca antes do procedimento adesivo. No caso dos grupos PNTA, a o plasma foi aplicado durante 10 s, a uma distância de 4 mm, num padrão cruzado para assegurar a cobertura completa da superfície da dentina (Figuras 9 e 10).

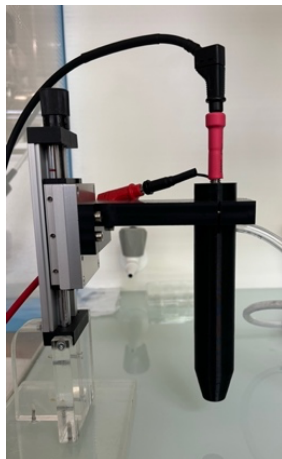


Figura 10. Caneta de PNTA utilizada neste estudo

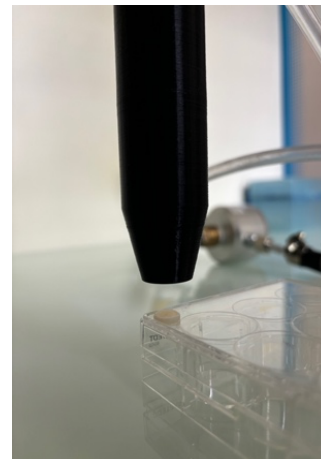


Figura 9. Imagem representativa de uma fatia de dentina tratada com PNTA

O sistema adesivo universal Prime&Bond active® (Dentsply Sirona, Charlotte, NC, EUA) (Figura 11) foi então aplicado em 10 das fatias de dentina, seguindo as instruções do fabricante, utilizando uma estratégia SE.

Nas restantes 4 fatias de dentina foi aplicado o sistema adesivo 3M™ Scotchbond™ Universal Plus (3M Oral Care, St. Paul, MN, EUA), também de acordo com as indicações do fabricante, segundo a estratégia SE (Figura 12).



Figura 11. Adesivo Universal Prime&Bond active®



Figura 12. Adesivo Universal 3M™ Scotchbond™ Universal Plus

Após a aplicação do adesivo, os blocos de resina foram construídos com a resina composta Ceram.x® Spectra ST HV (Dentsply Sirona, Charlotte, NC, EUA), em incrementos de 2 mm (Figura 13). Cada incremento foi polimerizado durante 20 s, a uma distância de 2 cm, de acordo com as instruções do fabricante, utilizando uma unidade de polimerização Optilux 501 (Kerr, Midleton, WI, EUA) a uma intensidade de 900 mW/cm² (Figura 14). Em seguida, os espécimes foram imersos em água desionizada e colocados numa incubadora a 37 °C (Mettmert INE 400, Schwabach, Alemanha) durante 24 h (Figura 15).



Figura 13. Restauração com incremento de 2mm



Figura 14. Unidade de polimerização Optilux 501 (Kerr, Midleton, WI, EUA)



Figura 15. Incubadora a 37°

Todas as fatias de dentina foram posteriormente seccionadas ao meio, com recurso a uma lâmina de diamante montada no micrótomo de tecidos duros e armazenadas em água desionizada, a 4 °C, durante 1 semana (Figuras 16 e 17).



Figura 17. Meio disco de dentina



Figura 16. Meio disco de dentina

O processo de preparação do espécime está esquematicamente apresentado na Figura 18.

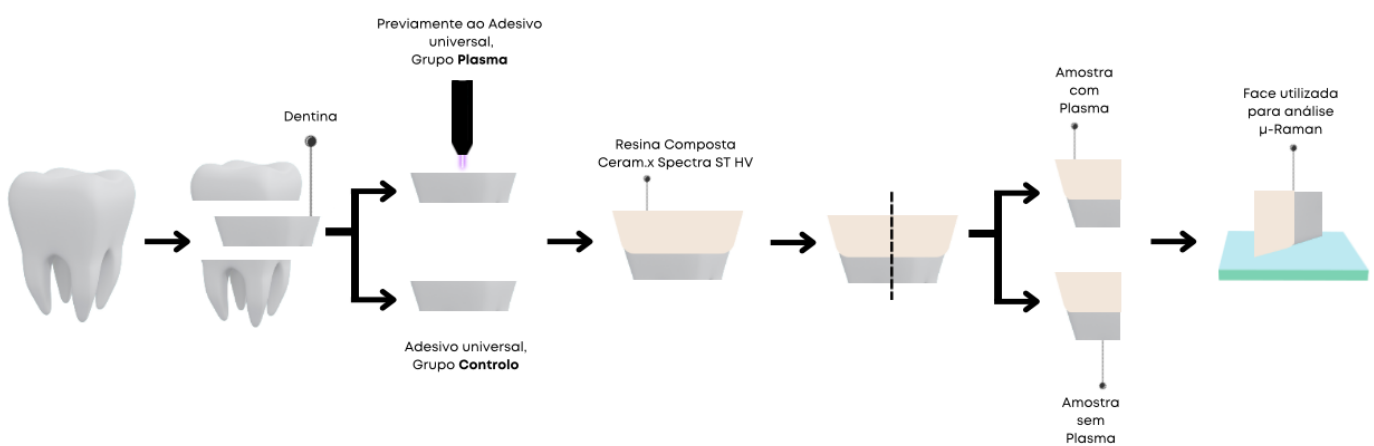


Figura 18. Diagrama de preparação do espécime

5. Microespectroscopia Raman

5.1 Configuração da μ -Raman confocal

Os espectros Raman foram obtidos através do espectrômetro confocal Raman XploRA (Horiba/Jobin-Yvon, França), com um laser díodo de 785 nm. Cada espécime foi focado com a objetiva de 100x, (Olympus BX41, Japão) e foram definidos os seguintes parâmetros de aquisição: um filtro de densidade neutra de 50%, um orifício confocal de 500 μm , fenda para o espectrômetro de 100 μm e uma rede de difração de 1200 linhas/mm de modo a obter um espectro entre os 810 cm^{-1} e os 1780 cm^{-1} , com resoluções em energia de 4 cm^{-1} e espacial $<0.5 \mu\text{m}$. O tempo de exposição foi de 30 s e 3 acumulações. Os espectros foram adquiridos, segundo linhas com intervalo de 1 μm ao longo da interface adesiva entre a dentina e o material restaurador. A correção da linha de base e desconvolução dos espectros foram realizadas utilizando o software LabSpec versão 5.58.25 (Horiba/Jobin-Yvon, França). Para registrar as intensidades dos picos de interesse ajustaram-se funções Voigt (Figura 19).

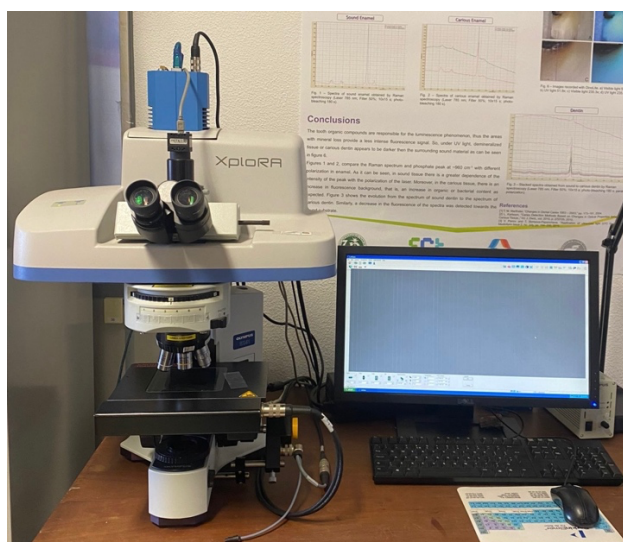


Figura 19. Microscópio de Raman

IV. RESULTADOS

Os resultados do ensaio de μ -Raman encontram-se apresentados abaixo.

Relativamente à espessura da CH, verificou-se que o grupo em que foi aplicado o PNTA previamente ao sistema adesivo Prime&Bond active® apresentou a CH ligeiramente mais espessa. O mesmo não se verificou com o adesivo 3M™ Scotchbond™ Universal Plus, onde as CH formadas tiveram aparentemente espessuras semelhantes (Tabelas 2-5).

Tabela 2. Espessura da camada híbrida medida nos espécimes preparados com Prime&Bond active®, sem aplicação prévia de PNTA. (C-espécime sem PNTA; L-linha de espetros)

Linhas	Espessura da CH (μm) +/- 0,5	Média (μm)
C1 L1	7,0	7,5 +/- 0,9
C1 L2	7,0	
C2 L2	7,0	
C3 L1	9,0	

Tabela 3. Espessura da camada híbrida medida nos espécimes preparados com Prime&Bond active®, com aplicação prévia de PNTA. (P-espécime com PNTA; L-linha de espetros)

Linhas	Espessura da CH (μm) +/- 0,5	Média (μm)
P1 L1	9,0	10 +/- 1
P1 L2	10,0	
P2 L1	15,0	
P3 L1	9,0	
P3 L2	6,0	

Tabela 4. Espessura da camada híbrida medida nos espécimes preparados com 3M™ Scotchbond™ Universal Plus, sem aplicação prévia de PNTA (C-espécime sem PNTA; L-linha de espetros)

Linhas	Espessura da CH (μm) +/- 0,5	Média (μm)
C1 L1	4,0	5,5 +/- 0,9
C1 L2	6,0	
C2 L1	6,0	
C2 L2	6,0	

Tabela 5. Espessura da camada híbrida medida nos espécimes preparados com 3M™ Scotchbond™ Universal Plus, com aplicação prévia de PNTA (P-espécime com PNTA; L-linha de espectros)

Linhas	Espessura da CH (μm) +/- 0,5	Média (μm)
P1 L1	4,0	5 +/- 1
P1 L2	4,0	
P2 L1	7,0	
P2 L2	6,0	

Quanto ao grau de conversão, não foi possível determinar este em nenhum dos espécimes preparados com o sistema adesivo Prime&Bond active®, uma vez que a relação entre a intensidade dos picos reativos (1640 cm^{-1}) e de referência (1610 cm^{-1}), conduzia consistentemente a valores de grau de conversão negativos (Figuras 20 e 21). O mesmo se verificou com a tentativa de determinação do grau de conversão na gota de adesivo (Figura 22).

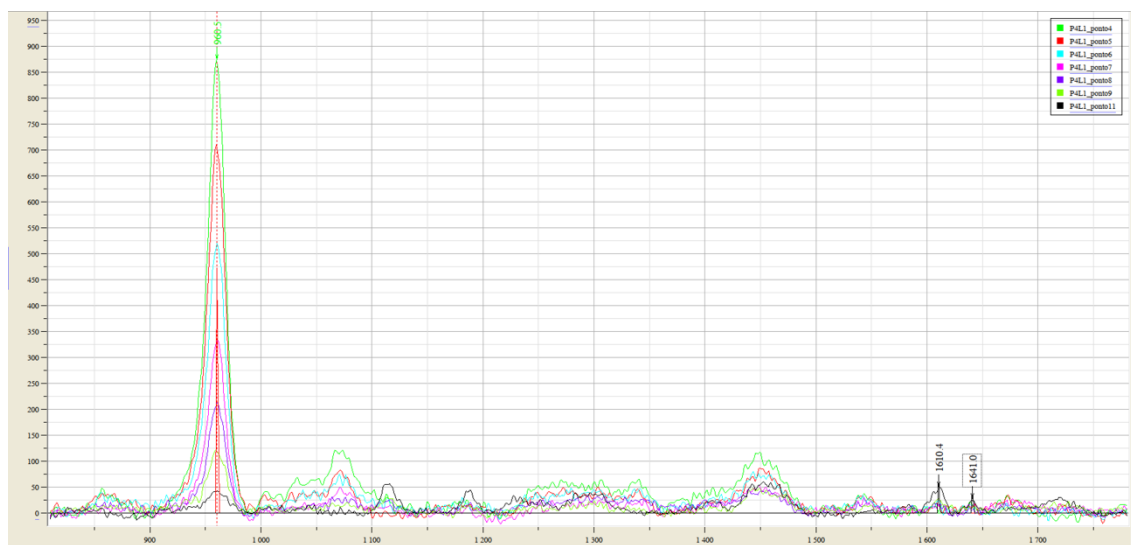


Figura 20. Espectros obtidos da análise em μ -Raman da CH criada com o adesivo Prime&Bond active®, com aplicação prévia de PNTA

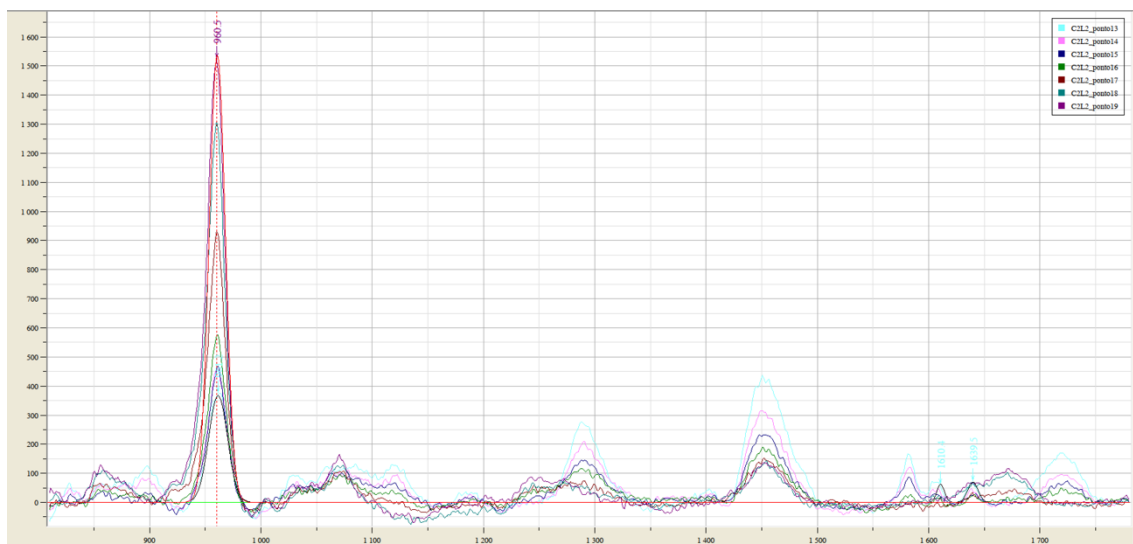


Figura 21. Espectros obtidos da análise em μ -Raman da CH criada com o adesivo Prime&Bond active®, sem aplicação prévia de PNTA

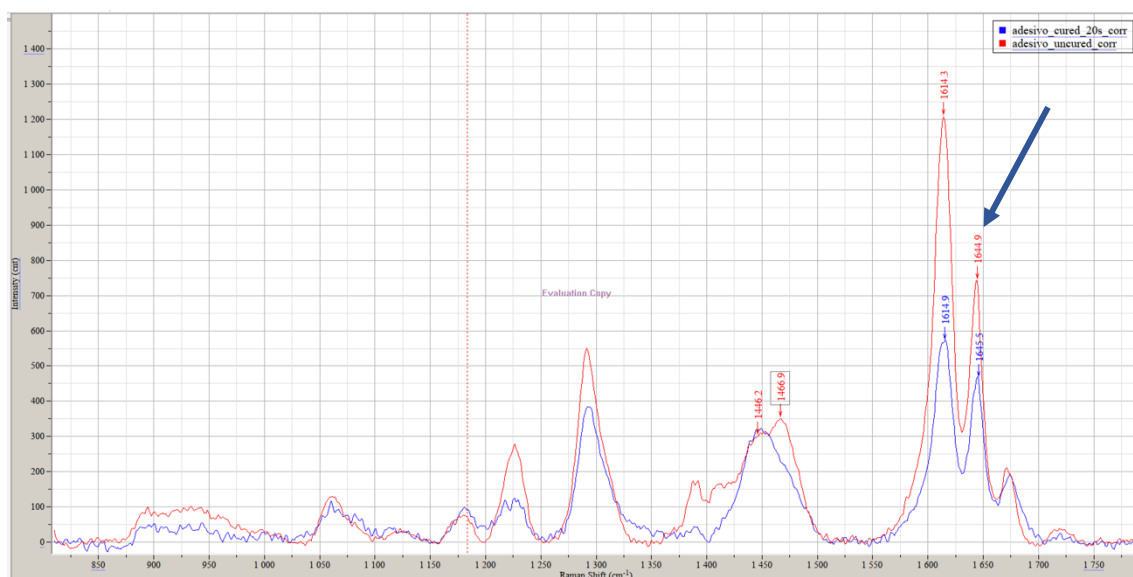


Figura 22. Espectros obtidos da análise em μ -Raman da gota de Prime&Bond active® (seta azul identifica relação de intensidade entre picos reativos e de referência)

Os valores do grau de conversão determinados nos espécimes produzidos com o sistema adesivo 3M™ Scotchbond™ Universal Plus (com e sem PNTA) encontram-se apresentados nas tabelas 6 e 7.

Tabela 6. Grau de conversão dos espécimes preparados com 3M™ Scotchbond™ Universal Plus, sem aplicação prévia de PNTA (C-espécime sem PNTA; L-linha de espectros)

C1_L1	μm	Grau de conversão	Média (grau de conversão)
	-1	0,897201273	0,88 +/- 0,03
	-2	0,91050433	
	-3	0,874924556	
	-4	0,836486913	
C1_L2	μm	Grau de conversão	Média (grau de conversão)
	-1	0,875369875	0,87 +/- 0,008
	-2	0,863909633	
	-3	0,879943616	
	-4	0,870455752	
	-5	0,884810766	
	-6	0,855584349	
C2_L1	μm	Grau de conversão	Média (grau de conversão)
	-1	0,901518896	0,70+/- 0,03
	-2	0,906775344	
	-3	0,897533802	
	-4	0,8973234	
	-5	0,861494797	
	-6	0,790532254	
C2_L2	μm	Grau de conversão	Média (grau de conversão)
	-1	0,84995331	0,80 +/- 0,07
	-2	0,893211337	
	-3	0,849526053	
	-4	0,775570272	
	-5	0,743037631	
	-6	0,668010865	

Tabela 7. Grau de conversão dos espécimes preparados com 3M™ Scotchbond™ Universal Plus, com aplicação prévia de PNTA (P-espécime com PNTA; L-linha de espetros)

P1_L1	μm	Grau de conversão	Média (grau de conversão)
	-1	0,892694536	0,84 +/- 0,05
	-2	0,890147554	
	-3	0,822818636	
	-4	0,771081678	
P1_L2	μm	Grau de conversão	Média (grau de conversão)
	-1	0,888601244	0,89 +/- 0,01
	-2	0,902234721	
	-3	0,875316818	
	-4	0,90125092	
P2_L1	μm	Grau de conversão	Média (grau de conversão)
	-1	0,957303613	0,90 +/- 0,05
	-2	0,940750552	
	-3	0,940152073	
	-4	0,852564412	
	-5	0,899006623	
	-6	0,850380182	
	-7	0,809234731	
P2_L2	μm	Grau de conversão	Média (grau de conversão)
	-1	0,875700458	0,87 +/- 0,02
	-2	0,932671082	
	-3	0,877583785	
	-4	0,891033461	
	-5	0,849064842	
	-6	0,831677704	

Quanto ao grau de conversão calculado para os espécimes preparados com o sistema adesivo 3M™ Scotchbond™ Universal Plus, aparentemente este foi ligeiramente superior no caso da aplicação prévia de PNTA.

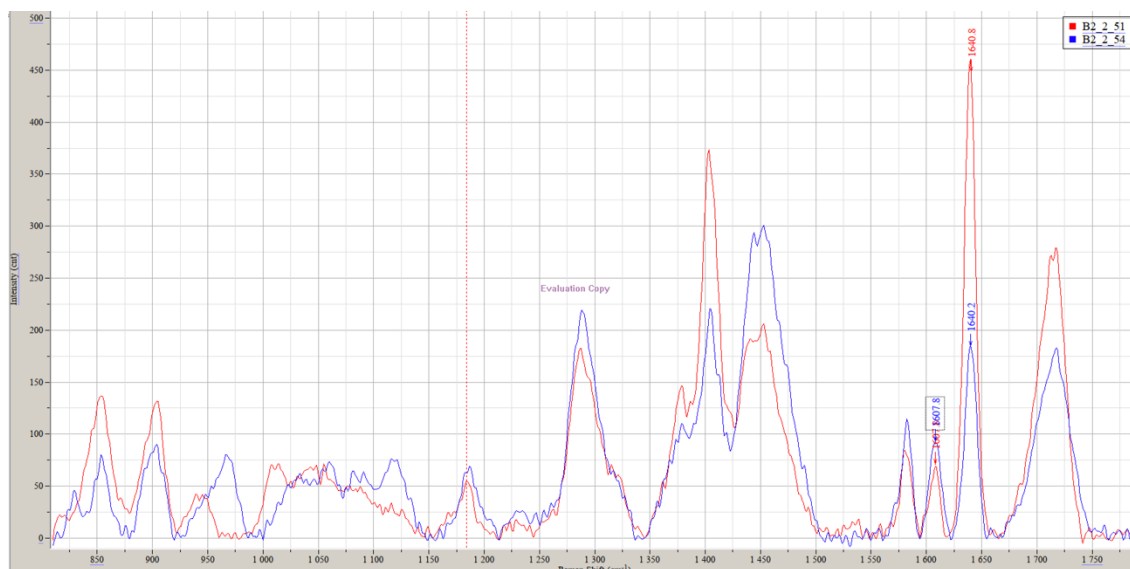


Figura 23. Espectros obtidos da análise em μ -Raman da gota de adesivo 3M™ Scotchbond™ Universal Plus

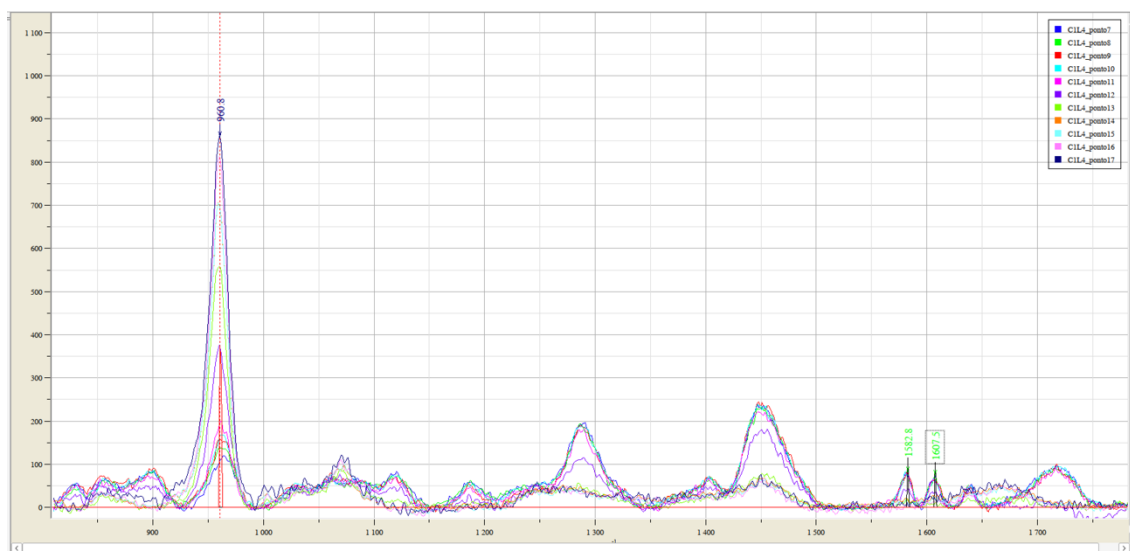


Figura 24. Espectros obtidos da análise em μ -Raman da CH criada com o adesivo 3M™ Scotchbond™ Universal Plus, sem aplicação prévia de PNTA

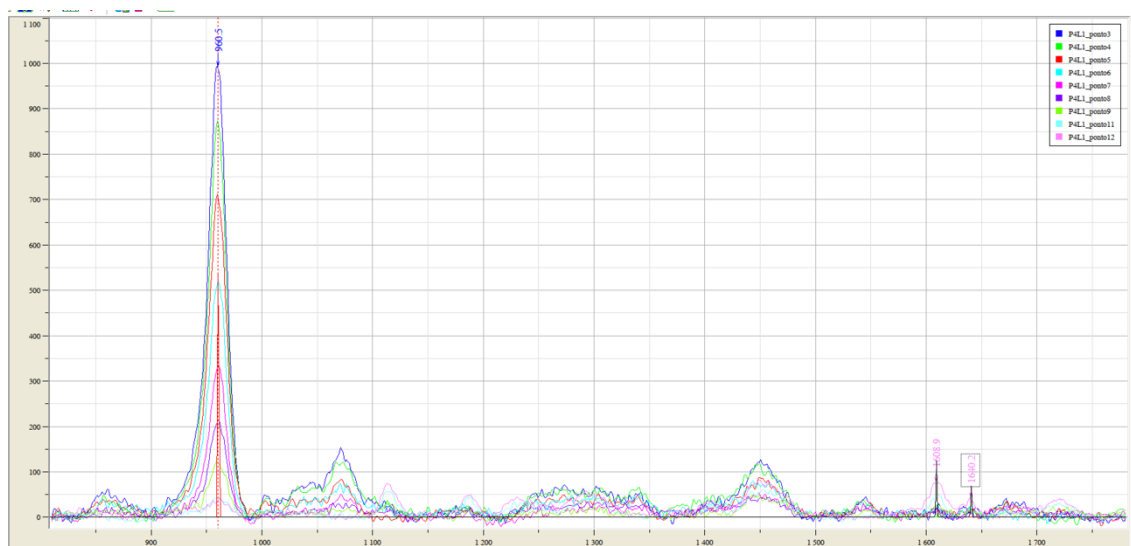


Figura 25. Espetros obtidos da análise em μ -Raman da CH criada com o adesivo 3M™ Scotchbond™ Universal Plus, com aplicação prévia de PNTA

V. DISCUSSÃO

A qualidade e a longevidade da adesão à dentina têm sido, desde sempre, o foco de grande parte da investigação em dentisteria adesiva.

A adesão é influenciada por diversos fatores, incluindo o tipo de substrato dentinário, o sistema adesivo escolhido e o protocolo de aplicação. A própria natureza heterogênea da dentina apresenta obstáculos significativos para a obtenção de uma adesão estável e duradoura (Breschi et al., 2008).

O ácido fosfórico, embora eficaz na criação de uma superfície microrretentiva para a adesão, apresenta algumas limitações tais como a degradação da camada híbrida, que leva à infiltração, exposição do colagénio, tornando-o vulnerável à degradação enzimática e a sensibilidade pós-operatória devido a desmineralização excessiva (Mokeem et al., 2023).

Assim, torna-se imperativo o desenvolvimento de novos protocolos e estratégias que visem uma adesão mais previsível, estável e duradoura.

Nesse contexto, o PNTA surge como uma alternativa promissora, uma vez que é um tratamento minimamente invasivo que preserva a integridade da dentina, em especial do colagénio, além de criar espécies reativas à superfície que formam ligações covalentes com a resina, aumentando a durabilidade da adesão (Pashley et al., 2011).

No presente trabalho, a μ -Raman foi a técnica selecionada para o estudo da interface de união entre o dente e o material restaurador, permitindo aferir sobre a espessura da CH formada e avaliar o grau de conversão do adesivo, bem como a sua capacidade de impregnação na rede de colagénio. No passado, a avaliação da qualidade da interface era realizada apenas com recurso a ensaios mecânicos e ultramorfológicos, pelo que esta técnica representa uma nova forma de olhar para o comportamento da adesão (Mokeem et al., 2023).

Considerando a natureza inovadora da aplicação da μ -Raman neste contexto, foi necessário um período inicial de familiarização com a técnica e o equipamento.

A própria aquisição dos espectros foi desafiante. Devido a dificuldades no tratamento dos espectros obtidos com o adesivo Prime&Bond active®, optou-se por validar o método utilizando o adesivo 3M™ Scotchbond™ Universal Plus, cujo comportamento espectroscópico já tinha sido estudado previamente. Isso fez com que o número de espécimes inicialmente planeado para cada grupo experimental tivesse de ser reduzido a fim de podermos estudar dois adesivos em vez de apenas um, como era objetivo inicial, devido ao tempo despendido nas várias tentativas, infrutíferas, de análise e tratamento dos espectros obtidos com o sistema Prime&Bond active®.

Essa dificuldade de análise deve-se ao facto da banda a 1610 cm^{-1} ser muito intensa e mesmo após polimerização, manter-se superior à banda de 1640 cm^{-1} , resultando em valores de grau de conversão negativos, o que não é possível.

Após análise dos espectros obtidos para os espécimes preparados com o adesivo Prime&Bond active®, constata-se a tendência para formação de CH ligeiramente mais espessas com a preparação prévia com PNTA. O mesmo não se verificou com o adesivo 3M™ Scotchbond™ Universal Plus. Essa diferença pode estar relacionada com a composição química do adesivo propriamente dita, nomeadamente, o pH do Prime&Bond active® ser ligeiramente inferior ao do 3M™ Scotchbond™ Universal Plus. Poderá implicar uma desmineralização ligeiramente superior, com consequente maior impregnação do adesivo.

O grau de conversão só foi possível calcular para as interfaces adesivas criadas com o 3M™ Scotchbond™ Universal Plus, pelo motivo anteriormente referido. Os valores obtidos foram semelhantes nos espécimes preparados com e sem aplicação prévia de PNTA, apesar de aparentemente um pouco superiores no grupo do PNTA, provavelmente por este melhorar as condições da superfície do substrato (Ritts et al., 2010). Em todas as medições realizadas, o grau de conversão médio na CH foi superior a 80%.

Os resultados deste estudo revelaram-se apenas preliminares, pelo que se torna imperativo continuar a explorar a influência do PNTA na qualidade e integridade da interface adesiva criada. Para tal, estudos futuros com Espetroscopia de Energia Dispersiva (EDS) e Energia Dispersiva de Raio-x (EDX), que permitem uma análise elementar da interface deverão ser realizados. Também a avaliação da ultramorfologia da superfície poderá ser um estudo a realizar com microscopia eletrónica de varrimento

Em relação ao sistema adesivo Prime&Bond active®, seria importante perceber o seu comportamento não expectável e tão diferente do que comumente tem sido estudado em adesivos dentinários com μ -Raman. Seria interessante investigar, com Espectroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier (FTIR) se existe na sua composição um outro tipo de monómero, por exemplo, não descrito pelo fabricante, que justifique a incapacidade de analisar este adesivo em μ -Raman da forma habitual. Uma justificação alternativa para os resultados inesperados pode ser algum problema com o lote específico utilizado no estudo. Portanto, repetir o mesmo estudo com um frasco de lote diferente seria recomendado para descartar essa possibilidade.

Apesar deste estudo não ter permitido aferir uma vantagem objetiva do PNTA no procedimento adesivo, ao não aplicarmos ácido sobre o substrato, melhoramos as condições de adesão por não expormos o colagénio nem correremos o risco de desmineralizarmos excessivamente o substrato com a vantagem de uma união mais íntima pela ligação dos monómeros às espécies reativas que se formam à superfície da dentina aquando da aplicação do PNTA

No futuro seria também importante replicar o presente estudo com outros dispositivos de plasma comercializados e outros sistemas adesivos.

VI. CONCLUSÃO

Após a concretização deste estudo, concluiu-se que a aplicação de PNTA como parte do protocolo adesivo aparenta ser benéfica para a dentisteria adesiva. No entanto, mais estudos são necessários para validar o método.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Alfaro-Mayorga, E., Rodríguez-Rojas, J., Bonilla, M., Chavarría-Bolaños, D., Vega-Baudrit, J. R., & Vargas, V. I. (2018). Physico-Chemical Characterization of Dentinal Surface Treated with Atmospheric-Pressure Plasma. *Plasma Medicine*, 8(4).
2. Armstrong, S., Breschi, L., Özcan, M., Pfefferkorn, F., Ferrari, M., & Van Meerbeek, B. (2017). Academy of Dental Materials guidance on in vitro testing of dental composite bonding effectiveness to dentin/enamel using micro-tensile bond strength (μ TBS) approach. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 33(2), 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2016.11.015>
3. Ayres, A. P., Bonvent, J. J., Mogilevych, B., Soares, L. E. S., Martin, A. A., Ambrosano, G. M., Nascimento, F. D., Van Meerbeek, B., & Giannini, M. (2018). Effect of non-thermal atmospheric plasma on the dentin-surface topography and composition and on the bond strength of a universal adhesive. *European journal of oral sciences*, 126(1), 53–65. <https://doi.org/10.1111/eos.12388>
4. Bae, J. H., Cho, B. H., Kim, J. S., Kim, M. S., Lee, I. B., Son, H. H., Um, C. M., Kim, C. K., & Kim, O. Y. (2005). Adhesive layer properties as a determinant of dentin bond strength. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, 74(2), 822–828. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30320>.
5. Berkovitz, B. K. B., Holland, G. R., & Moxham, B. J. (2009). *Oral anatomy, histology, and embryology* (4th ed.). Mosby Elsevier.
6. Bowen, R. L. (1962). *U.S. Patent No. 3,066,112*. U.S. Patent and Trademark Office.
7. Bowen, R. L. (1965). *U.S. Patent No. 3,179,623*. U.S. Patent and Trademark Office.

8. Bowen, R. L., Eick, J. D., Henderson, D. A., & Anderson, D. W. (1984). Smear layer: removal and bonding considerations. *Operative Dentistry Supplement*, 3, 30–34.
9. 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: official publication of the Academy of Dental Materials*, 24(1), 90–101. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2007.02.009>
10. Buoncore, M. G. (1955). A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. *Journal of dental research*, 34(6), 849–853. <https://doi.org/10.1177/00220345550340060801>
11. Buonocore M. G. (1973). Adhesives in the prevention of caries. *Journal of the American Dental Association* (1939), 87(5), 1000–1005. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.1973.0012>
12. Cardoso, M., de Almeida Neves, A., Mine, A., Coutinho, E., Van Landuyt, K., De Munck, J., Vanherle, G., & Van Meerbeek, B. (2011). Current aspects on bonding effectiveness and stability in adhesive dentistry. *Australian Dental Journal*, 56(s1), 31-44.
13. Cavaleiro, A., Vargas, M. A., Armstrong, S. R., Dawson, D. V., & Gratton, D. G. (2006). Effect of incorrect primer application on dentin permeability. *The journal of adhesive dentistry*, 8(6), 393–400.
14. Cheung, B. W., Cartier, L. L., Russlie, H. Q., & Sawchuk, R. J. (2005). The application of sample pooling methods for determining AUC, AUMC and mean residence times in pharmacokinetic studies. *Fundamental & clinical pharmacology*, 19(3), 347–354. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2005.00329.x>

15. De Munck, J., Van Landuyt, K., Peumans, M., Poitevin, A., Lambrechts, P., Braem, M., & Van Meerbeek, B. (2005). A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *Journal of dental research*, 84(2), 118–132. <https://doi.org/10.1177/154405910508400204>
16. 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>
17. 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), 355–362. <https://doi.org/10.1111/eos.12052>
18. Duke, E. S., & Lindemuth, J. (1991). Variability of clinical dentin substrates. *American Journal of Dentistry*, 4(5), 241-246.
19. Faltermeier, A., Rosentritt, M., Faltermeier, R., Reicheneder, C., & Müssig, D. (2007). Influence of filler level on the bond strength of orthodontic adhesives. *The Angle orthodontist*, 77(3), 494–498. [https://doi.org/10.2319/0003-3219\(2007\)077\[0494:IOFLOT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2319/0003-3219(2007)077[0494:IOFLOT]2.0.CO;2)
20. Feitosa, V. P., Sauro, S., Ogliari, F. A., Ogliari, A. O., Yoshihara, K., Zanchi, C. H., Correr-Sobrinho, L., Sinhoreti, M. A., Correr, A. B., Watson, T. F., & Van Meerbeek, B. (2014). Impact of hydrophilicity and length of spacer chains on the bonding of functional monomers. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 30(12), e317–e323. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2014.06.006>
21. Frankenberger, R., Perdigão, J., Rosa, B. T., & Lopes, M. (2001). "No-bottle" vs "multi-bottle" dentin adhesives--a microtensile bond strength and morphological study. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 17(5), 373–380. [https://doi.org/10.1016/s0109-5641\(00\)00084-1](https://doi.org/10.1016/s0109-5641(00)00084-1)

22. Fusayama, T. (1979). Two layers of carious dentin; diagnosis and treatment. *Operative Dentistry*, 4(2), 63–70.
23. Goldberg, M., Kulkarni, A. B., Young, M., & Boskey, A. (2011). Dentin: structure, composition and mineralization. *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)*, 3, 711-735.
24. Hanabusa, M., Mine, A., Kuboki, T., Momoi, Y., Van Ende, A., Van Meerbeek, B., & De Munck, J. (2012). Bonding effectiveness of a new 'multi-mode' adhesive to enamel and dentine. *Journal of dentistry*, 40(6), 475–484. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2012.02.012>
25. Hitmi, L., Bouter, D., & Degrange, M. (2002). Influence of drying and HEMA treatment on dentin wettability. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 18(7), 503–511. [https://doi.org/10.1016/s0109-5641\(01\)00075-6](https://doi.org/10.1016/s0109-5641(01)00075-6)
26. Inoue, S., Vargas, M. A., Abe, Y., Yoshida, Y., Lambrechts, P., Vanherle, G., Sano, H., & Van Meerbeek, B. (2003). Microtensile bond strength of eleven contemporary adhesives to enamel. *American journal of dentistry*, 16(5), 329–334.
27. Katchburian, E., & Arana, V. (2004). Complexo dentina-polpa. In E. Katchburian & V. Arana (Eds.), *Histologia e embriologia oral: texto - atlas - correlações clínicas* (2nd ed., pp. 177-232). Guanabara Koogan.
28. Kugel, G., & Ferrari, M. (2000). The science of bonding: from first to sixth generation. *Journal of the American Dental Association* (1939), 131 Suppl, 20S–25S. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2000.0398>
29. Laroussi, M., Tendero, C., Lu, X., Alla, S., & Hynes, W. L. (2006). Inactivation of Bacteria by the Plasma Pencil. *Plasma Process Polym*, 3(6–7), 470–473.

30. 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, 100200. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2021.100200>
31. Lehmann, A., Rueppell, A., Schindler, A., Zylla, I. M., Seifert, H. J., Nothdurft, F., ... & Weltmann, K.-D. (2013). Modification of Enamel and Dentin Surfaces by Non-Thermal Atmospheric Plasma: Modification of Enamel and Dentin Surfaces. *Plasma Processes and Polymers*, 10(3), 262–270.
32. Linde, A. (1989). Dentin matrix proteins: composition and possible functions in calcification. *Calcified Tissue International*, 45(1), 55-62.
33. 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>
34. Marchesi, G., Frassetto, A., Mazzoni, A., Apolonio, F., Diolosà, M., Cadenaro, M., Di Lenarda, R., Pashley, D. H., Tay, F., & Breschi, L. (2014). Adhesive performance of a multi-mode adhesive system: 1-year in vitro study. *Journal of dentistry*, 42(5), 603–612. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.12.008>
35. 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.
36. McCreery, R. L. (2000). Raman spectroscopy for chemical analysis (1st ed.). Wiley. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/0471721646>
37. Mixson, J. M., Spencer, P., Moore, D. L., Chappell, R. P., & Adams, S. (1995). Surface morphology and chemical characterization of abrasion/erosion lesions. *American Journal of Dentistry*, 8(1), 5–9.

38. Mjör, I. A. (2009). Dentin permeability: The basis for understanding pulp reactions and adhesive technology. *Brazilian Dental Journal*, 20(1), 3-16. <https://doi.org/10.1590/s0103-64402009000100001>
39. Mokeem, L. S., Garcia, I. M., & Melo, M. A. (2023). Degradation and Failure Phenomena at the Dentin Bonding Interface. *Biomedicines*, 11(5), 1256. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11051256>
40. Murray, P. E., Stanley, H. R., Matthews, J. B., Sloan, A. J., & Smith, A. J. (2002). Age-related odontometric changes of human teeth. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 93(4), 474-482. <https://doi.org/10.1067/moe.2002.120974>
41. Nair, R. S., Babu, B., & Mushtaq, E. (2016). Cold atmospheric plasma in dentistry. *Journal of Operative Dentistry and Endodontics*, 1(2), 82–86.
42. Nakabayashi, N., & Saimi, Y. (1996). Bonding to intact dentin. *Journal of dental research*, 75(9), 1706–1715. <https://doi.org/10.1177/00220345960750091401>
43. Nakabayashi, N., & Takarada, K. (1992). Effect of HEMA on bonding to dentin. *Dental materials: official publication of the Academy of 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)
44. Nakabayashi, N., Kojima, K., & Masuhara, E. (1982). The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *Journal of biomedical materials research*, 16(3), 265–273. <https://doi.org/10.1002/jbm.820160307>
45. Nanci, A. (2003). Dentin-pulp complex. In A. Nanci (Ed.), *Ten Cate's Oral Histology: Development, structure, and function* (6th ed., pp. 165-204). Mosby.
46. Nanci, A. (2017). *Ten Cate's oral histology: Development, structure, and function* (9th ed.). Elsevier.

47. Navarra, C. O., Cadenaro, M., Codan, B., Mazzoni, A., Sergo, V., De Stefano Dorigo, E., & Breschi, L. (2009). Degree of conversion and interfacial nanoleakage expression of three one-step self-etch adhesives. *European journal of oral sciences*, 117(4), 463–469. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2009.00654.x>
48. Park, S., Wang, D.H., Zhang, D., Romberg, E., & Arola, D. (2008). *Mechanical properties of human enamel as a function of age and location in the tooth*. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19(6), 2317-2324
49. Pashley, D. H. (1996). Dynamics of the pulpo-dentin complex. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 7(2), 104–133. <https://doi.org/10.1177/10454411960070020101>
50. Pashley, D. H., & Carvalho, R. M. (1997). Dentine permeability and dentine adhesion. *Journal of Dentistry*, 25(5), 355–372. [https://doi.org/10.1016/s0300-5712\(96\)00057-7](https://doi.org/10.1016/s0300-5712(96)00057-7)
51. Pashley, D. H., & Tay, F. R. (2001). Aggressiveness of contemporary self-etching adhesives. Part II: etching effects on unground enamel. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 17(5), 430–444. [https://doi.org/10.1016/s0109-5641\(00\)00104-4](https://doi.org/10.1016/s0109-5641(00)00104-4)
52. 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>
53. 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>
54. Perdigão, J. (2020). Current perspectives on dental adhesion:(1) Dentin adhesion - not there yet. *Japanese Dental Science Review*, 56(1), 190-207.

55. Perdigão, J., Lambrechts, P., van Meerbeek, B., Tomé, A. R., Vanherle, G., & Lopes, A. B. (1996). Morphological field emission-SEM study of the effect of six phosphoric acid etching agents on human dentin. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 12(4), 262–271. [https://doi.org/10.1016/s0109-5641\(96\)80033-9](https://doi.org/10.1016/s0109-5641(96)80033-9)
56. Perdigão, J., Muñoz, M. A., Sezinando, A., Luque-Martinez, I. V., Staichak, R., Reis, A., & Loguercio, A. D. (2014). Immediate adhesive properties to dentin and enamel of a universal adhesive associated with a hydrophobic resin coat. *Operative dentistry*, 39(5), 489–499. <https://doi.org/10.2341/13-203-LR>
57. Perdigão, J., Sezinando, A., & Monteiro, P. C. (2012). Laboratory bonding ability of a multi-purpose dentin adhesive. *American journal of dentistry*, 25(3), 153–158.
58. Pereira, J. C., Furuse, A. Y., Benetti, A. R., Hannas, A. R., Canova, G. C., Costa, L. C., ... & Ishikiriama, S. K. (2005). Proteção do complexo dentinopulpar. In *Dentística: filosofia, conceitos e prática clínica* (pp. 147-201).
59. Ranjan, R., Krishnamraju, P. V., Shankar, T., & Gowd, S. (2017). Nonthermal Plasma in Dentistry: An Update. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry*, 7(3), 71–75. https://doi.org/10.4103/jispcd.JISPCD_29_17
60. Ritter, A. V. (Ed.). (2019). *Sturdevant's art and science of operative dentistry* (7th ed.). Elsevier.
61. Ritts, A. C., Li, H., Yu, Q., Xu, C., Yao, X., Hong, L., & Wang, Y. (2010). Dentin surface treatment using a non-thermal argon plasma brush for interfacial bonding improvement in composite restoration. *European journal of oral sciences*, 118(5), 510–516. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2010.00761.x>

62. Sabatini, C., Andreana, S., & Wu, Z. (2013). Surface preparation and isotropic shear bond strength properties of superficial bovine dentin. *Open Journal of Stomatology*, 3(4), e35018. <https://doi.org/10.4236/ojst.2013.34046>
63. Shafer, W. G., Hine, M. K., & Levy, B. M. (1983). *A Textbook of Oral Pathology* (4th ed.). Saunders.
64. Shahmoradi, M., Bertassoni, L., Elfallah, H., & Swain, M. (2014). Fundamental structure and properties of enamel, dentin, and cementum. In M. V. Swain & J. W. A. Leeuwenburgh (Eds.), *Biomaterials in dentistry* (pp. 511-547). Elsevier.
65. Sonis, S. (2015). *Dental secrets* (4^a ed.). Elsevier.
66. Spencer, P., Wang, Y., Walker, M. P., Wieliczka, D. M., & Swafford, J. R. (2000). Interfacial chemistry of the dentin/adhesive bond. *Journal of dental research*, 79(7), 1458–1463. <https://doi.org/10.1177/00220345000790070501>
67. Spencer, P., Ye, Q., Park, J., Misra, A., Bohaty, B. S., Singh, V., Sene, F., Eslick, J., Camarda, K., & Katz, J. L. (2012). Durable bonds at the adhesive/dentin interface: an impossible mission or simply a moving target? *Brazilian Dental Science*, 15(1), 4-18.
68. 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>
69. 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>

70. Strazzi-Sahyon, H. B., Suzuki, T. Y. U., Lima, G. Q., Delben, J. A., Cadorin, B. M., Nascimento, V. D., Duarte, S., & Santos, P. H. D. (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>
71. Swift, E. J., Jr, Perdigão, J., & Heymann, H. O. (1995). Bonding to enamel and dentin: a brief history and state of the art, 1995. *Quintessence international (Berlin, Germany: 1985)*, 26(2), 95–110.
72. Tagami, J., Hosoda, H., Burrow, M. F., & Nakajima, M. (1992). Effect of aging and caries on dentin permeability. *Proceedings of the Finnish Dental Society*, 88(Suppl 1), 149–154.
73. Tay, F. R., Pashley, D. H., Suh, B. I., Carvalho, R. M., & Itthagarun, A. (2002). Single-step adhesives are permeable membranes. *Journal of dentistry*, 30(7-8), 371–382. [https://doi.org/10.1016/s0300-5712\(02\)00064-7](https://doi.org/10.1016/s0300-5712(02)00064-7)
74. Temel, U. B., Kam Hepdeniz, O., & Gulec, A. (2023). Evaluation of the bonding effectiveness of a universal adhesive to the plasma-activated dentin surface. *European journal of oral sciences*, 131(1), e12914. <https://doi.org/10.1111/eos.12914>
75. Tezvergil-Mutluay, A., Pashley, D., & Mutluay, M. M. (2015). Long-term durability of dental adhesives. *Current Oral Health Reports*, 2(4), 174–181. <https://doi.org/10.1007/s40496-015-0070-y>
76. Tsuda, H., & Arends, J. (1997). Raman spectroscopy in dental research: a short review of recent studies. *Advances in dental research*, 11(4), 539–547. <https://doi.org/10.1177/08959374970110042301>

77. Vaidyanathan, T. K., & Vaidyanathan, J. (2009). Recent advances in the theory and mechanism of adhesive resin bonding to dentin: a critical review. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, 88(2), 558–578. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31253>
78. Valizadeh, S., Farhadi, E., Moradi, A., & Hashemikamangar, S. S. (2021). Evaluation of the effect of cold plasma treatment on the microshear bond strength of composite resin restorations to dentin using different adhesive systems and the effect of thermocycling. *Open Dent J.*, 15(1), 734–741.
79. Van Meerbeek, B., & Yoshihara, K. (2014). Clinical recipe for durable dental bonding: why and how?. *The journal of adhesive dentistry*, 16(1), 94. <https://doi.org/10.3290/j.jad.a31652>
80. Van Meerbeek, B., Braem, M., Lambrechts, P., & Vanherle, G. (1994). Morphological characterization of the interface between resin and sclerotic dentine. *Journal of dentistry*, 22(3), 141–146. [https://doi.org/10.1016/0300-5712\(94\)90197-x](https://doi.org/10.1016/0300-5712(94)90197-x)
81. Van Meerbeek, B., De Munck, J., Yoshida, M., Inoue, S., Vargas, M., Vijay, P., Van Landuyt, K., Lambrechts, P., & Vanherle, G. (2003a). Enamel etching and bonding. *American Journal of Dentistry*, 16(2), 91-103.
82. Van Meerbeek, B., De Munck, J., Yoshida, Y., Inoue, S., Vargas, M., Vijay, P., Van Landuyt, K., Lambrechts, P., & Vanherle, G. (2003b). Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Operative dentistry*, 28(3), 215–235.
83. 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>

84. Van Meerbeek, B., Yoshihara, K., Yoshida, Y., Mine, A., De Munck, J., & Van Landuyt, K. L. (2011). State of the art of self-etch adhesives. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*, 27(1), 17–28. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2010.10.023>
85. Wang, Y., & Spencer, P. (2002). Quantifying adhesive penetration in adhesive/dentin interface using confocal Raman microspectroscopy. *Journal of biomedical materials research*, 59(1), 46–55. <https://doi.org/10.1002/jbm.1215>
86. Yiu, C. K., García-Godoy, F., Tay, F. R., Pashley, D. H., Imazato, S., King, N. M., & Lai, S. C. (2002). A nanoleakage perspective on bonding to oxidized dentin. *Journal of dental research*, 81(9), 628–632. <https://doi.org/10.1177/154405910208100910>
87. Yoshida, Y., Yoshihara, K., Hayakawa, S., Nagaoka, N., Okihara, T., Matsumoto, T., Minagi, S., Osaka, A., Van Landuyt, K., & Van Meerbeek, B. (2012). HEMA inhibits interfacial nano-layering of the functional monomer MDP. *Journal of dental research*, 91(11), 1060–1065. <https://doi.org/10.1177/0022034512460396>
88. Yoshida, Y., Yoshihara, K., Nagaoka, N., Hayakawa, S., Torii, Y., Ogawa, T., Osaka, A., & Meerbeek, B. V. (2012). Self-assembled Nano-layering at the Adhesive interface. *Journal of dental research*, 91(4), 376–381. <https://doi.org/10.1177/0022034512437375>
89. Yoshihara, K., Nagaoka, N., Yoshida, Y., Van Meerbeek, B., & Hayakawa, S. (2019). Atomic level observation and structural analysis of phosphoric-acid ester interaction at dentin. *Acta biomaterialia*, 97, 544–556. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.08.029>
90. Yoshihara, K., Yoshida, Y., Hayakawa, S., Nagaoka, N., Torii, Y., Osaka, A., Suzuki, K., Minagi, S., Van Meerbeek, B., & Van Landuyt, K. L. (2011). Self-etch monomer-calcium salt deposition on dentin. *Journal of dental research*, 90(5), 602–606. <https://doi.org/10.1177/0022034510397197>

91. Zhang, Y., & Wang, Y. (2012). Improved degree of conversion of model self-etching adhesives through their interaction with dentine. *Journal of dentistry*, 40(1), 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2011.10.004>
92. 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>
93. Zou, Y., Armstrong, S. R., & Jessop, J. L. (2006). Using Raman spectroscopy to determine adhesive distribution in hybrid layer of dental bonding. *Journal of Biomedical Optics*, 11(4), 044011.
94. Zou, Y., Armstrong, S. R., & Jessop, J. L. (2010). Quantitative analysis of adhesive resin in the hybrid layer using Raman spectroscopy. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 94(1), 288–297. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32692>

VIII. ANEXOS

Anexo 1- Instruções do Fabricante

Adesivo Universal Prime&Bond active®

Prime&Bond active®
Universal Adhesive

⚠

Caution, consult
Instructions for Use

20 sec.
Agitate
slightly

≥ 5 sec.
Remove
solvent

Cure
≥ 550 mW/cm²: 20 sec.
≥ 800 mW/cm²: 10 sec.

Dentsply DeTrey GmbH
De-Trey-Str. 1
78467 Konstanz
GERMANY
www.dentsplysirona.com
© 2024 Dentsply Sirona, Inc.

Dentsply
Sirona
Prime&Bond
active®
Universal Adhesive
Powder 606.67346

THE DENTAL
SOLUTIONS
COMPANY™

Dentsply
Sirona

Step-by-step instructions:

1

Preparation

Pull off originality seal.

2

Preparation

Flip Top Bottle can be opened and closed with one hand. Do not screw off the cap.

3

Preparation

Dispense Prime&Bond active® into a CliXdish™. In a closed CliXdish™ Prime&Bond active® remains usable for up to 30 minutes.

4

Preparation

To close the bottle, press down the cap until it locks in place with a perceptible "click".

5

Cleaning & Disinfection

Disassemble CliXdish™ for reprocessing.

OR

6

Single Unit Dose

Grasp container at each end, placing thumb along center score. Firmly apply pressure until container separates.

7

Single Unit Dose

Insert applicator into opening to saturate Applicator Tip.

8

Etching

Start etching at enamel margins.

9

Etching

Extend to dentin.

10

Rinsing

Remove acid gel and rinse.

11

Application

Remove excess water. Do not desiccate!

12

Application

Apply Prime&Bond active® to all cavity surfaces. Avoid pooling.

13

Application

Keep Prime&Bond active® slightly agitated for 20 seconds.

14

Evaporation

Evaporate solvent with air for at least 5 seconds.

15

Light-curing

≥ 550 mW/cm²=20 s
≥ 800 mW/cm²=10 s

Anexo 2- Instruções do Fabricante

Adesivo 3M™ Scotchbond™ Universal Plus



Apply with agitation for 20 seconds



Air dry for at least 5 seconds until adhesive does not move anymore.



Light-cure for 10 seconds
No light-cure is needed when using with 3M™ RelyX™ Universal Cement

Anexo 3- Parecer de Laboratório

agir

Home

+

Menu

Link

Relógio

Beatriz Salgueiro

PT-145/23 Proposta de Tese registada por Beatriz Salgueiro a 03/10/2023

Workflow

Proposta de Tese

Tipo Proposta de Tese

Data de Emissão 03/10/2023

Formulário de submissão

Dados dos orientadores

Documentos para Comissão de Ética

Parecer Orientação

ROT

Direção Clínica

Direção de Laboratórios

PCC

PC

Comissão de Ética

Lista de pareceres dos Laboratórios

Tipo de parecer	Laboratório	Link	Atual	Estado
Parecer Laboratório	Mário Polido	Ver PL	Sim	Parecer positivo

Aprovado

INÍCIO

Submissão de pedido de proposta de tese

Parecer Orientação - Proposta de Tese

Parecer do ROT - Proposta de Tese

Aprovação de Custos

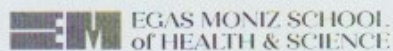
Aprovação da Direção Clínica - Proposta de Tese

Aprovação da Direção de Laboratórios - Proposta de Tese

Aprovação PCC - Proposta de Tese

Aprovação PC - Proposta de Tese

Anexo 4- Parecer da Comissão de Ética



EGAS MONIZ SCHOOL
OF HEALTH & SCIENCE

Comissão de Ética EGAS MONIZ

Proc. Interno nº 1357

PT-145/23

Ex.ma Senhora

Beatriz Pires Salgueiro

Monte de Caparica, 25 de janeiro de 2024.

Ex.ma Senhora,

Em resposta ao Pedido de Parecer que submeteu à apreciação da Comissão de Ética da Egas Moniz, com o tema denominado: **"Efeito do PTNA na interface adesiva promovida por um sistema adesivo universal: análise em Microespectroscopia de Raman"**, foi aprovado.

A Presidente da Comissão de Ética da Egas Moniz

Profª Doutora Cidália de Castro