

Universidade de Lisboa
Faculdade de Medicina Dentária



**Estudo da Morfologia da Camada Híbrida e da
Nanoinfiltração de um Sistema Adesivo Universal**

Nádia Sofia Justino Oliveira

Dissertação

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

2014

Universidade de Lisboa
Faculdade de Medicina Dentária



**Estudo da Morfologia da Camada Híbrida e da
Nanoinfiltração de um Sistema Adesivo Universal**

Nádia Sofia Justino Oliveira

Dissertação orientada pela Prof. Doutora Sofia Arantes e Oliveira

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

2014

Agradecimentos

A todos os que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

À minha orientadora, Professora Doutora Sofia Arantes e Oliveira, pela disponibilidade, incentivo e bom humor constantes. Agradeço ainda todo o conhecimento transmitido ao longo da realização desta dissertação.

À Dra. Filipa Chasqueira, pelo tempo e apoio disponibilizados na execução laboratorial, e por responder prontamente a todas as dúvidas que foram surgindo.

Ao Dr. Telmo Nunes, da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, onde foram realizadas parte das análises microscópicas.

A todos os docentes e funcionários da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa, que contribuíram para a minha formação pessoal e profissional.

À Sara, Carolina e Letícia, que me acompanharam de perto no laboratório durante a execução deste trabalho, mas também pela amizade demonstrada ao longo destes anos.

A todos os meus colegas e principalmente à Rita, Edna, Joana e Tânia, que me acompanharam desde o primeiro ano, e que foram partilhando os bons e maus momentos.

A todos os meus amigos pela amizade, incentivo e momentos passados.

À minha família, principalmente aos meus pais e irmã, por terem sempre acreditado em mim e me terem feito o que sou hoje, e por me terem ensinado que desistir não é opção.

À minha Avó Maria.

Resumo

Objetivo: Caracterizar a morfologia da camada híbrida e quantificar a nanoinfiltração originada por um sistema adesivo universal utilizado com as estratégias de adesão *self-etch* (SE) e *etch&rinse* (ER).

Materiais e Métodos: 36 molares foram divididos em três grupos (A – sistema adesivo; B – sistema adesivo e camada de resina hidrófoba; C – sistema adesivo e camada de resina hidrófoba sujeitos a pressão pulpar de 77 cmH₂O), e dentro destes, em quatro subgrupos, de acordo com o sistema adesivo estudado: Easybond, Scotchbond 1XT, e Futurabond U utilizado como SE e ER ($n=3$). Após aplicação do sistema adesivo e restauração com resina composta, os espécimes foram seccionados longitudinalmente, sendo metade dos hemi-discos preparados para caracterização de camada híbrida, e outra metade preparados para visualização de nanoinfiltração. A percentagem de nanoinfiltração foi medida na interface, e os dados obtidos foram sujeitos a testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney com uma significância de 5%.

Resultados: A camada híbrida não foi identificável na maioria dos grupos, nomeadamente nos SE. Nestes observam-se poucos prolongamentos de resina, em oposição aos ER. Nos grupos A e B não são identificadas diferenças, mas no grupo C estas observam-se na estrutura da interface. A nanoinfiltração, observada em todos os grupos e subgrupos, foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$) apenas entre os subgrupos do Grupo B. A comparação entre grupos mostrou diferenças entre Grupo A e B e entre Grupos B e C.

Conclusões: A camada híbrida é apenas visível nos sistemas ER, não apresentando diferenças após aplicação da camada de resina hidrófoba. Quando aplicada pressão pulpar, surgem defeitos na camada híbrida e adesiva. De todos os espécimes avaliados, só num (Futurabond SE; grupo B) não foi detetada nanoinfiltração. A nanoinfiltração diminui com a aplicação de uma camada de resina hidrófoba e aumenta com a pressão pulpar.

Palavras-chave: sistema adesivo universal, camada híbrida, nanoinfiltração; microscópio eletrónico de varrimento.

Abstract

Objective: The purpose of this study is to characterize the morphology of the hybrid layer and quantify nanoleakage caused by a universal adhesive system with different etching modes: self-etch (SE) and etch & rinse (ER).

Materials and Methods: 36 molars were divided into three groups (A - adhesive system, B - adhesive system and hydrophobic resin layer; C - adhesive system and hydrophobic resin layer with 77 cmH₂O pulpal pressure), and within these, in four subgroups, according to the adhesive system studied: Easybond, Scotchbond 1XT and Futurabond U used as ER and SE ($n = 3$). After application of the adhesive system and composite, the specimens were longitudinally sectioned, with half of the hemi-discs prepared for hybrid layer characterization, and another half prepared for nanoleakage. The nanoleakage was measure in the interface, and the data were subjected to non-parametric Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests. Statistical testing was performed at a 0.05 level of significance.

Results: The hybrid layer was not identified in most groups, particularly in the SE. These showed few resin tags, as opposed to the ER. No differences were identified between groups A and B, but they were observed in group C, in the interface's structure. Nanoleakage was statistically different ($p < 0.05$) only between subgroups of Group B. There were significant differences between Group A and B and between B and C.

Conclusions: Hybrid layer is only visible in the ER systems; there are no significant differences when hydrophobic resin layer is applied. Under pulpal pressure, the hybrid and adhesive layer show morphological defects. Futurabond U in the SE mode was the only one that yielded a specimen without nanoleakage, in group B. The nanoleakage decreases with the application of a hydrophobic resin layer and increases under pulpal pressure.

Keywords: universal adhesive system, hybrid layer, nanoleakage; scanning electron microscopy.

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	iii
Abstract	v
Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas.....	xiii
Abreviaturas	xiv
Símbolos.....	xiv
Unidades.....	xiv
1. Introdução	1
2. Objetivos	8
3. Materiais e Métodos.....	10
3.1. Delineamento Experimental.....	10
3.2. Materiais.....	11
3.3. Preparação dos espécimes	12
3.4. Caracterização morfológica da interface dentina-adesivo	13
3.5. Avaliação do grau de nanoinfiltração.....	14
3.6. Análise estatística.....	16
4. Resultados	17
4.1. Caracterização Morfológica da interface dentina-adesivo	17
4.2. Avaliação do grau de nanoinfiltração.....	22
5. Discussão	25
6. Conclusões	30
Referências Bibliográficas	I
Anexo A – Figuras	VIII
Anexo B – Tabelas	XVII

Lista de Figuras

Figura 1 - Esquema de preparação dos espécimes.	10
Figura 2 - Imagem obtida em SEM para o sistema adesivo Futurabond SE (A) – Grupo A: aplicação do sistema adesivo em estudo; (B) – Grupo B: com aplicação de camada de resina hidrófoba após sistema adesivo; (C) – Grupo C: aplicação de sistema adesivo e camada de resina hidrófoba com pressão pulpar; 1 – Ampliação 500x; 2 – Ampliação 2000x; 3 – Ampliação 5000x; 4 – Ampliação 10000x.....	18
Figura 3 - Imagem obtida em SEM para o sistema adesivo Futurabond ER (A) – Grupo A: aplicação do sistema adesivo em estudo; (B) – Grupo B: com aplicação de camada de resina hidrófoba após sistema adesivo; (C) – Grupo C: aplicação de sistema adesivo e camada de resina hidrófoba com pressão pulpar; 1 – Ampliação 500x; 2 – Ampliação 2000x; 3 – Ampliação 5000x; 4 – Ampliação 10000x.....	19
Figura 4 - Imagem obtida em SEM para o sistema adesivo Easybond (A) – Grupo A: aplicação do sistema adesivo em estudo; (B) – Grupo B: com aplicação de camada de resina hidrófoba após sistema adesivo; (C) – Grupo C: aplicação de sistema adesivo e camada de resina hidrófoba com pressão pulpar; 1 – Ampliação 500x; 2 – Ampliação 2000x; 3 – Ampliação 5000x; 4 – Ampliação 10000x.....	20
Figura 5 - Imagem obtida em SEM para o sistema adesivo Scotchbond 1XT (A) – Grupo A: aplicação do sistema adesivo em estudo; (B) – Grupo B: com aplicação de camada de resina hidrófoba após sistema adesivo; (C) – Grupo C: aplicação de sistema adesivo e camada de resina hidrófoba com pressão pulpar; 1 – Ampliação 500x; 2 – Ampliação 2000x; 3 – Ampliação 5000x; 4 – Ampliação 10000x.	21
Figura 6 - Imagens de SEM no Grupo C: aplicação de sistema adesivo e camada de resina hidrófoba com pressão pulpar; Ampliação 500x; a – Futurabond SE; b – Futurabond ER; c – Scotchbond 1XT.	22
Figura 7 - Média das percentagens de nanoinfiltração na interface da camada híbrida por sistema adesivo.....	23
Figura 8 - Média das percentagens de nanoinfiltração na interface da camada híbrida por grupo; letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em estudo.	24

Figura A. 1 - Imagem de SEM para o sistema adesivo Futurabond SE. (A) – Grupo A: aplicação de um dos sistemas adesivos em estudo; (B) – Grupo B: aplicação de um dos sistemas adesivos seguido de camada de resina hidrófoba; (C) – Grupo C: aplicação de um dos sistemas adesivos sobre pressão pulpar seguido de camada de resina hidrófoba; (1) – Espécime 1; (2) – Espécime 2; Ampliação 500x..... IX

Figura A. 2 - Imagem de SEM para o sistema adesivo Futurabond ER; (A) – Grupo A: aplicação de um dos sistemas adesivos em estudo; (B) – Grupo B: aplicação de um dos sistemas adesivos seguido de camada de resina hidrófoba; (C) – Grupo C: aplicação de um dos sistemas adesivos sobre pressão pulpar seguido de camada de resina hidrófoba; (1) – Espécime 1; (2) – Espécime 2; Ampliação 500x..... IX

Figura A. 3 - Imagem de SEM para o sistema adesivo Easybond; (A) – Grupo A: aplicação de um dos sistemas adesivos em estudo; (B) – Grupo B: aplicação de um dos sistemas adesivos seguido de camada de resina hidrófoba; (C) – Grupo C: aplicação de um dos sistemas adesivos sobre pressão pulpar seguido de camada de resina hidrófoba; (1) – Espécime 1; (2) – Espécime 2; Ampliação 500x..... X

Figura A. 4 - Imagem de SEM para o sistema adesivo Scotchbond 1XT; (A) – Grupo A: aplicação de um dos sistemas adesivos em estudo; (B) – Grupo B: aplicação de um dos sistemas adesivos seguido de camada de resina hidrófoba; (C) – Grupo C: aplicação de um dos sistemas adesivos sobre pressão pulpar seguido de camada de resina hidrófoba; (1) – Espécime 1; (2) – Espécime 2; Ampliação 500x. XI

Figura A. 5 - Reconstrução de imagens de SEM com elétrons retrodifundidos para cálculo de percentagem de nanoinfiltração para o sistema adesivo Futurabond SE do grupo A: aplicação de um dos sistemas adesivos em estudo; (1) – Espécime 1; (2) – Espécime 2; (3) – Espécime 3; Ampliação 75x..... XI

Figura A. 6 - Reconstrução de imagens de SEM com elétrons retrodifundidos para cálculo de percentagem de nanoinfiltração para o sistema adesivo Futurabond ER do grupo A: aplicação de um dos sistemas adesivos em estudo; (1) – Espécime 1; (2) – Espécime 2; (3) – Espécime 3; Ampliação 75x..... XII

Figura A. 7 - Reconstrução de imagens de SEM com elétrons retrodifundidos para cálculo de percentagem de nanoinfiltração para o sistema adesivo Easybond do grupo A: aplicação de um dos sistemas adesivos em estudo; (1) – Espécime 1; (2) – Espécime 2; (3) – Espécime 3; Ampliação 75x. XII

Figura A. 8 - Reconstrução de imagens de SEM com elétrons retrodifundidos para cálculo de percentagem de nanoinfiltração para o sistema adesivo Scotchbond 1XT do grupo A: aplicação de um dos sistemas adesivos em estudo; (1) – Espécime 1; (2) – Espécime 2; (3) – Espécime 3; Ampliação 75x.....XIII

Figura A. 9 - Reconstrução de imagens de SEM com elétrons retrodifundidos para cálculo de percentagem de nanoinfiltração para o sistema adesivo Futurabond SE do grupo B: aplicação de um dos sistemas adesivos seguido de camada de resina hidrófoba; (1) – Espécime 1; (2) – Espécime 2; (3) – Espécime 3; Ampliação 75x.....XIII

Figura A. 10 - Reconstrução de imagens de SEM com elétrons retrodifundidos para cálculo de percentagem de nanoinfiltração para o sistema adesivo Futurabond ER do grupo B: aplicação de um dos sistemas adesivos seguido de camada de resina hidrófoba; (1) – Espécime 1; (2) – Espécime 2; (3) – Espécime 3; Ampliação 75x..... XIV

Figura A. 11 – Reconstrução de imagens de SEM com elétrons retrodifundidos para cálculo de percentagem de nanoinfiltração para o sistema adesivo Easybond do grupo B: aplicação de um dos sistemas adesivos seguido de camada de resina hidrófoba; (1) – Espécime 1; (2) – Espécime 2; (3) – Espécime 3; Ampliação 75x. XIV

Figura A. 12 - Reconstrução de imagens de SEM com elétrons retrodifundidos para cálculo de percentagem de nanoinfiltração para o sistema adesivo Scotchbond 1XT do grupo B: aplicação de um dos sistemas adesivos seguido de camada de resina hidrófoba; (1) – Espécime 1; (2) – Espécime 2; (3) – Espécime 3; Ampliação 75x.....XV

Figura A. 13 - Reconstrução de imagens de SEM com elétrons retrodifundidos para cálculo de percentagem de nanoinfiltração para o sistema adesivo Futurabond SE do grupo C: aplicação de um dos sistemas adesivos sobre pressão pulpar seguido de camada de resina hidrófoba; (1) – Espécime 1; (2) – Espécime 2; (3) – Espécime 3; Ampliação 75x.....XV

Figura A. 14 - Reconstrução de imagens de SEM com elétrons retrodifundidos para cálculo de percentagem de nanoinfiltração para o sistema adesivo Futurabond ER do grupo C: aplicação de um dos sistemas adesivos sobre pressão pulpar seguido de camada de resina hidrófoba; (1) – Espécime 1; (2) – Espécime 2; (3) – Espécime 3; Ampliação 75x.....XV

Figura A. 15 – Reconstrução de imagens de SEM com elétrons retrodifundidos para cálculo de percentagem de nanoinfiltração para o sistema adesivo Easybond do grupo C:

aplicação de um dos sistemas adesivos sobre pressão pulpar seguido de camada de resina hidrófoba; (1) – Espécime 1; (2) – Espécime 2; (3) – Espécime 3; Ampliação 75x..... XVI

Figura A. 16 - Reconstrução de imagens de SEM com elétrons retrodifundidos para cálculo de percentagem de nanoinfiltração para o sistema adesivo Scotchbond 1XT do grupo C: aplicação de um dos sistemas adesivos sobre pressão pulpar seguido de camada de resina hidrófoba; (1) – Espécime 1; (2) – Espécime 2; (3) – Espécime 3; Ampliação 75x..... XVI

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Composição e modo de aplicação dos diferentes materiais utilizados.....	11
Tabela 2 - Média e desvio-padrão da área de nanoinfiltração na interface da camada híbrida por sistema adesivo, respetivamente a cada grupo.....	22
Tabela B. 1 - Estatística descritiva da percentagem de nanoinfiltração para cada grupo e subgrupo.	XVIII
Tabela B. 2 - Testes de Kolmogorov-Smirnov para avaliação da normalidade da distribuição de valores.....	XIX
Tabela B. 3 - Testes de Levene para avaliação de homogeneidade.....	XX
Tabela B. 4 - Teste de Kruskal-Wallis para análise de nanoinfiltração entre sistemas adesivos estudados para cada grupo de estudo.	XX
Tabela B. 5 -Teste de Kruskal-Wallis para análise de nanoinfiltração entre grupos com ou sem aplicação de resina hidrófoba e com e sem pressão pulpar.....	XXI
Tabela B. 6 -Teste de Mann-Whitney para análise de nanoinfiltração entre sistemas adesivos para o grupo de estudo B (com aplicação de camada de resina hidrófoba).	XXII
Tabela B. 7 - Teste de Mann-Whitney para análise de nanoinfiltração entre grupos com e sem pressão pulpar para cada sistema adesivo.	XXIII

Abreviaturas

ER – *etch&rinse*

SE – *self-etch*

HEMA – 2-hidroxiethyl metacrilato

MDP – monómero metacriloxidecil fosfato (*10-methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate monomer*)

TEM – microscópio eletrónico de transmissão (*transmission electron microscope*)

SEM – microscópio eletrónico de varrimento (*scanning electron microscope*)

Bis-GMA – Bisfenol glicidil metacrilato

CQ – Canforoquinona

HEDMA – Polimetileno dimetacrilato

UDMA – Uretano dimetacrilato

TEGDMA – Trietileno glicol dimetacrilato

LED – diódo emissor de luz (*light-emitting diode*)

Símbolos

% – percentagem

pH – potencial de hidrogénio

n – tamanho da amostra

p – significância estatística

Unidades

cmH₂O – unidade de pressão (centímetros de água)

µm – unidade de medida (micrómetros)

°C – unidade de temperatura (graus Celsius)

nm – unidade de medida (nanómetros)

mm – unidade de medida (milímetros)

mW/cm² – unidade de intensidade de radiação (microwatt por centímetro quadrado)

h – unidade de tempo (horas)

M – unidade de concentração (molar – mol/dm³)

ml – unidade de volume (mililitros)

kV – unidade de tensão elétrica (quilovolts)

1. Introdução

A tecnologia adesiva sofreu uma grande evolução desde a sua introdução no mercado há mais de 50 anos. O maior desafio para os sistemas adesivos é fornecer uma qualidade de adesão semelhante em dois tecidos dentários de diferente natureza (Van Meerbeek et al., 2003). Apesar da adesão ao esmalte ter sido provada como durável e estável (Cardoso et al., 2011), devido à natureza mais heterogénea da dentina, a adesão a este substrato é mais complexa e aparentemente só pode ser alcançada quando são aplicados procedimentos mais complexos e morosos (Van Meerbeek et al., 2006). Adicionalmente, a dentina encontra-se intimamente conectada com o tecido pulpar através dos túbulos dentinários, por onde circula, em dentes vitais, o fluido dentinário, que se encontra sobre pressão externa constante, estimada em aproximadamente 77 cmH₂O (Brown, Yankowitz, 1964; Ciucchi et al., 1995; Sauro et al., 2007; Hiraishi et al., 2009). Este fator torna húmida e consequentemente hidrofílica a superfície da dentina exposta (Cardoso et al., 2008; Pashley, 1992).

Assim, a técnica adesiva é frequentemente considerada como tecnicamente sensível. O mínimo erro no procedimento de aplicação do sistema adesivo pode resultar em degradação marginal, descoloração e perda de retenção (Gaengler et al., 2004; Opdam et al., 2004). Existe, desta forma, uma grande procura por sistemas adesivos tecnicamente menos sensíveis e simples de utilizar, o que leva os fabricantes a desenvolver novos adesivos a um ritmo elevado (Van Meerbeek et al., 2011).

O processo de adesão consiste essencialmente na substituição de minerais removidos dos tecidos dentários duros por monómeros de resina, de tal forma que o polímero se torne micro-mecanicamente interligado com o substrato dentário (Nakabayashi, Kojima, Masuhara, 1982).

Os sistemas adesivos atuais dividem-se em *etch&rinse* (ER) e *self-etch* (SE), consoante a sua forma de interação com o tecido dentário: os sistemas ER removem a *smear-layer* (camada de resíduos na superfície de dentina resultante da instrumentação dos tecidos dentários) através da aplicação de um ácido (Pashley, 1992), enquanto os sistemas SE a modificam, mantendo-a como substrato para a adesão (Van Landuyt et al., 2007).

Os sistemas adesivos ER encontram-se disponíveis em dois ou três passos. Os de três passos são os mais tradicionais, e consistem na aplicação de um ácido ou

condicionador, seguido de um *primer* e posteriormente um agente adesivo. O passo mais crítico destes sistemas é o passo do *primer* (Van Meerbeek et al., 2003), que contém monómeros específicos com capacidades hidrofílicas, tal como o 2-hidroxietil metacrilato (HEMA), que se encontra dissolvido em solventes orgânicos, como a acetona, álcool e água. Enquanto o HEMA é responsável pelo aumento de molhabilidade e promoção da expansão da rede de colagénio, os solventes removem a água da superfície dentinária, preparando a dentina para o passo seguinte, que consiste na aplicação de uma camada de resina hidrófoba, a qual irá penetrar por entre as fibrilhas de colagénio (Nakabayashi, 2003).

Os sistemas ER de dois passos combinam o segundo e terceiro passo num só líquido sendo por isso mais hidrofílicos. São sistemas simplificados como resposta à dificuldade e morosidade da técnica de aplicação do sistema ER de três componentes (Van Landuyt et al., 2007). Estes sistemas ER são ainda considerados como os mais eficazes e estáveis para a adesão ao esmalte, uma vez que requerem apenas dois passos: o condicionamento ácido, responsável pela dissolução dos cristais de hidroxiapatite (geralmente através de ácido ortofosfórico com concentração entre 30 e 40%, durante 15 segundos) (Peumans et al., 2005), criando-se assim microrugosidades que serão posteriormente preenchidas pelo adesivo (Van Meerbeek et al., 2003). Na dentina, este tratamento ácido é responsável pela exposição de uma rede superficial microporosa de colagénio que é praticamente desprovida de hidroxiapatite. Desta forma, o mecanismo de adesão dos sistemas ER à dentina depende da hibridização ou infiltração de prolongamentos de resina na rede de fibrilhas de colagénio. Este processo leva à formação de uma camada híbrida, a qual é idealmente caracterizada por apresentar uma rede tridimensional de polímero e colagénio que fornece uma ligação estável e contínua entre adesivo e estrutura dentinária, sendo por isso responsável pela adesão (Spencer et al., 2010, Nakabayashi, Kojima, Masuhara, 1982).

Não parece existir, no entanto, uma verdadeira ligação química entre estes sistemas adesivos e a dentina, uma vez que os grupos funcionais dos monómeros têm uma baixa afinidade para o colagénio (Van Meerbeek et al., 2003). Este facto, juntamente com a difícil penetração do monómero na rede de colagénio é, segundo Sano et al. (Sano et al., 1994; 1995), a principal razão para o fenómeno de nanoinfiltração. Por outro lado, o risco de colapso das fibras de colagénio após a desmineralização da

dentina leva também a nanoinfiltração e a perda de forças de adesão (Spencer, Swafford, 1999).

Os sistemas SE surgiram com o objetivo de simplificar o procedimento clínico e de ultrapassar algumas dificuldades sentidas pelos sistemas ER (Arantes-Oliveira, Chasqueira, 2013). Ao contrário dos sistemas ER, os sistemas adesivos SE não necessitam de um passo de condicionamento isolado. Como contêm monómeros acídicos, estes sistemas juntam no mesmo passo ácido e *primer* (sistema SE de dois passos), ou ácido, *primer* e adesivo (sistema SE de um passo, que pode ser dividido em sistemas de dois componentes, ou sistemas de um só componente) (Van Meerbeek et al., 2011).

Desta forma, a infiltração de resina nos sistemas SE ocorre simultaneamente com o processo de auto-condicionamento, evitando o colapso das fibras de colagénio, visto a humidade da dentina deixar de ser um aspeto fulcral (Schulze et al., 2005; Oliveira et al., 2004), o que torna estes sistemas adesivos tecnicamente menos sensíveis (Peumans et al., 2005, 2010). Como nestes sistemas adesivos a *smear-layer* não é completamente removida, os túbulos dentinários permanecem parcialmente obstruídos com *smear-layer*, estrutura denominada por *smear-plugs*, o que torna estes sistemas menos sujeitos aos efeitos negativos da pressão pulpar positiva (Itthagarun, Tay, 2000; Van Meerbeek et al., 1998), apresentando menor permeabilidade (Hashimoto, 2004) e estando por isso associados a uma menor sensibilidade pós-operatória (Perdigão, Geraldeli, Hodges, 2003; Unemori et al., 2004; Moszner, Salz, Zimmermann, 2005).

As características morfológicas da interface dentina-adesivo produzida pelos sistemas SE dependem da forma como os seus monómeros interagem com o substrato dentário (De Munck et al. 2005). A profundidade de interação dos sistemas adesivos SE no esmalte e dentina varia consoante o seu pH. Na dentina, os ultra-suaves ($\text{pH} > 2,5$) originam poucos nanómetros de profundidade, os suaves ($\text{pH} \approx 2$) originam cerca de $1\ \mu\text{m}$, os intermédios ($\text{pH} \leq 1$) são responsáveis por uma profundidade de 1 a $2\ \mu\text{m}$, e os fortes originam uma profundidade de interação de vários micrómetros (Van Meerbeek et al., 2011). Os prolongamentos de resina na dentina só são formados com os mais fortes; com os intermédios ou com os suaves, os *smear-plugs* podem ser ligeiramente desmineralizados e conseqüentemente infiltrados por resina (Van Meerbeek et al., 2011). Apenas os sistemas SE fortes são capazes de originar um padrão de desmineralização no esmalte mais próximo daquele que é formado pelos sistemas ER,

embora inferior (Van Landuyt et al., 2007; Van Meerbeek et al., 2011). Assim, o padrão de desmineralização originado pelos sistemas SE é menos retentivo que aquele que é obtido com o ácido fosfórico, o que resulta, segundo alguns autores, numa menor resistência adesiva ao esmalte (Perdigão, Geraldeli, 2003).

Desta forma, tem sido proposto um condicionamento seletivo do esmalte, prévio à aplicação do sistema adesivo SE (Van Meerbeek et al., 2005). Por outro lado, tem também sido sugerido que a dentina não seja condicionada com ácido de forma a evitar a incompleta impregnação de todo o colagénio exposto, o que iria resultar numa diminuição da qualidade de adesão, com consequente nanoinfiltração (Toledano et al., 2007; Van Meerbeek et al., 2005; Rengo et al., 2012; Peumans et al., 2010).

Apesar da fraca *performance* demonstrada pela maioria dos sistemas SE, certos sistemas têm mostrado melhor desempenho do que outros. Estes correspondem geralmente a sistemas SE que contêm o monómero metacriloxidecil fosfato (MDP) (Yoshida et al., 2004). Este monómero permite um aumento na estabilidade da adesão e torna possível a união química entre sistema adesivo e o tecido dentário, através de ligação iónica com o cálcio da hidroxiapatite e formação de estruturas na camada híbrida denominadas de nanocamadas (Peumans et al., 2005; Van Meerbeek et al., 2005; Peumans et al., 2010; Van Meerbeek et al., 2011). Esta ligação química parece ser importante no estabelecimento da interface dentina-adesivo ao longo do tempo (Van Meerbeek et al., 2011).

Tanto os sistemas adesivos ER de dois passos como os sistemas SE de um passo apresentam uma maior quantidade de monómeros hidrofílicos e de solventes, não contemplando uma camada de resina hidrófoba sobre a camada híbrida. A quantidade de solvente que permanece na interface adesiva é de grande importância, visto que um excedente de solvente enfraquece diretamente a integridade da adesão, fornece canais para nanoinfiltração e afeta a polimerização dos monómeros infiltrados. Para além disto, a interface torna-se mais hidrofílica, logo, com maior probabilidade de sofrer degradação hidrolítica (Tay et al., 2002; Tay, Pashley, Yoshiyama, 2002). Desta forma, a camada híbrida funciona nestes sistemas como uma membrana semipermeável, permitindo o movimento de água através da interface, mesmo após a polimerização, o que pode comprometer a adesão, levando à degradação desta mesma camada, através de um mecanismo de hidrólise (Tay, Pashley, 2003). Um dos métodos usados para evitar este problema é a aplicação de uma camada adicional de resina hidrófoba sobre a resina

adesiva (King et al., 2005). Esta resina hidrófoba tem como função aumentar a espessura e uniformidade da camada adesiva, assim como reduzir o fluxo de fluido dentinário proveniente da polpa através da interface adesiva (King et al., 2005; de Andrade e Silva et al., 2009), diminuindo o contacto dos monómeros do sistema adesivo com a água. Nos sistemas adesivos SE de um passo e nos sistemas ER de dois passos por vezes são observadas gotículas de fluido na transição entre a camada adesiva e o material de restauração, que resultam de um processo de osmose através da camada adesiva, processo este que ocorre bilateralmente através da camada adesiva (Tay et al., 2002, 2004; Van Landuyt et al., 2007; Sauro et al., 2009). Num estudo *in vitro* recente foi observado que aquando da colocação de uma camada de resina hidrófoba adicional, a adaptação marginal era maior em comparação com as amostras em que a camada de resina hidrófoba não era colocada (Pushpa, Suresh, 2010).

Recentemente surgiram novos sistemas adesivos, designados universais ou *multi-mode*, mais versáteis, que incluem as opções *etch&rinse*, *self-etch* e *self-etch* precedido de condicionamento seletivo do esmalte, combinando assim as vantagens dos adesivos *etch&rinse* em esmalte, com a aplicação simplificada dos *self-etch* em dentina, permitindo uma ligação química adicional aos cristais de apatite. Os fabricantes afirmam que estes sistemas adesivos, para além da capacidade de adesão ao esmalte e dentina, têm ainda a capacidade de promover a adesão em diversos materiais de restauração (Hanabusa et al., 2012; Perdigão, Sezinando, Monteiro, 2012). O condicionamento prévio com ácido fosfórico nos sistemas adesivos universais resultou, em alguns estudos, num aumento das forças de adesão ao esmalte (Goes, Shinohara, Freitas, 2014), porém, afetou negativamente a qualidade de hibridização da dentina (Hanabusa et al., 2012). Um estudo *in vitro* recente mostrou que um sistema adesivo universal aplicado como SE de dois passos, ou seja, com colocação de camada de resina hidrófoba sobre o *primer* ácido, resulta em forças de adesão superiores à dentina, bem como num maior grau de conversão quando comparado com outros sistemas adesivos universais simplificados (Munoz et al., 2013). Um outro estudo mostrou que a aplicação de uma camada de resina hidrófoba pode ser benéfica na técnica de condicionamento seletivo do esmalte, visto aumentar as forças de adesão ao esmalte quando aplicado com a estratégia ER, e à dentina, quando utilizada a estratégia SE (Perdigão et al., 2014).

Alguns adesivos universais contêm MDP na sua composição, sendo a ligação química que se forma entre o MDP e a hidroxiapatite responsável pela formação de uma

nanocamada estável, principalmente junto aos túbulos dentinários, onde o adesivo infiltrou a *smear-layer* residual, como referido anteriormente. No entanto, esta nanocamada parece ser menor do que a formada pelos sistemas SE, o que pode ser explicado pela diferença de concentrações de MDP (Yoshida et al., 2012).

Dois artigos clínicos recentes, com resultados a 6 e 18 meses, referem que o comportamento clínico de um sistema adesivo universal não depende da estratégia de adesão utilizada, ou seja, se é usado como SE ou ER (Mena-Serrano et al., 2013; Perdigão et al., 2013). Um outro artigo, *in vitro*, com resultados a 12 meses, refere que independentemente da estratégia de adesão utilizada, os resultados (força adesiva, grau de conversão e nanoinfiltração) em dentina foram em geral inferiores aos respetivos grupos controlo (SE e ER) (Munoz et al., 2013). Apesar destes resultados, existe ainda pouca informação na literatura acerca destes novos adesivos (Marchesi et al., 2014).

A nanoinfiltração é um fator importante para julgar a capacidade de selamento da interface por um material adesivo (Sano et al., 1995). Ao contrário da tradicional microinfiltração, que engloba as porosidades e defeitos da margem, a nanoinfiltração pode ter origem na deficiente infiltração de resina ou na extração de monómeros hidrofílicos polimerizados (Sano et al., 1995). A nanoinfiltração não ocorre apenas na camada híbrida, mas também na camada adesiva (Li, Burrow, Tyas, 2001). Um selamento incompleto leva a que o componente hidrofílico da resina quando incompletamente polimerizado seja extraído da camada híbrida e da camada adesiva a curto prazo, o que leva à exposição das fibras de colagénio, que são sucessivamente atacadas por enzimas, como as metaloproteinases detetadas principalmente após condicionamento da dentina com ácido fosfórico (Sano et al., 1999; Mazzoni et al., 2013). Vários estudos de microscopia eletrónica de transmissão (TEM) têm revelado diferentes padrões de nanoinfiltração (pontilhado, reticular e com canais de água) através do recurso ao nitrato de prata amoniacal (Tay, Pashley, Yoshiyama, 2002). O modo de eletrões retrodifundidos do microscópio eletrónico de varrimento (SEM) permite a produção de uma imagem com contraste de materiais, devido às diferenças do número atómico de cada elemento, sendo usado no estudo da nanoinfiltração para a deteção de partículas de prata (Sano et al., 1995; Li, Burrow, Tyas, 2000).

Tay et al. reportaram a existência de canais cheios de água (*water trees*), encontrados em muitos adesivos *all-in-one* e concluíram que as camadas adesivas dos sistemas de um passo atuavam como membranas permeáveis que permitiam que a água

se difundisse a partir da dentina. Os *self-etch* que têm um passo de adesão separado, com uma resina hidrófoba, demonstraram uma maior capacidade hidrofóbica da camada adesiva (Tay, 2003; Tay, 2002).

Vários estudos sobre forças de resistência adesiva referem a importância do uso da simulação de pressão pulpar durante a aplicação do sistema adesivo (Tao, Pashley, 1989; Ozok et al., 2004; Hebling et al., 2007). A utilização da pressão pulpar demonstrou que a humidade derivada do fluido pode influenciar a resistência de adesão e a capacidade dos sistemas em selarem a dentina (Ciucchi et al., 1995; Sauro et al., 2007; Hiraishi et al., 2009). Sendo que a maior parte dos procedimentos de técnica adesiva é realizada em dentes vitais, é importante o recurso à simulação da pressão pulpar, de forma a podermos aproximar os resultados obtidos *in vitro* aos obtidos na realidade clínica.

2. Objetivos

Este estudo experimental tem como objetivos gerais determinar se a morfologia da camada híbrida e a percentagem de nanoinfiltração originada por um sistema adesivo universal utilizado como *self-etch* e *etch&rinse* e por outros dois sistemas adesivos não universais (um *self-etch* e outro *etch&rinse*), são influenciadas pela aplicação de uma camada de resina hidrófoba sobre o sistema adesivo, e por uma pressão pulpar positiva.

Este objetivo geral foi concretizado nos seguintes objetivos específicos:

1 – Comparar a morfologia da camada híbrida promovida pelos diferentes sistemas adesivos estudados.

H₀: Não se verificam diferenças morfológicas na camada híbrida formada pelos sistemas adesivos estudados.

H₁: Verificam-se diferenças morfológicas na camada híbrida formada entre os sistemas adesivos estudados.

2 – Analisar a influência de uma camada de resina hidrófoba na morfologia da camada híbrida promovida pelos sistemas adesivos estudados.

H₀: A camada de resina hidrófoba não altera a morfologia da camada híbrida promovida pelos sistemas adesivos estudados.

H₁: A camada de resina hidrófoba altera a morfologia da camada híbrida promovida pelos sistemas adesivos estudados.

3 – Analisar a influência da pressão pulpar na morfologia da camada híbrida promovida pelos sistemas adesivos estudados, com uma camada de resina hidrófoba.

H₀: A pressão pulpar não altera a morfologia da camada híbrida promovida pelos sistemas adesivos estudados, com uma camada de resina hidrófoba.

H₁: A pressão pulpar altera a morfologia da camada híbrida promovida pelos sistemas adesivos estudados, com uma camada de resina hidrófoba.

4 – Comparar a percentagem de nanoinfiltração verificada com os sistemas adesivos estudados.

H₀: A percentagem de nanoinfiltração foi igual para todos os sistemas adesivos estudados.

H₁: Verificam-se diferenças na percentagem de nanoinfiltração entre os sistemas adesivos estudados.

5 – Comparar a percentagem de nanoinfiltração verificada com os sistemas adesivos estudados após a aplicação de uma camada de resina hidrófoba.

H₀: Após a aplicação de uma camada de resina hidrófoba, a percentagem de nanoinfiltração foi igual para todos os sistemas adesivos estudados.

H₁: Após a aplicação de uma camada de resina hidrófoba, a percentagem de nanoinfiltração foi diferente entre os sistemas adesivos estudados.

6 – Comparar a percentagem de nanoinfiltração verificada com os sistemas adesivos estudados após a aplicação de uma camada de resina hidrófoba e após a aplicação de pressão pulpar.

H₀: Após a aplicação de uma camada de resina hidrófoba, a percentagem de nanoinfiltração foi igual para todos os sistemas adesivos estudados com pressão pulpar.

H₁: Após a aplicação de uma camada de resina hidrófoba, a percentagem de nanoinfiltração foi diferente para os sistemas adesivos estudados com pressão pulpar.

7 – Analisar a influência de uma camada de resina hidrófoba na percentagem de nanoinfiltração dos sistemas adesivos estudados.

H₀: A percentagem de nanoinfiltração, após a aplicação de uma camada de resina hidrófoba, foi igual para todos os sistemas adesivos estudados.

H₁: Verificam-se diferenças na percentagem de nanoinfiltração, após a aplicação de uma camada de resina hidrófoba, entre os sistemas adesivos estudados.

8 – Analisar a influência da pressão pulpar na percentagem de nanoinfiltração dos sistemas adesivos estudados com uma camada de resina hidrófoba.

H₀: A percentagem de nanoinfiltração foi igual, após a aplicação de pressão pulpar, para todos os sistemas adesivos estudados com uma camada de resina hidrófoba.

H₁: A percentagem de nanoinfiltração foi diferente, após a aplicação de pressão pulpar, entre os sistemas adesivos estudados com uma camada de resina hidrófoba.

3. Materiais e Métodos

3.1. Delineamento Experimental

O estudo desenvolvido para este trabalho de dissertação foi um estudo experimental comparativo, *in vitro*, que pretendeu caracterizar a morfologia da camada híbrida e quantificar a nanoinfiltração originada por um sistema adesivo universal utilizado como *self-etch* e *etch&rinse* comparando com outros dois sistemas adesivos (um *self-etch* e outro *etch&rinse*), em situações experimentais diversas.

Foram utilizados 36 dentes molares humanos, não cariados, e armazenados em Cloramina T a 0,5% a uma temperatura de cerca de 4°C por um período máximo de 6 meses.

Após corte dos dentes em discos de dentina, os discos foram divididos em três grupos, de acordo com o protocolo a utilizar:

Grupo A: aplicação de um dos sistemas adesivos em estudo;

Grupo B: aplicação de um dos sistemas adesivos seguido de uma camada de resina hidrófoba;

Grupo C: aplicação de um dos sistemas adesivos quando o disco de dentina está submetido a pressão pulpar, seguido de uma camada de resina hidrófoba.

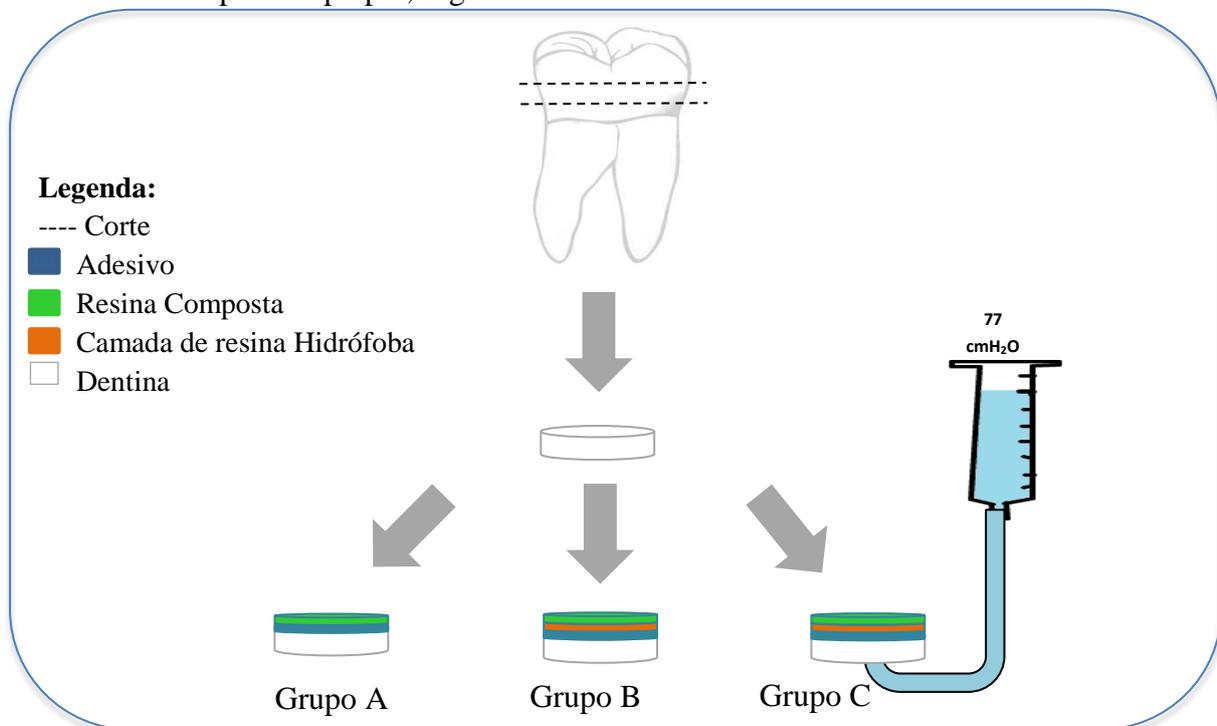


Figura 1 - Esquema de preparação dos espécimes.

3.2. Materiais

Neste estudo foram utilizados três sistemas adesivos: um universal, utilizado como *self-etch* e *etch&rinse*, um *self-etch* de um passo, e um *etch&rinse* de dois passos. A informação relativa aos materiais utilizados neste estudo está descrita na Tabela 1.

Material	Composição	Modo de aplicação
Easy Bond (3M ESPE, Alemanha) Lote: 453793 Validade: 10/2013	Bis-GMA, HEMA, ésteres fosfóricos metacrilados, 1,6 dimetacrilato hexanediol, metacrilatos funcionalizados, ácido polialquenoico, carga de sílica finamente dispersa com 7 nm, etanol, água, iniciadores baseados em canforoquinona (CQ), estabilizadores	Aplicar o adesivo 20 segundos; Secar 5 segundos; Fotopolimerizar 10 segundos:
Scotchbond 1XT (3M ESPE, EUA) Lote: N286534 Validade: 06/2014	Bis-GMA, HEMA, dimetacrilatos, etanol, água, fotoiniciador, copolímero funcional de metacrilato de ácidos poliacrílico e polialquenoico, 10% em peso de partículas esféricas de sílica de 5 nm de diâmetro	Ácido fosfórico a 35% na superfície dentária 15 segundos; Lavar durante 10 segundos; Secar com <i>pellet</i> de algodão; Aplicar o adesivo 15 segundos; secar 5 segundos; Fotopolimerizar 10 segundos:
Futurabond U <i>Singledose</i> (VOCO, Alemanha) Lote: 1308456 Validade: 05/2014	2-hidroxietil metacrilato, Bis-GMA, HEDMA, monômero adesivo ácido, Uretano Dimetacrilato (UDMA), catalisador, etanol, iniciador	Self-etch Aplicar o adesivo 20 segundos; secar 5 segundos; Fotopolimerizar 10 segundos: Etch&Rinse Ácido fosfórico a 35% na superfície dentária 15 segundos; Lavar durante 10 segundos; Secar com <i>pellet</i> de algodão; Aplicar o adesivo 20 segundos; secar 5 segundos; Fotopolimerizar 10 segundos:
GrandioSO (VOCO, Alemanha) Lote: 1049310 Validade: 07/2015	BISGMA (2.5-5%), TEGDMA (2.5-5)	Aplicar em incrementos de 2mm e fotopolimerizar 20 segundos
Unitek™ Etching Gel 35% (3M Unitek, EUA) Lote: N300404 Validade: 07/2014	Água (55-65%); ácido fosfórico (30-40%); espessante de sílica (5-10%)	
Adper™ Scotchbond™ Multi-purpose (3M ESPE, EUA) Lote: N254988 Validade: 03/2014	3º Passo - camada de resina hidrófoba: BISGMA (60-70%), HEMA (30-40%), trifenilantimônio (<0,5%).	Aplicar adesivo na superfície preparada; Remover excessos com <i>microbrush</i> ; Fotopolimerizar 10 segundos

Tabela 1 - Composição e modo de aplicação dos diferentes materiais utilizados.

3.3. Preparação dos espécimes

Os dentes foram seccionados transversalmente de forma a remover o terço oclusal e as raízes com uma máquina de corte Isomet 1000 Precision Saw (nº série 666-IPS-03518; Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), equipada com disco de corte impregnado de diamante (Lapcraft, OH, EUA; 4" x .012" x ½"), obtendo-se discos de dentina com cerca de 1,5 mm de espessura. Cada disco de dentina foi aleatoriamente alocado a um dos três grupos do estudo, onde diferiram as condições e tipo de material a aplicar no procedimento adesivo.

Na superfície de dentina foi criada uma *smear-layer* padronizada com a aplicação de lixa de grão 320 (Ref.: 30-5218-320; Buhler, Lake Bluff, IL, EUA), durante 2 minutos, sob refrigeração com água. Os discos de dentina foram divididos em 3 grupos, de acordo com o protocolo a utilizar e cada grupo foi dividido em 4 subgrupos de acordo com o sistema adesivo a aplicar ($n=3$).

No caso dos sistemas adesivos *etch&rinse* foi aplicado um ácido fosfórico a 35% (Unitek Etching Gel, 3M Unitek), antes da aplicação do sistema adesivo, segundo as instruções do fabricante (Tabela 1). Após a aplicação do sistema adesivo, os discos de dentina foram fotopolimerizados durante 10 segundos com um fotopolimerizador de diodo emissor de luz (LED; Ortholux™ LED Curing Light, nº série 939830002571, 3M Unitek GmbH, Seefeld, Alemanha). A intensidade da luz emitida foi verificada antes da polimerização de cada grupo, durante 10 segundos com um radiómetro (Bluephase® meter, nº série 001390, Ivoclar Vivadent, Schann, Liechtenstein), com intensidade de 880 mW/cm². No grupo A, posteriormente ao sistema adesivo foram aplicadas duas camadas (com cerca de 2mm cada) de resina composta nanohíbrida (Grandioso – VOCO de cor A3), que foram fotopolimerizadas durante cerca de 20 segundos cada. No grupo B, antes da aplicação da resina composta foi aplicada uma camada de resina hidrófoba (Tabela 1), que foi polimerizada separadamente.

No Grupo C os discos de dentina foram submetidos a pressão pulpar durante a aplicação da camada de adesivo e da camada de resina hidrófoba. Para tal, os espécimes foram colados a placas de acrílico que foram colocadas num dispositivo com uma pressão pulpar de 77 cmH₂O (Brown, Yankowitz, 1964). Em média os discos ficaram sob influência de pressão pulpar durante uma hora até ser colocada a camada de resina composta.

Os discos de dentina restaurados (Grupos A, B e C) foram seccionados longitudinalmente com máquina de corte Isomet 1000 Precision Saw (nº série 666-IPS-03518, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), equipada com disco de corte impregnado de diamante (Lapcraft, OH, EUA; 4" x .012" x ½"), obtendo-se hemi-discos de dentina, tendo metade sido utilizados para análise da morfologia da camada híbrida, e a metade correspondente utilizada para cálculo da percentagem de nanoinfiltração.

Os hemi-discos foram colocados em humidade relativa durante cerca de 12h (*overnight*) a cerca de 4°C antes de serem processados para análise.

3.4. Caracterização morfológica da interface dentina-adesivo

Os hemi-discos de dentina foram fixados em 2,5% de glutaraldeído e 2% de paraformaldeído numa solução tamponada de 0,1M de cacodilato de sódio (pH=7,4) durante 24h, protegidos da luz com uma película de alumínio, a 4°C.

De seguida foram submersos em banhos de 20ml de 0,1M de cacodilato de sódio por uma hora em três banhos sucessivos e lavados por um minuto com água destilada.

Os espécimes foram então polidos com lixas de Silicone-Carbide (Ref. 30-5218; Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) de abrasividade decrescente: grão 320 durante 3 segundos, grão 600 durante 10 segundos, grão 1000 durante 60 segundos, grão 2500 durante 60 segundos. De seguida foram polidos com suspensões de diamante (Meta Di[®] Monocrystalline Diamond Suspension, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), de grão 6µm, 3µm e 1µm durante 60 segundos cada em panos de feltro (Whitefelt; Ref.162002; Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) para polimento. Os espécimes foram submersos num banho de ultrassons com água destilada durante 1 minuto no final das lixas de grão 320 e de grão 600, no final das lixas de grão 1000 e grão 2500 e entre cada pasta para remover restos de pasta de polimento e *smear-layer* remanescente. No final, os espécimes foram mergulhados num banho de ultrassons com etanol a 100%, durante 60 segundos.

Posteriormente, para expor a camada híbrida, foram descalcificados durante cerca de 90 segundos com ácido hidroclorídrico a 0,1M e foram imersos numa solução de hipoclorito de sódio a 10% durante 60 segundos. Os espécimes foram lavados após cada imersão com água destilada corrente durante 30 segundos, e colocados num banho de ultrassons com água destilada durante 60 segundos, sendo de seguida desidratados em concentrações crescentes de etanol: 100ml a 25% durante 20 minutos, 100ml a 50%

durante 20 minutos, 100ml a 75% durante 20 minutos, 100ml a 95% durante 30 minutos e 100ml a 100% durante 60 minutos. No final os espécimes foram submersos em hexametildisilazano (Ref.: 440191-1L; Sigma Aldrich) durante 10 minutos e deixados a secar ao ar, sobre um papel de feltro (Whitefelt; Ref.162002; Buhler, Lake Bluff, IL, EUA), à temperatura ambiente, durante 10 minutos.

Os espécimes foram colados em discos de alumínio para microscopia eletrónica de varrimento (SEM) com Araldite® de presa rápida (Huntsman Advanced Materials, Everberg, Reino Unido), com a superfície a visualizar voltada para cima. 24 horas depois foi aplicada tinta de carbono (Lote 090917; Eletron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EUA), com um pincel, entre o espécime e o suporte, excepto na superfície a visualizar. Os espécimes foram depois metalizados numa atmosfera de argon com 200nm de ouro/paládio após serem colocados no interior de um dispositivo apropriado para o efeito (JEOL Fine Coat Ion Sputter JFC-1100E, nº série SM333132-670, Tóquio, Japão).

As observações foram realizadas com recurso ao microscópio eletrónico de varrimento de alta resolução Hitachi S-450 (nº série 5333884, Tóquio, Japão) com eletrões secundários, a 20kV; as microfotografias de microscopia eletrónica foram capturadas com a ampliação 500x em todos os espécimes, e em pelo menos um dos hemi-discos de cada grupo foi realizada uma série completa de ampliações (500x, 2000x, 5000x, 10000x) para caracterização da camada híbrida, tendo de seguida sido digitalizadas no sistema de microanálise Esprit 1.8.2.2167 (Bruker, MA, EUA) que se encontra associado.

3.5. Avaliação do grau de nanoinfiltração

Após serem colocados em humidade relativa *overnight*, cada hemi-disco foi recoberto com 2 camadas de verniz das unhas (Lote: 912169B; Risqué Niasi, Brasil), exceto 1mm à volta da interface adesiva.

Os espécimes foram re-hidratados por imersão em água destilada durante 20 minutos antes da imersão na solução de nitrato de prata amoniacal.

Os espécimes foram então mergulhados em solução aquosa de 50% de nitrato de prata amoniacal (pH=9,5) (preparada segundo o protocolo de Tay et al., 2002) durante 24 horas. Posteriormente foram enxaguados em água destilada e imersos durante 8 horas em solução foto-reveladora (Periomat Intra, DÜRR DENTAL, Bieigheim-

Bissingen, Alemanha) debaixo de luz fluorescente (para redução de iões de prata em grãos metálicos de prata).

Após remoção da solução foto-reveladora, os espécimes foram lavados em água destilada durante 1 minuto e de seguida imersos em 2,5% de glutaraldeído e 2% de paraformaldeído numa solução tamponada de 0,1M de cacodilato de sódio (pH=7,4) durante 24 horas a 4°C, e protegidos da luz com uma película de alumínio.

De seguida foram submersos em banhos de 20ml de 0,1M de cacodilato de sódio por uma hora em três banhos sucessivos e lavados por um minuto com água destilada.

Os espécimes foram então polidos com lixas de Silicone-Carbide (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) de abrasividade decrescente: grão 320 durante 3 segundos, grão 600 durante 10 segundos, grão 1000 durante 10 segundos, grão 2500 durante 10 segundos. De seguida foram polidos com suspensões de diamante (Meta Di[®] Monocrystalline Diamond Suspension, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) de grão 6, 3, 1µm durante 60 segundos cada em panos de feltro (Whitefelt; Ref.162002; Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) para polimento.

Após cada pasta utilizada, os espécimes foram submersos num banho de ultrassons com água destilada durante 1 minuto, no final das lixas de grão 320 e grão 600, no final das lixas de grão 1000 e grão 2500 e entre cada pasta para remover restos de pasta de polimento e *smear-layer* remanescente. No final, os espécimes foram mergulhados no banho de ultrassons com etanol a 100%, durante 10 segundos.

Posteriormente, para expor a camada híbrida, foram descalcificados durante cerca de 90 segundos com ácido hidrocloreídrico a 0,1M e imersos numa solução de hipoclorito de sódio a 10% durante 60 segundos. Os espécimes foram lavados após cada imersão com água destilada corrente durante 30 segundos, e colocados num banho de ultrassons com água destilada durante 60 segundos, sendo de seguida desidratados, em concentrações crescentes de etanol: 100ml a 25% durante 20 minutos, 100ml a 50% durante 20 minutos, 100ml a 75% durante 20 minutos, 100ml a 95% durante 30 minutos e 100ml a 100% durante 60 minutos. No final, os espécimes foram submersos em hexametildisilazano (Ref.: 440191-1L; Sigma Aldrich) durante 10 minutos e deixados a secar ao ar, sobre um papel de feltro (Whitefelt; Ref.162002; Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), à temperatura ambiente, durante 10 minutos.

Os espécimes foram colados em discos de alumínio para microscopia eletrónica de varrimento (SEM) com Araldite[®] de presa rápida (Huntsman Advanced Materials,

Everberg, Reino Unido), com a superfície a visualizar voltada para cima. 24 horas depois foi aplicada tinta de carbono (Lote 090917; Eletron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EUA), com um pincel, entre o espécime e o suporte, exceto na superfície a visualizar. Os espécimes foram depois metalizados numa atmosfera de árgon com 200nm de ouro/paládio após serem colocados no interior de um dispositivo apropriado para o efeito (JEOL Fine Coat Ion Sputter JFC-1100E, nº série SM333132-670, Tóquio, Japão).

Os espécimes foram observados no SEM utilizando eletrões retrofundidos com recurso ao microscópio eletrónico de varrimento de alta resolução JSM – 5200 Lv (Jeol, Tóquio, Japão) numa voltagem de aceleração de 20kV e foram focados na zona da interface resina-dentina; as microfotografias de microscopia eletrónica foram capturadas com ampliação de 75x, de modo a reconstruir toda a interface resina-dentina.

Com recurso a régua milimétrica do programa Image J versão 1.48 (Wayne Rasbond; National Institute of Health, EUA) foram registadas medições lineares por espécime para determinar o comprimento total do espécime, seguido da medição linear de penetração do nitrato de prata na camada híbrida.

Foi realizado o cálculo da percentagem de penetração do nitrato de prata na camada híbrida de cada espécime, e posterior cálculo da média de cada grupo.

3.6. Análise estatística

Foi realizada uma análise descritiva dos valores de nanoinfiltração recorrendo ao programa SPSS (Statistic Package for Social Sciences; IBM SPSS statistics V21). Para cada grupo foi calculada a média de percentagem de nanoinfiltração e desvio padrão. O teste Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliação da normalidade da distribuição de valores e o de Levene para analisar a homogeneidade das variâncias de forma a avaliar a possibilidade de utilização de testes paramétricos. Os valores de nanoinfiltração foram tratados com testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. O nível de significância estatística foi fixado em 5%.

4. Resultados

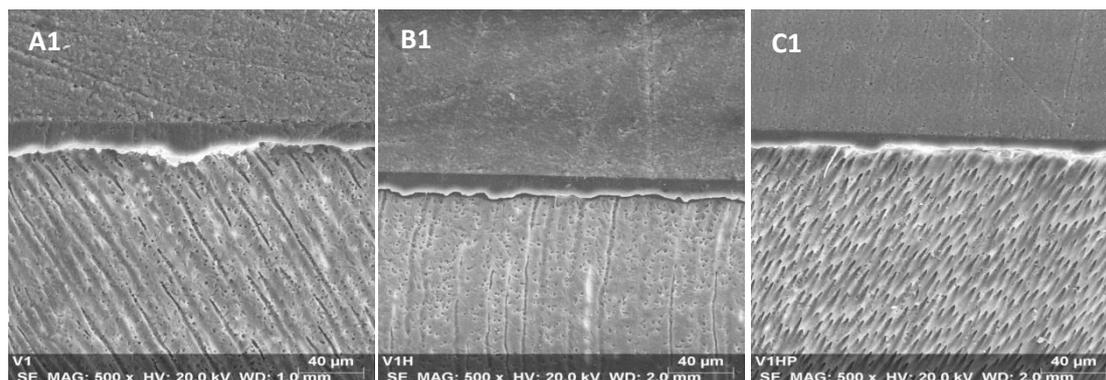
4.1. Caracterização Morfológica da interface dentina-adesivo

A caracterização da interface dentina-adesivo foi efetuada nos três grupos em estudo e é apresentada nas imagens que se seguem para cada subgrupo de adesivo com a mesma ampliação.

Em geral, para todos os grupos a camada híbrida não foi identificável, principalmente nos sistemas SE. Apesar de se verificar a existência de uma estrutura (Figura 2) que parece ser a *smear layer* incorporada por resina, no subgrupo Futurabond U SE.

Para os sistemas SE praticamente não se identificaram prolongamentos de resina, que são visíveis nos sistemas ER. Os prolongamentos formados pelos sistemas ER contêm inclusivamente prolongamentos acessórios nos grupos sem pressão pulpar.

Quando se comparam os grupos de estudo não se identificam diferenças entre o grupo com camada de resina hidrófoba e o grupo sem camada de resina hidrófoba, no entanto no grupo com pressão pulpar é identificável o efeito dessa pressão na estrutura da interface em todos os subgrupos, com presença de defeitos quer na camada híbrida quer na camada adesiva (Figura 6). Nos subgrupos ER essa pressão afetou também os prolongamentos de resina, que se encontram mais curtos, com menor definição e sem prolongamentos acessórios visíveis (Figura 3, 5).



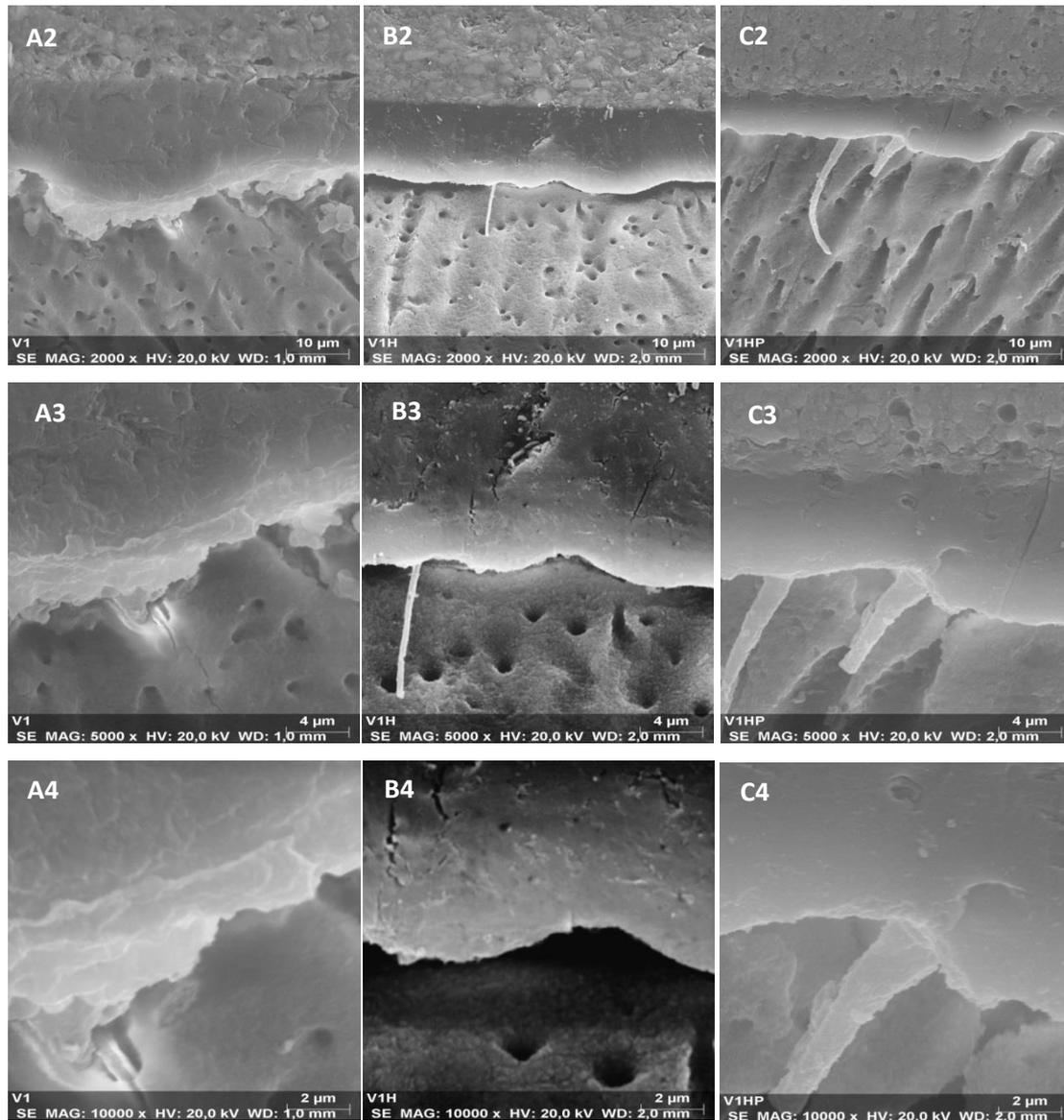
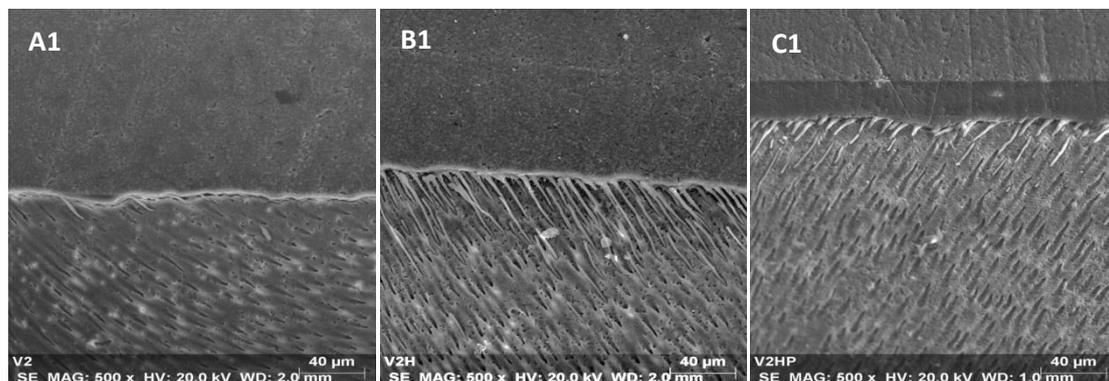


Figura 2 - Imagem obtida em SEM para o sistema adesivo Futurabond SE (A) – Grupo A: aplicação do sistema adesivo em estudo; (B) – Grupo B: com aplicação de camada de resina hidrófoba após sistema adesivo; (C) – Grupo C: aplicação de sistema adesivo e camada de resina hidrófoba com pressão pulpar; 1 – Ampliação 500x; 2 – Ampliação 2000x; 3 – Ampliação 5000x; 4 – Ampliação 10000x.



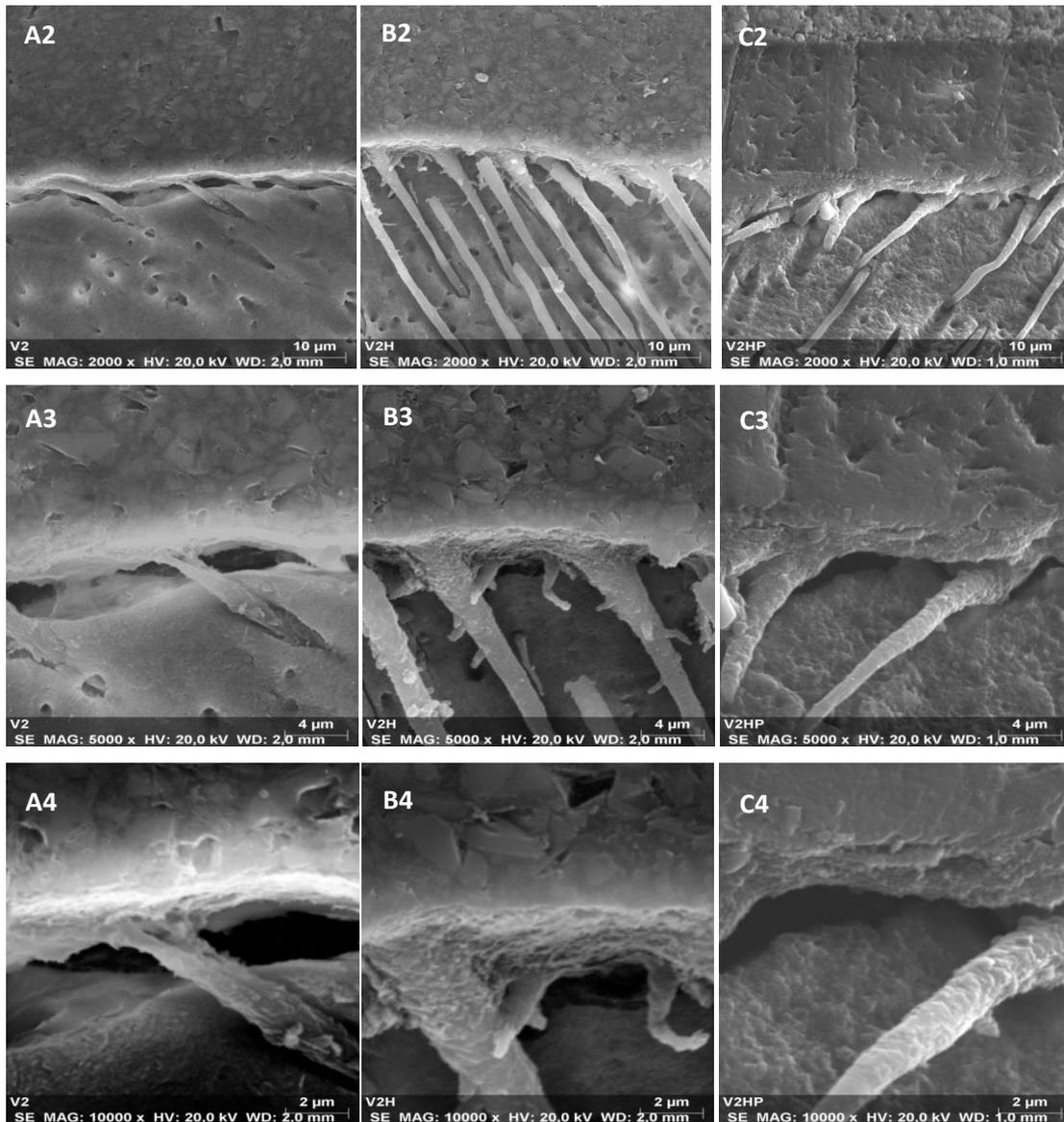
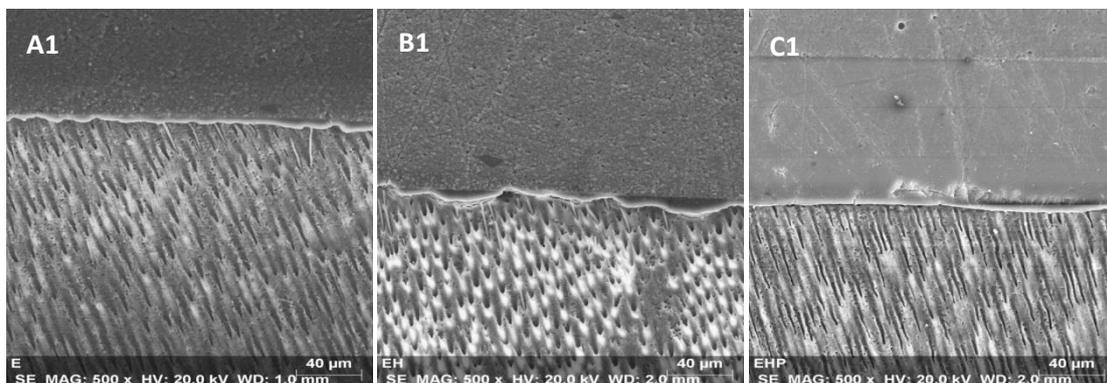


Figura 3 - Imagem obtida em SEM para o sistema adesivo Futurabond ER (A) – Grupo A: aplicação do sistema adesivo em estudo; (B) – Grupo B: com aplicação de camada de resina hidrófoba após sistema adesivo; (C) – Grupo C: aplicação de sistema adesivo e camada de resina hidrófoba com pressão pulpar; 1 – Ampliação 500x; 2 – Ampliação 2000x; 3 – Ampliação 5000x; 4 – Ampliação 10000x.



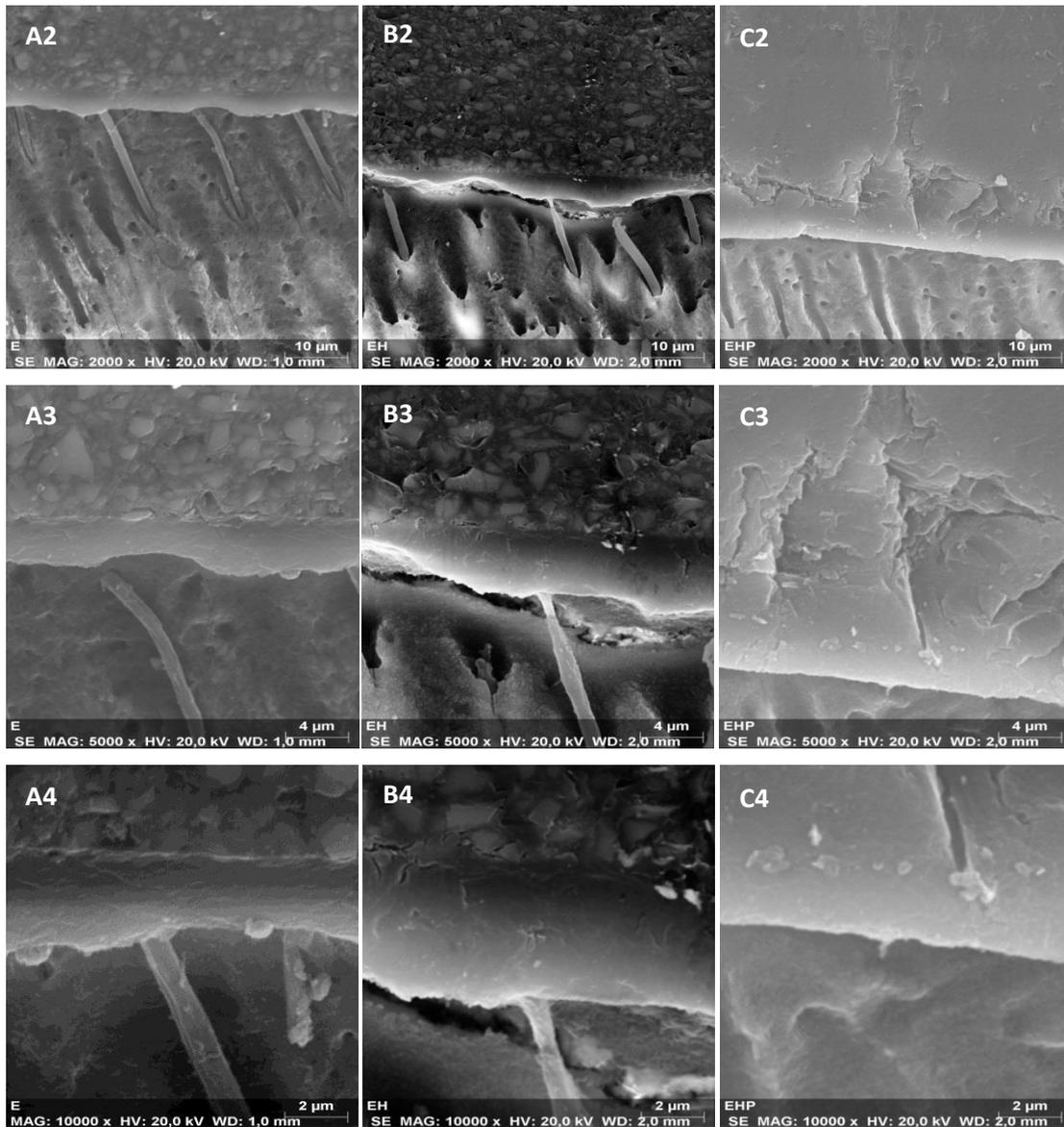
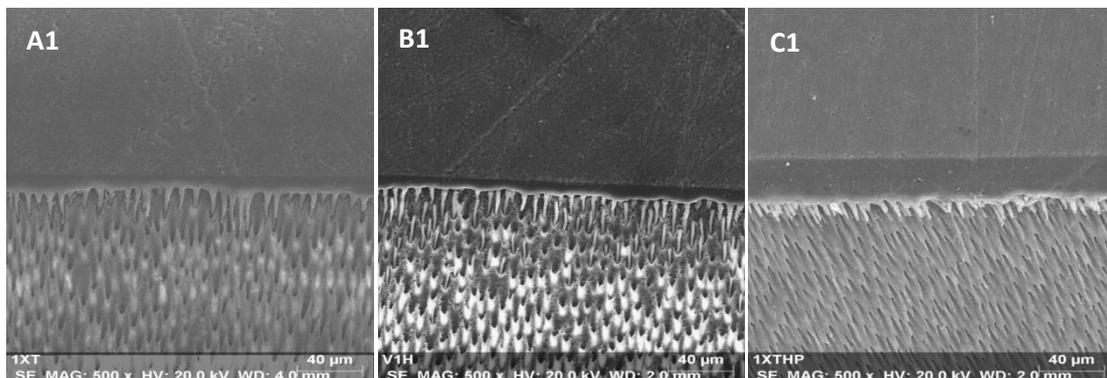


Figura 4 - Imagem obtida em SEM para o sistema adesivo Easybond (A) – Grupo A: aplicação do sistema adesivo em estudo; (B) – Grupo B: com aplicação de camada de resina hidrófoba após sistema adesivo; (C) – Grupo C: aplicação de sistema adesivo e camada de resina hidrófoba com pressão pulpar; 1 – Ampliação 500x; 2 – Ampliação 2000x; 3 – Ampliação 5000x; 4 – Ampliação 10000x.



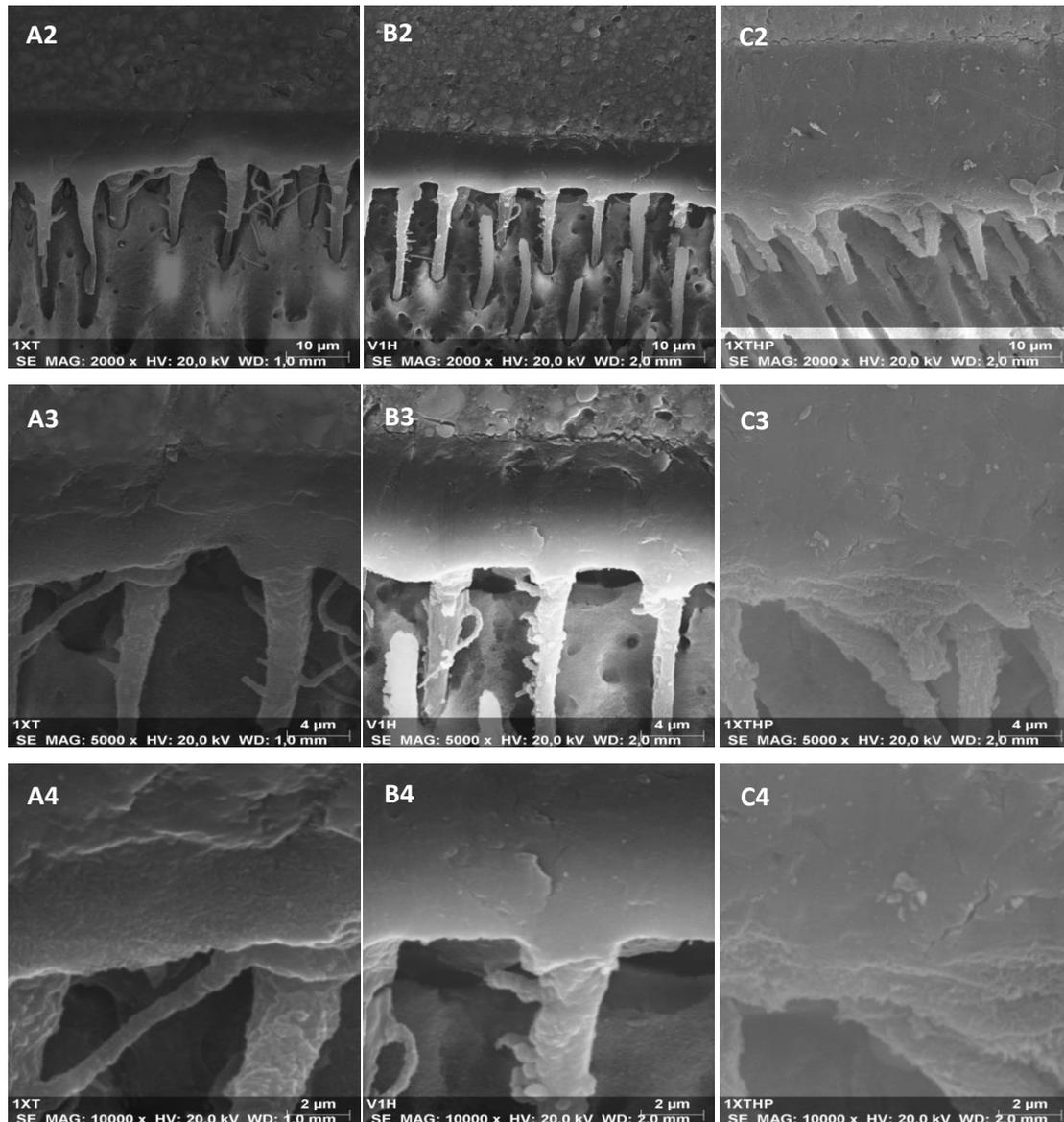


Figura 5 - Imagem obtida em SEM para o sistema adesivo Scotchbond 1XT (A) – Grupo A: aplicação do sistema adesivo em estudo; (B) – Grupo B: com aplicação de camada de resina hidrófoba após sistema adesivo; (C) – Grupo C: aplicação de sistema adesivo e camada de resina hidrófoba com pressão pulpar; 1 – Ampliação 500x; 2 – Ampliação 2000x; 3 – Ampliação 5000x; 4 – Ampliação 10000x.

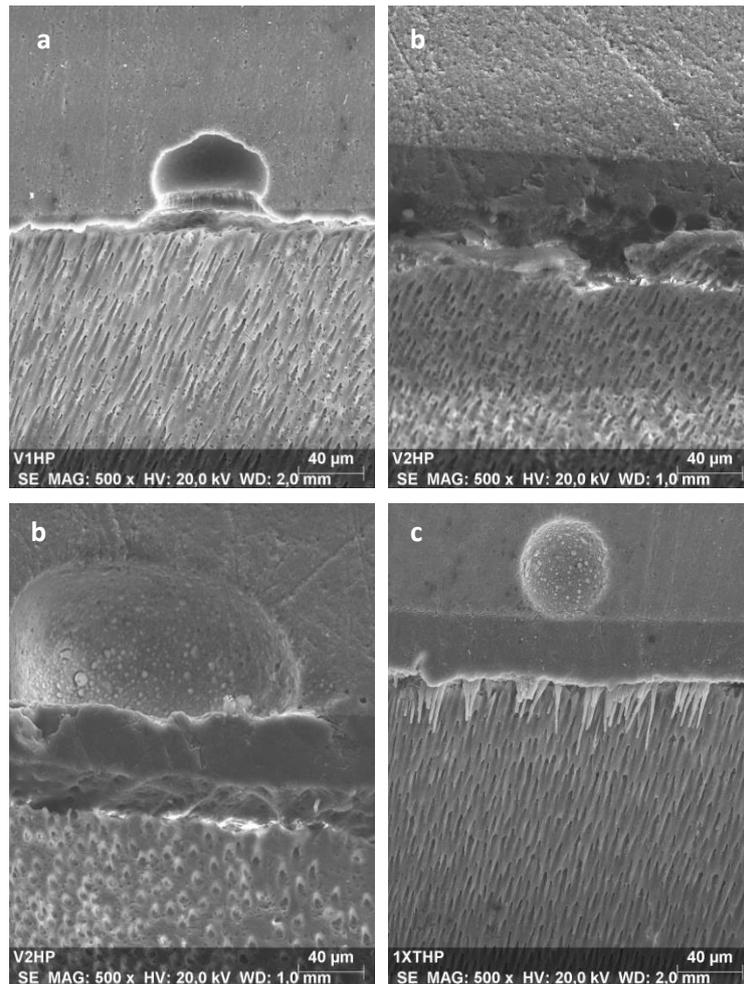


Figura 6 - Imagens de SEM no Grupo C: aplicação de sistema adesivo e camada de resina hidrófoba com pressão pulpar; Ampliação 500x; a – Futurabond SE; b –Futurabond ER; c – Scotchbond 1XT.

4.2. Avaliação do grau de nanoinfiltração

As médias de nanoinfiltração, bem como os respectivos desvios-padrão estão representados na Tabela 2, para cada sistema adesivo e para cada grupo.

		Futurabond SE	Futurabond ER	Easybond	Scotchbond 1XT
Grupo	Adesivo	44,1 (30,81)	37,27 (34,53)	34,23 (37,96)	20,87 (6,16)
	Camada de resina Hidrófoba Sem Pressão Pulpar	0,53 (0,66)	12,81 (8,00)	6,47 (8,41)	48,38 (12,85)
	Camada de resina Hidrófoba com Pressão Pulpar	29,81 (20,31)	57,88 (31,44)	65,17 (13,32)	48,997 (9,05)

Tabela 2 - Média e desvio-padrão da área de nanoinfiltração na interface da camada híbrida por sistema adesivo, respetivamente a cada grupo.

Todos os sistemas adesivos apresentaram nanoinfiltração na interface dentina-adesivo, com exceção para um dos espécimes do sistema adesivo Futurabond SE do grupo B.

Uma vez que a distribuição dos resultados não apresentou normalidade da distribuição de valores e que a variância não foi homogênea, optou-se por realizar testes não paramétrico de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney.

O Grupo B apresentou uma percentagem de nanoinfiltração significativamente ($p < 0,05$) menor do que a do Grupo A e do que a do Grupo C. No entanto, com o teste de Mann-Whitney não foram detetadas diferenças entre os grupos para cada subgrupo estudado (Tabela B. 5).

Confirmou-se a existência de diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) na percentagem de nanoinfiltração entre os sistemas adesivos estudados unicamente no Grupo B ($p = 0,027$). O teste de Mann-Whitney quando efetuado para o grupo da camada de resina hidrófoba, que continha diferenças entre os subgrupos de adesivos, não teve poder suficiente para detetar, dois a dois, as diferenças estatisticamente significativas na nanoinfiltração dos sistemas adesivos estudados ($p \geq 0,05$).

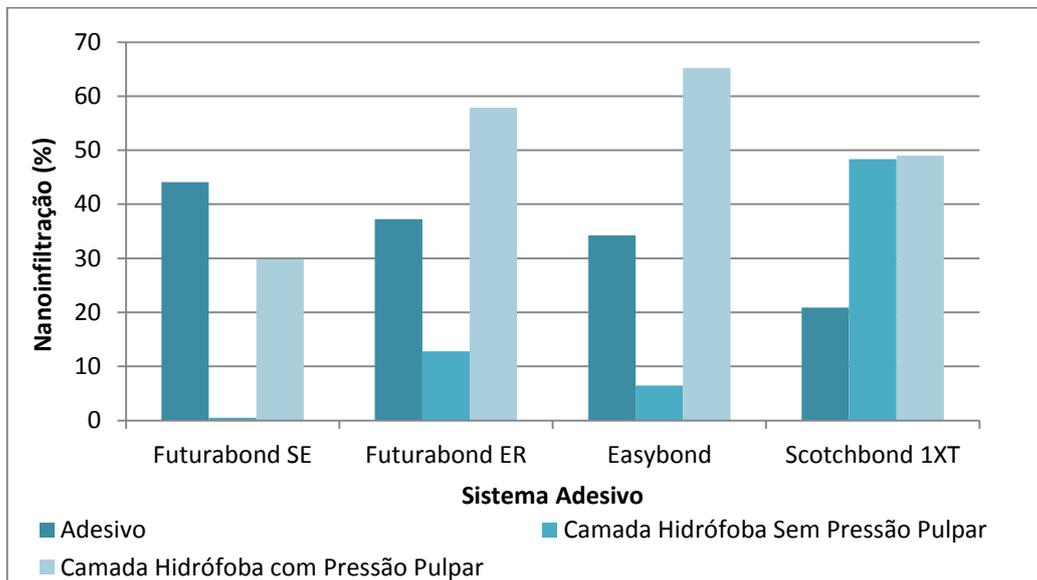


Figura 7 - Média das percentagens de nanoinfiltração na interface da camada híbrida por sistema adesivo.

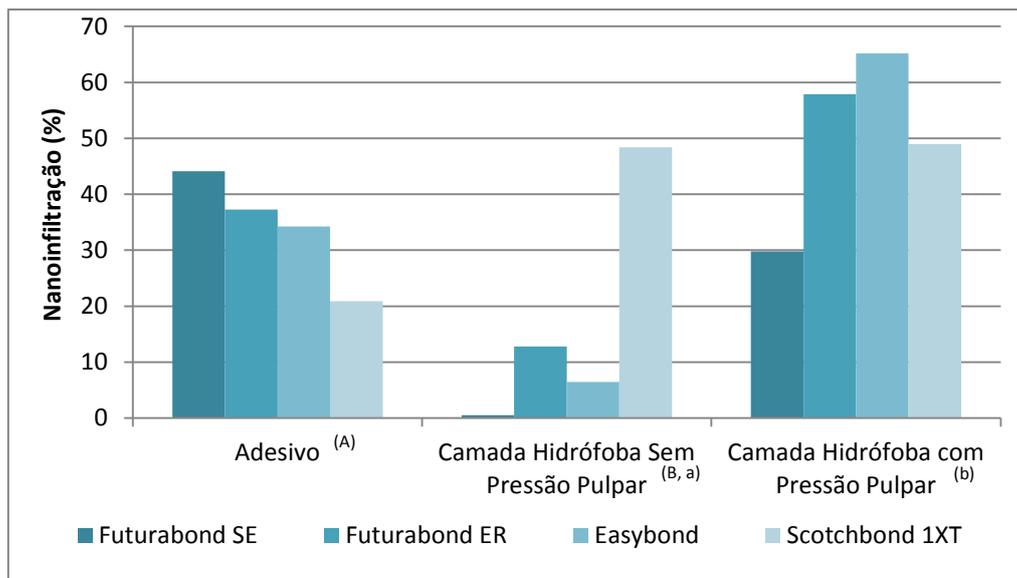


Figura 8 - Média das percentagens de nanoinfiltração na interface da camada híbrida por grupo; letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em estudo.

5. Discussão

Neste estudo laboratorial avaliou-se um sistema adesivo universal, utilizado com duas estratégias de adesão distintas (ER e SE), através da comparação da morfologia da camada híbrida formada e da percentagem de nanoinfiltração decorrente, com outros dois sistemas adesivos (um SE e outro ER), em três grupos: sistema adesivo, sistema adesivo com camada de resina hidrófoba e sistema adesivo com camada de resina hidrófoba aplicados com pressão pulpar.

A adição de uma camada de resina hidrófoba é responsável pela impermeabilização das margens, pelo que o fluxo de água proveniente das margens fica reduzido. No caso da dentina seca, todas as vias de fluxo de água ficam assim reduzidas. No entanto, quando a dentina é sujeita a pressão pulpar positiva, é possível uma aproximação à realidade clínica, visto este fluxo ocorrer continuamente, pela proximidade de uma câmara pulpar cheia de água, que mantém a dentina continuamente húmida.

A análise da interface resina-dentina, avaliada em SEM, demonstrou que a camada híbrida não é visível para todos os sistemas adesivos, nomeadamente nos espécimes com sistemas SE, o que não é incomum em visualizações em SEM, visto os sistemas adesivos SE produzirem camadas híbridas pequenas (Osório et al., 2003; Toledano et al., 2006). No entanto, é possível verificar a existência de uma estrutura que parece ser a *smear-layer* incorporada por resina no Futurabond SE (Figura 2), facto que pode ser explicado por não existir condicionamento ácido nestes sistemas, pelo que existe a permanência da *smear-layer* incorporada pelos monómeros de resina, como visto anteriormente (Itthagarun, Tay, 2000; Van Meerbeek et al., 1998). No entanto, e por comparação, as imagens das interfaces formadas pelo Easybond, neste estudo, não apresentaram esta estrutura. Verificam-se ainda diferenças a nível dos prolongamentos de resina, que são mais finos e em menor número nos espécimes com os sistemas SE do que com os sistemas ER. Os prolongamentos de resina formados com os sistemas ER são, por oposição, mais compridos e mais densos, bem como mais cónicos. A maior conicidade na zona superior dos prolongamentos é responsável por um maior selamento da camada híbrida, visto que esta se estende até à entrada dos túbulos dentinários, resultando assim na hibridização das paredes dos túbulos (Vashisth et al., 2014).

Quando se comparam os espécimes entre grupos, não são identificadas diferenças quanto à morfologia da camada híbrida, entre os Grupos A e B. Segundo

alguns autores, a camada de resina hidrófoba é responsável por um aumento do grau de conversão da camada híbrida (Itthagarun et al., 2004) e pelo aumento de monómeros hidrofóbicos, o que resulta numa camada híbrida menos hidrofílica (Van Landuyt et al., 2006). No entanto, estas alterações não são visíveis em SEM, o que explica a ausência de diferenças entre estes grupos. Os espécimes do Grupo C mostraram diferenças, nomeadamente por surgirem defeitos quer na camada híbrida, quer na camada adesiva (Figura 6), bem como nos prolongamentos de resina formados pelos sistemas ER, que são mais curtos, e por não terem prolongamentos acessórios como nos espécimes dos outros grupos.

Em algumas imagens de SEM, a camada de resina hidrófoba não foi visível, o que poderá ser causado por uma excessiva secagem da resina aquando da sua aplicação.

Desta forma, de acordo com os resultados laboratoriais, e relativamente à análise da morfologia da camada híbrida, a primeira hipótese nula foi rejeitada, visto existirem diferenças na morfologia da camada híbrida promovida pelos diferentes sistemas adesivos estudados; a segunda hipótese nula testada foi aceite, por não serem identificadas diferenças na morfologia da camada híbrida promovida pelos sistemas adesivos estudados após a aplicação de uma camada de resina hidrófoba, quando em comparação com o grupo em que esta não foi aplicada. A terceira hipótese nula foi rejeitada, pois observaram-se diferenças na morfologia da camada híbrida promovida pelos sistemas adesivos estudados após a aplicação de uma camada de resina hidrófoba, quando sujeitos a uma pressão pulpar positiva, em comparação com o grupo não sujeito a pressão pulpar.

Outra forma de estudar a qualidade da camada híbrida é a análise da percentagem de nanoinfiltração. Estudos mostram que o uso de nitrato de prata para revelação da nanoinfiltração é um método mais sensível de deteção de degradação da superfície que o uso da microscopia eletrónica de varrimento (SEM) (Wu, Cobb, 1981; Mair, 1999; McKinney, Wu, 1982).

No presente estudo, foi verificada a existência de desvios-padrão elevados para todos os grupos e subgrupos (com exceção do Futurabond SE do grupo B), o que dificultou a deteção de diferenças pelos testes estatísticos, provavelmente também devido ao número de espécimes ($n=3$) utilizados. Este número foi escolhido tendo em conta outros estudos que utilizaram os mesmos métodos (Pinzon et al., 2013; Loguercio et al., 2014). Não foi feita nenhuma análise de poder estatístico por não existir

variabilidade conhecida para os sistemas adesivos estudados. Desta forma, o presente estudo pode ser considerado como um estudo piloto para estudos futuros.

A ausência tanto de normalidade da distribuição de valores como de homogeneidade de variância levou à realização de testes não paramétricos. O teste de Kruskal-Wallis apenas revelou diferenças entre os espécimes tratados com sistemas adesivos do grupo B ($p < 0,05$), motivo pelo qual se realizou o teste de Mann-Whitney, capaz de fazer comparações múltiplas entre os sistemas adesivos deste grupo, apesar de existir perda de poder estatístico. Neste estudo não foi realizada a correção de Bonferroni para o teste de Mann-Whitney, visto este não ter revelado diferenças significativas ($p \geq 0,05$) quando os sistemas adesivos foram comparados dois a dois. O teste de Kruskal-Wallis mostrou ainda existirem diferenças entre os espécimes dos grupos A e B e entre os espécimes dos grupos B e C, ou seja, quando aplicada uma camada de resina hidrófoba a nanoinfiltração diminuiu de uma forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para todos os sistemas adesivos, quer em comparação com o Grupo A, quer com o Grupo C.

Estes resultados podem ser explicados pelo facto de nos espécimes do grupo A, a nanoinfiltração ocorrer provavelmente através da interface e das margens, que neste caso estão desprotegidas, enquanto no caso do grupo B, a camada de resina hidrófoba é responsável por impermeabilizar as margens, reduzindo a nanoinfiltração. Por outro lado, estudos revelam que a aplicação de uma camada de resina hidrófoba sobre adesivos com monómeros hidrofílicos leva à redução desses monómeros, com um aumento do grau de conversão na camada híbrida e à criação de uma camada adesiva mais espessa e uniforme, com menor retenção de água e solvente (Itthagarun et al., 2004). Estas são vantagens claras na adesão à dentina, visível pela diminuição da permeabilidade através da interface, e consequentemente da nanoinfiltração (Choi, Condon, Ferracane, 2000; Zheng et al., 2001).

No grupo C, a camada de resina hidrófoba tem uma ação diferente, visto existir a presença de uma câmara pulpar cheia de água. O fluxo de água proveniente desta câmara pulpar interferiu na formação da camada híbrida ainda antes da aplicação da camada de resina hidrófoba, como se observam nas imagens morfológicas (Figura 6), com defeitos de estrutura a nível da camada híbrida e camada adesiva, bem como nos prolongamentos de resina. Os grupos formados neste estudo permitiram comparar claramente o efeito da camada de resina hidrófoba quando o sistema adesivo é aplicado

num espécime de dentina seca e quando o mesmo adesivo é aplicado num espécime de dentina com pressão pulpar positiva. Assim, o aumento da percentagem de nanoinfiltração nos espécimes deste grupo foi devido unicamente à pressão pulpar, não existindo influência externa (margens da interface adesiva), uma vez que apesar da presença da camada de resina hidrófoba, os espécimes do grupo C sofreram maior percentagem de nanoinfiltração do que os do grupo B. A maior parte dos estudos que refere que a camada de resina hidrófoba leva a uma diminuição da nanoinfiltração são realizados sem a influência de uma pressão pulpar positiva. Assim, é importante estudar estes sistemas adesivos com pressão pulpar, de forma a aproximar os resultados à realidade clínica. Infelizmente, neste estudo não foi possível detetar diferenças estatisticamente significativas na nanoinfiltração entre os sistemas adesivos de cada grupo, como referido anteriormente, o que não seria expectável, visto terem sido aplicadas estratégias de adesão distintas. Estas diferenças provavelmente seriam detetadas com o aumento do *n*.

Assim, a quarta e sexta hipóteses nulas são aceites, pois a percentagem de nanoinfiltração não apresentou diferenças estatisticamente significativas nos sistemas adesivos do Grupo A e nos sistemas adesivos do Grupo C. No entanto, a quinta hipótese nula foi rejeitada, visto que após a aplicação de uma camada de resina hidrófoba, a percentagem de nanoinfiltração foi diferente entre os sistemas adesivos estudados. A sétima hipótese nula é rejeitada, pois a percentagem de nanoinfiltração, após a aplicação de uma camada de resina hidrófoba, diminuiu para todos os sistemas adesivos estudados.

Quanto à oitava hipótese nula, esta foi rejeitada, visto a percentagem de nanoinfiltração, após a aplicação de uma camada de resina hidrófoba sobre pressão pulpar, ter sofrido um aumento significativo para todos os sistemas adesivos estudados.

Para o sistema adesivo universal estudado, a nanoinfiltração foi tendencialmente superior na estratégia de adesão ER, facto que pode estar relacionado com a abertura dos túbulos dentinários, que é maior nos ER devido ao condicionamento ácido. Quanto maior a abertura dos túbulos, maior a permeabilidade, logo, maior a nanoinfiltração decorrente. Por outro lado, um estudo recente realizado a 12 meses com um outro sistema universal mostrou que a nanoinfiltração de sistemas adesivos universais aumentava com o tempo, independentemente da humidade da dentina (Marchesi et al., 2014).

Outros estudos mostraram que o Easybond apresentava uma maior resistência à degradação após um ano de armazenamento sobre pressão pulpar, quando comparado com outros sistemas adesivos (Belli et al., 2010), parecendo ser menos permeável à humidade da dentina (Belli et al., 2011). No entanto, no presente estudo e apesar de não se detetarem diferenças estatisticamente significativas, os espécimes do subgrupo Easybond, quando sujeitos a pressão pulpar positiva, mostram uma tendência para uma maior nanoinfiltração.

Este estudo de nanoinfiltração poderá ser repetido não só com maior número de espécimes por grupo, mas também com mais tempo de simulação de pressão pulpar em cada espécime de forma a simular o envelhecimento dos espécimes.

6. Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo laboratorial sugerem que:

- A morfologia da camada híbrida é muito semelhante entre os sistemas adesivos ER e entre os sistemas adesivos SE estudados, independentemente de serem Universais ou não;

- A aplicação de pressão pulpar originou defeitos estruturais na camada híbrida, os quais poderão implicar um maior risco de degradação desta camada a longo prazo, justificando-se assim a realização de estudos com mais tempo de sujeição a pressão pulpar;

- A nanoinfiltração é mais afetada pelas condições estudadas (sistema adesivo, resina hidrófoba sobre o sistema adesivo, resina hidrófoba sobre o sistema adesivo com pressão pulpar) do que pela estratégia de adesão (ER ou SE);

- A percentagem de nanoinfiltração é menor após a aplicação da camada de resina hidrófoba, mas aumenta significativamente quando os espécimes são sujeitos a pressão pulpar. Conclui-se que para o estudo da influência da camada de resina hidrófoba na nanoinfiltração é imprescindível a presença de uma pressão pulpar positiva;

- Quando utilizado com a estratégia de adesão SE, o Futurabond U foi o único sistema adesivo a apresentar um espécime sem qualquer nanoinfiltração, aquando da aplicação de uma camada de resina hidrófoba;

- Os elevados desvios-padrão obtidos neste estudo e o facto de as amostras serem processadas para visualização após 24h do ensaio justifica a realização de mais estudos com amostras de maiores dimensões e com mais tempo de envelhecimento.

Referências Bibliográficas

1. Arantes-Oliveira S, Chasqueira F. Atualidades em adesivos dentários. *Revista OMD*. 2013; 19:12-18
2. Belli R, Sartori N, Peruchi LD, Guimaraes JC, Araujo E, Monteiro S Jr et al., Slow progression of dentin bond degradation during one-year water storage under simulated pulpal preassure. *J Dent*. 2010; 38(10):802-10.
3. Belli R, Sartori N, Peruchi LD, Guimaraes JC, Vieira LCC, Baratieri LN et al., Effect of multiple coats of ultra-mild al-in-one adhesives on bond strenght to dentin covered with two diferente smear layer thicknesses. *J Adhes Dent*. 2011; 13(6):507-16
4. Brown AC, Yankowitz D. Tooth pulp tissue pressure and hydraulic permeability. *Circ Res*. 1964; 15:42-50.
5. Cardoso MV, de Almeida Neves A, Mine A, Coutinho E, Van Landuyt K, De Munck J, et al., Current aspects on bonding effectiveness and stability in adhesive dentistry. *Aus Dent J*. 2011; 56 (Suppl.1):31-44
6. Cardoso MV, Moretto SG, Carvalho RCR, Russo EMA. Influence of intrapulpal pressure simulation on the bond strength of adhesive systems to dentin. *Braz Oral Res*. 2008; 22(2):170–175.
7. Choi KK, Condon JR, Ferracane JL. The effects of adhesive thickness on polymerization contraction stress of composite. *J Dent Res*. 2000; 79(3):812-17.
8. Ciucchi B, Bouillaguet S, Holz J, Pashley D. Dentinal fluid dynamics in human teeth, in vivo. *J Endod*. 1995; 21(4):191-4
9. de Andrade e Silva SM, Carrilho MR, Marquezini Junior L, Garcia FC, Manso AP, Alves MC, et al. Effect of an additional hydrophilic versus hydrophobic coat on the quality of dentinal sealing provided by two-step etch-and-rinse adhesives. *J Appl Oral Sci*. 2009; 17(3):184–9.
10. De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, et al. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *J Dent Res*. 2005; 84(2):118-32.
11. De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P, Van Landuyt K, et al. Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Oper Dent*. 2003; 28(3):215-35.

12. de Goes MF, Shinohara MS, Freitas MS. Performance of a New One-step Multi-mode Adhesive on Etched vs Non-etched Enamel on Bond Strength and Interfacial Morphology. *J Adhes Dent*. 2014 May 16 [Epub ahead of print].
13. Gaengler P, Hoyer I, Montag R, Gaebler P. Micromorphological evaluation of posterior composite restorations: a 10-year report. *J Oral Rehabil*. 2004; 31(10):991–1000.
14. Hanabusa M, Mine A, Kuboki T, Momoi Y, Van Ende A, Van Meerbeek B, et al. Bonding effectiveness of a new 'multi-mode' adhesive to enamel and dentine. *J Dent*. 2012; 40(6):475-84.
15. Hashimoto M, Ito S, Tay FR, Svizero NR, Sano H, Kaga M, et al. Fluid movement across the resin-dentin interface during and after bonding. *J Dent Res*. 2004; 83(11):843-8.
16. Hebling J, Castro FL, Costa CA. Adhesive performance of dentin bonding agents applied in vivo and in vitro. Effect of intrapulpal pressure and dentin depth. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007; 83(2):295-303.
17. Hiraishi N, Yiu CK, King NM, Tay FR. Effect of pulpal pressure on the microtensile bond strength of luting resin cements to human dentin. *Dent Mater*. 2009; 25(1):58–66
18. Itthagarun A, Tay FR, Pashley DH, Wefel JS, Garcia-Godoy F, Wei SH. Single-step, self-etch adhesives behave as permeable membranes after polymerization. Part III. Evidence from fluid conductance and artificial caries inhibition. *Am J Dent*. 2004; 17(6):394-400.
19. Itthagarun A, Tay FR. Self-contamination of deep dentin by dentin fluid. *Am J Dent*. 2000; 13(4):195-200.
20. King NM, Tay FR, Pashley DH, Hashimoto M, Ito S, Brackett WW, et al. Conversion of one-step to two-step self-etch adhesives for improved efficacy and extended application. *Am J Dent*. 2005; 18(2):126–34
21. Li HP, Burrow MF, Tyas MJ. The effect of long-term storage on nanoleakage. *Oper Dent*. 2001; 26(6):609-16.
22. Li H, Burrow MF, Tyas MJ. Nanoleakage patterns of four dentin bonding systems. *Dent Mater*. 2000; 16(1):48-56.

23. Loguercio A, Luque-Martinez I, Munoz M, Szesz A, Cuadros-Sánchez J, Reis A. A comprehensive laboratory screening of three-step etch-and-rinse adhesives. *Oper Dent*. 2014 [Epub ahead of print]
24. Mair LH. The silver sorption layer in dental composites: three year results. *Dent Mater*. 1999; 15(6):408-12.
25. Marchesi G, Frassetto A, Mazzoni A, Apolonio F, Diolosà M, Cadenaro M, et al. Adhesive performance of a multi-mode adhesive system: 1-year in vitro study. *J Dent*. 2014; 42(5):603-12.
26. Mazzoni A, Scaffa P, Carrilho M, Tjaderhane L, Di Lenarda R, Polimeni A, et al. Effects of etch-and-rinse and self-etch adhesives on dentin MMP-2 and MMP-9. *J Dent Res*. 2013; 92(1):82–6.
27. McKinney JE, Wu W. Relationship between subsurface damage and wear of dental restorative composites. *J Dent Res*. 1982; 61(9):1083-8.
28. Mena-Serrano A, Kose C, De Paula EA, Tay LY, Reis A, Loguercio AD, et al. A new universal simplified adhesive: 6-month clinical evaluation. *J Esthet Restor Dent*. 2013; 25(1):55-69.
29. Moszner N, Salz U, Zimmermann J. Chemical aspects of self-etching enamel-dentin adhesives: a systematic review. *Dent Mater*. 2005; 21(10):895-910.
30. Muñoz MA, Luque I, Hass V, Reis A, Loguercio AD, Bombarda NH. Immediate bonding properties of universal adhesives to dentine. *J Dent*. 2013; 41(5):404-11.
31. Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res*. 1982; 16(3):265-73
32. Nakabayashi N. Dental biomaterials and the healing of dental tissue. *Biomaterials*. 2003; 24(13):2437-39
33. Oliveira SSa, Marshall SJ, Habelitz S, Gansky SA, Wilson RS, Marshall GW. The effect of a self-etching primer on the continuous desmineralization of dentin. *Eur J Oral Sci*. 2004; 112(4):376-83
34. Opdam NJ, Loomans BA, Roeters FJ, Bronkhorst EM. Five-year clinical performance of posterior resin composite restorations placed by dental students. *J Dent*. 2004; 32(5):379–83.

35. Osorio R, Toledano M, De Leonardi G, Tay F. Microleakage and interfacial morphology of self-etching adhesives in class V resin composite restorations. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2003; 66(1):399-409.
36. Ozok AR, Wu MK, De Gee AJ, Wesselink PR. Effect of dentin perfusion on the sealing ability and microtensile bond strengths of a total-etch versus an all-in-one adhesive. *Dent Mater*. 2004; 20(5):479-86
37. Pashley DH. The effects of acid etching on the pulpodentin complex. *Oper Dent*. 1992; 17(6):229-42.
38. Perdigão J, Geraldeli S, Hodges JS. Total-etch versus self-etch adhesive: effect on postoperative sensitivity. *J Am Dent Assoc*. 2003; 134(12):1621-9.
39. Perdigão J, Kose C, Mena-Serrano AP, De Paula EA, Tay LY, Reis A, et al. A new universal simplified adhesive: 18-month clinical evaluation. *Oper Dent*. 2013; 39(2):113-27.
40. Perdigão J, Muñoz M, Sezinando A, Luque-Martinez I, Staichak R, Reis A, et al. Immediate Adhesive Properties to Dentin and Enamel of a Universal Adhesive Associated With a Hydrophobic Resin Coat. *Oper Dent*. 2013 Dec 3 [Epub ahead of print].
41. Peumans M, Kanumilli P, De Munck J, Van Landuyt K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Clinical effectiveness of contemporary adhesives: A systematic review of current clinical trials. *Dent Mater*. 2005; 21(9):864-81
42. Peumans M, De Munck J, Van Landuyt KL, Poitevin A, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Eight-year clinical evaluation of a 2-step self-etch adhesive with and without selective enamel etching. *Dent Mater*. 2010; 26(12):1176-84.
43. Pinzon LM, Watanabe LG, Reis AF, Powers JM, Marshall GJ. Analysis of interfacial structure and bond strength of self-etch adhesives. *Am J Dent*. 2013; 26(6):335-40.
44. Pushpa R, Suresh BS. Marginal permeability of one step self-etch adhesives: Effects of double application or the application of hydrophobic layer. *J Conserv Dent*. 2010; 13(3):141-4.
45. Rengo C, Goracci C, Juloski J, Chieffi N, Giovannetti A, Vichi A, et al. Influence of phosphoric acid etching on microleakage of a self-etch adhesive and a self-adhering composite. *Aust Dent J*. 2012; 57(2):220-6.

46. Sano H, Yoshikawa T, Pereira PN, Kanemura N, Morigami M, Tagami J, et al. Long-term durability of dentin bonds made with a self-etching primer, in vivo. *J Dent Res.* 1999; 78(4):906-11.
47. Sano H, Shono T, Takatsu T, Hosoda H. Microporous dentin zone beneath resin-impregnated layer. *Oper Dent.* 1994; 19(2):59-64.
48. Sano H, Takatsu T, Ciucchi B, Horner JA, Matthews WG, Pashley DH. Nanoleakage: leakage within the hybrid layer. *Oper Dent.* 1995; 20(1):18-25.
49. Sano H, Yoshiyama M, Ebisu S, Burrow MF, Takatsu T, Ciucchi B, et al. Comparative SEM and TEM observations of nanoleakage within the hybrid layer. *Oper Dent.* 1995; 20(4):160-7.
50. Sauro S, Pashley DH, Montanari M, Chersoni S, Carvalho RM, Toledano M, et al. Effect of stimulated pulpal pressure on dentin permeability and adhesion of self-etch adhesives. *Dent Mater.* 2007; 23(6):705-13
51. Sauro S, Mannocci F, Toledano M, Osorio R, Thompson I, Watson TF. Influence of the hydrostatic pulpal pressure on droplets formation in current etch-and-rinse and self-etch adhesives: a video rate/TSM microscopy and fluid filtration study. *Dent Mater.* 2009; 25(11):1392-402.
52. Schulze KA, Oliveira SA, Wilson RS, Gansky SA, Marshall G W, Marshall SJ. Effect of hydration variability on hybrid layer properties of a self-etching versus an acid-etching system. *Biomaterials.* 2005; 26(9):1011-8.
53. Spencer P, Swafford JR. Unprotected protein at the dentin-adhesive interface. *Quintessence Int.* 1999; 30(7):501-7
54. Spencer P, Ye Q, Park J, Topp EM, Misra A, Marangos O, et al. Adhesive/Dentin interface: the weak link in the composite restoration. *Ann Biomed Eng.* 2010; 38(6):1989-2003.
55. Tao L, Pashley DH. Dentin perfusion effects on the shear bond strengths of bonding agents to dentin. *Dent Mater.* 1989; 5(3):181-4.
56. Tay FR, Carvalho RM, Pashley DH. Water movement across bonded dentin - too much of a good thing. *J Appl Oral Sci.* 2004; 12:12-25.
57. Tay FR, Pashley DH, Suh BI, Carvalho RM, Itthagarun A. Single step adhesives are permeable membranes. *J Dent.* 2002; 30(7-8):371-82.
58. Tay FR, Pashley DH, Yoshiyama M. Two modes of nanoleakage expression in single-step adhesives. *J Dent Res.* 2002; 81(7):472-6.

59. Tay FR, Pashley DH. Have dentin adhesives become too hydrophilic? *J Can Dent Assoc.* 2003; 69(11):726-31.
60. Toledano M, Osorio R, Albaladejo A, Aguilera FS, Osorio E. Differential effect of in vitro degradation on resin-dentin bonds produced by self-etch versus total-etch adhesives. *J Biomed Mater Res A.* 2006; 77(1):128-35.
61. Toledano M, Proença JP, Erhardt MCG, Osorio E, Aguilera FS, Osorio R, et al. Increases in dentin-bond strength if doubling application time of an acetone-containing one-step adhesive. *Oper Dent.* 2007; 32(2):133-7
62. Unemori M, Matsuya Y, Akashi A, Goto Y, Akamine A. Self-etching adhesives and postoperative sensitivity. *Am J Dent.* 2004; 17(3):191-5
63. Van Landuyt KL, Snauwaert J, De Munck J, Peumans M, Yoshida Y, Poitevin A, et al. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials* 2007; 28(26):3757–85.
64. Van Landuyt KL, Peumans M, De Munck J, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Extension of a one-step self-etch adhesive into a multi-step adhesive. *Dent Mater.* 2006; 22(6):533-44.
65. Van Meerbeek B, Perdigão J, Lambrechts P, Vanherle G. The clinical performance of adhesives. *J Dent.* 1998; 26(1):1-20
66. Van Meerbeek B, Yoshida Y, Van Landuyt K. Enamel and Dentin Adhesion. In: Summitt JB, Robbins JW, Hilton TJ, et al. *Fundamentals of Operative Dentistry. A Contemporary Approach.* 3^a ed. Chicago: Quintessence Publishing; 2006:183–260
67. Van Meerbeek B, Yoshihara K, Yoshida Y, Mine A, De Munck J, Van Landuyt KL. State of the art of self-etch adhesives. *Dent Mater.* 2011; 27(1):17-28
68. Van Meerbeek B, Kanumilli P, De Munck J, Van Landuyt K, Lambrechts P, Peumans M. A randomized controlled study evaluating the effectiveness of a two-step self-etch adhesive with and without selective phosphoric-acid etching of enamel. *Dent Mater.* 2005; 21(4):375-83.
69. Vashisth P, Mittal M, Goswami M, Chaudhary S, Dwivedi S. Bond strength and interfacial morphology of different dentin adhesives in primary teeth. *J Dent (Tehran).* 2014; 11(2):179-87
70. Wu W, Cobb EN. A silver staining technique for investigating wear of restorative dental composites. *J Biomed Mater Res.* 1981; 15(3):343-8.

71. Yoshida Y, Nagakane K, Fukuda R, Nakayama Y, Okazaki M, Shintani H, et al. Comparative study on adhesive performance of functional monomers. *J Dent Res.* 2004; 83(6):454–8.

72. Yoshida Y, Yoshihara K, Nagaoka N, Hayakawa S, Torii Y, Ogawa T, et al. Self-assembled Nano-layering at the Adhesive interface. *J Dent Res.* 2012; 91(4):376-81.

73. Zheng L, Pereira PN, Nakajima M, Sano H, Tagami J. Relationship between adhesive thickness and microtensile bond strength. *Oper Dent.* 2001; 26(1):97-104.

Anexo A – Figuras

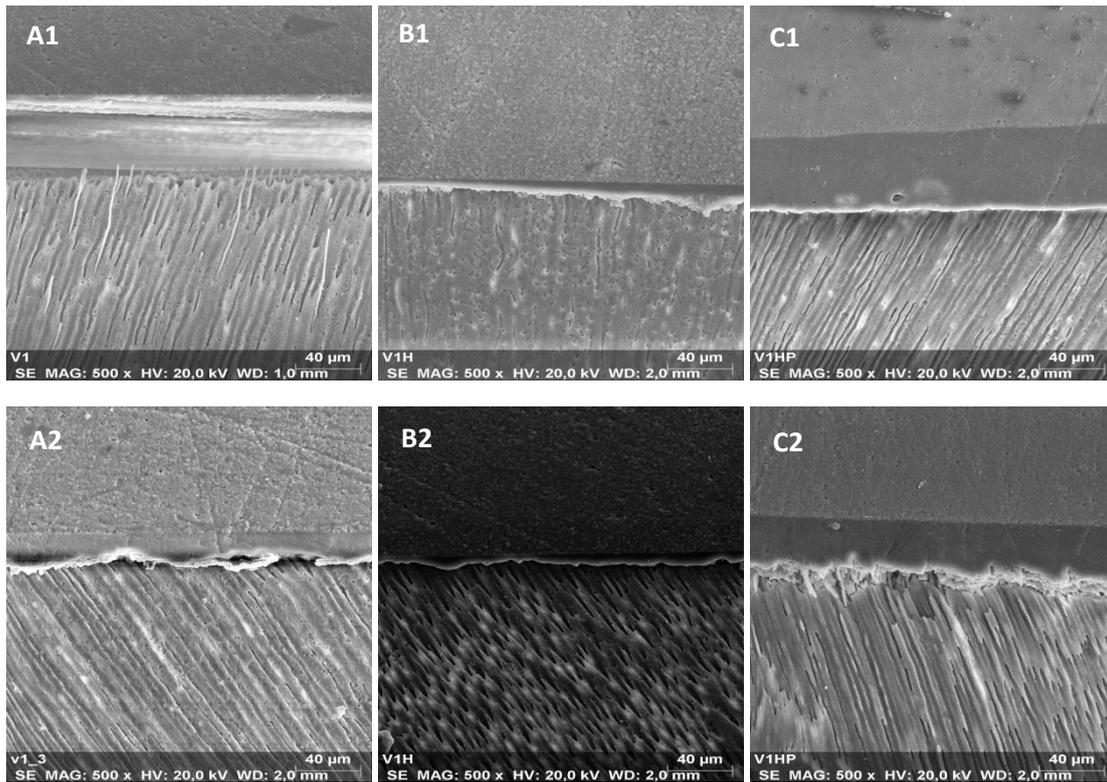


Figura A. 1 - Imagem de SEM para o sistema adesivo Futurabond SE. (A) – Grupo A: aplicação de um dos sistemas adesivos em estudo; (B) – Grupo B: aplicação de um dos sistemas adesivos seguido de camada de resina hidrófoba; (C) – Grupo C: aplicação de um dos sistemas adesivos sobre pressão pulpar seguido de camada de resina hidrófoba; (1) – Espécime 1; (2) – Espécime 2; Ampliação 500x.

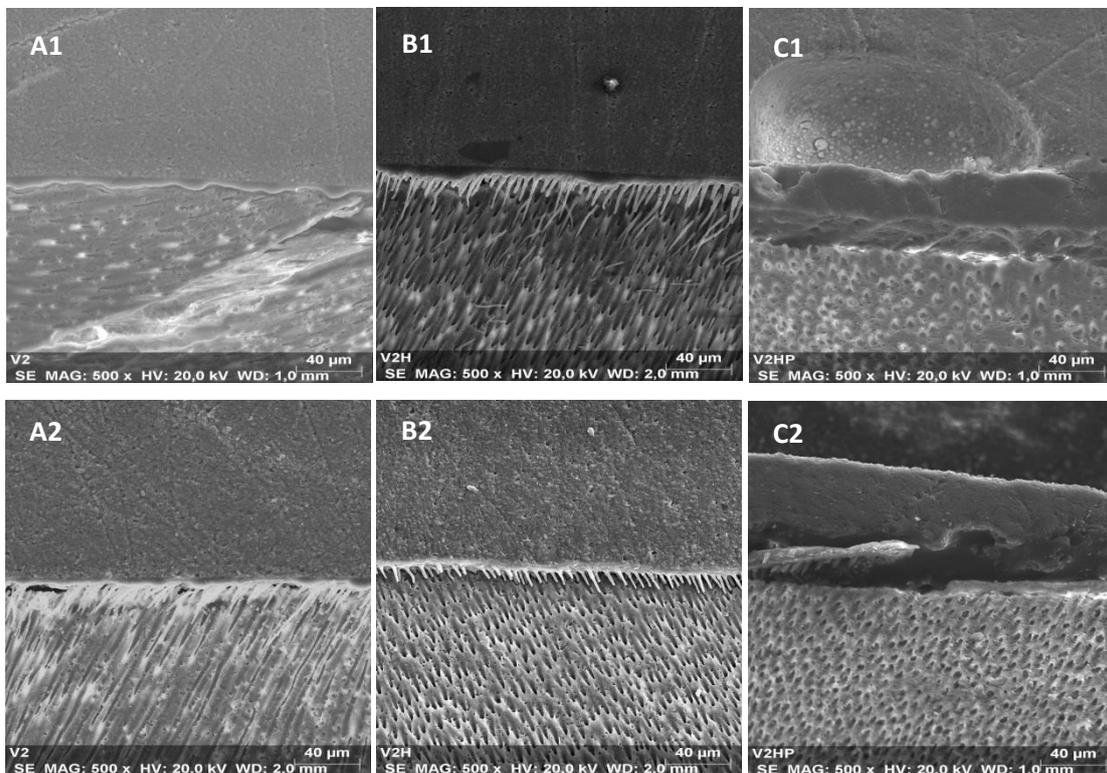


Figura A. 2 - Imagem de SEM para o sistema adesivo Futurabond ER; (A) – Grupo A: aplicação de um dos sistemas adesivos em estudo; (B) – Grupo B: aplicação de um dos sistemas

adesivos seguido de camada de resina hidrófoba; (C) – Grupo C: aplicação de um dos sistemas adesivos sobre pressão pulpar seguido de camada de resina hidrófoba; (1) – Espécime 1; (2) – Espécime 2; Ampliação 500x.

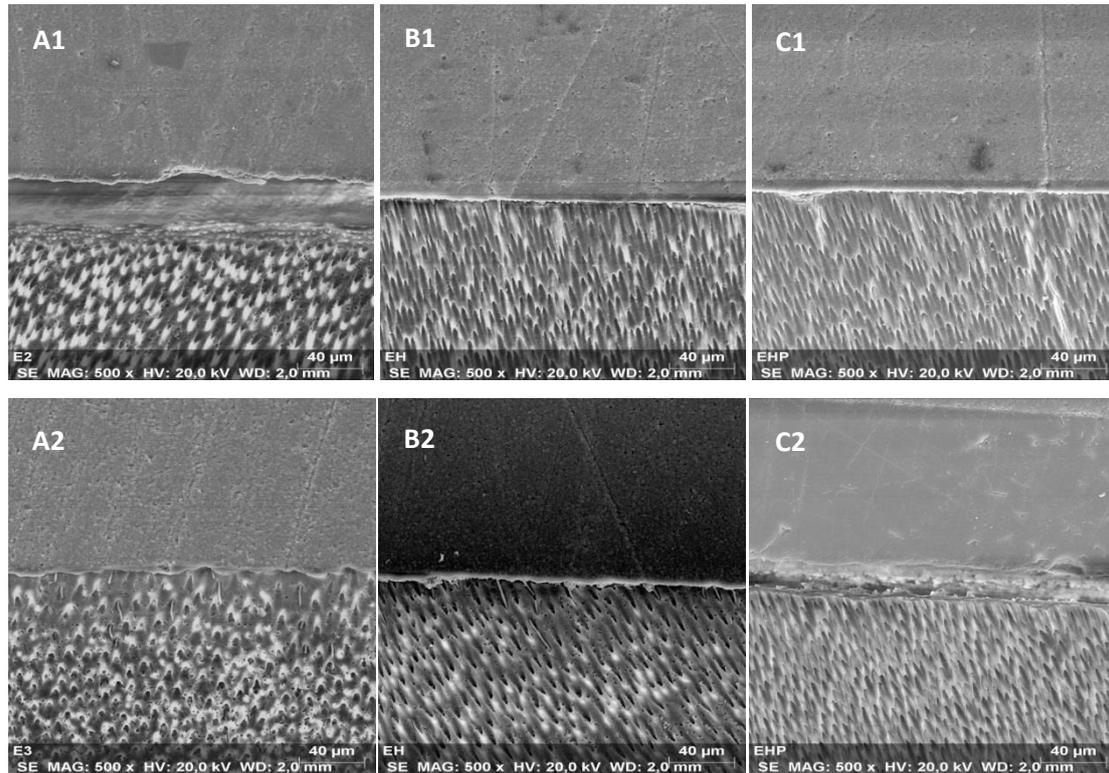
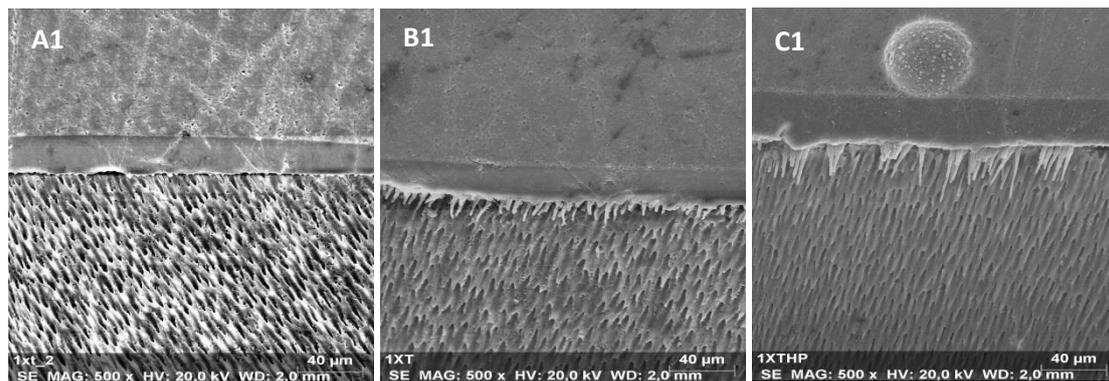


Figura A. 3 - Imagem de SEM para o sistema adesivo Easybond; (A) – Grupo A: aplicação de um dos sistemas adesivos em estudo; (B) – Grupo B: aplicação de um dos sistemas adesivos seguido de camada de resina hidrófoba; (C) – Grupo C: aplicação de um dos sistemas adesivos sobre pressão pulpar seguido de camada de resina hidrófoba; (1) – Espécime 1; (2) – Espécime 2; Ampliação 500x.



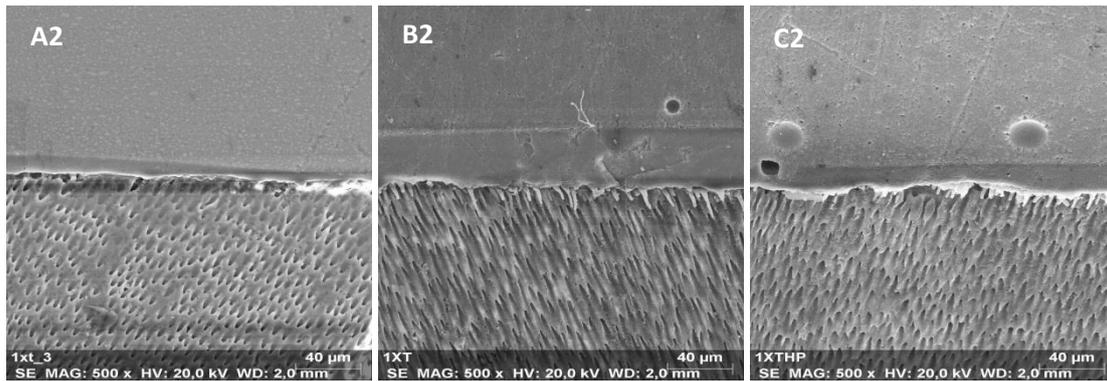


Figura A. 4 - Imagem de SEM para o sistema adesivo Scotchbond 1XT; (A) – Grupo A: aplicação de um dos sistemas adesivos em estudo; (B) – Grupo B: aplicação de um dos sistemas adesivos seguido de camada de resina hidrófoba; (C) – Grupo C: aplicação de um dos sistemas adesivos sobre pressão pulpar seguido de camada de resina hidrófoba; (1) – Espécime 1; (2) – Espécime 2; Ampliação 500x.

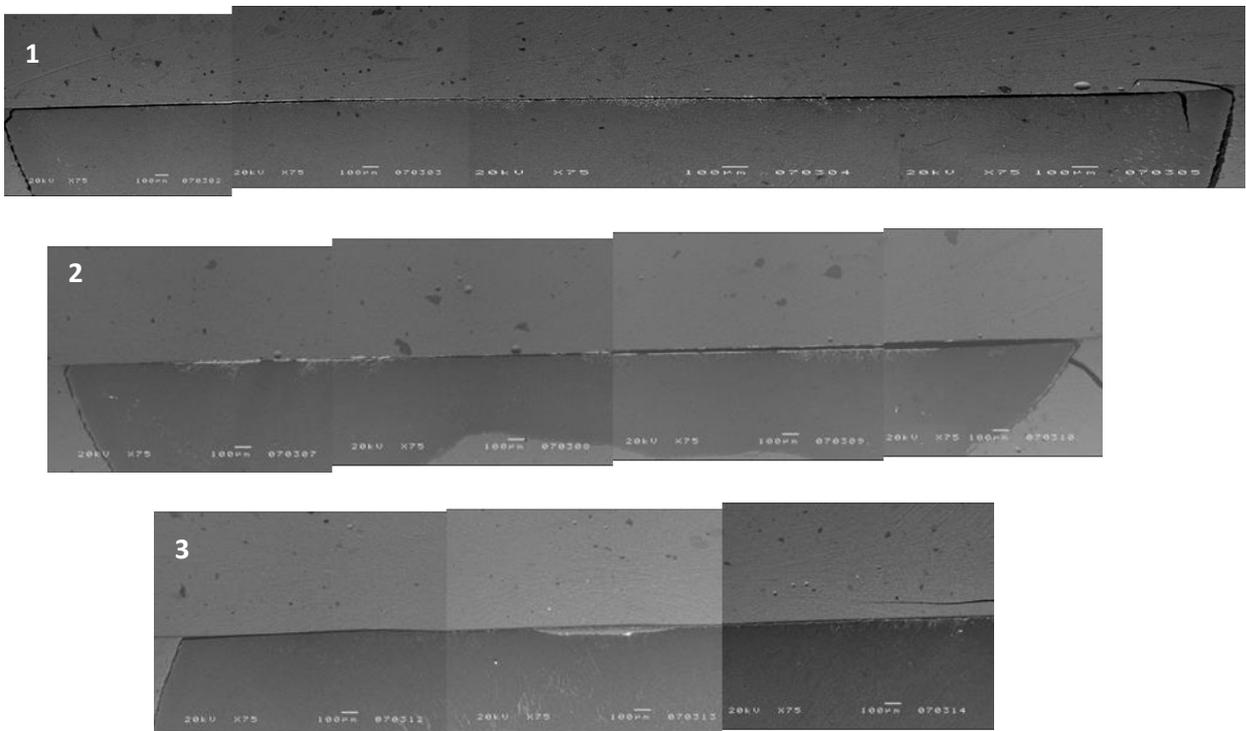
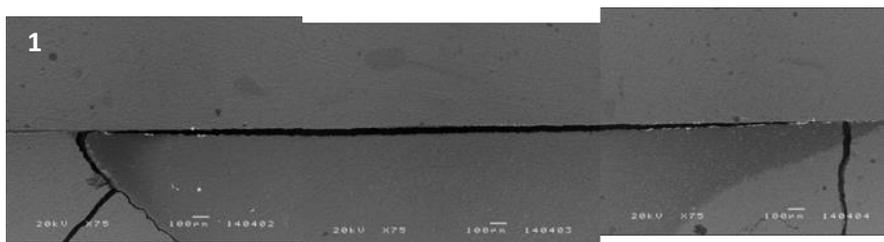


Figura A. 5 - Reconstrução de imagens de SEM com elétrons retrodifundidos para cálculo de percentagem de nanoinfiltração para o sistema adesivo Futurabond SE do grupo A: aplicação de um dos sistemas adesivos em estudo; (1) – Espécime 1; (2) – Espécime 2; (3) – Espécime 3; Ampliação 75x.



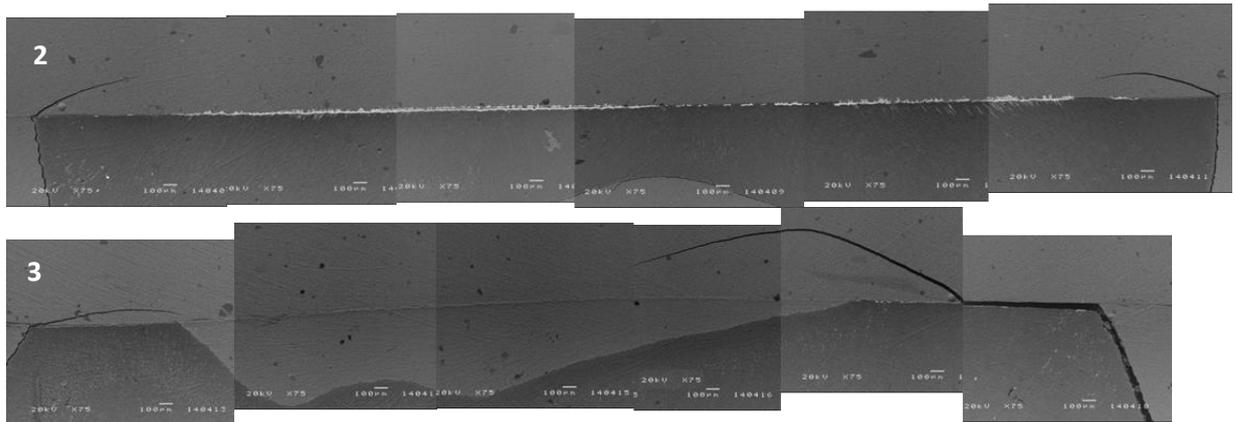


Figura A. 6 - Reconstrução de imagens de SEM com elétrons retrodifundidos para cálculo de percentagem de nanoinfiltração para o sistema adesivo Futurabond ER do grupo A: aplicação de um dos sistemas adesivos em estudo; (1) – Espécime 1; (2) – Espécime 2; (3) – Espécime 3; Ampliação 75x.

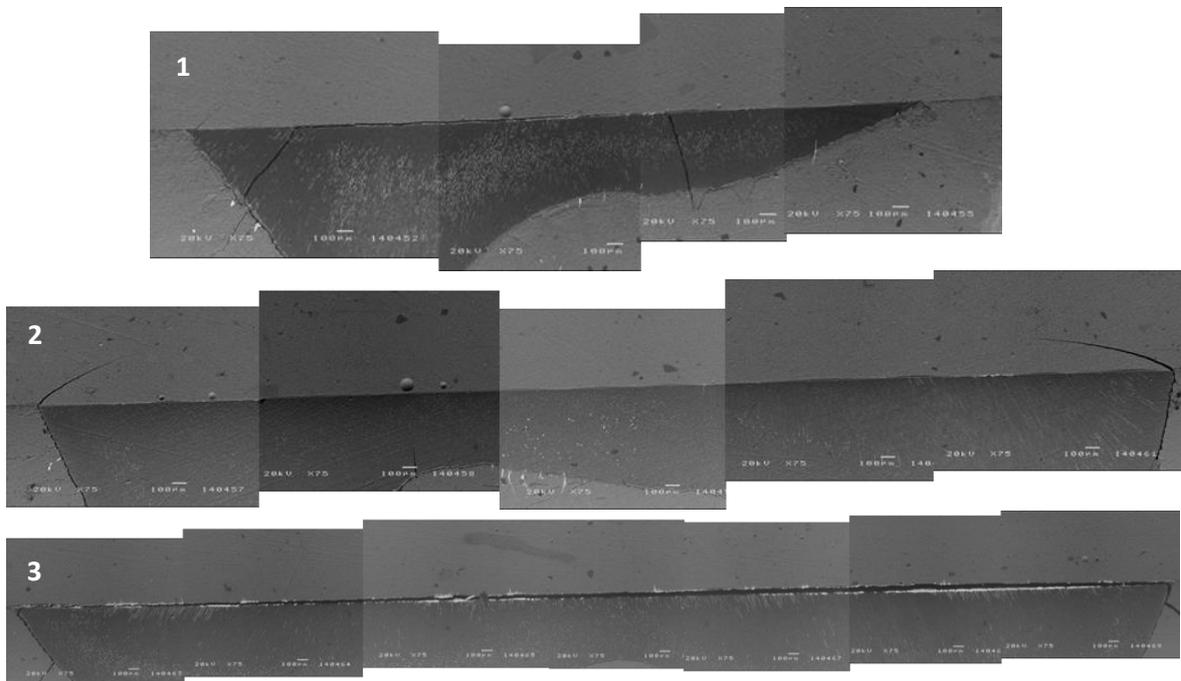
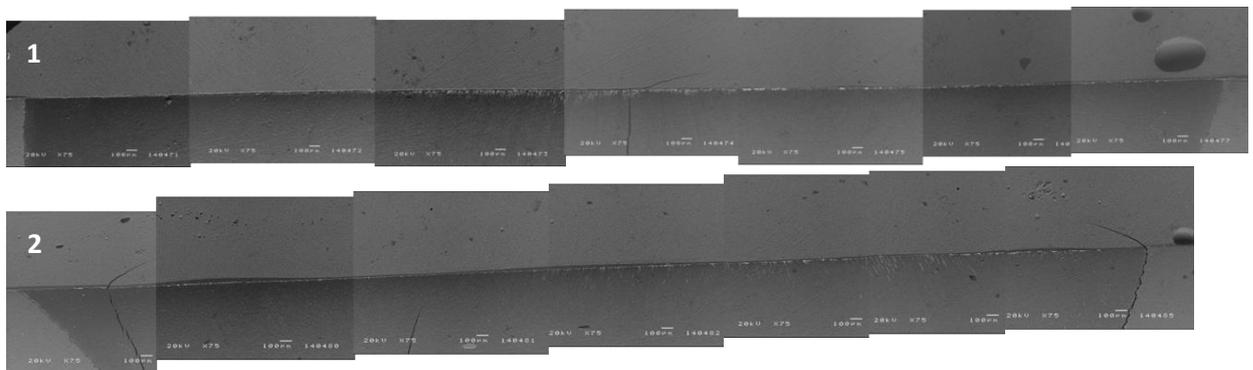


Figura A. 7 - Reconstrução de imagens de SEM com elétrons retrodifundidos para cálculo de percentagem de nanoinfiltração para o sistema adesivo Easybond do grupo A: aplicação de um dos sistemas adesivos em estudo; (1) – Espécime 1; (2) – Espécime 2; (3) – Espécime 3; Ampliação 75x.



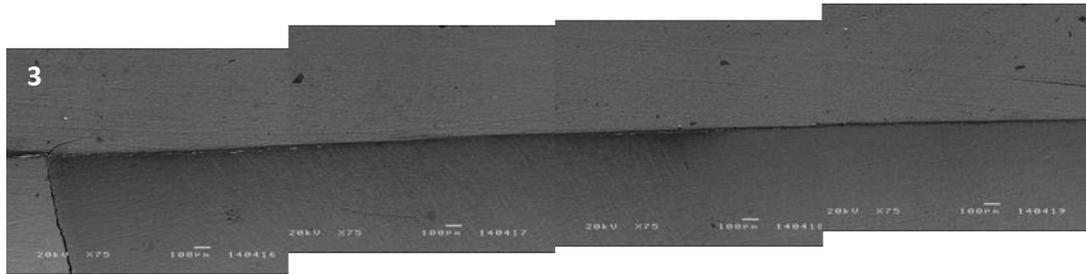


Figura A. 8 - Reconstrução de imagens de SEM com elétrons retrodifundidos para cálculo de percentagem de nanoinfiltração para o sistema adesivo Scotchbond 1XT do grupo A: aplicação de um dos sistemas adesivos em estudo; (1) – Espécime 1; (2) – Espécime 2; (3) – Espécime 3; Ampliação 75x.

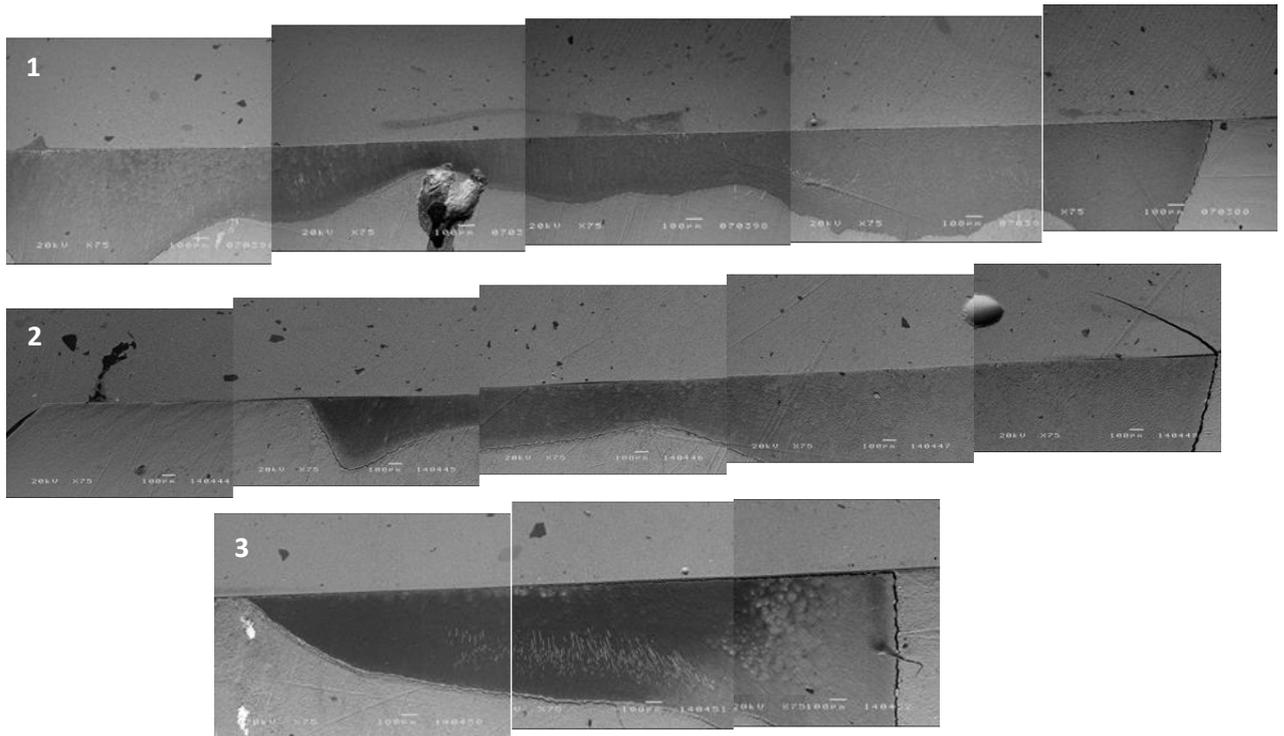
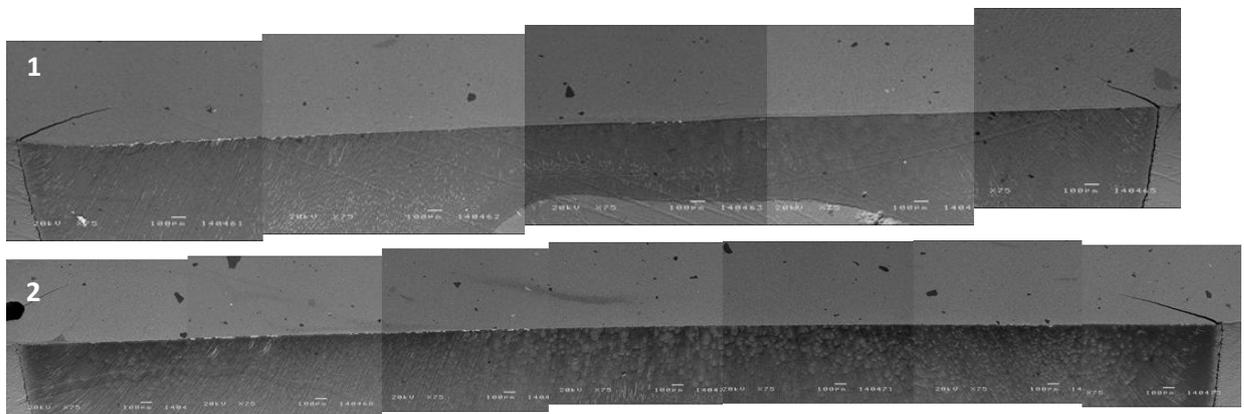


Figura A. 9 - Reconstrução de imagens de SEM com elétrons retrodifundidos para cálculo de percentagem de nanoinfiltração para o sistema adesivo Futurabond SE do grupo B: aplicação de um dos sistemas adesivos seguido de camada de resina hidrófoba; (1) – Espécime 1; (2) – Espécime 2; (3) – Espécime 3; Ampliação 75x.



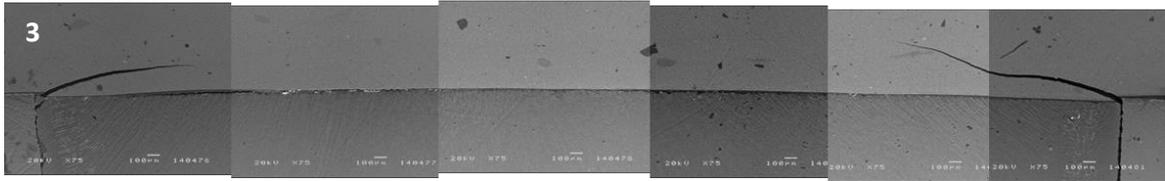


Figura A. 10 - Reconstrução de imagens de SEM com elétrons retrodifundidos para cálculo de percentagem de nanoinfiltração para o sistema adesivo Futurabond ER do grupo B: aplicação de um dos sistemas adesivos seguido de camada de resina hidrófoba; (1) – Espécime 1; (2) – Espécime 2; (3) – Espécime 3; Ampliação 75x.

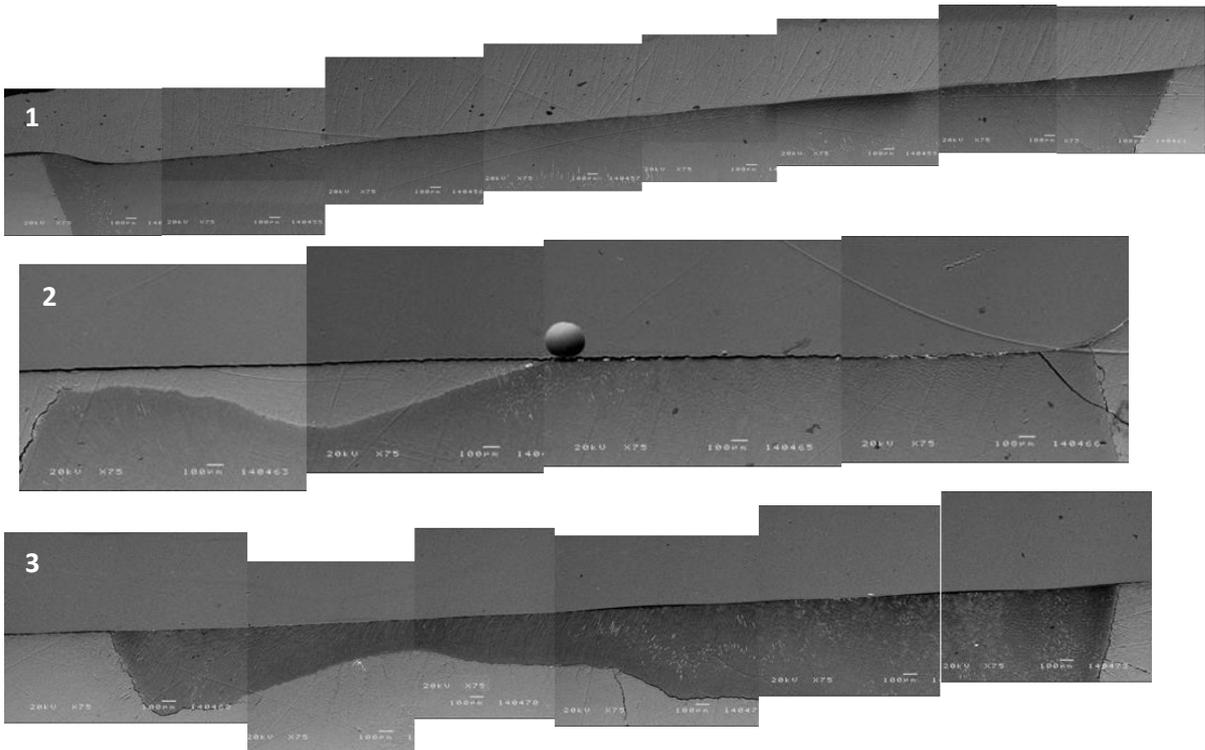
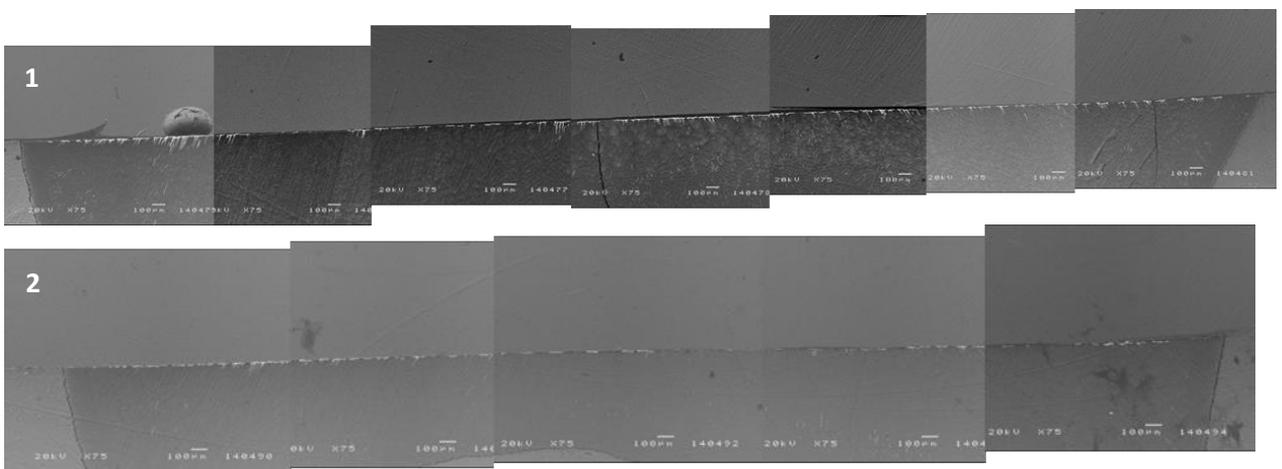


Figura A. 11 – Reconstrução de imagens de SEM com elétrons retrodifundidos para cálculo de percentagem de nanoinfiltração para o sistema adesivo Easybond do grupo B: aplicação de um dos sistemas adesivos seguido de camada de resina hidrófoba; (1) – Espécime 1; (2) – Espécime 2; (3) – Espécime 3; Ampliação 75x.



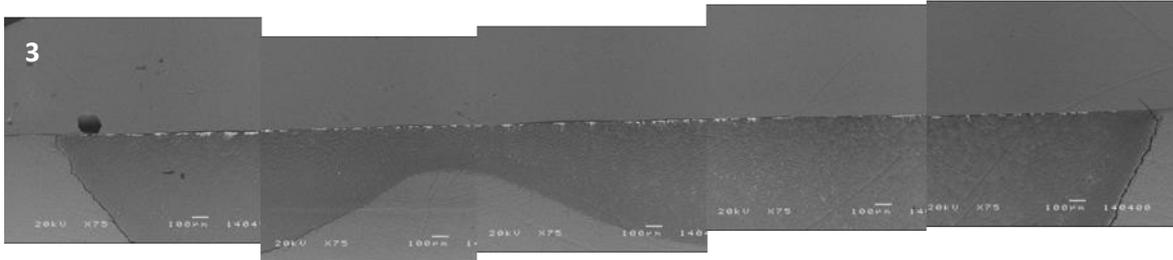


Figura A. 12 - Reconstrução de imagens de SEM com elétrons retrodifundidos para cálculo de percentagem de nanoinfiltração para o sistema adesivo Scotchbond 1XT do grupo B: aplicação de um dos sistemas adesivos seguido de camada de resina hidrófoba; (1) – Espécime 1; (2) – Espécime 2; (3) – Espécime 3; Ampliação 75x.

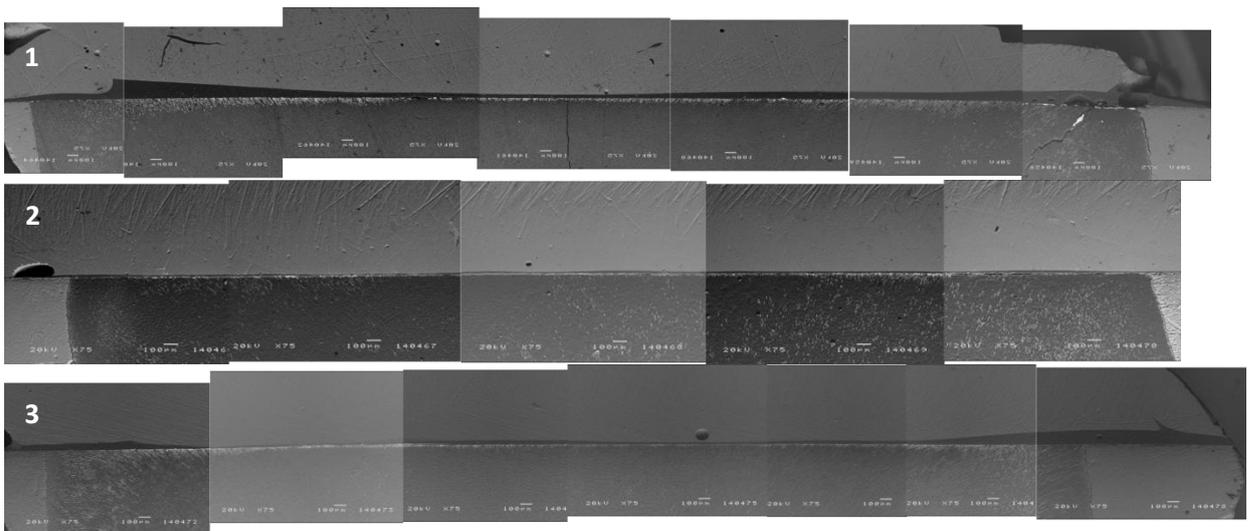


Figura A. 13 - Reconstrução de imagens de SEM com elétrons retrodifundidos para cálculo de percentagem de nanoinfiltração para o sistema adesivo Futurabond SE do grupo C: aplicação de um dos sistemas adesivos sobre pressão pulpar seguido de camada de resina hidrófoba; (1) – Espécime 1; (2) – Espécime 2; (3) – Espécime 3; Ampliação 75x.

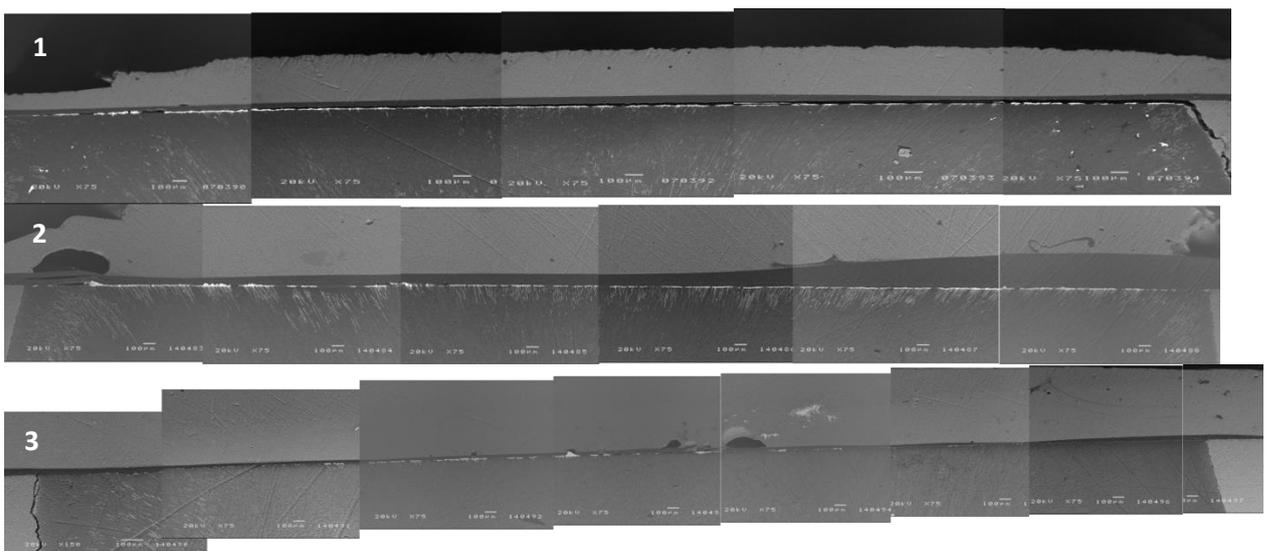


Figura A. 14 - Reconstrução de imagens de SEM com elétrons retrodifundidos para cálculo de percentagem de nanoinfiltração para o sistema adesivo Futurabond ER do grupo C: aplicação de

um dos sistemas adesivos sobre pressão pulpar seguido de camada de resina hidrófoba; (1) – Espécime 1; (2) – Espécime 2; (3) – Espécime 3; Ampliação 75x.

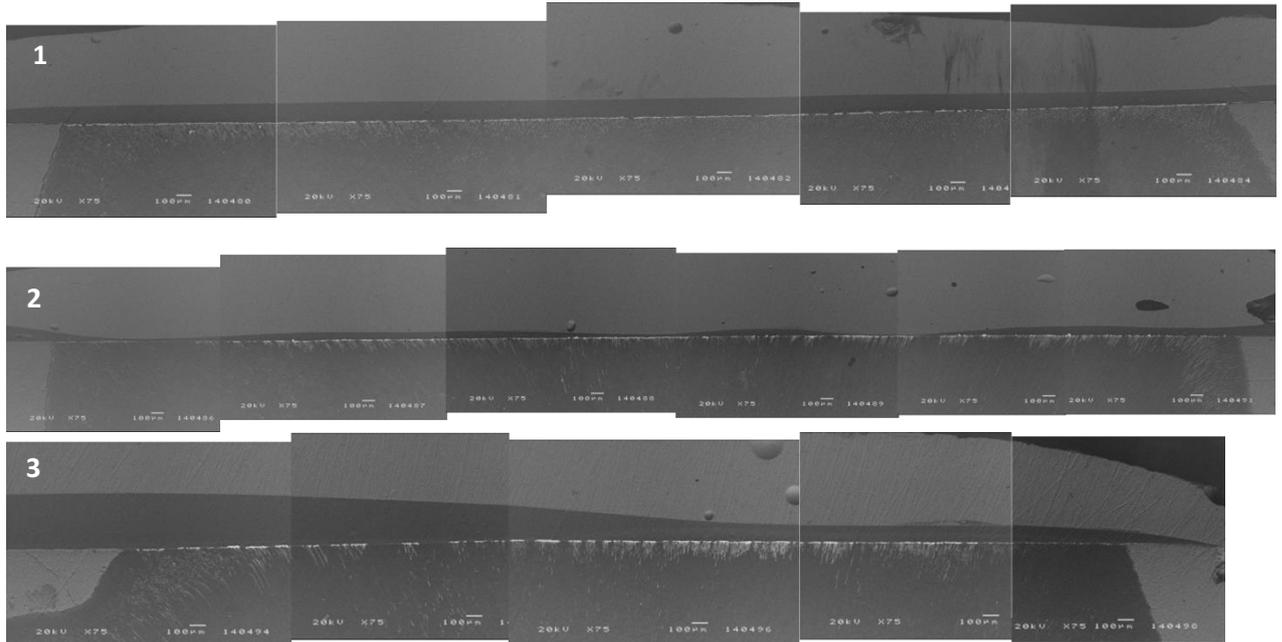


Figura A. 15 – Reconstrução de imagens de SEM com elétrons retrodifundidos para cálculo de percentagem de nanoinfiltração para o sistema adesivo Easybond do grupo C: aplicação de um dos sistemas adesivos sobre pressão pulpar seguido de camada de resina hidrófoba; (1) – Espécime 1; (2) – Espécime 2; (3) – Espécime 3; Ampliação 75x.

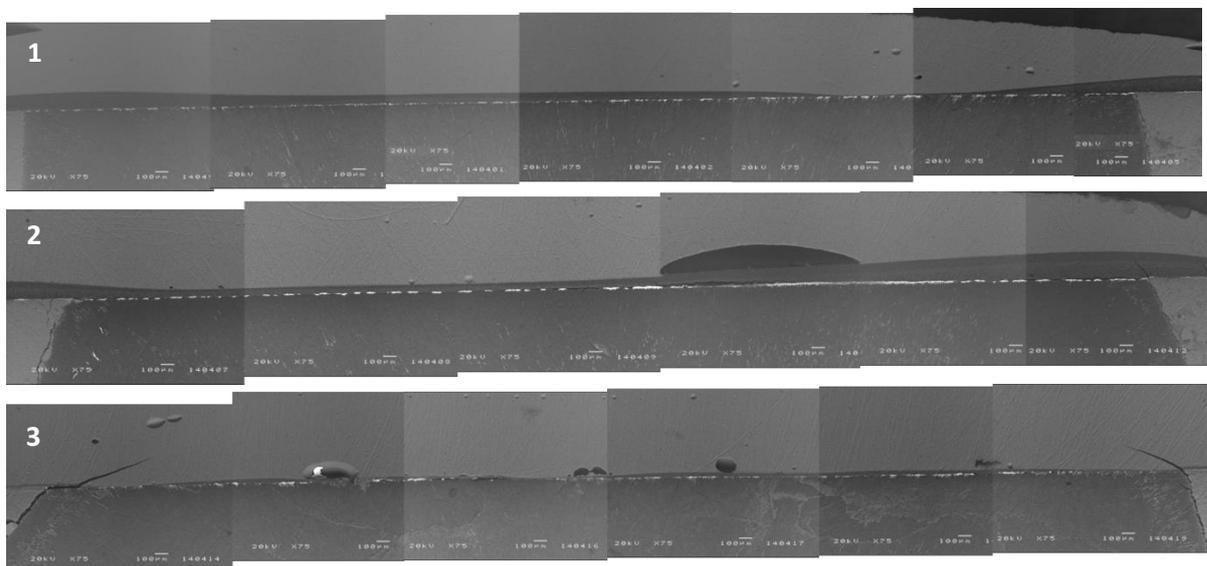


Figura A. 16 - Reconstrução de imagens de SEM com elétrons retrodifundidos para cálculo de percentagem de nanoinfiltração para o sistema adesivo Scotchbond 1XT do grupo C: aplicação de um dos sistemas adesivos sobre pressão pulpar seguido de camada de resina hidrófoba; (1) – Espécime 1; (2) – Espécime 2; (3) – Espécime 3; Ampliação 75x.

Anexo B – Tabelas

Tabela B. 1 - Estatística descritiva da percentagem de nanoinfiltração para cada grupo e subgrupo.

Grupo	Subgrupo	Estatística descritiva (percentagens)	
A	Futurabond SE	Média	44,1000
		Desvio-padrão	30,81411
		Mínimo	8,56
		Máximo	63,35
	Futurabond ER	Média	37,2667
		Desvio-padrão	34,52953
		Mínimo	12,72
		Máximo	76,75
	Easybond	Média	34,2267
		Desvio-padrão	37,95989
		Mínimo	7,58
		Máximo	77,69
	Scotchbond 1XT	Média	20,8667
		Desvio-padrão	6,16137
		Mínimo	14,55
		Máximo	26,86
B	Futurabond SE	Média	0,5300
		Desvio-padrão	0,65818
		Mínimo	0,01
		Máximo	1,27
	Futurabond ER	Média	12,8133
		Desvio-padrão	8,00383
		Mínimo	6,25
		Máximo	21,73
	Easybond	Média	6,4700
		Desvio-padrão	8,40666
		Mínimo	0,90
		Máximo	16,14
	Scotchbond 1XT	Média	48,3800
		Desvio-padrão	12,84589
		Mínimo	38,01
		Máximo	62,75
C	Futurabond SE	Média	29,8067
		Desvio-padrão	20,31336

	Mínimo	11,57
	Máximo	51,70
Futurabond ER	Média	57,8767
	Desvio-padrão	31,44832
	Mínimo	21,84
	Máximo	79,77
Easybond	Média	65,1733
	Desvio-padrão	13,32466
	Mínimo	54,42
	Máximo	80,08
Scotchbond 1XT	Média	48,9967
	Desvio-padrão	9,05000
	Mínimo	39,95
	Máximo	58,05

Tabela B. 2 - Testes de Kolmogorov-Smirnov para avaliação da normalidade da distribuição de valores.

Tests of Normality

SistemaAdesivo	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
nanoinfiltração Futurabond SE	,246	9	,124	,824	9	,038
Futurabond ER	,338	9	,004	,777	9	,011
EasyBond	,263	9	,072	,850	9	,075
Scotchbond 1XT	,132	9	,200 [*]	,969	9	,890

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Tests of Normality

camadahidrofoba	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
nanoinfiltração sim	,128	24	,200 [*]	,916	24	,048
nao	,272	12	,014	,813	12	,013

*. This is a lower bound of the true significance.

Tests of Normality

pressaopulpar	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
nanoinfiltração Sim	,140	12	,200 [*]	,951	12	,645
nao	,218	24	,005	,848	24	,002

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Tabela B. 3 - Testes de Levene para avaliação de homogeneidade.

Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
nanoinfiltração	Based on Mean	6,436	3	32	,002
	Based on Median	3,508	3	32	,026
	Based on Median and with adjusted df	3,508	3	12,569	,048
	Based on trimmed mean	5,425	3	32	,004

Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
nanoinfiltração	Based on Mean	5,353	1	34	,027
	Based on Median	3,814	1	34	,059
	Based on Median and with adjusted df	3,814	1	24,599	,062
	Based on trimmed mean	4,343	1	34	,045

Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
nanoinfiltração	Based on Mean	4,225	1	34	,048
	Based on Median	1,954	1	34	,171
	Based on Median and with adjusted df	1,954	1	24,482	,175
	Based on trimmed mean	3,010	1	34	,092

Tabela B. 4 - Teste de Kruskal-Wallis para análise de nanoinfiltração entre sistemas adesivos estudados para cada grupo de estudo.

Ranks

camadahidrofoba	pressaopulpar	SistemaAdesivo	N	Mean Rank
nao	nao	nanoinfiltração		
		Futurabond SE	3	7,00
		Futurabond ER	3	7,00
		EasyBond	3	6,00
		Scotchbond 1XT	3	6,00
		Total	12	

Test Statistics^{a,b}

camadahidrofoba	pressaopulpar	nanoinfiltração	
nao	nao	Chi-Square	,231
		df	3
		Asymp. Sig.	,972

Ranks

camadahidrofoba	pressaopulpar	SistemaAdesivo	N	Mean Rank
sim	nao	nanoinfiltração		
		Futurabond SE	3	2,33
		Futurabond ER	3	7,33
		EasyBond	3	5,33
		Scotchbond 1XT	3	11,00
		Total	12	

Test Statistics^{a,b}

camadahidrofoba	pressaopulpar	nanoinfiltração	
sim	nao	Chi-Square	9,154
		df	3
		Asymp. Sig.	,027

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: SistemaAdesivo

Ranks

camadahidrofoba	pressaopulpar	SistemaAdesivo	N	Mean Rank
sim	Sim	nanoinfiltração Futurabond SE	3	3,33
		Futurabond ER	3	7,67
		EasyBond	3	9,33
		Scotchbond 1XT	3	5,67
		Total	12	

Test Statistics^{a,b}

camadahidrofoba	pressaopulpar	nanoinfiltração	
sim	Sim	Chi-Square	4,641
		df	3
		Asymp. Sig.	,200

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: SistemaAdesivo

Tabela B. 5 -Teste de Kruskal-Wallis para análise de nanoinfiltração entre grupos com ou sem aplicação de resina hidrófoba e com e sem pressão pulpar.

Ranks

	pressaopulpar	N	Mean Rank
nanoinfiltração	Sim	12	17,00
	nao	12	8,00
	Total	24	

Test Statistics^{a,b}

	nanoinfiltração
Chi-Square	9,720
df	1
Asymp. Sig.	,002

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: pressaopulpar

Ranks

	camadahidrofoba	N	Mean Rank
nanoinfiltração	sim	12	9,58
	nao	12	15,42
	Total	24	

Test Statistics^{a,b}

	nanoinfiltração
Chi-Square	4,083
df	1
Asymp. Sig.	,043

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: camadahidrofoba

Tabela B. 6 -Teste de Mann-Whitney para análise de nanoinfiltração entre sistemas adesivos para o grupo de estudo B (com aplicação de camada de resina hidrófoba).

Ranks

camadahidrofoba	pressaopulpar	SistemaAdesivo	N	Mean Rank	Sum of Ranks	
sim	nao	nanoinfiltração	Futurabond SE	3	2,33	7,00
			EasyBond	3	4,67	14,00
			Total	6		

Test Statistics^a

camadahidrofoba	pressaopulpar	nanoinfiltração	
sim	nao	Mann-Whitney U	1,000
		Wilcoxon W	7,000
		Z	-1,528
		Asymp. Sig. (2-tailed)	,127
		Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,200 ^b

a. Grouping Variable: SistemaAdesivo
 b. Not corrected for ties.

Ranks

camadahidrofoba	pressaopulpar	SistemaAdesivo	N	Mean Rank	Sum of Ranks	
sim	nao	nanoinfiltração	Futurabond SE	3	2,00	6,00
			Futurabond ER	3	5,00	15,00
			Total	6		

Test Statistics^a

camadahidrofoba	pressaopulpar	nanoinfiltração	
sim	nao	Mann-Whitney U	,000
		Wilcoxon W	6,000
		Z	-1,964
		Asymp. Sig. (2-tailed)	,050
		Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,100 ^b

a. Grouping Variable: SistemaAdesivo
 b. Not corrected for ties.

Ranks

camadahidrofoba	pressaopulpar	SistemaAdesivo	N	Mean Rank	Sum of Ranks	
sim	nao	nanoinfiltração	Futurabond ER	3	2,00	6,00
			Scotchbond 1XT	3	5,00	15,00
			Total	6		

Test Statistics^a

camadahidrofoba	pressaopulpar	nanoinfiltração	
sim	nao	Mann-Whitney U	,000
		Wilcoxon W	6,000
		Z	-1,964
		Asymp. Sig. (2-tailed)	,050
		Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,100 ^b

a. Grouping Variable: SistemaAdesivo
 b. Not corrected for ties.

Ranks

camadahidrofoba	pressaopulpar	SistemaAdesivo	N	Mean Rank	Sum of Ranks	
sim	nao	nanoinfiltração	EasyBond	3	2,00	6,00
			Scotchbond 1XT	3	5,00	15,00
			Total	6		

Test Statistics^a

camadahidrofoba	pressaopulpar	nanoinfiltração	
sim	nao	Mann-Whitney U	,000
		Wilcoxon W	6,000
		Z	-1,964
		Asymp. Sig. (2-tailed)	,050
		Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,100 ^b

a. Grouping Variable: SistemaAdesivo
 b. Not corrected for ties.

Tabela B. 7 - Teste de Mann-Whitney para análise de nanoinfiltração entre grupos com e sem pressão pulpar para cada sistema adesivo.

Ranks^a

	pressaopulpar	N	Mean Rank	Sum of Ranks
nanoinfiltração	Sim	3	5,00	15,00
	nao	3	2,00	6,00
	Total	6		

a. SistemaAdesivo = EasyBond

Test Statistics^{a,b}

	nanoinfiltração
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	6,000
Z	-1,964
Asymp. Sig. (2-tailed)	,050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,100 ^c

a. SistemaAdesivo = EasyBond

b. Grouping Variable: pressaopulpar

c. Not corrected for ties.

Ranks^a

	pressaopulpar	N	Mean Rank	Sum of Ranks
nanoinfiltração	Sim	3	5,00	15,00
	nao	3	2,00	6,00
	Total	6		

a. SistemaAdesivo = Futurabond SE

Test Statistics^{a,b}

	nanoinfiltração
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	6,000
Z	-1,964
Asymp. Sig. (2-tailed)	,050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,100 ^c

a. SistemaAdesivo = Futurabond SE

b. Grouping Variable: pressaopulpar

c. Not corrected for ties.

Ranks^a

	pressaopulpar	N	Mean Rank	Sum of Ranks
nanoinfiltração	Sim	3	3,67	11,00
	nao	3	3,33	10,00
	Total	6		

a. SistemaAdesivo = Scotchbond 1XT

Test Statistics^{a,b}

	nanoinfiltração
Mann-Whitney U	4,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-,218
Asymp. Sig. (2-tailed)	,827
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1,000 ^c

a. SistemaAdesivo = Scotchbond 1XT

b. Grouping Variable: pressaopulpar

c. Not corrected for ties.

Ranks^a

pressaopulpar		N	Mean Rank	Sum of Ranks
nanoinfiltração	Sim	3	5,00	15,00
	nao	3	2,00	6,00
Total		6		

a. SistemaAdesivo = Futurabond ER

Test Statistics^{a,b}

	nanoinfiltração
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	6,000
Z	-1,964
Asymp. Sig. (2-tailed)	,050
Exact Sig. [2* (1-tailed Sig.)]	,100 ^c

a. SistemaAdesivo = Futurabond ER

b. Grouping Variable: pressaopulpar

c. Not corrected for ties.