



FMUC FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

**Avaliação de forças de adesão de adesivos autocondicionantes em esmalte decíduo:
estudo piloto**

Ana Margarida Mourão Monteiro da Silva e Castro

Orientador: Prof. Doutor João Carlos Ramos

Coorientadora: Dra. Ana Daniela Soares

Coimbra, Julho 2018

**Avaliação de forças de adesão de adesivos autocondicionantes em esmalte decíduo:
estudo piloto**

Castro, M¹; Soares AD²; Ramos, JC³

¹ Aluna do Mestrado Integrado em Medicina Dentária, FMUC, Coimbra, Portugal

² Assistente Convidada da Unidade Curricular de Odontopediatria I, II e III do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

³ Professor Auxiliar do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Área de Medicina Dentária, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra
Av. Bissaya Barreto, Blocos de Celas
Portugal
Tel.: +351 239484183
Fax.: +351 239402910
3000-075 Coimbra
Portugal

E-mail: marg.castro94@gmail.com

Sumário

- Resumo
- *Abstract*
- Introdução
- Materiais e Métodos
- Resultados
- Discussão
- Conclusões
- Agradecimentos
- Referências bibliográficas
- Anexos
- Lista de abreviaturas
- Índice

RESUMO

Introdução: A considerável evolução dos sistemas adesivos é responsável por muitas publicações a respeito do comportamento destes materiais relativamente à dentição definitiva. Em dentição decídua, estes estudos revelam-se escassos e as peculiaridades estruturais desta dentição não permitem que os resultados obtidos em dentes definitivos sejam extrapolados para os dentes decíduos.

Objetivo: Conduzir um estudo piloto para avaliação das forças de adesão, com recurso a testes de microtração (μ TBS), de três sistemas adesivos aplicados segundo as normas do fabricante em esmalte decíduo.

Materiais e Métodos: Onze superfícies de esmalte foram preparadas com auxílio de uma broca diamantada de acabamento, em turbina (de grão 45) em baixa rotação e com disco de grão grosso (Black (Coarse L506), Super-Snap Rainbow Technique Kit), finalizando-se a preparação do esmalte com lixa de carboneto de silício (grão 600). As amostras foram divididas aleatoriamente em três grupos experimentais de acordo com o sistema adesivo a avaliar: Grupo 1 - Prime & Bond[®] XP, Grupo 2 - Clearfil[™] S³ bond plus e Grupo 3 - Clearfil[™] SE Protect. De seguida foram realizados os procedimentos adesivos (de acordo com as instruções do fabricante) e posteriormente restaurados com uma resina composta microhíbrida (Ceram.X[®]). Os dentes foram seccionados (Accutom 5, Struers, Ballerup, Dinamarca) por forma a obter bastonetes de secção quadrangular (1mm x 1mm), e posteriormente sujeitos a testes de adesão por microtração numa máquina de testes universal (Model AG-I, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). Os valores obtidos (MPa) analisaram-se utilizando os testes paramétricos ANOVA e de comparação múltipla de Tukey HSD ($p \leq 0,05$). Adicionalmente, foram preparadas duas amostras por cada grupo para estudar a ultramorfolgia da interface através de microscopia electrónica de varrimento (MEV).

Resultados: O sistema adesivo Prime & Bond[®] XP apresentou o maior valor médio de μ TBS (19,70 Mpa), que não foi significativamente diferente do valor médio de μ TBS obtido para o Clearfil[™] SE Protect (19,27 Mpa). Em contrapartida, o menor valor foi obtido pelo grupo 2 (Clearfil[™] S³ bond plus) (13,22 Mpa). Este grupo foi estatisticamente diferente do Prime & Bond[®] XP e do o Clearfil[™] SE Protect.

Conclusões: Tendo em conta as limitações inerentes aos estudos *in vitro*, foi possível concluir que alguns sistemas adesivos autocondicionantes conseguem obter valores de adesão em esmalte decíduo similares aos adesivos do tipo “condicionar e lavar”.

Palavras-chave: “microtensile”, “enamel”, “primary teeth”, “deciduous teeth”, “self-etch”.

ABSTRACT

Introduction: The considerable evolution of adhesive systems is responsible for many publications regarding the behavior of these materials when applied to the permanent dentition. In primary dentition, these studies are scarce and the structural peculiarities of this dentition do not allow the results obtained in permanent teeth to be extrapolated to the primary teeth.

Aim: Conducting a pilot study to evaluate the adhesive strength using the microtensile test (μ TBS), of three groups of adhesive systems, in primary enamel.

Materials and Methods: Eleven enamel surfaces were prepared using a diamond finishing drill in a low-rotation turbine (45 grit) and with a coarse-grain black disc (Coarse L506), Super-Snap Rainbow Technique Kit), the preparation of the enamel with silicon carbide sandpaper (grain 600). The samples were randomly divided into three experimental groups, according to the adhesive system to evaluate: Group 1 - Prime & Bond[®] XP, Group 2 - Clearfil[™] S³ bond plus and Group 3 - Clearfil[™] SE Protect. The adhesive procedures (according to the manufacturer's instructions) were then performed and then restored with a microhybrid composite resin (Ceram.X[®]). The teeth were sectioned (Accutom 5, Struers, Ballerup, Denmark) in order to obtain quadrangular section rods (1x1mm), each of them were subsequently subjected to a microtensile adhesion test on a universal testing machine (Model AG-I, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). The obtained values (MPa) were analyzed using the parametric ANOVA and comparison of Tukey HSD ($p \leq 0.05$). In addition, two samples per group were prepared to study the ultramorphology of the interface by scanning electron microscopy (SEM).

Results: The adhesive system Prime & Bond XP showed the highest medium value of μ TBS (19,70 Mpa), which was not significantly different of medium value of μ TBS obtained by Clearfil[™] SE Protect (19,27 Mpa). On the other hand, the lowest value was obtained by group 2 (Clearfil[™] S³ bond plus) (13,22 Mpa). This group was statistically different of Prime & Bond XP and Clearfil[™] SE Protect.

Conclusions: Regarding the inherent limitations to the *in vitro* studies, it was possible to conclude that some self-etching adhesives can achieve adhesion values in deciduous enamel similar to the etch-and-rinse adhesives systems.

Keywords: "microtensile", "enamel", "primary teeth", "deciduous teeth", "self-etch

INTRODUÇÃO

Atualmente, em Medicina Dentária, há um enorme interesse pela procura de sistemas adesivos de melhor qualidade, isto é, que sejam capazes de fornecer a maior força de adesão em esmalte e dentina de forma a prevenir a formação de falhas marginais, contaminação bacteriana, sensibilidade pós-operatória e recidiva de cárie, e ainda assim tenham protocolos de aplicação mais simplificados. Com o objetivo de promover uma retenção micromecânica e/ou química entre a estrutura dentária e o material restaurador, os sistemas adesivos atualmente utilizados podem ser agrupados segundo o protocolo de aplicação: o de “condicionar e lavar” (*etch-and-rinse*) que requer um condicionamento prévio da superfície com ácido fosfórico e respetiva lavagem, o autocondicionante (*self-etch*) que dispensa o passo do condicionamento ácido; e por último a estratégia mista que consiste no condicionamento seletivo do esmalte com ácido fosfórico conjugado com o método autocondicionante na dentina^{1,2,3,4,5,6,7}.

Os sistemas adesivos *etch-and-rinse* (condicionar e lavar), podem ser classificados em três passos e dois frascos ou dois passos e um frasco, sendo os segundos os mais utilizados atualmente. Estes sistemas adesivos baseiam-se num primeiro passo, o condicionamento com ácido fosfórico, que permite a remoção completa da *smear layer*, e na aplicação do *primer* seguida da resina adesiva^{1,3,7,8}.

Os adesivos *self-etch* diferem dos anteriores pois não necessitam do passo isolado do condicionamento ácido dos substratos dentários, uma vez que contêm na sua composição monómeros acídicos que vão dissolver parcialmente a *smear layer*, tendo na sua base um mecanismo duplo de adesão (micromecânica e química)¹. A *smear layer* dissolvida é incorporada na camada híbrida, que neste tipo de adesão, pode ser menos espessa que a formada pelos adesivos *etch-and-rinse*^{1,2,3,7}. Os adesivos autocondicionantes encontram-se disponíveis para utilização em dois passos e dois frascos, quando o *primer* ácido e o adesivo são fornecidos separadamente; em dois frascos e um passo, quando a mistura dos dois componentes é feita fora da cavidade oral; ou ainda em um passo – um frasco, se estes forem fornecidos no mesmo frasco. Estes podem ainda ser classificados de acordo com a sua acidez: fortes (pH <1), intermédios (pH=1,5) ou leves (pH >2)^{2,9}. Esta abordagem é reivindicada como mais simples, uma vez que o tempo da sua aplicação é menor e compreende menos passos, o que constitui uma vantagem na área da Odontopediatria. Nestes adesivos são também relatados menor número de casos de sensibilidade pós-

operatória, uma vez que toda a estrutura desmineralizada pelos *primers* acídicos é em simultâneo preenchida pelo sistema adesivo, existindo uma menor probabilidade de encontrar zonas desmineralizadas e sem adesivo (como por vezes ocorre quando o condicionamento ácido é feito de forma isolada) ^{3,7,10,11,12}.

Mais recentemente, foi introduzido no mercado um tipo de sistema adesivo vulgarmente denominado como “universal”, “multi purpose” ou “multi-mode”, sendo descrito pelos fabricantes como um produto com muita versatilidade permitindo que o Médico Dentista opte pela técnica adesiva (*etch-and-rinse* de dois passos, *self-etch* de um passo ou até de um condicionamento seletivo apenas no esmalte) consoante a sua preferência ou adaptado à situação clínica ^{3,6}.

O esmalte é uma estrutura homogénea, constituída maioritariamente por conteúdo inorgânico e hidroxiapatite cristalina (cerca de 96%) que permite que o condicionamento e consequentemente a adesão seja mais previsível do que na dentina (constituída por conteúdo orgânico e água) ^{9,10,13}. Na literatura, encontram-se descritos, para o esmalte, três possíveis tipos de padrões de desmineralização: no tipo I o condicionamento ocorre sobretudo na zona do núcleo do prisma e a bainha em torno deste não desmineraliza (criando-se assim zonas de depressão no interior dos prismas), por sua vez no tipo II o núcleo do prisma não sofre um condicionamento tão acentuado, ocorrendo a maior desmineralização na periferia do prisma de esmalte, e por último o tipo III engloba uma combinação dos dois tipos de padrão anteriores ^{4,9}.

É importante realçar que a estrutura morfológica da camada de esmalte periférico difere do esmalte das camadas mais centrais e profundas. Considera-se que a camada mais superficial de esmalte é menos reativa aos ácidos do que as outras camadas. Como o *primer* dos sistemas adesivos *self-etch* apresenta uma acidez inferior à do ácido fosfórico, a presença da camada mais superficial de esmalte parece ser responsável por uma menor *performance* destes adesivos neste substrato ^{11,14}. Alguns autores, referem que o tipo de instrumentação usada para preparar a superfície dentária e também o modo de aplicação pode interferir com a eficácia destes sistemas adesivos ¹⁴. No entanto, a maioria dos autores ainda preconiza um condicionamento seletivo do esmalte anteriormente à utilização de um adesivo *self-etch* ou *universal* de forma a obter valores de adesão mais aceitáveis ^{1,9,13,14}.

Comparativamente aos dentes definitivos, os dentes decíduos apresentam uma câmara pulpar mais ampla (refletindo-se em cornos pulpares localizados muito superficialmente), uma menor espessura da camada de esmalte e do nível de mineralização, maior densidade de prismas de esmalte, assim como, propriedades mecânicas (dureza, força

de tensão) diminuídas^{15,16,17}. Apresentam também uma camada aprismática mais pronunciada (com cerca de 16-45µm de espessura) que se localiza na zona mais superficial do esmalte e, na qual os cristais de hidroxiapatite são regularmente dispostos paralelamente entre si^{13,16}. A camada aprismática, formada pré-eruptivamente, resulta de uma redução da atividade dos ameloblastos, e é mais resistente à dissolução de ácidos dificultando a obtenção de um padrão de condicionamento acentuado e regular^{18,19,20}. O dente decíduo apresenta, ainda, uma maior densidade de túbulos dentinários o que conseqüentemente vai proporcionar uma área menor de dentina intertubular disponível para adesão. A camada híbrida produzida na dentição decídua parece ser mais espessa do que a que é produzida na dentição permanente quando é utilizado o mesmo ácido^{17,21}.

Em conseqüência das diferenças morfológicas do esmalte decíduo e permanente, a interação deste com o ácido fosfórico e os *primers* acídicos é diferente, tornando a adesão mais questionável e não permitindo que os resultados obtidos em dentes definitivos sejam extrapolados para os dentes decíduos. Assim, torna-se fulcral a especificação de um protocolo adesivo eficaz, rápido e simples para este tipo de dentição^{1,10,12}.

O objetivo do presente estudo foi testar as forças de adesão de 3 sistemas adesivos diferentes em esmalte decíduo. Estabeleceu-se a seguinte hipótese nula:

- (H0) não existem diferenças nas forças de adesão entre os vários tipos de adesivos testados em esmalte decíduo.

MATERIAIS E MÉTODOS

1.1 Pesquisa Bibliográfica

A pesquisa foi realizada na base de dados *Pubmed/Medline* com as seguintes palavras-chave: "*deciduous teeth*", "*self etch*", "*primary teeth*", "*microtensile*", "*enamel*" conjugadas seletivamente com o conector booleano "*AND*", definindo-se como critérios de inclusão artigos publicados nos últimos 10 anos, em inglês e com resumo disponível. Por pesquisa cruzada foram ainda acrescentados artigos considerados relevantes para a temática estudada.

1.2 Metodologia

1.2.1 Preparação das amostras

Para a realização do estudo experimental, utilizaram-se 6 molares decíduos, sem lesões de cárie e/ou restaurações. Os 6 dentes foram armazenados individualmente em recipientes com soro fisiológico à temperatura ambiente, por um período não excedente de 6 meses. De seguida, procedeu-se à remoção da polpa remanescente da câmara pulpar de todos os dentes, com auxílio de uma broca diamantada de acabamento de grão 15 de turbina e realizou-se a respetiva radiografia (com o objetivo de avaliar a espessura de esmalte existente). Com recurso a resina composta *Synergy[®] D6*, adesivo *Prime and Bond active[™]* e ácido ortofosfórico, foi preenchida a câmara pulpar de todos os dentes.

Após estes procedimentos, todos os molares foram seccionados paralelamente ao seu longo eixo no sentido mesio-distal para obter duas amostras por dente, e as superfícies vestibular e lingual foram cuidadosamente identificadas. Posteriormente, todas as superfícies de esmalte (vestibular e palatina/lingual) foram desgastadas por forma a mimetizar a *smear layer* produzida durante a remoção da lesão de cárie, primeiramente, com uma broca diamantada de acabamento em turbina (grão 45) em baixa rotação, de seguida com disco de grão grosso (*Black (Coarse L506)*, *Super-Snap Rainbow Technique Kit*), e finalizou-se a preparação do esmalte com lixa de carboneto de silício (grão 600).

As amostras preparadas foram, cuidadosamente, observadas no microscópio óptico (M300, Leica, Suíça) com uma ampliação de 25x para garantir a ausência de dentina na superfície onde seria aplicado o sistema adesivo. Após este procedimento, as amostras vestibulares e linguais foram aleatoriamente divididas em três grupos de acordo com o sistema adesivo testado (a sua composição e métodos de aplicação estão descritos na

Tabela I:

- **Grupo 1** - Prime & Bond® XP (sistema adesivo *etch-and-rinse*)
- **Grupo 2** - Clearfil™ S³ bond (sistema adesivo *self-etch* de 1 frasco e 1 passo)
- **Grupo 3** - Clearfil™ SE Protect (sistema adesivo *self-etch* 2 frascos e 2 passos)

Um único operador aplicou os sistemas adesivos de acordo com os protocolos recomendados pelos fabricantes (Tabela II). Após a aplicação do adesivo, uma resina composta (Ceram.X®, Dentsply, EUA) foi utilizada para reproduzir as restaurações em camadas de 2 mm de espessura. Cada camada foi fotopolimerizada por 20s com um fotopolimerizador de luz LED (SPEC, Coltène, Altstätten, Suíça), seguida por uma polimerização final de 80s (unidade de fotopolimerização de baixa potência com uma intensidade de luz de 650 mW / cm²).

Tabela I - Sistemas adesivos usados no estudo, classificação, composição química, lote, pH e data validade

MATERIAL	FABRICANTE	CLASSIFICAÇÃO	COMPOSIÇÃO	PH	LOTE	VALIDADE
Prime & Bond® XP	DENTSPLY	Sistema <i>etch-and-rinse</i> (2 passos)	Dimetacrilato, Resina de acrilato modificada com ácido fosfórico, iniciador, estabilizador, isopropasol, água	2,5	160700 0575	2018-06
Clearfil™ S³ bond	Kuraray Noritake Dental inc.	Sistema adesivo <i>self-etch</i> (1 frasco, 1 passo)	MDP, Bis-GMA, HEMA, dimetacrilato, alifático hidrófilo, metacrilato alifático hidrófobo, sílica coloidal, aceleradores, iniciadores, NaF, etanol, água, dicamforoquinona <i>Primer</i> : MDPB, MDP, HEMA, dimetacrilato hidrofílico, água.	2,3	1N0059	2019-02
Clearfil™ SE Protect	Kuraray Noritake Dental inc.	Sistema adesivo <i>self-etch</i> (2 frasco, 2 passo)	Adesivo: MDP, Bis-GMA, HEMA, dimetacrilato hidrofóbico, PI, N,N-dietanol-p-toluidina, sílica coloidal silanizada, NaF	2,0	000016	2019 - 01
Ácido Ortofosfórico	VOCO		Ácido fosfórico a 35%	--	172219 2	2019-11
Ceram.X®	DENTSPLY	Compósito universal nano-cerâmico, fotopolimerizável, radiopaco	Bis EMA, TEGDMA, poliureinemetacrilatoC	--	161000 0707	2018-10

HEMA – metacrilato de 2-hidroxietilo; **Bis-GMA** – metacrilato de bisfenol A glicidil; **MDPB** – Brometo de metacrilóilxidecilmiridíneo; **MDP** – Dihidronenofosfato de metacrilóilxidecilo; **NaF** – fluoreto de sódio; **Bis EMA** - bisfenol A etoxilado dimetacrilato; **TEGDMA** – trietilenoglicol dimetacrilato; **PI** – dl-camforoquinona.

Tabela II - Procedimento de aplicação dos materiais em estudo

ADESIVO UTILIZADO	PROCEDIMENTO DE APLICAÇÃO
PRIME & BOND® XP (GRUPO 1)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Aplicação do ácido na superfície durante 15 segundos; 2. Lavagem da superfície com jato de água; 3. Aplicação do adesivo de forma passiva durante 20 segundos; 4. Secar com a seringa de ar durante 5 segundos; 5. Fotopolimerizar durante 20 segundos.
CLEARFIL™ S³ BOND (GRUPO 2)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Aplicação do adesivo durante 10 segundos; 2. Secagem da superfície durante 5 segundos com seringa de ar, suavemente; 3. Fotopolimerizar durante 10 segundos.
CLEARFIL™ SE PROTECT (GRUPO 3)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Aplicação ativa do <i>primer</i> durante 20 segundos; 2. Secagem da superfície com seringa de ar, suavemente, durante 5 segundos; 3. Aplicação do <i>bond</i>; 4. Secar gentilmente; 5. Fotopolimerizar durante 20 segundos.

1.2.2. Teste de microtração (μ TBS)

Para a elaboração dos testes de microtração, cada amostra foi seccionada sequencialmente numa máquina de corte por um disco diamantado (Accutom 5, Struers, Ballerup, Dinamarca) a uma velocidade de 1000 rpm a 0,100mm/s, perpendicularmente à interface adesiva a fim de obter cortes paralelos de 1 mm. Posteriormente, os espaços entre as fatias foram secos e preenchidos com um silicone polivinilsiloxano (Aquasil Ultra XLV; Dentsply DeTrey; Konstanz, Alemanha) para estabilização da amostra. Seguidamente, as amostras foram seccionadas verticalmente, dividindo os cortes paralelos horizontais em bastonetes. Todos os bastonetes derivados de cada amostra foram analisados num microscópio óptico (Leica CLS 150 MR; Heerbrugg, Suíça) ajustado a uma ampliação de 35x de modo a eliminar os elementos com algum tipo de falha.

Cada bastonete foi medido com um especímetro (Mitutoyo digital caliper, Kanagawa,

Japão) para determinar a respetiva área. Para a execução dos testes de microtração, cada bastonete foi fixado com cola (CE10 Flex, Cehem) num dispositivo metálico devidamente identificado. Seguidamente, cada peça foi submetida ao teste de microtração numa máquina universal de ensaios mecânicos (Modelo AG-IS, 10 Kn, Shimadzu, Kyoto, Japão). Os valores de μ TBS foram expressos em MPa e calculados dividindo-se a força imposta (N) no momento da fratura pela área aderida (mm^2). As amostras fraturadas foram avaliadas em microscópio ótico (Leica CLS 150 MR Heerbrugg, Suíça) com aumento de 40x para determinar o modo de falha, que foi classificado como falha coesiva no esmalte (CE), falha coesiva em resina composta (CR), adesiva (A) ou mista (M).

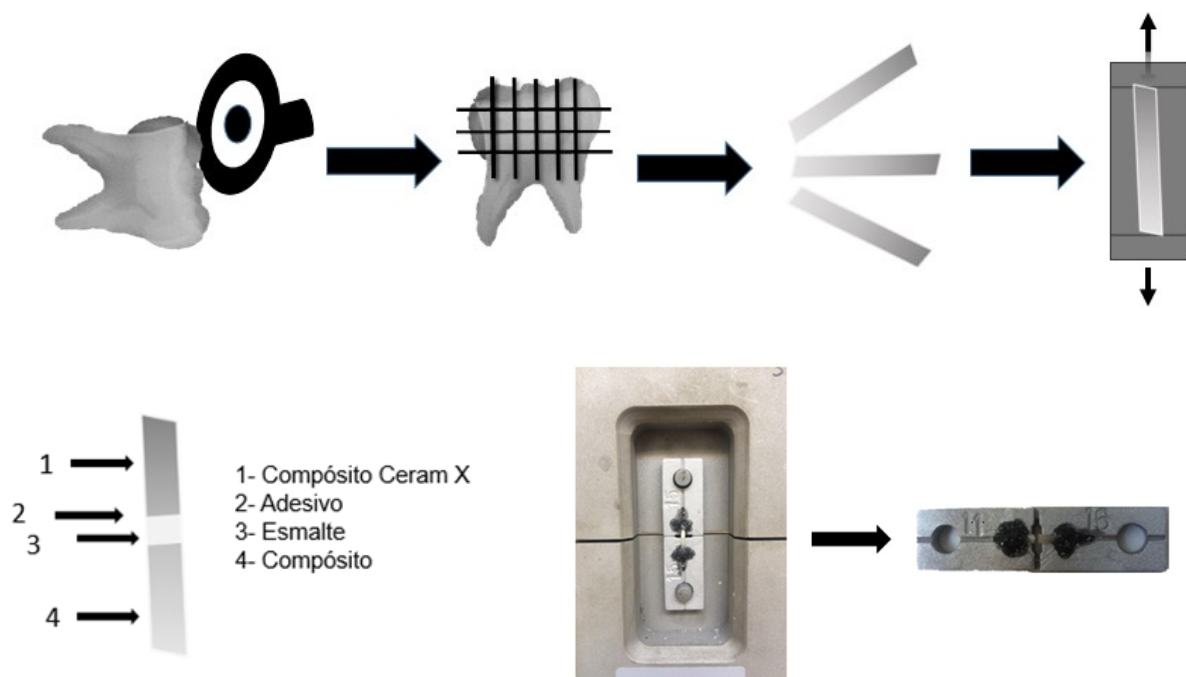


Figura 1- Desenho esquemático da preparação da amostra e teste de microtração

1.2.3 Análise ultramorfológica das interfaces por MEV (Microscopia electrónica de varrimento)

As amostras foram desidratadas, com recurso a sequências crescentes de etanol, sendo imersas durante 10 minutos em cada solução (50%, 75%, 95%, 100%), em ciclos de ultrassons com 12 minutos. Foram incluídas em suportes de microscopia utilizando uma cola de carbono e revestiram-se num banho de ouro-paládio, sendo depois observadas num microscópio electrónico de varrimento (Hitachi S-4100, Hitachi, Tóquio, Japão). As ampliações

utilizadas foram de 2.500x e 5.000x. Observaram-se as amostras em toda a sua extensão e procedeu-se à captação de imagens representativas de cada uma.

1.2.4. Análise estatística

A análise estatística foi efetuada através do teste One-Way ANOVA e teste de Turkey HSD. Foi obtida utilizando um programa específico (SPSS/17.0, SPSS Inc.), e estabeleceu-se um intervalo de confiança a 95% e nível de significância estatística para $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

1.1 Pesquisa Bibliográfica

Após uma primeira leitura dos artigos encontrados, foram selecionadas 85 publicações. Destes, e após análise do resumo, foram selecionadas 23, aos quais se adicionaram 8 por pesquisa cruzada, perfazendo um total de 31 publicações para análise integral. Destes 31 artigos, 1 artigo é uma revisão sistemática e meta-análise, 1 artigo é um estudo clínico e 29 artigos são estudos *in vitro*.

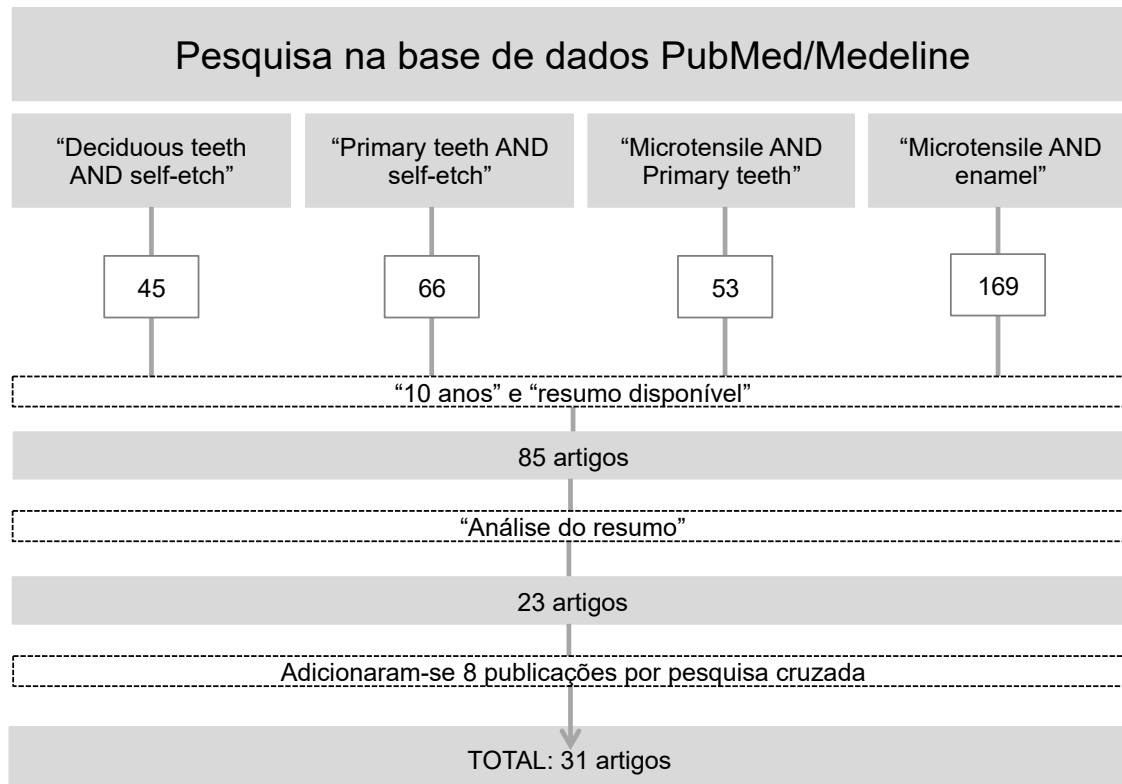


Figura 2- Diagrama *flow* ilustrando a metodologia da pesquisa bibliográfica.

1.2. Teste de microtração (μ TBS)

A Tabela III e a Figura 3 mostram os resultados dos testes de microtração dos três sistemas adesivos testados.

Tabela III - Média dos resultados dos testes de microtração, desvio padrão, valor mínimo e máximo

GRUPO	N	MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO
<i>Prime & Bond[®] XP</i> (Grupo 1)	17	19,70 \pm 7,11	7,74	32,08
<i>Clearfil[™] S³ bond</i> (Grupo 2)	17	13,22 \pm 5,47	7,01	28,43
<i>Clearfil[™] SE Protect</i> (Grupo 3)	17	19,27 \pm 9,33	6,61	38,83
Total	51	17,40 \pm 7,91	6,61	38,83

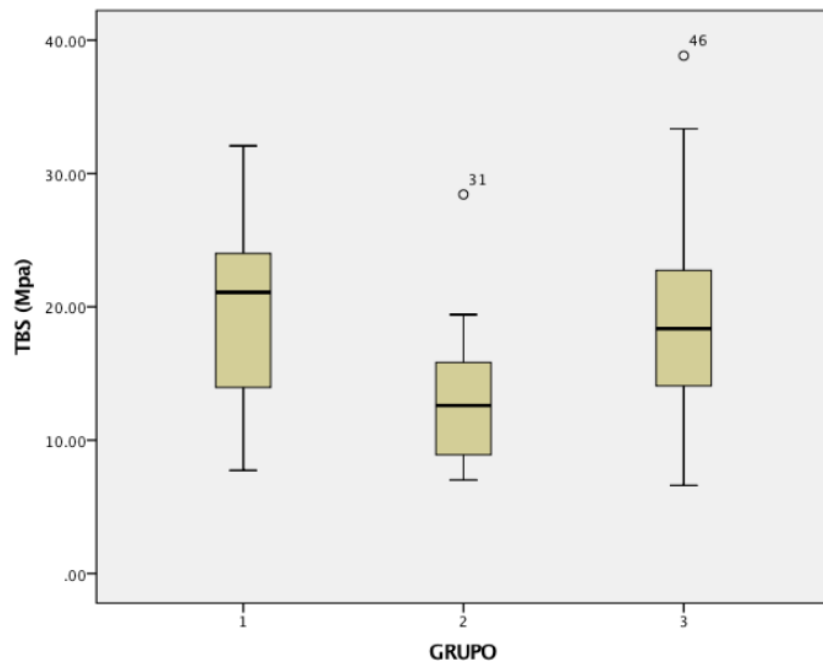


Figura 3- Distribuição da Força de Ligação (MPa)

O teste ANOVA relatou diferenças estatisticamente significantes nos valores de μ TBS entre os grupos $F(2, 50) = 4.0$, $p=0.025$. As comparações múltiplas post-hoc estão resumidas na tabela IV:

Tabela IV - Comparações múltiplas post-hoc

GRUPO (TUKEY HSD)		DIFERENÇA DA MÉDIA (I-J)	ERRO PADRAO	SIG.	95% intervalo de confiança	
					LIMITE SUPERIOR	LIMITE INFERIOR
1-PRIME & BOND® XP	Clearfil™ S3 bond plus	6,48368	2,56372	,044	,1237	12,8437
		,42753	2,56372	1,000	-5,9325	6,7876
	Clearfil™ SE Protect					
2- CLEARFIL™ S3 BOND PLUS	Prime & Bond® XP	-6,48368	2,56372	,044	-12,8437	-,1237
		-6,05615	2,56372	,067	-12,4162	,3039
	Clearfil™ SE Protect					
3- CLEARFIL™ SE PROTECT	Prime & Bond® XP	-,42753	2,56372	1,000	-6,7876	5,9325
		6,05615	2,56372	,067	-,3039	12,4162
	Clearfil™ S3 bond plus					

O Prime & Bond® XP apresentou o maior valor médio de μ TBS, que não foi significativamente diferente do valor médio de μ TBS obtido para o Clearfil™ SE Protect. Em contrapartida, o menor μ TBS foi obtido pelo grupo 2 - Clearfil™ S3 bond plus. Este grupo foi estatisticamente diferente do Prime & Bond® XP e do Clearfil™ SE Protect.

De acordo com os parâmetros registados, rejeita-se a hipótese nula formulada inicialmente, na medida em que se encontraram diferenças nas forças de adesão entre os vários tipos de adesivos testados em esmalte decíduo.

Tabela V - Distribuição dos padrões de falha dos grupos experimentais em número absoluto de amostras (percentagem)

Grupo	1-PRIME&BOND®	2-CLEARFIL™S3	3-CLEARFIL™SE
	XP	BOND PLUS	PROTECT
Adesiva	8 (47)	13 (76)	10 (59)
Mista	3 (18)	4 (24)	5 (29)
Coesiva na Resina	4 (23)	0 (0)	0 (0)
Coesiva no Esmalte	2 (12)	0 (0)	2 (12)

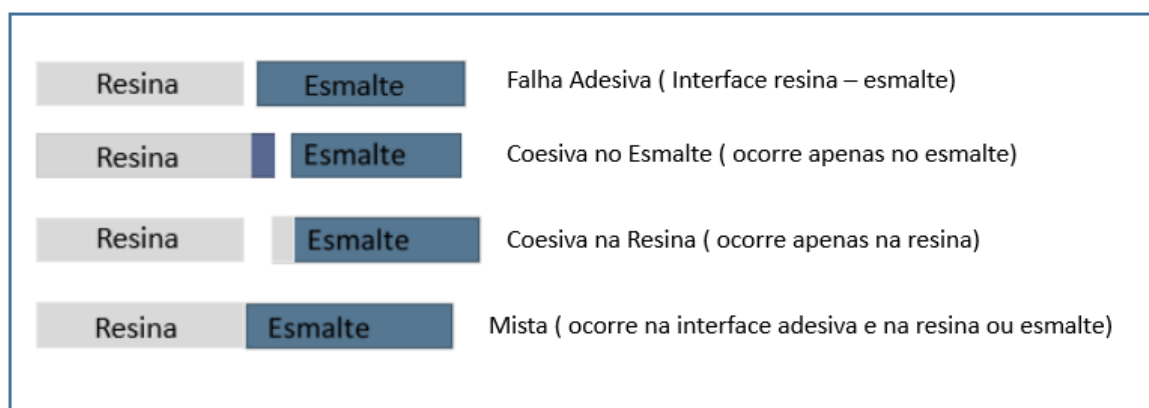


Figura 4-Figura ilustrativa dos padrões de falha.

1.3. Análise ultramorfológica das interfaces por MEV (Microscopia electrónica de varrimento)

Os resultados da análise ultramorfológica das interfaces por MEV estão representados nas seguintes imagens captadas em condições o mais uniformizadas possível.

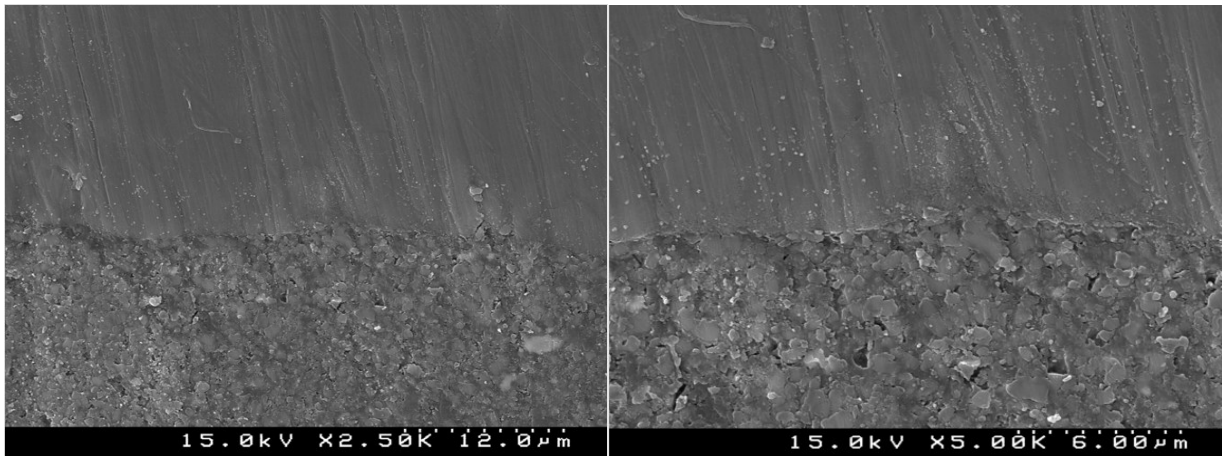


Figura 5 - Imagens de MEV ilustrando a interface adesiva do sistema adesivo Prime & Bond® XP (ampliações 2500x e 5000x respetivamente). É possível observar uma interface íntegra de esmalte, sem descolamento.

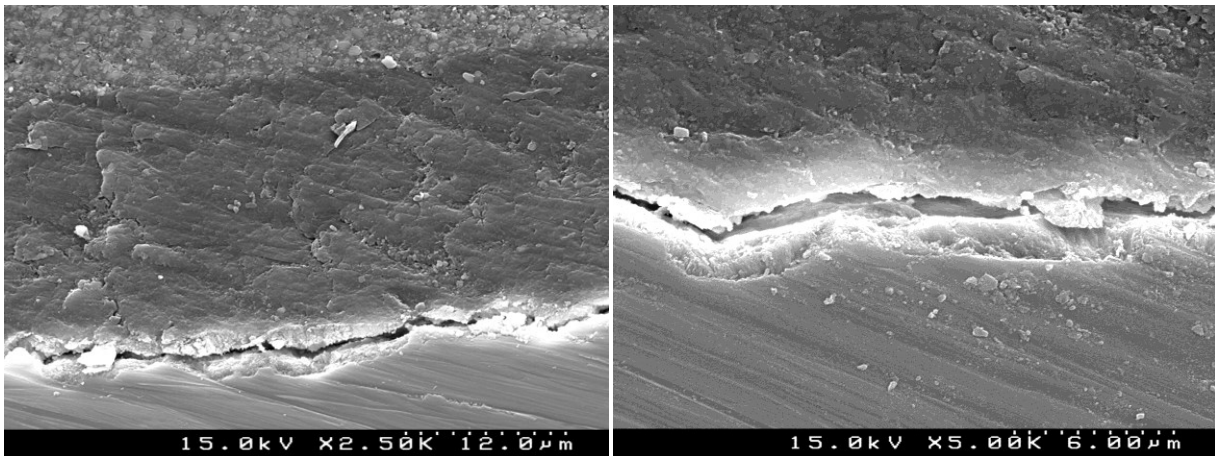


Figura 6 - Imagens de MEV ilustrando a interface adesiva do sistema adesivo Clearfil™ SE Protect (ampliações 2500x e 5000x respetivamente). É possível observar alguma rugosidade na superfície de esmalte, mas com descolamento da interface e grande espessura de adesivo.

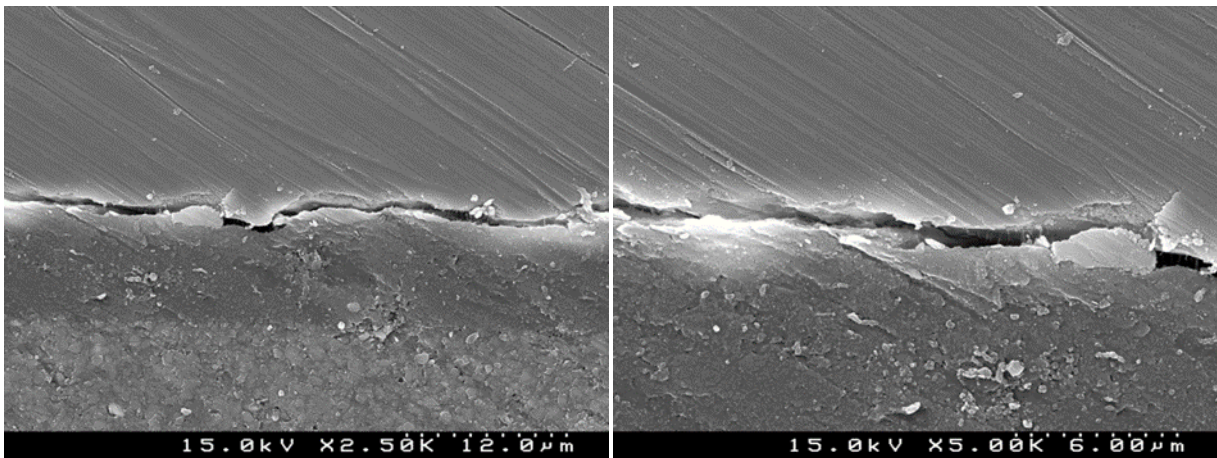


Figura 7 - Imagens de MEV ilustrando a interface adesiva do sistema adesivo Clearfil™ S³ bond plus (ampliações 2500x e 5000x respectivamente). É possível observar uma interface com descolamento do esmalte, um padrão irregular de esmalte e uma grande espessura de adesivo.

As imagens obtidas por MEV permitem identificar claramente os limites da interface adesiva, o esmalte, a resina, e a espessura de adesivo em ambos os grupos.

DISCUSSÃO

Embora os estudos *in vitro* apresentem um baixo nível de evidência, são muito utilizados na Medicina Dentária, uma vez que são mais rápidos, de fácil execução, não dependem da *compliance* dos pacientes e apresentam uma base científica válida²².

O constante aparecimento de novos materiais, levanta cada vez mais questões na escolha do sistema e estratégias adesivas a utilizar, tendo em conta os diferentes substratos onde é aplicado. Atendendo às particularidades estruturais da dentição decídua, os resultados obtidos em dentes definitivos não devem ser extrapolados para os decíduos, sendo de considerável interesse investigar qual a melhor abordagem adesiva para restaurar estes últimos^{19,20,22,23}.

Esta dissertação visou a realização de um estudo piloto, com o objetivo de avaliar as forças de adesão em dentes decíduos, com recurso ao teste de microtração (μ TBS). O teste de microtração é considerado um método muito sensível e confiável para avaliar o desempenho de adesão dos materiais *in vitro*^{10,24,25}. A preparação das amostras para a realização deste teste laboratorial consiste na secção das mesmas de forma a obter vários bastonetes de pequenas áreas, cerca de 0,5 a 1,5 mm^{2,24}. É importante referir que nos dentes decíduos, devido às suas dimensões reduzidas, existe menor disponibilidade de esmalte e, conseqüentemente, a amostra torna-se mais frágil e propensa à fratura.

O sucesso da adesão encontra-se intimamente relacionado com o tipo de substrato a aderir^{22,23,26,27}. Segundo Tedesco e colaboradores, o esmalte decíduo apresenta valores de adesão inferiores aos de esmalte permanente, sendo que esta diferença é mais notória quando o esmalte está desmineralizado. O autor concluiu que os dentes decíduos são mais suscetíveis às alterações causadas pelo efeito cariogénico e, conseqüentemente, a adesão ao esmalte desmineralizado dos dentes decíduos é mais crítica do que a obtida com os dentes permanentes na mesma condição²³. Em 2016, Antoniazzi e colaboradores, corroboraram que o esmalte primário desmineralizado afeta negativamente as forças de adesão comparado com o esmalte primário são⁴. Também Hosoya e colaboradores, em 2014, compararam forças de adesão em esmalte decíduo e permanente e concluíram que os valores obtidos em dentição permanente eram substancialmente superiores, demonstrando a necessidade de avaliar especificamente a interação de materiais adesivos com o esmalte decíduo²⁶.

Segundo a literatura, o modo como é previamente preparado o esmalte parece influenciar o comportamento dos sistemas adesivos, nomeadamente dos adesivos

autocondicionantes^{4,11,14,23}. Estudos relatam a imprevisibilidade do desempenho de adesivos autocondicionantes em esmalte íntegro, evidenciando que a preparação prévia, por exemplo, com uma broca diamantada aparenta potenciar a capacidade de adesão^{11,14}.

A existência de uma camada aprismática de esmalte que se encontra mais pronunciada na dentição decídua, e que a parece tornar menos reativa ao ácido, também é responsável pelo menor desempenho dos sistemas adesivos neste substrato^{20,21}. Segundo Moura S. K. e colaboradores, a utilização de uma broca diamantada parece ser o único procedimento capaz de remover homoganeamente o esmalte aprismático. Estes autores referem ainda, que a utilização de pedra-pomes e a abrasão com lixa de carboneto de silício não parece ser suficiente para remover esta camada¹¹. Neste estudo optou-se por preparar a superfície também com broca diamantada, de forma a promover uma melhor remoção da camada aprismática, mimetizando o procedimento clínico e também indo ao encontro do que a literatura relata.

O modo como o sistema adesivo é aplicado no substrato, é também um factor que deve ser tido em conta na apreciação global dos resultados. Alguns autores referem que a aplicação de uma forma ativa dos adesivos autocondicionantes reflete-se num aumento das forças de adesão ao esmalte resultando numa melhor profundidade de desmineralização, infiltração e interação química^{11,14}. No estudo de Vinagre e colaboradores, confirmou-se uma correlação positiva entre o modo de aplicação ativo e a capacidade de condicionamento destes adesivos. Não obstante, estes resultados nem sempre foram acompanhados por melhores forças de adesão ao esmalte¹⁴. Igualmente, no presente estudo laboratorial, confirmou-se que a utilização de uma forma ativa do adesivo, neste caso do Clearfil™ SE Protect, refletiu-se em bons resultados a nível da adesão ao esmalte.

No que concerne aos resultados obtidos, ficou comprovado que o adesivo Prime & Bond® XP obteve o maior valor médio de adesão, sendo este muito similar ao valor obtido pelo Clearfil™ SE Protect. Estes resultados parecem ser justificados pela presença da molécula MDP na constituição do *primer* deste sistema adesivo autocondicionante de 2 passos. Segundo Moura S. K. e colaboradores, o excelente desempenho deste sistema *in vitro* e *in vivo* pode ser parcialmente atribuído à interação química adicional da hidroxiapatite com este monómero¹¹. Esta interação, teoricamente, contribui para um maior potencial de adesão ao esmalte^{11,15,16,26}. Outro fator adicional que pode justificar os valores de adesão obtidos pelo Clearfil™ SE Protect é o seu baixo pH (2,0). Segundo a literatura, quanto menor o pH, maior será a capacidade de desmineralização do substrato e, por conseguinte, as forças de adesão ao esmalte também serão superiores¹¹.

Em conformidade com outros estudos, o adesivo que requer condicionamento ácido prévio (Prime & Bond® XP) obteve o melhor valor de adesão ao esmalte decíduo^{9,14,15,20,22,29}. O estudo de Lenzi e colaboradores, em 2012, corroborou estes resultados, referindo que o condicionamento ácido do esmalte anteriormente à utilização de um sistema adesivo vai aumentar as forças de adesão ao esmalte^{19,28,29,30,31}. Kensche e colaboradores, em 2015, realizaram um estudo em que compararam forças de adesão de diferentes sistemas adesivos do mercado, e concluíram que os adesivos que requerem condicionamento ácido garantem melhor adesão ao esmalte decíduo²². Também Antoniazzi e colaboradores, em 2016, concluíram que o condicionamento prévio com ácido ortofosfórico aumenta as forças de adesão ao esmalte quando comparado com a utilização de um adesivo universal⁴. Na revisão sistemática de Lenzi e colaboradores, em 2016, concluíram que os adesivos do tipo “condicionar e lavar” apresentam melhor performance, na dentição decídua, comparativamente aos adesivos autocondicionantes¹⁹.

A menor resistência adesiva ao teste de microtração foi obtida pelo sistema adesivo Clearfil™ S³ bond plus. Este sistema adesivo é caracterizado por um pH relativamente suave (2,3), que pode ser uma das justificações para os resultados obtidos. Este adesivo também apresenta na sua constituição a molécula MDP que, segundo a literatura e como anteriormente referido, parece melhorar a eficácia adesiva, mas os resultados obtidos não apoiam esta informação^{10,15,16,26}. A aplicação passiva deste sistema adesivo bem como o facto de todos os seus componentes se encontrarem misturados num só frasco pode também justificar os menores valores de adesão obtidos. No entanto, a lacuna de evidência científica relacionada com a aplicação deste tipo de sistemas adesivos no esmalte decíduo dificulta a interpretação e discussão dos resultados obtidos^{20,23,25}.

A avaliação dos modos de falha revelou um predomínio de falhas adesivas. A ocorrência de falhas adesivas é uma característica dos testes de microtração. A ocorrência deste tipo de falha é consequência da menor área utilizada para a preparação das amostras, o que resulta numa distribuição mais uniforme das tensões ao longo da interface adesiva durante o teste mecânico evitando assim, fraturas no substrato²³.

Através da análise das imagens obtidas por MEV conclui-se, como expectável, que o adesivo que obteve os melhores resultados, o Prime & Bond® XP, apresenta uma interface de esmalte íntegra, sem descolamento e um maior nível de penetração de resina na superfície de esmalte desmineralizado. Contrariamente, nas imagens do Grupo 2 (Clearfil™ S³ bond plus) e Grupo 3 (Clearfil™ SE Protect) é possível observar descolamento da interface do esmalte, assim como uma grande espessura de adesivo. No estudo de Vinagre e

colaboradores, no qual também foi realizada a avaliação qualitativa por MEV das interfaces adesivas verificou-se uma grande diferença qualitativa na morfologia das superfícies do esmalte condicionadas por ácido ortofosfórico e sistemas adesivos autocondicionantes. Segundo os autores, o ácido ortofosfórico criou o padrão de condicionamento mais regular e mais profundo¹⁴.

Para além das limitações descritas anteriormente, importa ainda realçar o reduzido número de amostras avaliadas neste estudo piloto. Nesse sentido, é necessário interpretar e aplicar estes resultados de forma criteriosa, sendo necessários mais estudos, com amostras superiores e de maior nível de evidência científica.

CONCLUSÃO

Com a execução deste estudo piloto, e tendo em conta as limitações inerentes, pode ser concluído que:

- Alguns sistemas adesivos *self-etch* conseguem obter valores de adesão em esmalte decíduo semelhantes aos conseguidos com o sistema *etch-and-rinse* estudado;
- O sistema adesivo Prime & Bond® XP e o Clearfil™ SE Protect obtiveram os valores mais elevados de forças de adesão;
- O sistema adesivo Clearfil™ S3 bond plus obteve valores de adesão ao esmalte significativamente inferiores aos do Prime & Bond® X.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer ao meu orientador Prof. Doutor João Carlos Ramos, e à minha Coorientadora Dra. Daniela Soares, por toda ajuda, apoio e motivação, para além da enorme partilha de conhecimentos.

A todos os funcionários, docentes e não docentes, do Mestrado Integrado em Medicina Dentária, que contribuíram para o enriquecimento da minha formação académica e cívica durante estes cinco anos. Um agradecimento especial à Prof. Doutora Ana Luísa Costa por me ter permitido a realização deste trabalho.

À Dra. Ana Messias, por toda a disponibilidade prestada na execução do trabalho prático deste estudo.

Ao Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro, nas pessoas do Prof. Doutor Augusto Luís Barros Lopes, Prof Doutor José Maria da Fonte Ferreira e Engenheira Marta Ferro.

Às trinómias de tese, Carla Delgado e Lara Garrido, pela amizade, ajuda e dedicação neste trabalho.

À Maria e Margarida, as melhores colegas de casa que podia pedir.

Aos melhores amigos que Coimbra me deu, em especial à Teresa, por me ter acompanhado desde o primeiro dia. Obrigada por todos os momentos que passámos juntas, todos os sorrisos e choros. Nunca me esquecerei!

Ao Nuno, o amor que Coimbra me deu e o meu segundo papá, obrigada por toda a preocupação, ajuda, carinho e todo o amor.

Aos meus pais e aos meus maninhos, João e Afonso, por serem os melhores do mundo, por acreditarem sempre em mim e por fazerem tudo, até o impossível, por mim! Sou uma sortuda.

Aos meus avozinhos, que onde quer que estejam, me deram muita força para conseguir alcançar este objetivo. Obrigada!

REFERÊNCIAS

1. Carvalho A, Turbina M. Can previous acid etching increase the bond strength of a self-etching primer adhesive to enamel? *Braz Oral Res.* 2009;23(2):169–74.
2. Vashisth P, Goswami M, Mittal M, Chaudhary S. Comparative evaluation of the effect of different bonding agents on the ultramorphology of primary tooth dentin and the resin dentin interface. *J Conserv Dent.* 2012;15(4):357.
3. Thanaratikul B, Santiwong B, Harnirattisai C. Self-etch or etch-and-rinse mode did not affect the microshear bond strength of a universal adhesive to primary dentin. *Dent Mater J.* 2016;35(2):174–9.
4. Antoniazzi BF, Nicoloso GF, Lenzi TL, Soares FZM, Rocha R de O. Selective Acid Etching Improves the Bond Strength of Universal Adhesive to Sound and Demineralized Enamel of Primary Teeth. *J Adhes Dent.* 2016;18(4):311–6.
5. Sharifi M, Khoramian S. Comparison of Microtensile Bond Strength of Silorane-Based Composite with the Conventional Methacrylate Composite to the Dentin of Primary Teeth. *J Dent Biomater.* 2016;3(4):315–21.
6. Firoozmand L, Noleto L, Gomes I, Bauer J, Ferreira M. Effect of Fluoride and Simplified Adhesive Systems on the Bond Strength of Primary Molars and Incisors. *Braz Dent J.* 2015;26(4):368–73.
7. Ramos JC, Soares AD, Torres S, Costa AL, Messias A, Vinagre A. Adhesive interface and microtensile bond strength evaluation of four adhesive systems to primary dentin. *Rev Port Estomatol Med Dent e Cir Maxilofac.* 2016;57(2):65–73
8. Shakerian M, Esmaeili B, Alaghehmand H. Effect of different surface treatments on microtensile bond strength of two resin cements to aged simulated composite core materials. *Indian J Dent Res.* 2015;26(3):309.
9. Gisovar E F, Hedayati N, Shadman N, Shafiee L. Comparing the Shear Bond Strength of Six Adhesive Systems to Enamel of Primary Teeth. *Dentistry.* 2014;04(10).

10. Durmuslar S, Olmez A. Microtensile Bond Strength and Failure Modes of Flowable Composites on Primary Dentin with Application of Different Adhesive. *Contemp Clin Dent.* 2017;8(3):538–44.
11. Moura SK, Reis A, Pelizzaro A, Dal-Bianco K, Loguercio A, Arana-Chavez V, et al. Bond strength and morphology of enamel using self-etching adhesive systems with different acidities. *J Appl oral Sci.* 2009;17(4):315–25.
12. Lenzi T, Calvo A, Tedesco T, Ricci H, Hebling J, Raggio DP. Effect of method of caries induction on aged resin-dentin bond of primary teeth. *BMC Oral Health.* 2015;15(1):1–6.
13. da Silva G, Araújo I, Pereira R, Barreto B, do Prado C, Soares C, et al. Microtensile bond strength of methacrylate and silorane resins to enamel and dentin. *Braz Dent J.* 2014;25(4):327–31.
14. Vinagre A, Ramos J, Messias A, Marques F, Caramelo F, Mata A. Microtensile Bond Strength and Micromorphology of Bur-cut Enamel Using Five Adhesive Systems. *J Adhes Dent.* 2015;17(2):107–16.
15. Mithiborwala S, Chaugule V, Munshi A, Patil V. Comparative Evaluation of the Adhesive Properties of Two Generations of Dentin Bonding Agents by Checking the Microleakage in the Primary Teeth: An in vitro Study. *Int J Clin Pediatr Dent.* 2011;4(3):195–202.
16. Sabel N. Enamel of Primary Teeth - Morphological and Chemical Aspects. *Swedish Dental Journal Supplement.* 2012. 1-77 p.
17. Lopes G, Thys D, Klauss P, Mussi G, Widmer N. Enamel Acid Etching: *2007;28(January):662–9.*
18. Hasim S, Chaugule V, Katge F, Poojari M, Pujari P, Pammi T. A Comparative Evaluation of the Efficacy of Etching by the Total Etch and Self-etch Dentin Bonding Systems in the Primary Teeth: An in vitro Study. *Clin Pediatr Dent.* 2015;8(1):30–6.
19. Lenzi TL, Gimenez T, Tedesco TK, Mendes FM, Rocha R de O, Raggio DP. Adhesive systems for restoring primary teeth: a systematic review and meta-analysis of in vitro studies. *Int J Paediatr Dent.* 2016;26(5):364–75.
20. Lenzi TL, Soares FZM, Rocha R de O. Degradation of resin-dentin bonds of etch-and-rinse adhesive system to primary and permanent teeth. *Braz Oral Res.* 2012;26(6):511–5.

21. Donmez S, Turgut M, Uysal S, Ozdemir P, Tekcicek M, Zimmerli B, et al. Randomized Clinical Trial of Composite Restorations in Primary Teeth: Effect of Adhesive System after Three Years. *Biomed Res Int.* 2016;2016.
22. Kensche A, Dähne F, Wagenschwanz C, Richter G, Viergutz G, Hannig C. Shear bond strength of different types of adhesive systems to dentin and enamel of deciduous teeth in vitro. *Clin Oral Investig.* 2016;20(4):831–40.
23. Tedesco T, Soares FZM, Grande RHM, Rodrigues-Filho LE, Rocha RDO. Effect of Cariogenic Challenge on Bond Strength of Adhesive Systems to Sound and Demineralized Primary and Permanent Enamel. *J Adhes Dent.* 2014;16(5):1–8.
24. de Andrade A, Moura S, Reis A, Loguercio A, Garcia E, Grande R. Evaluating resin-enamel bonds by microshear and microtensile bond strength tests: effects of composite resin. *J Appl Oral Sci.* 2010;18(6):591–8.
25. di Hipólito V, Alonso R, Carrilho M, Netto C, Sinhoreti M, de Goes M. Microtensile bond strength test and failure analysis to assess bonding characteristics of different adhesion approaches to ground versus unground enamel. *Braz Dent J.* 2011;22(2):122–8.
26. Hosoya Y, Tay FR, Miyakoshi S, Pashley DH. Hardness and elasticity of caries-affected and sound primary tooth dentin bonded with 4-META one-step self-etch adhesives. *Am J Dent.* 2008;21(4):223–8.
27. Hosoya Y, Tay FR. Bonding ability of 4-META self-etching primer used with 4-META/MMA-TBB resin to enamel and dentine: Primary vs permanent teeth. *J Dent.* 2014;42(4):425–31.
28. Yildiz E, Karaarslan ES, Simsek M, Cebe F, Ozsevik AS, Ozturk B. Effect of a re-wetting agent on bond strength of an adhesive to primary and permanent teeth dentin after different etching techniques. *Niger J Clin Pract.* 2015;18(3):364–70.
29. Lenzi TL, Guglielmi CDAB, Umakoshi CB, Raggio DP. One-step self-etch adhesive bonding to pre-etched primary and permanent enamel. *J Dent Child (Chic).* 2013;80(2):57–61.
30. Bassir M, Rezvani M, Ghomsheh E, Hosseini Z. Effect of different surface treatments on microtensile bond strength of Composite Resin to Normal and Fluorotic Enamel After Microabrasion. *J Dent.* 2016;13.

31. Mithiborwala S, Chaugule V, Munshi A, Patil V. A comparison of the resin tag penetration of the total etch and the self-etch dentin bonding systems in the primary teeth: An in vitro study. *Contemp Clin Dent.* 2012;3(2):158.

ANEXOS

I. Lista de abreviaturas

Bis GMA: Bisfenol Glicidil Metacrilato

HEMA: 2-hidroxietil metacrilato

MDP: Metacrilóidecila fosfato de di-hidrogénio

MDPB: Brometo de metacrilóiloxidodecila piridínio

µTBS: microtração

MPa: megapascal

MEV: Microscopia eletrónica de varrimento

Bis EMA: bisfenol A etoxilado dimetacrilato

TEGDMA: trietilenoglicol dimetacrilato

ÍNDICE

RESUMO	I
ABSTRACT	III
INTRODUÇÃO	1
MATERIAIS E MÉTODOS.....	4
1.1 Pesquisa Bibliográfica	4
1.2 Metodologia	4
1.2.1 Preparação das amostras	4
1.2.2. Teste de microtração (μ TBS).....	6
1.2.3 Análise ultramorfológica das interfaces por MEV (Microscopia electrónica de varrimento)	7
1.2.4. Análise estatística	8
RESULTADOS	9
1.1 Pesquisa Bibliográfica.....	9
1.2. Teste de microtração (μ TBS).....	10
1.3. Análise ultramorfológica das interfaces por MEV (Microscopia electrónica de varrimento)	12
DISCUSSÃO	15
CONCLUSÃO	19
AGRADECIMENTOS	20
REFERÊNCIAS.....	21
ANEXOS	25

ÍNDICE DE IMAGENS E TABELAS

Figura 1- Desenho esquemático da preparação da amostra e teste de microtração..	7
Figura 2- Diagrama flow ilustrando a metodologia da pesquisa bibliográfica.	9
Figura 3- Distribuição da Força de Ligação (MPa).....	10
Figura 4- Figura ilustrativa dos padrões de falha.	12
Figura 5 - Imagens de MEV ilustrando a interface adesiva do sistema adesivo Prime & Bond® XP (ampliações 2500x e 5000x respetivamente). É possível observar uma interface íntegra de esmalte, sem descolamento.	13
Figura 6 - Imagens de MEV ilustrando a interface adesiva do sistema adesivo Clearfil™ SE Protect (ampliações 2500x e 5000x respetivamente). É possível observar alguma rugosidade na superfície de esmalte, mas com descolamento da interface e grande espessura de adesivo.	13
Figura 7 - Imagens de MEV ilustrando a interface adesiva do sistema adesivo Clearfil™ S3 bond plus (ampliações 2500x e 5000x respetivamente). É possível observar uma interface com descolamento do esmalte, um padrão irregular de esmalte e uma grande espessura de adesivo.	14
Tabela I - Sistemas adesivos usados no estudo, classificação, composição química, lote, pH e data validade	5
Tabela II - Procedimento de aplicação dos materiais em estudo	6
Tabela III - Média dos resultados dos testes de microtração, desvio padrão, valor mínimo e máximo.....	10
Tabela IV - Comparações múltiplas post-hoc.....	11
Tabela V - Distribuição dos padrões de falha dos grupos experimentais em número absoluto de amostras (percentagem).....	12