

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

LUCAS BONFANTI SILVESTRIN

MOLÉCULA CATIONICA CONTENDO GUANIDINA COMO AGENTE  
ANTIBACTERIANO PARA RESINA ADESIVA.

Porto Alegre

2020

LUCAS BONFANTI SILVESTRIN

MOLÉCULA CATIONICA CONTENDO GUANIDINA COMO AGENTE  
ANTIBACTERIANO PARA RESINA ADESIVA.

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Graduação em  
Odontologia da Faculdade de Odontologia  
da Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul, como requisito parcial para obtenção do  
título de Cirurgiã-Dentista.

Orientador: Professor Doutor Vicente  
Castelo Branco Leitune

Porto Alegre

2020

### CIP - Catalogação na Publicação

Bonfanti Silvestrin , Lucas  
Molécula catiônica contendo guanidina como agente antibacteriano para resina adesiva. / Lucas Bonfanti Silvestrin . -- 2020.  
29 f.  
Orientador: Vicente Castelo Branco Leitune.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Curso de Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Poliexametileno Guanidina . 2. Resina Adesiva .  
3. Antimicrobiano . I. Castelo Branco Leitune, Vicente, orient. II. Título.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus **familiares**, Norides, Moacir, Thales, Thomas, Juliana e Nicolas, agradeço pelo carinho, apoio, sustento e segurança, em tornar um sentido para luta e carreira que escolhi trilhar, por me fazer acreditar que não importa o quão longe eu vá, o quão alto eu tente voar, terei uma base a me firmar.

Aos meus **amigos**, em especial ao Marcelo, que com muita paciência, me auxiliou, me encorajou a desenrolar problemas inerentes à construção de um trabalho de conclusão curso. Agradeço amigos, Antony, Pricila, Marciele, por não só dar apoio em meu dia a dia, mas por ser uma família, tornado real, concreto e com certeza significativa minhas conquistas. Agradeço por amizades que construí na graduação. Nadini por ter me ensinado que sempre podemos ser humanos melhores, ao Douglas que guiou meu caminho em um mundo desconhecido, ao Lorenzo com sua paciência, ao Raphael com seu humor, que fizeram a diferença .

Ao meu **orientador**, professor Vicente Castelo Branco Leitune pela orientação neste trabalho e durante toda a Iniciação Científica. Por compartilhar e incentivar o conhecimento, sendo exemplo de dedicação em pesquisa.

Ao **professor** Fabrício Mezzomo Collares pela disponibilidade, paciência, ajuda e ensinamentos durante a iniciação científica.

Às **professoras** Susana Maria Werner Samuel e Carmem Beatriz Borges, pelos ensinamentos e por serem exemplos de dedicação ao ensino.

Aos **profissionais** Marcela Werner, Lilian Veronese Freire e Ricardo Goulart por me ensinarem a arte da atenção à saúde, e que “gente é que cuida de gente”.

Aos **colegas de LAMAD**, em especial a não somente minha colega mas também amiga, tutora, e guia Isadora Martini Garcia, que com inteligência, empenho, dedicação e competência acompanhou toda minha trajetória de aluno de iniciação científica, auxiliando em todas as etapas e sempre estando presente.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico**, pelo apoio à pesquisa.

À **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, à Faculdade de Odontologia, e a todos os professores, pela oportunidade de ensino de excelência.

## RESUMO

O objetivo desse estudo foi formular um adesivo experimental com hidrocloreto de polihexametileno guanidina (PHMGH) e avaliar suas propriedades físico-químicas, atividade antibacteriana, e citotoxicidade. O adesivo foi formulado com 66,66% de bisfenol glicidil metacrilato, 33,33% de 2-hidroxiethyl metacrilato e um sistema fotoiniciador. PHMGH foi incorporado à resina nas concentrações de 0,5%, 1% e 2%, em massa. Um grupo sem adição de PHMGH foi utilizado como controle. Os grupos resultantes foram: G<sub>CTRL</sub>, G<sub>0,5%</sub>, G<sub>1%</sub>, G<sub>2%</sub>. Os adesivos experimentais foram avaliados quanto grau de conversão (GC) por espectroscopia de infravermelho (n=3), dureza Knoop e amolecimento em solvente ( $\Delta$ KHN) (n=5), resistência coesiva (UTS) (n=10), resistência de união à microtração ( $\mu$ -TBS) imediato (24h) e longitudinal (1 ano) (n=20), citotoxicidade contra células de polpa humana (n=3) e atividade antibacteriana contra biofilme de *Streptococcus mutans* sobre as amostras e contra bactérias planctônicas (n=3). Para análise estatística utilizou-se ANOVA de duas vias e teste post hoc de Tukey para  $\mu$ -TBS, teste post hoc de Tukey e ANOVA de uma via para antimicrobiano, teste T pareado para dureza Knoop e ANOVA de uma via para os demais ensaios. O GC variou de 61,52 ( $\pm$ 0,26) para o G<sub>CTRL</sub> a 63,61 ( $\pm$ 1,37) para G<sub>2%</sub> (p>0,05%). Não houve diferença estatística quanto  $\Delta$ KHN e UTS (p>0,05%). Nenhum grupo com PHMGH apresentou diferença estatística em  $\mu$ -TBS imediato comparando a G<sub>CTRL</sub> (p>0,05). Quanto a  $\mu$ -TBS longitudinal os grupos com PHMGH apresentaram maiores valores de adesão quando comparados ao G<sub>CTRL</sub> (p<0,05%). Os valores de viabilidade celular variaram de 138,16 ( $\pm$ 16,53) para G<sub>CTRL</sub> e de 121,31 ( $\pm$ 17,32) para o G<sub>2%</sub>, sem diferença entre os grupos (p>0,05). A partir de 1%, houve redução de formação de biofilme e viabilidade de *Streptococcus mutans* na forma planctônica (p<0,05). Conclui-se que a incorporação de guanidina à resina adesiva a partir de 1% proporcionou atividade antibacteriana sem efeito citotóxico, e induziu estabilidade da resistência de união ao longo do tempo.

Descritores: Hidrocloreto de Guanidina, Cárie Dentária, Resinas Adesiva.

## ABSTRACT

The aim of this study was to formulate and evaluate the physical-chemical properties, antibacterial activity, and cytotoxicity of an experimental adhesive containing polyhexamethylene guanidine hydrochloride (PHMGH). The adhesive was formulated with 66.66% of bisphenol glycidyl methacrylate and 33.33% of 2-hydroxyethyl methacrylate, besides a photo initiator system. PHMGH was added to the resin at 0.5%, 1% and 2%, in mass. Samples without PHMGH were used as control. The resulting sample groups were G<sub>CTRL</sub>, G<sub>0.5%</sub>, G<sub>1%</sub>, G<sub>2%</sub>. The experimental adhesives were evaluated in terms of degree of conversion (DC) by infrared spectroscopy (n=3), Knoop hardness (KHN) and softening in solvent ( $\Delta$ KHN) (n=5), ultimate tensile strength (UTS) (n=10), immediate (24h) and longitudinal (1 year) microtensile bond strength ( $\mu$ -TBS) (n=20), cytotoxicity against human fibroblasts (n=3) and antibacterial activity against a *Streptococcus mutans* biofilm over the samples, and planktonic bacteria (n=3). Statistical analysis was carried out using Two-way ANOVA and *post hoc* Tukey tests for  $\mu$ -TBS, *post hoc* Tukey and one-way ANOVA for antibacterial activity, Test student t for Knoop hardness, and one-way ANOVA for all other experiments. The DC varied from  $61.52 \pm 0.26$  for G<sub>CTRL</sub> to  $63.61 \pm 1.37$  for G<sub>2%</sub> ( $p > 0.05$ ). No significant statistical difference was observed in terms of  $\Delta$ KHN and UTS ( $p > 0.05$ ). No PHMGH containing groups presented statistical difference in immediate  $\mu$ -TBS in comparison to the G<sub>CTRL</sub> ( $p > 0.05$ ). However, PHMGH containing groups presented higher longitudinal  $\mu$ -TBS adhesion compared to G<sub>CTRL</sub> ( $p < 0.05$ ). The cell viability values varied from  $138.16 \pm 16.53$  for G<sub>CTRL</sub> to  $121.31 \pm 17.32$  for G<sub>2%</sub>, without difference among groups ( $p > 0.05$ ). For PHMGH content higher than 1%, a reduction in the biofilm and viability of *Streptococcus mutans* in planktonic form was observed ( $p < 0.05$ ). Thus, it can be concluded that the incorporation of guanidine in the adhesive resin, in concentrations above 1% in mass, produce antibacterial activity without cytotoxicity, also improving the stability of long-term adhesion.

**Keywords:** Guanidine Hydrochloride, Dental caries, Detin adhesives.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	9
2. OBJETIVO .....	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	13
3.1 Tipo de estudo .....	13
3.2 Local de realização .....	13
3.3 Reagentes e formulação das resinas adesivas experimentais .....	13
3.4 Fluxograma .....	14
3.5 Grau de Conversão .....	14
3.6 Amolecimento em Solvente .....	15
3.7 Resistência Coesiva .....	15
3.8 Atividade antimicrobiana .....	16
3.9 Citotoxicidade .....	17
3.10 Resistência da União Adesiva .....	17
4. RESULTADOS .....	19
5. DISCUSSÃO .....	20
6. CONCLUSÃO .....	23
REFERÊNCIAS .....	26

## 1.INTRODUÇÃO

A odontologia operatória, responsável por uma parte de cuidados em saúde bucal realizados diariamente pelo cirurgião dentista, compreende a prevenção, diagnóstico e opções de tratamentos deixados pela doença cárie (LYNCH *et al.*, 2014). Uma forma comum de se tratar as lesões deixadas era restaurá-las com amalgama de prata, visto que já era utilizado como principal material pela maioria dos países, por ser de fácil manuseio, desempenho previsível e baixo custo (WILSON *et al.*, 1997). No entanto, juntamente com boas qualidades, limitações inerentes ao material existem, como baixa estética, alta rigidez, e a necessidade de fazer preparos invasivos (LYNCH *et al.*, 2014). Ao longo dos anos, pesquisas foram realizadas buscando biomateriais com melhor desempenho estético e menos invasivos, levando ao desenvolvimento da odontologia adesiva (BRUDEVOLD *et al.*, 1956; FUSAYAMA *et al.*, 1979; NAKABAYASHI *et al.*, 1982)

A introdução de materiais dentários à base de resina em meados do século passado foi uma revolução na odontologia restauradora. Os compósitos dentários são esteticamente agradáveis, pois possuem aparência semelhante a um dente, são estáveis no ambiente oral, são relativamente fáceis de manusear e são fotopolimerizáveis (JANDT;SIGUSCH, 2009) (KLAUS *et al.*, 2009). Com o avanço das pesquisas em estratégias mais conservadoras, os adesivos e resinas compostas passaram a se difundir na prática clínica odontológica, por serem materiais que possam ser utilizados em preparos expulsivos, de preenchimento direto, estéticos, e com possibilidade de reparo (DEMARCO *et al.*, 2017; DEMARCO *et al.*, 2012; FERRACANE, 2011). A união do material restaurador à estrutura dentária se deve ao imbricamento micromecânico entre o adesivo e as fibras de colágeno que ocorre da penetração desse material resinoso nas fibras pré-condicionadas (NAKABAYASHI *et al.*, 1982). É justamente nessa interface que pode ocorrer a degradação por enzimas colagenolíticas, por fluido oral ou por bactérias (CADENARO *et al.*, 2019). A microinfiltração e a formação de fendas nessa interface enfraquecida fornecem um caminho eficaz para a invasão de biofilmes da placa oral e o desenvolvimento de cáries nas margens da restauração, que é a principal causa de falhas de restaurações à longo prazo (DEMARCO *et al.*, 2017; FERRACANE, 2013; KERMANSHAHI *et al.*, 2010; OPDAM *et al.*, 2014). A substituição de restaurações com falhas constitui cerca de 50 a 70% de todo o trabalho de odontologia operatória (DELIGEORGI *et al.*, 2001; MJOR *et al.*, 1990; MURRAY *et al.*, 2002), que é o

procedimento mais comum na odontologia geral. Portanto, melhorar a durabilidade da adesão e impedir a invasão bacteriana são questões fundamentais para inibir a cárie adjacente e aumentar a longevidade de restaurações (LIU;ZHAO, 2005). O tratamento da cárie dentária consome de 5 % a 10 % do orçamento da saúde nos países industrializados. Assim, prevenir e tratar a cárie dentária constitui um grande desafio global à saúde pública (OMS., 2003).

A incorporação de agentes antimicrobianos na formulação de adesivos odontológicos, passou a ser entendida como aperfeiçoamento das propriedades biológicas do material (COLLARES *et al.*, 2017; DEGRAZIA *et al.*, 2016). Materiais como monômeros à base de triazina (SCHIROKY *et al.*, 2017), cloreto de etil trimetil amônio (COLLARES *et al.*, 2017) Apigenina e Farnesol (ANDRE *et al.*, 2017) entre outros, começaram a ser incorporados e testados em adesivos odontológicos que demonstraram capacidade antibacteriana superior ao serem comparada a adesivos sem a adição desses compostos, criando assim uma interface adesiva ativa, capaz de agir contra bactérias, formando uma restauração de resina mais estável e um selamento marginal mais duradouro (CHENG *et al.*, 2013).

O cloridrato de polhexametileno-guanidina (PHMGH) é uma macromolécula catiônica com uma capacidade antimicrobiana mesmo em baixas concentrações, capaz de agir contra fungos (CHOI *et al.*, 2017), vírus, bactérias gram positivas e negativas (OULE *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2015). O PHMGH apresenta maior atividade antimicrobiana contra patógenos ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Actinobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter*), que são microorganismos resistentes a antibióticos clinicamente importantes (ZHOU *et al.*, 2015). Dessa forma por possuir características incolores e inodoras foi utilizado na indústria alimentar (OULE *et al.*, 2012) e em desinfetantes hospitalares, como o *Akacid Plus* (ZHOU *et al.*, 2015). Na odontologia foi estudado incorporado a selantes resinosos, onde demonstrou eficaz contra formação de biofilme de *Streptococcus mutans* (GARCIA;RODRIGUES, 2019), e como solução irrigadora para tratamento da periodontite crônica que demonstrou eficácia em ação imediata (VITT *et al.*, 2019). Embora o PHMGH revela-se um excelente antimicrobiano, e comparado a outros compostos como clorexidina e compostos quaternários de amônio, tenha efeito citotóxico mais baixo contra células humanas (MULLER;KRAMER, 2008), quando utilizado em altas concentrações em desinfetantes umidificadores leva a complicações como a fibrose pulmonar (LEE;YU, 2017; PARK, 2016). Desta forma torna-se relevante estudos

incorporando antimicrobianos como PHMGH em resinas adesivas odontológicas como um agente de controle microbiano para redução de cárie adjacente.

## **2. OBJETIVO**

O objetivo do presente estudo foi formular um adesivo experimental com hidrocloreto de poliexametileno guanidina (PHMGH) e avaliar suas propriedades físico-químicas, atividade antibacteriana e citotoxicidade.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Tipo de estudo

O presente estudo trata-se de um estudo experimental, *in vitro* e controlado.

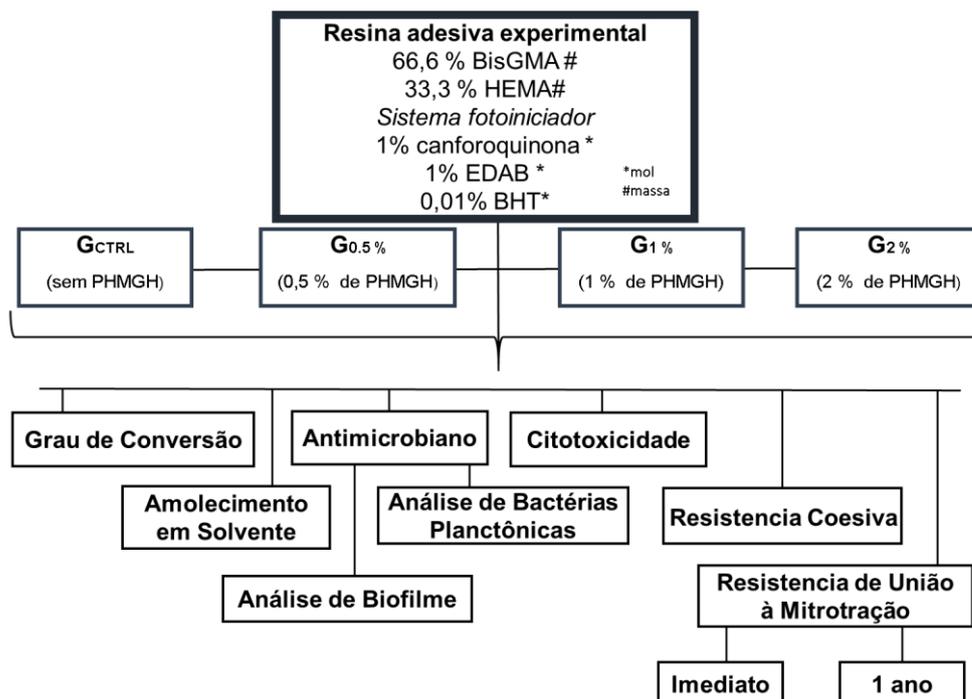
#### 3.2 Local de realização

Os testes foram realizados no Laboratório de Materiais Dentários (LAMAD), Núcleo de Pesquisa Básica em Odontologia (NPBO) e Laboratório de Bioquímica e Microbiologia (LABIM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

#### 3.3 Reagentes e formulação das resinas adesivas experimentais

Os adesivos foram formulados a partir da mistura em peso de 66,66 % de bisfenol A glicerato dimetacrilado (Bis-GMA) e 33,33 % de 2-hidroxietil metacrilato (HEMA). Foram adicionados como parte do sistema fotoiniciador 1 %, em mol, de canforoquinona (CQ) e 1 %, em mol, de etil 4-dimetilamino benzoato (EDAB), além de 0,01 % em peso de butil-hidroxi-tolueno (BHT). Nessa resina base foram incorporados pó de hidrocloreto de polioxametileno-guanidina nas concentrações de 0,5 %, 1 % e 2 %. Um grupo controle foi formulado apenas com a resina base ( $G_{CTRL}$ ). Após a formulação dos grupos, foram realizados os ensaios para avaliação dos adesivos experimentais ( $G_{0,5\%}$ ,  $G_{1\%}$  e  $G_{2\%}$ ) (Figura 1).

### 3.4 Fluxograma



### 3.5 Grau de conversão

O grau de conversão (GC) do foi avaliado por meio de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier em um espectrômetro (VERTEX 70, Bruker Optics, Ettingen, Alemanha) equipado com ATR (reflectância total atenuada) composto por um cristal horizontal de diamante, formando um ângulo de 45° com o espelho. As resinas foram dispensadas diretamente sobre o cristal e foi utilizada uma matriz de polivinilsiloxano (ADSIL, VIGODENT; Rio de Janeiro, Brasil) com 1 mm de espessura por 4 mm de diâmetro para que os espécimes tivessem as mesmas dimensões.

As amostras foram fotoativadas utilizando-se equipamento de fotoativação LED (Radii; SDI, Bayswater, Australia) com irradiação de 1200 mW/cm<sup>2</sup> por 20 s, com padronização da distância de 1 mm entre a ponta do equipamento e as amostras. O software Opus 6.5 (Bruker Optics, Ettlingen, Alemanha) foi utilizado para o processamento dos espectros, usando a apodização Blackman-Harris 3-termos.

### 3.6 Amolecimento em solvente

Para análise da amolecimento em solvente foram confeccionados corpos de prova para cada grupo do adesivo experimental a partir de uma matriz de polivinilsiloxano de 4 mm de diâmetro x 1 mm de espessura, cobertos com uma matriz de poliéster e fotoativados com um diodo emissor de luz (Radii Cal., SDI Ltda, Austrália) por 30 s em cada lado. Os mesmos foram incluídos em resina acrílica e submetidos a polimento em uma politriz elétrica rotativa com sistema de polimento múltiplo (Model 3v, Arotec, Cotia, SP, Brazil), utilizando lixas de carvão de silício de granulação 1200 e 2000 e disco de feltro umedecido com líquido para polimento de óxido de alumínio (Alumina, 6 µm, Arotec, Cotia, SP, Brasil). Em seguida, os corpos de prova foram armazenados por 24 h em um ambiente a 37 °C. A dureza Knoop foi avaliada através de um microdurômetro digital (HNV2, Shimadzu, Kyoto, Japão). Foram feitas 3 endentações com 10 g/ 5 s e distância de 100 µm equidistantes na superfície de cada corpo de prova. O cálculo da microdureza Knoop será realizado de acordo com a equação (3):

$$KHN = \left[ \frac{(14228 c)}{(d^2)} \right]^3$$

Na qual: KHN é o valor de dureza Knoop, 14228 é o valor de uma constante, c é a carga aplicada em gramas e d é a maior diagonal deixada pela penetração em um corpo.

O valor médio das endentações de cada amostra foi o valor da microdureza Knoop inicial (KHN1). Os corpos de prova foram armazenados em álcool etílico 70% durante 2 h, sendo posteriormente lavados e secados para a microdureza Knoop (KHN2) ser avaliada novamente. Foram consideradas as médias para cada corpo de prova e para cada grupo. O percentual da diferença entre KHN1 e KHN2 foi calculado para cada amostra

### 3.7 Resistência Coesiva

Para análise de resistência coesiva, espécimes de cada grupo do adesivo experimental foram confeccionados em uma matriz metálica em formato de ampulheta com 1 mm<sup>2</sup> na área de constrição. Os adesivos foram dispensados, cobertos com uma

matriz de poliéster e fotoativados com um diodo emissor de luz (Radii Cal., SDI Ltda, Austrália) por 30 s em cada lado. Após 24 h, os espécimes foram tracionados em uma máquina de ensaios mecânicos universal (Shimadzu, Tóquio, Japão) com velocidade de 1 mm/min. Os valores de força foram registrados em Newtons (N) e calculada a resistência em Megapascal (MPa) pela fórmula sendo RC (a resultante da resistência coesiva):

$$RC = \frac{\text{força (N)}}{\text{área da constrição (mm}^2\text{)}}$$

### 3.8 Atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antibacteriana do adesivo foi realizada pelo método de aderência superficial. Foram confeccionados corpos de prova de cada grupo com 5 mm de diâmetro e 1 mm de espessura que foram submetidos à esterilização em plasma de peróxido de hidrogênio (58 %) por 48 min a 56 °C. Utilizando uma placa de 48 poços de fundo plano, as amostras fixadas em porta-amostras de teflon na tampa da placa foram submersas em poços contendo 900 µL de caldo BHI e 100 µL de uma suspensão de *Streptococcus mutans*. Além disso, dois poços contendo 900 µL de caldo BHI foram inoculados com 100 µL da suspensão, sem a colocação das amostras, constituindo um G<sub>CTRL</sub> positivo. Os caldos e placas ficaram em contato por 24 h, a fim de analisar o efeito antibacteriano. Os corpos de prova foram removidos da placa e agitados durante 1 min em solução salina. 100 µL do conteúdo de cada um dos poços foi diluído em 900 µL de solução salina (0,9%) as quais foram diluídos até 10<sup>-6</sup> de diluição, que foi plaqueado 2 gotículas de 25 µL em ágar BHI sobre uma placa de Petri dividida em seis. As placas foram armazenadas a 37°C e, após 48 h, o número de colônias foi contado visualmente e transformado em unidades formadoras de colônia (UFCs) por mL, considerando as diluições.

Para a avaliação da viabilidade de bactéria planctônica, o ensaio foi realizado utilizando as mesmas amostras e meio citados acima (n = 3). Para a primeira diluição, foram diluídos 100 µL de cada poço em 1 mL de solução salina até a diluição 10<sup>-6</sup>. Duas gotas (25 µL de cada) de cada diluição foram colocadas em agar de infusão de coração cerebral (BHI) em placas de Petri e incubadas durante 48 h a 37 °C para contar e calcular a UFC / mL como referido acima.

### 3.9 Citotoxicidade

Para o ensaio de citotoxicidade a linhagem celular foi obtida de um terceiro molar humano, extaído depois de receber o consentimento informado do paciente (comitê de ética n.1.739.340). Foi preparado um eluato imergindo amostras (4 mm de diâmetro x 1 mm de espessura) de cada grupo experimental em 1 mL de meio tipo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) durante 24 h. As células foram colocadas em uma concentração de  $5 \times 10^3$  em placas de 96 poços e tratadas com 100  $\mu$ L do eludato. Após 72 h, as células foram fixadas com uma concentração de ácido tricloroacético a 10 % (TCA), incubadas a 4° C durante uma hora, lavadas seis vezes com água corrente e secas à temperatura ambiente. Foi adicionado sulforodamida B (SRB, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) a 0,4 % para colorir as células e a placa será incubada durante 30 min à temperatura ambiente. As placas foram lavadas quatro vezes com ácido acético a 1 % para remover o excesso de corante não ligado e foram secas à temperatura ambiente. A solução de Trizma foi adicionada e a placa incubada por uma hora para permitir a solubilização completa do corante. No final deste processo as microplacas foram lidas em 560 nm em um espectofotometro. Os resultados foram normalizados em relação à absorbância encontrada para poços sem eluato (controle negativo) e expressos em porcentagem de viabilidade celular.

### 3.10 Resistência da união adesiva

Para avaliação da resistência de união da interface adesiva foram utilizados 160 dentes bovinos, 80 para o ensaio imediato (24 h) e 80 para longitudinal de um ano. Após a limpeza e remoção da raiz, o esmalte vestibular foi removido e a dentina superficial foi exposta com lixas de carbetto de silício com granulação de 600 para formar a *smear layer* por 30 s em seguida secos. A superfície dentinária foi condicionada com ácido fosfórico 37 % por 15 s, lavada pelo mesmo tempo de condicionamento e seca com filtro de papel absorvente. Em seguida o *primer* foi aplicado de forma ativa por 20 s utilizando um micro aplicador, volatilizado com jato de ar, e então os adesivos experimentais foram aplicados separadamente com um novo micro aplicador, sendo que os excessos foram removidos. A camada de adesivo foi fotoativada por 20 s com um equipamento de diodo emissor de luz (Ratii; SDI, Bayswater, Australia) com irradiação de 1200 mW/cm<sup>2</sup>. Dois

incrementos de resina composta (Filtek Z350 XT Restaurador universal, 3M ESPE, EUA) foram inseridos sobre a dentina e fotoativados por 20 s cada. Após armazenamento em água destilada a 37 °C por 24 h, os dentes foram seccionados com uma cortadeira de precisão sob irrigação constante (Isomet Low Speed Saw, Buehler Ltd, EUA) em fatias de 0,7 mm de espessura no sentido mesio-distal. Em seguida, cada fatia foi seccionada perpendicularmente à interface adesiva, obtendo-se palitos a partir de cada fatia. Os palitos foram armazenados de acordo com o tempo de armazenamento do grupo (24 h e 12 meses).

A resistência da união adesiva foi avaliada com uma máquina de ensaios mecânicos universal (Shimadzu, Tóquio, Japão) com velocidade de 1 mm/min e equipada com uma célula de carga de 500 N. Os valores de força foram registrados em Newtons (N) e a resistência calculada em Megapascal (MPa) pela fórmula:

$$RU = \frac{\text{força (N)}}{\text{área adesiva (mm}^2\text{)}}$$

#### 4. RESULTADOS

Os dados de GC estão apresentados na Tabela 1. Os valores variaram de 61,52 ( $\pm 0,26$ )% em G<sub>2%</sub> para 63,61 ( $\pm 1,37$ )% no G<sub>CTRL</sub>. Não houve diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

Os resultados de KHN 1, KHN 2 e  $\Delta$ KHN % estão apresentados na Tabela 1. Os valores de KHN 1 variaram de 17,27 ( $\pm 1,38$ ) para G<sub>1%</sub> a 18,80 ( $\pm 1,20$ ) G<sub>CTRL</sub>, sem haver diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ). Todos os grupos reduziram a dureza após imersão em solvente ( $p < 0,05$ ). Os valores de  $\Delta$ KHN % variaram de 47,44 ( $\pm 5,21$ ) para G<sub>0,5%</sub> a 57,26 ( $\pm 5,67$ ) para G<sub>CTRL</sub>, sem diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

Os valores de atividade antibacteriana estão apresentados na Figura 1. Os valores de UFC/mL (log) variaram de 1,46 ( $\pm 0,28$ ) para G<sub>2%</sub> e 5,34 ( $\pm 0,05$ ) para G<sub>CTRL</sub>. Conforme a concentração de PHMGH aumentou, maior foi a atividade antibacteriana contra formação de biofilme ( $p < 0,05$ ). Em relação a viabilidade de bactérias planctônicas, os valores variaram de 7,21 ( $\pm 0,10$ ) para G<sub>2%</sub> e 8,25 ( $\pm 0,02$ ) para G<sub>CTRL</sub> sem haver diferença estatística entre G<sub>CTRL</sub> e G<sub>0,5%</sub> ( $p > 0,05$ ). G<sub>1%</sub> e G<sub>2%</sub> induziram redução de bactérias planctônicas viáveis em relação a G<sub>CTRL</sub> e G<sub>0,5%</sub> ( $p < 0,05$ ).

Os valores de citotoxicidade variaram de 121,32 ( $\pm 17,32$ ) % para G<sub>2%</sub> a 153,58 ( $\pm 1,52$ ) % para G<sub>CTRL</sub>. Não houve diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ). Conforme Figura (2).

A tabela 2 mostra os valores de UTS e  $\mu$ -TBS. Para UTS variaram de 72,39 ( $\pm 9,10$ ) MPa G<sub>2%</sub> a 73,75 ( $\pm 6,01$ ) MPa para G<sub>CTRL</sub>. Não houve diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Os resultados de  $\mu$ -TBS imediato, não apresentaram diferença estatística entre grupos com PHMGH em relação a G<sub>CTRL</sub> ( $p < 0,05$ ). Os valores variaram de 42,35 ( $\pm 19,00$ ) MPa G<sub>2%</sub> a 46,00 ( $\pm 19,22$ ) MPa G<sub>CTRL</sub>. Após 1 ano de armazenamento, os resultados de  $\mu$ -TBS variaram de 16,35 ( $\pm 6,75$ ) a 33,28 ( $\pm 12,93$ ) e o maior valor foi observado para G<sub>2%</sub> ( $p > 0,05$ ), havendo diferença estatística entre as amostras com PHMGH e G<sub>CTRL</sub>. Os grupos G<sub>1%</sub> e G<sub>2%</sub> não apresentaram diferença estatística para  $\mu$ -TBS entre imediato e 1 ano de armazenamento no entanto para G<sub>CTRL</sub> e G<sub>0,5%</sub> indicaram haver redução da resistência de adesão do ensaio imediato para o longitudinal.

## 5. DISCUSSÃO

Nesse trabalho, foi formulado um adesivo experimental com uma molécula catiônica conhecida pela sua atividade antimicrobiana. Todas as concentrações com PHMGH testadas tiveram efeito contra *Streptococcus mutans*, e as amostras de resina a partir de 1% de PHGMH induziram a estabilidade de resistência de união ao longo do tempo. Além disso, todos adesivos experimentais apresentaram alta viabilidade celular, sem efeito citotóxico contra células de polpa humana.

A incorporação de diferentes agentes à matriz resinosa pode alterar o GC, podendo levar a sua redução devido a diferença entre o índice de refração da resina e da carga adicionada ou pela redução da transmissão de luz pelo material (KHAN *et al.*, 1992). Nesse estudo, não houve diferença estatística significativa no GC entre os grupos e todos apresentaram valor acima de 50%, valor o qual foi observado para os adesivos comerciais em estudo prévio (GAGLIANONE *et al.*, 2012). Um alto GC de polímeros é desejado por estar relacionado a melhores propriedades mecânicas e melhor estabilidade hidrolítica (COLLARES *et al.*, 2011). Contudo, valores altos de GC podem não estar relacionados a alta densidade de ligações cruzadas o que é essencial para o bom desempenho do polímero (SCHULZ *et al.*, 2008). Por isso, as resinas adesivas experimentais também foram avaliadas quanto ao amolecimento em solvente, UTS e  $\mu$ -TBS. Todos os grupos apresentaram redução da dureza Knoop após imersão em solução aquosa de etanol a 70%. Isso ocorre porque quando as forças de atração de cadeias poliméricas são ultrapassadas pelas forças de atração de cadeias poliméricas com as moléculas de solvente, o polímero é permeado e sua dureza reduz (COLLARES *et al.*, 2011; FERRACANE, 2006). Poderia-se esperar que a incorporação de PHMGH apresente uma maior redução da dureza, uma vez que apresenta um cloridrato em sua estrutura tornando o polímero de caráter higroscópico (DEGRAZIA *et al.*, 2017). No entanto, não houve diferença na  $\Delta$ KHN entre os grupos, indicando que a incorporação de PHMGH em qualquer concentração testada não alterou a resistência ao amolecimento em solvente dos adesivos experimentais.

No ensaio de análise antimicrobiana com *Streptococcus mutans* foram feitas duas análises: atividade antibacteriana contra formação de biofilme sobre as amostras de resina polimerizada e atividade contra bactérias planctônicas. O PHMGH possui capacidade antimicrobiana agindo na parece celular bacteriana e na duplicação do DNA (ZHOU *et al.*, 2010), fazendo com que a atração da parede celular bacteriana tenha afinidade pela molécula catiônica de PHMGH e assim levando a lise da bactéria (OULÉ *et al.*, 2008).

Os compostos antibacterianos clássicos na Odontologia como compostos quaternários de amônio possuem geralmente ação apenas na parede e na membrana bacteriana (MAKVANDI *et al.*, 2018). Todas as concentrações testadas de PHMGH induzem efeito antibacteriano em relação à formação de biofilme comparado ao G<sub>CTRL</sub>. Quanto maior a concentração de PHMGH, maior o efeito contra a formação de biofilme. Quando avaliado o efeito sobre a viabilidade de bactérias planctônicas, houve redução de bactérias a partir de 1% de PHMGH incorporado. Esse resultado pode sugerir lixiviação do agente antibacteriano da resina para o meio ou redução da viabilidade das bactérias após entrarem em contato com a superfície do material (DRAGO *et al.*, 2018).

O método de coloração por SRB foi utilizado para avaliar atividade citotóxica. Esse método é capaz de corar células em baixo estado metabólico e que ainda são viáveis, ao contrário do método MTT (VAN TONDER *et al.*, 2015) sugerido pela ISO 10993-5, que depende essencialmente da atividade metabólica celular. No presente ensaio, após 72 h de contato entre os eluatos e os fibroblastos de polpa humana, não foi observada diferença estatística entre os grupos quanto à viabilidade. E ainda, os valores foram acima de 100 % para todos os grupos. Sugere-se que não houve lixiviação de PHMGH para o DMEM ou que a quantidade liberada não induziu efeito citotóxico contra as células. Contudo, estudo anterior sugere que composto de PHMGH quando usado em umidificadores de ambiente pode estar associado à fibrose pulmonar (LEE;YU, 2017). Por isso, mesmo com os resultados positivos desse estudo, o uso de PHMGH deve ser visto com cautela e mais ensaios sobre biocompatibilidade devem ser realizados, levando em consideração diferentes concentrações de exposição.

Para avaliar a eficácia do sistema adesivo em camadas híbridas, o ensaio de resistência da união adesiva à microtração ( $\mu$ -TBS) foi realizado. Não foi encontrado diferença nos resultados de  $\mu$ -TBS imediato dos grupos com PHMGH em relação a G<sub>CTRL</sub>. Em relação à avaliação a longo prazo, após um ano de armazenamento em água destilada, os grupos contendo PHMGH apresentaram melhor desempenho. Em 1 ano de armazenamento a  $\mu$ -TBS está relacionada com resultados *in vivo* (VAN MEERBEEK *et al.*, 2010) em relação à degradação hidrolítica do polímero e da matriz de colágeno. A degradação da resina adesiva está diretamente relacionada com a presença de água remanescente durante o procedimento adesivo, hidrólise dos monômeros e sorção de água. Essa degradação geralmente acontece quando as ligações covalentes entre os monômeros se rompem, levando a perdas prematuras da resistência adesiva interferindo na longevidade da restauração (LIN, 2017) (COLLARES *et al.*, 2011; KHAN *et al.*, 1992).

A interação química entre a resina adesiva e o substrato pode degradar sendo mais relevante do que a degradação colagenolítica para longevidade do procedimento restaurador (VAN MEERBEEK *et al.*, 2010). Dessa forma o PHMGH pode ter agido reduzindo a ação de enzimas colagenolíticas e proteases, auxiliando na longevidade da camada híbrida e na manutenção da adesão. Sabe-se da importância que materiais antimicrobianos podem exercer prevenindo a degradação dos materiais por reduzir a quantidade de produtos bacterianos, como ácidos e enzimas (LIN, 2017). Portanto seria interessante observar na presença de um ambiente propício à cárie dentária o comportamento do material formulado.

## 6. CONCLUSÃO

A adição de PHMGH melhorou o comportamento mecânico do adesivo. Esse material proporcionou atividade antibacteriana contra *S. mutans*, sem alterar a viabilidade de células pulpareas. O conjunto de propriedades físicas, químicas e biológicas do polímero formado junto com uma maior estabilidade da resistência de união ao longo do tempo tornam o PHMGH um composto promissor para materiais à base de resina.

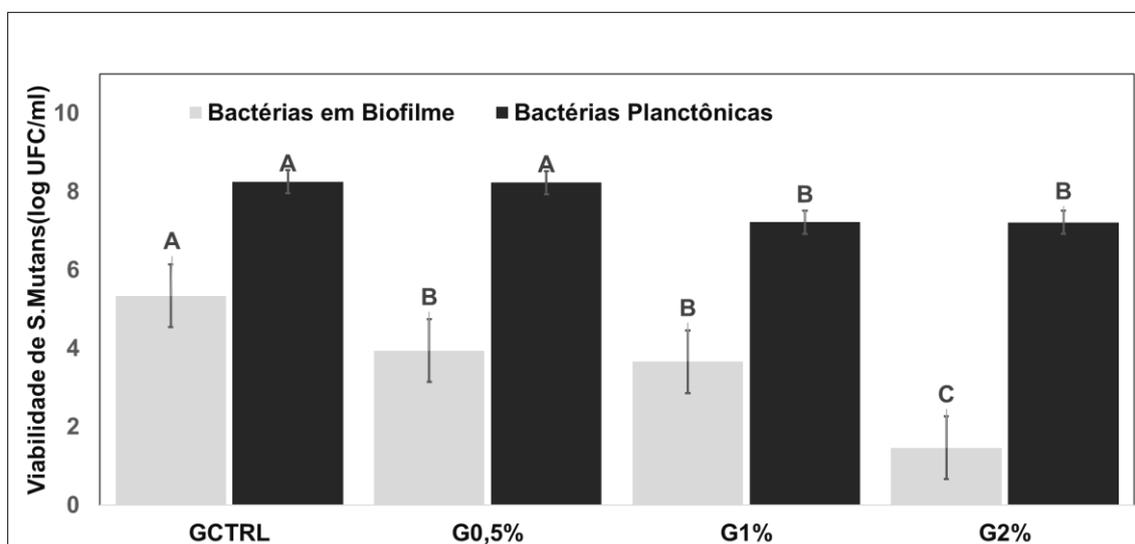
## Graficos e Tabelas

**Tabela 1:** Valores de média e desvio-padrão de GC (%), dureza knoop inicial (KHN1), dureza knoop final (KHN2), variação de dureza ( $\Delta$ KHN)

Grupos	GC	KHN1	KHN2	$\Delta$ KNH (%)
<b>G<sub>CTRL</sub></b>	63,61 ( $\pm$ 1,37) A	18,80 ( $\pm$ 1,20) Aa	7,99 ( $\pm$ 0,90) b	57,26 ( $\pm$ 5,67) A
<b>G<sub>0,5%</sub></b>	63,06 ( $\pm$ 1,23) A	18,64 ( $\pm$ 1,42) Aa	9,82( $\pm$ 1,44) b	47,44 ( $\pm$ 5,21) A
<b>G<sub>1%</sub></b>	61,78 ( $\pm$ 0,77) A	17,27 ( $\pm$ 1,38) Aa	8,70 ( $\pm$ 2,08) b	50,00 ( $\pm$ 8,29) A
<b>G<sub>2%</sub></b>	61,52 ( $\pm$ 0,26) A	18,18 ( $\pm$ 1,13) Aa	9,08 ( $\pm$ 2,08) b	50,23 ( $\pm$ 9,98) A

\*Letras iguais indicam não haver diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ )

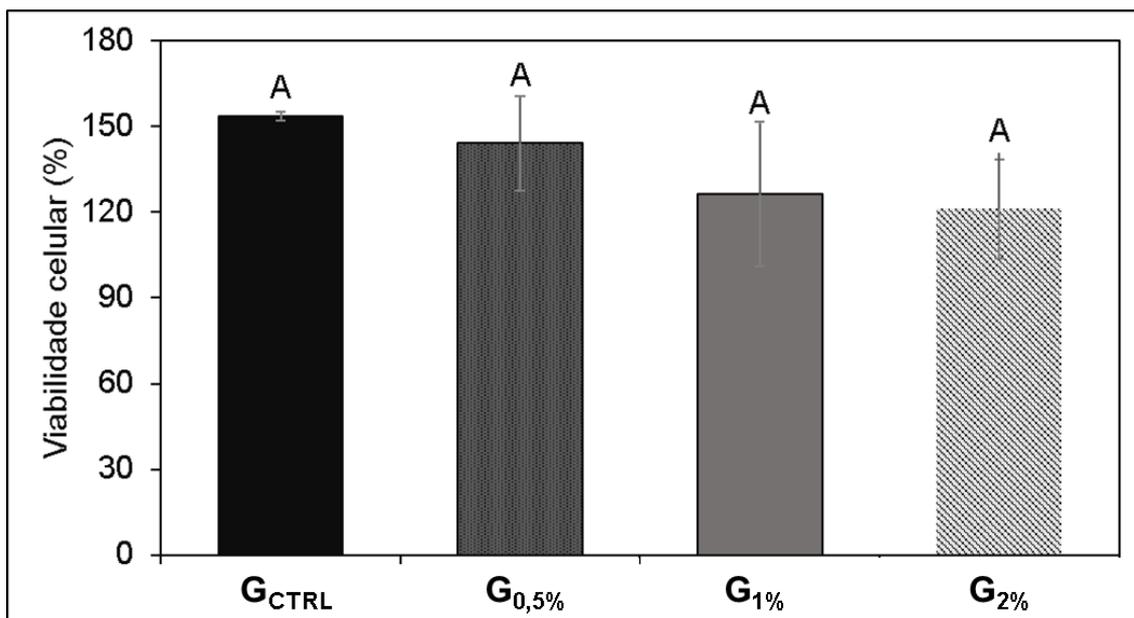
\*Letras diferentes indicam estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ )



**Figura 1.** Valores de média e desvio-padrão de viabilidade de Streptococcus Mutans (log UFC/ml).

\*Letras iguais indicam não haver diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ )

\*Letras diferentes indicam estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ )



**Figura 2:** Valores de média e desvio-padrão de viabilidade celular (%) na análise de citotoxicidade dos adesivos experimentais

\***Letras iguais indicam não haver diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ )**

**Tabela 2:** Valores de média e desvio-padrão de Resistencia Coesiva (UTS) e resistência de união ( $\mu$ TBS) em megapascais dos adesivos experimentais.

Grupos	UTS	$\mu$ TBS Imediato	$\mu$ TBS Longitudinal
G <sub>CTRL</sub>	73,75 ( $\pm 6,01$ ) #	46,00 ( $\pm 19,22$ ) ABa	16,35 ( $\pm 6,75$ ) Bb
G <sub>0,5%</sub>	71,09 ( $\pm 9,60$ ) #	57,10 ( $\pm 12,10$ ) Aa	33,64 ( $\pm 16,35$ ) Ab
G <sub>1%</sub>	74,88 ( $\pm 6,12$ ) #	42,55 ( $\pm 21,40$ ) Ba	29,64 ( $\pm 9,71$ ) Aa
G <sub>2%</sub>	72,39 ( $\pm 9,10$ ) #	42,35 ( $\pm 19,03$ ) ABa	33,28 ( $\pm 12,93$ ) Aa

\* Símbolos iguais indicam ausência de diferença estatística na mesma coluna ( $p > 0,05$ ).

\*Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ )

\*Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística na mesma linha para o mesmo ensaio ( $\mu$ TBS imediato e longitudinal)

## REFERÊNCIAS

ANDRE, C. B.; ROSALEN, P. L.; GALVAO, L. C. C.; FRONZA, B. M. *et al.* Modulation of *Streptococcus mutans* virulence by dental adhesives containing anti-caries agents. **Dent Mater**, v. 33, n. 10, p. 1084-1092, Oct 2017.

BRUDEVOLD, F.; BUONOCORE, M.; WILEMAN, W. A report on a resin composition capable of bonding to human dentin surfaces. **J Dent Res**, v. 35, n. 6, p. 846-851, Dec 1956.

CADENARO, M.; MARAVIC, T.; COMBA, A.; MAZZONI, A. *et al.* The role of polymerization in adhesive dentistry. **Dent Mater**, v. 35, n. 1, p. e1-e22, Jan 2019.

CHENG, L.; WEIR, M. D.; ZHANG, K.; AROLA, D. D. *et al.* Dental primer and adhesive containing a new antibacterial quaternary ammonium monomer dimethylaminododecyl methacrylate. **J Dent**, v. 41, n. 4, p. 345-355, Apr 2013.

CHOI, H.; KIM, K. J.; LEE, D. G. Antifungal activity of the cationic antimicrobial polymer-polyhexamethylene guanidine hydrochloride and its mode of action. **Fungal Biol**, v. 121, n. 1, p. 53-60, Jan 2017.

COLLARES, F. M.; LEITUNE, V. C. B.; FRANKEN, P.; PAROLLO, C. F. *et al.* Influence of addition of [2-(methacryloyloxy)ethyl]trimethylammonium chloride to an experimental adhesive. **Braz Oral Res**, v. 31, p. e31, May 4 2017.

COLLARES, F. M.; OGLIARI, F. A.; ZANCHI, C. H.; PETZHOLD, C. L. *et al.* Influence of 2-hydroxyethyl methacrylate concentration on polymer network of adhesive resin. **J Adhes Dent**, v. 13, n. 2, p. 125-129, Apr 2011.

DEGRAZIA, F. W.; LEITUNE, V. C.; GARCIA, I. M.; ARTHUR, R. A. *et al.* Effect of silver nanoparticles on the physicochemical and antimicrobial properties of an orthodontic adhesive. **J Appl Oral Sci**, v. 24, n. 4, p. 404-410, Jul-Aug 2016.

DEGRAZIA, F. W.; LEITUNE, V. C. B.; SAMUEL, S. M. W.; COLLARES, F. M. Boron nitride nanotubes as novel fillers for improving the properties of dental adhesives. **J Dent**, v. 62, p. 85-90, Jul 2017.

DELIGEORGI, V.; MJOR, I. A.; WILSON, N. H. An overview of reasons for the placement and replacement of restorations. **Prim Dent Care**, v. 8, n. 1, p. 5-11, Jan 2001.

DEMARCO, F. F.; COLLARES, K.; CORREA, M. B.; CENCI, M. S. *et al.* Should my composite restorations last forever? Why are they failing? **Braz Oral Res**, v. 31, n. suppl 1, p. e56, Aug 28 2017.

DEMARCO, F. F.; CORREA, M. B.; CENCI, M. S.; MORAES, R. R. *et al.* Longevity of posterior composite restorations: not only a matter of materials. **Dent Mater**, v. 28, n. 1, p. 87-101, Jan 2012.

DRAGO, L.; TOSCANO, M.; BOTTAGISIO, M. Recent Evidence on Bioactive Glass Antimicrobial and Antibiofilm Activity: A Mini-Review. v. 11, n. 2, Feb 24 2018.

FERRACANE, J. L. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. **Dent Mater**, v. 22, n. 3, p. 211-222, Mar 2006.

FERRACANE, J. L. Resin composite--state of the art. **Dent Mater**, v. 27, n. 1, p. 29-38, Jan 2011.

FERRACANE, J. L. Resin-based composite performance: are there some things we can't predict? **Dent Mater**, v. 29, n. 1, p. 51-58, Jan 2013.

FUSAYAMA, T.; NAKAMURA, M.; KUROSAKI, N.; IWAKU, M. Non-pressure adhesion of a new adhesive restorative resin. **J Dent Res**, v. 58, n. 4, p. 1364-1370, Apr 1979.

GAGLIANONE, L. A.; LIMA, A. F.; GONCALVES, L. S.; CAVALCANTI, A. N. *et al.* Mechanical properties and degree of conversion of etch-and-rinse and self-etch adhesive systems cured by a quartz tungsten halogen lamp and a light-emitting diode. **J Mech Behav Biomed Mater**, v. 12, p. 139-143, Aug 2012.

GARCIA, I. M.; RODRIGUES, S. B. Antibacterial, chemical and physical properties of sealants with polyhexamethylene guanidine hydrochloride. v. 33, p. e019, Mar 18 2019.

JANDT, K. D.; SIGUSCH, B. W. Future perspectives of resin-based dental materials. **Dent Mater**, v. 25, n. 8, p. 1001-1006, Aug 2009.

KERMANSHAHI, S.; SANTERRE, J. P.; CVITKOVITCH, D. G.; FINER, Y. Biodegradation of resin-dentin interfaces increases bacterial microleakage. **J Dent Res**, v. 89, n. 9, p. 996-1001, Sep 2010.

KHAN, A. M.; SUZUKI, H.; NOMURA, Y.; TAIRA, M. *et al.* Characterization of inorganic fillers in visible-light-cured dental composite resins. **J Oral Rehabil**, v. 19, n. 4, p. 361-370, Jul 1992.

LEE, J. H.; YU, I. J. Human exposure to polyhexamethylene guanidine phosphate from humidifiers in residential settings: Cause of serious lung disease. **Toxicol Ind Health**, v. 33, n. 11, p. 835-842, Nov 2017.

LIN, N. J. Biofilm over teeth and restorations: What do we need to know? **Dent Mater**, v. 33, n. 6, p. 667-680, Jun 2017.

LIU, Y.; ZHAO, Q. Influence of surface energy of modified surfaces on bacterial adhesion. **Biophys Chem**, v. 117, n. 1, p. 39-45, Aug 22 2005.

LYNCH, C. D.; OPDAM, N. J.; HICKEL, R.; BRUNTON, P. A. *et al.* Guidance on posterior resin composites: Academy of Operative Dentistry - European Section. **J Dent**, v. 42, n. 4, p. 377-383, Apr 2014.

MAKVANDI, P.; JAMALEDIN, R.; JABBARI, M.; NIKFARJAM, N. *et al.* Antibacterial quaternary ammonium compounds in dental materials: A systematic review. **Dent Mater**, v. 34, n. 6, p. 851-867, Jun 2018.

MJOR, I. A.; JOKSTAD, A.; QVIST, V. Longevity of posterior restorations. **Int Dent J**, v. 40, n. 1, p. 11-17, Feb 1990.

MULLER, G.; KRAMER, A. Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity. **J Antimicrob Chemother**, v. 61, n. 6, p. 1281-1287, Jun 2008.

MURRAY, P. E.; WINDSOR, L. J.; SMYTH, T. W.; HAFEZ, A. A. *et al.* Analysis of pulpal reactions to restorative procedures, materials, pulp capping, and future therapies. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 13, n. 6, p. 509-520, 2002.

NAKABAYASHI, N.; KOJIMA, K.; MASUHARA, E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. **J Biomed Mater Res**, v. 16, n. 3, p. 265-273, May 1982.

OPDAM, N. J.; VAN DE SANDE, F. H.; BRONKHORST, E.; CENCI, M. S. *et al.* Longevity of posterior composite restorations: a systematic review and meta-analysis. **J Dent Res**, v. 93, n. 10, p. 943-949, Oct 2014.

OULÉ, M. K.; AZINWI, R.; BERNIER, A. M.; KABLAN, T. *et al.* Polyhexamethylene guanidine hydrochloride-based disinfectant: a novel tool to fight meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* and nosocomial infections. **J Med Microbiol**, v. 57, n. Pt 12, p. 1523-1528, Dec 2008.

OULE, M. K.; QUINN, K.; DICKMAN, M.; BERNIER, A. M. *et al.* Akwaton, polyhexamethylene-guanidine hydrochloride-based sporicidal disinfectant: a novel tool to fight bacterial spores and nosocomial infections. **J Med Microbiol**, v. 61, n. Pt 10, p. 1421-1427, Oct 2012.

PARK, K. An analysis of a humidifier disinfectant case from a toxicological perspective. **Environ Health Toxicol**, v. 31, p. e2016013, 2016.

SCHIROKY, P. R.; LEITUNE, V. C. B.; GARCIA, I. M.; OGLIARI, F. A. *et al.* Triazine Compound as Copolymerized Antibacterial Agent in Adhesive Resins. **Braz Dent J**, v. 28, n. 2, p. 196-200, Mar-Apr 2017.

SCHULZ, H.; SCHIMMOELLER, B.; PRATSINIS, S. E.; SALZ, U. *et al.* Radiopaque dental adhesives: dispersion of flame-made Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/SiO<sub>2</sub> nanoparticles in methacrylic matrices. **J Dent**, v. 36, n. 8, p. 579-587, Aug 2008.

VAN MEERBEEK, B.; PEUMANS, M.; POITEVIN, A.; MINE, A. *et al.* Relationship between bond-strength tests and clinical outcomes. **Dent Mater**, v. 26, n. 2, p. e100-121, Feb 2010.

VAN TONDER, A.; JOUBERT, A. M.; CROMARTY, A. D. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. **BMC Res Notes**, v. 8, p. 47, Feb 20 2015.

VITT, A.; GUSTAFSSON, A.; RAMBERG, P.; SLIZEN, V. *et al.* Polyhexamethylene guanidine phosphate irrigation as an adjunctive to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis. **Acta Odontol Scand**, v. 77, n. 4, p. 290-295, May 2019.

WILSON, N. H.; DUNNE, S. M.; GAINSFORD, I. D. Current materials and techniques for direct restorations in posterior teeth. Part 2: Resin composite systems. **Int Dent J**, v. 47, n. 4, p. 185-193, Aug 1997.

ZHOU, Z.; WEI, D.; LU, Y. Polyhexamethylene guanidine hydrochloride shows bactericidal advantages over chlorhexidine digluconate against ESKAPE bacteria. **Biotechnol Appl Biochem**, v. 62, n. 2, p. 268-274, Mar-Apr 2015.

ZHOU, Z. X.; WEI, D. F.; GUAN, Y.; ZHENG, A. N. *et al.* Damage of Escherichia coli membrane by bactericidal agent polyhexamethylene guanidine hydrochloride: micrographic evidences. **J Appl Microbiol**, v. 108, n. 3, p. 898-907, Mar 2010.