

Eficacia antimicrobiana del primer ortodóncico adicionado con nanopartículas de plata. Estudio transversal *in vitro*.

Humberto Mariel Murga, Rene Centeno Sanchez, Wulfrano Sánchez Meraz, Ana María González Amaro, Raymundo Arredondo Hernández, Jairo Mariel Cárdenas y Francisco Javier Gutiérrez Cantu.

Facultad de Estomatología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis de Potosí, México.

Palabras clave: nanopartículas de plata; primer ortodóncico; unidades formadoras de colonias; desmineralización.

Resumen. Se evaluó la eficacia antimicrobiana de las nanopartículas de plata (NPsAg) incorporadas al adhesivo (primer) colocado en el esmalte dental adyacente a la aparatología ortodóncica fija (brackets). Se realizó un estudio experimental *in vitro* en 40 premolares, los cuales se dividieron en dos grupos con brackets, uno cementado con primer convencional y otro adicionado con NPsAg; se colocaron en medios de cultivo, previamente inoculados con *Streptococcus mutans*, y se tomaron muestras para hacer cultivos y conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) al día 1, 15 y 30. Se observó una disminución de la presencia de *Streptococcus mutans* en las muestras a los 15 días de colocado el primer con la agregación de nanopartículas, aunque tal efecto se redujo a los 30 días. Esta reducción del efecto de las nanopartículas puede deberse a la inexistencia de limpieza mecánica, lo cual favoreció la agregación bacteriana sobre el biofilm, afectando su efecto antimicrobiano. Esto sugiere la necesidad de realizar estudios *in vivo* que permitan observar el comportamiento de los biomateriales en el medio bucal. Las NPsAg agregadas al primer resultan una herramienta eficaz para prevenir la desmineralización del esmalte alrededor de la aparatología ortodóncica fija.

Antimicrobial efficacy of orthodontic primer added with silver nanoparticles. Cross-sectional *in vitro* study.

Invest Clin 2016; 57(4): 321 - 329

Key words: silver nanoparticles; orthodontic primer; colony-forming units; demineralization.

Abstract. The antimicrobial efficacy of the silver nanoparticles (NPsAg), incorporated into the adhesive (primer) placed in the enamel adjacent to fixed orthodontic appliances (brackets), was evaluated. An experimental study was performed on 40 premolars *in vitro*, which were divided into two groups with brackets, one cemented with conventional primer and another added with NPsAg, placed in culture media previously inoculated with *Streptococcus mutans*, and sampled for culturing and counting colony forming units (UFC) on days 1, 15 and 30. A decrease in the presence of *Streptococcus mutans* in the samples after 15 days with nanoparticle aggregation was observed, and a reduction in the effect of said nanoparticles after 30 days. This reduction of the nanoparticles effects can be due to the absence of mechanical cleaning, which favored the bacterial aggregation on the biofilm, affecting its antimicrobial effect. This suggests the need for realizing studies in “*vivo*” which will allow the observation of the behavior of the biomaterials on the buccal medium. The NPsAg added to the primer are an effective tool to prevent the demineralization of the enamel around the fixed orthodontic appliances.

Recibido: 01-02-2016. Aceptado: 30-06-2016

INTRODUCCIÓN

La desmineralización del esmalte es una complicación común en el tratamiento ortodóncico con aparatología fija que provoca lesiones cariosas o “manchas blancas”. Prevenir estas es una de las preocupaciones de los ortodoncistas debido a que resultan poco saludables y anties-téticas, así como potencialmente irreversibles. Las lesiones por desmineralización, causadas por los ácidos formados por los microorganismos alrededor de la aparatología ortodóncica fija, se observan como manchas blancas en el esmalte (1-3).

La cavidad oral está constituida por gran número de microorganismos que coexisten en simbiosis con el huésped. Un grupo de complejos bacterianos son los principales responsables

del inicio y progresión de la desmineralización; aunque gran parte de los microorganismos que ingresan en la cavidad bucal se eliminan, un pequeño porcentaje puede adherirse y persistir para organizarse en placas o biopelículas que desencadenan el inicio de la desmineralización del esmalte. La adhesión de la aparatología ortodóncica fija al diente es facilitada mediante el primer. Estudios previos han reportado que estos primer proveen un sitio de fácil adhesión y rápido crecimiento de microorganismos, debido a la rugosidad de su superficie (4, 5). Un método para prevenir la desmineralización del esmalte es utilizar primer ortodóncicos resistentes a la acumulación y colonización bacteriana. Para este propósito, varios agentes antimicrobianos, como fluoruro y clorhexidina se han incorporado en productos ortodóncicos; sin embargo, en

la práctica, se ha comprobado que no son duraderos y que afectan las propiedades mecánicas de adhesión del material (1-5). El desarrollo científico que ha alcanzado la nanotecnología ha generado una nueva dimensión en el desarrollo de materiales o técnicas odontológicas. La nanotecnología incluye a la electrónica y el magnetismo, para la fabricación de estructuras de carbón, silicio, materiales inorgánicos, metales y materiales semiconductores. El término nanotecnología, se refiere a la fabricación y utilización de materiales, dispositivos y sistemas en el rango de dimensión de 0,1-100 nm ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$) que permite fabricar materiales a partir del reordenamiento de átomos y moléculas, presentando propiedades diferentes que las normales. En otros estudios, las nanopartículas de plata (NPsAg) se han incorporado a diversos materiales de adhesión, debido a que presentan en su química superficial, propiedades que han demostrado tener un efecto antibacteriano contra la biopelícula de bacterias inoculadas en la superficie de las restauraciones (6-9). Para ser aceptados clínicamente, los nuevos primers deben proveer actividad antimicrobiana superior, disminuir la colonización bacteriana y mostrar propiedades físicas comparables a los primers convencionales (10-13).

El propósito de este estudio *in vitro* fue evaluar la eficacia antimicrobiana de las NPsAg incorporadas al primer ortodóncico y compararla con la actividad bacteriana del primer convencional.

MATERIAL Y MÉTODOS

La primera fase del estudio comenzó seleccionando y analizando una muestra de 40 premolares; los criterios de inclusión fueron los siguientes: primeros premolares inferiores extraídos de pacientes sanos, sin caries, desmineralización, restauraciones, fracturas o fluorosis, los cuales se sometieron a un protocolo de

desinfección y esterilización. Dichos procesos se corroboraron inoculando las muestras en agar soya tripticasa (Difco, BD, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos), incubándolos por 24 horas en horno de incubación (Felisa, Zapopan, Jalisco, México) a 37°C ; se midió el desarrollo microbiano en escala de McFarland y en siembras en placas de agar soya tripticasa (Difco, BD, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos), en los cuales no se observó crecimiento bacteriano.

Durante la segunda fase del estudio, la muestra se dividió en 2 grupos: grupo control ($n=20$) y grupo de tratamiento con NAg ($n=20$). En el grupo control, se procedió a realizar el protocolo de cementado con aparatología ortodóncica fija Flexx MBT (Ah-Kim-Pech, D.F., México) mediante Transbond XT Primer (3M® Minnesota Mining and Manufacturing Company, Estados Unidos). Para el grupo con NAg, se usó también Transbond XT Primer pero adicionando nanopartículas de plata al material ortodóncico. Para tales efectos se usó una mezcla de NPsAg en polvo elaborada en un cuarto oscuro de laboratorio, con una concentración de 600 ppm, pH 7 y un tamaño aproximadamente de 50 nm, previamente evaluado por un equipo Malvern Co. M Od. Nanosizer Técnica DLS; el tamaño y la distribución de las NPsAg, la cristalinidad y el grado de dispersión dependieron de la cinética de la reacción. Para la síntesis de las NPsAg se utilizó NaBH_4 como agente reductor. La relación molar Ag^+ a reductor fue mayor a uno. Se adicionaron agentes estabilizantes (aminas primarias con relación molar metal-estabilizante) para controlar el tamaño y uniformidad. Se realizó el protocolo de grabado mediante ácido fosfórico al 37 % Scotchbond (3M, Monrovia, CA, Estados Unidos), el cual se aplicó por 30 segundos, se enjuagó por 30 segundos y se procedió a secar con aire a presión. El primer fue entonces aplicado en la superficie vestibular grabada del diente, se procedió a colocar resina Transbond XT (3M® Minnesota Mining

and Manufacturing Company, Estados Unidos) en la base del bracket, colocándolo en el diente con una presión constante, retirando el exceso de resina y se fotopolimerizó (Demetron VCL 401, Kerr, Orange, CA, Estados Unidos) por 40 segundos en total (10 segundos por cada cara de la aparatología fija).

Para la inoculación bacteriana de los premolares se tomaron muestras a 4 pacientes. Los criterios de exclusión fueron los siguientes: caries activa, bolsas periodontales, hábitos perniciosos o haber sido tratado con antibióticos en los últimos 3 meses. La toma de muestra se realizó mediante la colocación de una punta de papel estéril (Hygenic, Akron, OH, Estados Unidos) en la cara vestibular del incisivo central inferior; posteriormente se colocaron en un contenedor cerrado y fueron transportados inmediatamente al laboratorio para cultivo de *S mutans* (14). Las muestras obtenidas se sembraron en agar mitis-salivarius (Difco, BD, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos), agar lactobacillus (Difco, BD, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos) y agar extracto de levadura sucrosa-bacitracina (Difco, BD, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos). Para corroborar la presencia de las bacterias de interés del estudio, se realizaron pruebas preliminares de morfología macroscópica y microscópica. Una vez obtenidos los cultivos se realizaron pruebas de identificación bioquímica API20strep (bioMérieux México, D.F., México). Se identificó la presencia de *S. mutans*, *S. mitis*, *S. salivarius*, *S. sanguis* y *Lactobacillus*. Se aislaron los microorganismos en tubos de ensayo con 10 ml de Brain-HeartInfusion (BHI) (Lansing, MI, Estados Unidos) y se mantuvieron a 37°C en horno de incubación (Felisa, Zapopan, Jalisco, México). Se dividieron las muestras de ambos grupos de manera aleatoria en tubos de ensayo con 20 ml de BHI que contenían las muestras bacterianas obtenidas previamente. Se incubaron a 37°C y se realizaron se realizaron recambios de BHI cada 48 horas para que las

bacterias siguieran en un medio apto con nutrientes que las mantuvieran activas el tiempo de duración del estudio. Las tomas de muestras microbiológicas de cada uno de los premolares se llevaron a cabo en dos intervalos de tiempo, a los 15 y 30 días. Dichas muestras fueron tomadas con 3 puntas de papel estéril (Hygenic, Akron, OH, Estados Unidos) a cada diente, con una duración de toma de muestra de 1 minuto. Se depositaron en tubos de ensayo con 10 ml de caldo soya tripticasa, se incubaron por 2 horas en horno de incubación a 37°C y se hizo dilución seriada 10^{-1} a 10^{-3} . Posteriormente, se sembraron todas las diluciones en placas agar soya tripticasa, se etiquetaron y sellaron las muestras y se incubaron durante 24 horas en horno de incubación a 37°C. Posteriormente, se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC) usando un lápiz digital contador de colonias (modelo 1002, Labtron, Tehran, Iran) y se tomaron en cuenta las muestras que tuvieran entre 25-250 UFC con la finalidad de permitir la observación de las características morfológicas de las bacterias, así como el conteo por dispersión adecuada de las UFC (15). Para el análisis estadístico se utilizó el software MINITAB (Versión 17, State College, PA, Estados Unidos), se analizó la normalidad de las variables y se realizó comparaciones entre las muestras con la prueba t de student para determinar la significancia. Para reducir el sesgo de las medidas se calculó el coeficiente de confiabilidad (95%) y con una significancia estadística de $p < 0,05$.

Se hizo la transformación de los datos del número de UFC a datos exponenciales para su análisis estadístico con la siguiente fórmula:

No. de colonias en placa x Factor de dilución / 0,1 mL = No. de colonias por mililitro

Posteriormente se expresó el número de UFC en \log_{10} para los tiempos de toma de muestra en los grupos de estudio.

El presente fue un estudio *in vitro* con manejo de residuos con desarrollo microbiano,

cuyo protocolo fue autorizado por el honorable comité de ética en investigación de la Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí asignado con la clave CEI-FE034-014, se siguieron los lineamientos de acuerdo a la norma oficial mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002 de protección ambiental, salud ambiental, residuos peligrosos biológico infecciosos, de clasificación y especificaciones del manejo.

RESULTADOS

Se identificó la carga bacteriana en los dos grupos de estudio a los días 1, 15 y 30 para cada una de las muestras. Se realizó la estadística descriptiva que incluye la media, error estándar, desviación estándar, valor mínimo y máximo para cada variable. En ambos grupos se obtuvo una toma basal con carga bacteriana en el día 0; en el día 15 se identificaron las diferencias entre los grupos de control y de tratamiento encontrándose una media de $9,6 \text{ UFClog}_{10}$ con una desviación estándar de 1,4 para el grupo de tratamiento (adicionado con NPsAg), y de $10,8 \text{ UFClog}_{10}$ con una desviación estándar de 0,8 en el grupo control, lo que indicó una disminución significativa de UFC en el grupo de tratamiento ($p=0,02$). Al realizarse el recuento en el día 30,

que han empleado las NPsAg como agente antimicrobiano. Así Silva Benítez y col. (25) observaron que al colocar adhesivo sobre el esmalte dental, aumentaba la presencia de *S. mutans* y disminuía con la agregación de NPsAg, siendo ésta una buena opción para prevenir la desmineralización del esmalte alrededor de la aparatología ortodóncica (25). En este estudio se observó una reducción del efecto de las NPsAg en la toma de muestras en el día 30, lo cual pudo deberse a la adhesión que se establece entre los microorganismos y los tejidos del hospedero, microorganismos que se agregan entre sí para organizarse en placas o biopelículas que son comunidades complejas de microorganismos recubiertas de un polímero extracelular que les ayuda a retener el alimento y protegerse de los agentes tóxicos.

Al ser un estudio *in vitro*, estas capas de biofilm no pueden ser removidas mecánicamente por el cepillado dental, por lo que permiten una continua agregación bacteriana, y junto con su materia de desecho pueden afectar el efecto antimicrobiano de las NPsAg que se encuentran en la superficie del esmalte adyacente a los *brackets*. Aunque los resultados del estudio fueron no significativos a los 30 días, representan un valioso aporte ya que sugieren que el cepillado juega un papel importante en la prevención

TABLA I
CARGA BACTERIANA EN LOG_{10} UFC EN LOS GRUPOS EN ESTUDIO EN LOS DÍAS 1, 15 Y 30 DESPUÉS DE APLICADO EL TRATAMIENTO

Día 1		Día 15		Día 30	
Control n= 20	NPSAg n= 20	Control n= 20	NPSAg n= 20	Control n= 20	NPSAg n= 20
0	0	$10,8 \pm 0,8$ (9,1-12,1)	$9,6 \pm 1,4^*$ (6,5-12,2)	$11,5 \pm 1,6$ (8,4-14,6)	$11,6 \pm 1,7^{**}$ (7,8-14,4)

Las cifras representan el promedio \pm desviación estándar (mínimo-máximo)

* $p < 0,02$ en comparación con el control

** $p = 0,82$ en comparación con el control

NPSAg: nanopartículas de plata

se observó una marcada disminución del efecto de las NPsAg con una media de 11,6 UFClog₁₀ y desviación estándar de 1,7 para el grupo de tratamiento (adicionado con NPsAg) y una media de 11,5 UFClog₁₀ con desviación estándar de 1,6 para el grupo control, no encontrándose diferencia significativa entre ambos grupos. Se determinó la significancia entre los grupos al día 15, no así en la toma basal y al día 30. (Tabla I).

DISCUSIÓN

Actualmente, gran parte de la población recurre a tratamientos ortodóncicos con el fin de conseguir mayor estética dental, para lo cual es necesario el uso de brackets. Los tratamientos de ortodoncia con aparatología fija tienen un gran efecto sobre la desmineralización del esmalte ya que estos crean, debido a la rugosidad de su superficie, un ambiente favorable para la acumulación de microorganismos (10). La desmineralización durante el tratamiento es la complicación más frecuente y se hace evidente en el primer mes de la colocación de la aparatología de ortodoncia (11).

A pesar de la disponibilidad de diversos protocolos para el uso de fluoruros en pacientes con tratamiento de ortodoncia, estos materiales no han demostrado un efecto inhibitorio en la desmineralización del esmalte dental (1-5). Son muchos los estudios en distintos campos de la medicina que han utilizado NPsAg y reportan su eficacia antimicrobiana (7-23).

En el 2005, Elechiguerra y col. demostraron el efecto bactericida de las NPsAg (1 y 10 nm) sobre *E. coli*, *P. aeruginosa*, *V. cholerae* y *S. typhi*. El efecto bactericida de las NPsAg ha sido demostrado en diversos microorganismos como *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhi* y *V. cholerae* observándose una inhibición en la reproducción bacteriana, penetración de las NPsAg al núcleo y destrucción de DNA (14). En el presente estudio se propuso el uso de

NPsAg para reducir la carga bacteriana presente en el esmalte adyacente a la aparatología de ortodoncia, por ello se sintetizaron y adicionaron a un medio adhesivo de uso diario para el ortodoncista, en el cual mediante el cementado normal de brackets y sin repercusiones en el nivel de adhesión al esmalte pudiera tener un efecto positivo en la reducción de las bacterias formadoras de manchas blancas como *S. mutans*, *S. mitis*, *S. salivarius*, *S. sanguis* y *Lactobacillus*. El diseño de este estudio permitió tener un mayor control en el laboratorio para identificar y aislar las bacterias involucradas en el desarrollo de manchas blancas en el esmalte dental, y el aislamiento de cepas de las bacterias estudiadas, que permitieron imitar en gran medida las condiciones existentes en la boca. En el laboratorio se pudieron manejar los más altos estándares de asepsia; el estudio fue realizado por un solo operador entrenado asegurando una toma basal con cero carga bacteriana, trabajando en un ambiente estéril como el que brinda la campana de flujo laminar, evitando que los resultados del mismo se debieran a un factor externo. En cuanto a la selección de los órganos dentarios de interés, se tuvo cuidado de que cumplieran con los criterios de inclusión, y fueron asignados en los grupos control y de tratamiento (con NPsAg) de manera aleatoria para tener la seguridad de que tuvieran características similares y así evitar que los resultados fueran alterados por algún factor externo.

El conteo de UFC en placas de agar es una técnica validada por Gaitán-Fonseca y col. (24); es una técnica fidedigna, reproducible, fácil de realizar y más económica que otras técnicas usadas; por tales ventajas se eligió esta técnica, la cual arrojó resultados que entraron en los rangos establecidos 25-250, tal como otros autores han reportado (24).

Los resultados obtenidos en este estudio en la toma a los 15 días, tuvieron valor significativo ($p= 0,02$) y son corroborados por estudios

de la desmineralización del esmalte adyacente a la aparatología fija.

En la literatura no se encontraron estudios similares que permitan establecer el efecto de las NPsAg al ser combinadas con el cepillado dental por periodos mayores de tiempo, y con la concentración exacta de bacterias en el medio oral, así como las diversas especies que coexisten en ella, por lo que es necesario que se realicen estudios in vivo que aporten más información sobre la eficacia de las NPsAg.

De acuerdo a nuestros resultados, la adición de NPsAg al primer de ortodoncia es eficaz en la disminución de carga bacteriana causante de la desmineralización y formación de manchas blancas y caries.

La actividad antimicrobiana de las NPsAg se vió disminuida con respecto al tiempo de la toma de muestra de los 15 días a los 30 días; esto puede ser debido a la falta de una acción de limpieza mecánica como la que confiere el cepillado dental que remueve los restos de desecho de los microorganismos, pudiendo esto cubrir las NPsAg en el esmalte adyacente a la aparatología de ortodoncia disminuyendo su efectividad antimicrobiana, se necesitan estudios clínicos in vivo que permitan evaluar el poder de las NPsAg actuando en un medio bucal vivo con todos sus componentes. Las NPsAg tienden a inhibir selectivamente a las bacterias sin causar toxicidad en células de mamíferos. Algunos estudios han puesto de manifiesto la correlación positiva entre la concentración de NPsAg y efectos citotóxicos. Sin embargo, la ausencia de citotoxicidad contra células humanas se demostró cuando concentraciones de NPsAg de 0,05-0,70% fueron incorporados (26,27). La toxicidad por la exposición aguda a iones de plata es relativamente baja; las principales vías de exposición reportadas comprenden la inhalación, ingestión, tópica dérmica, urológica y hematogena. La exposición crónica puede llevar al depósito de partículas en la piel (argiria), ojos

(argirosis) y otros órganos (28).

De acuerdo a nuestros resultados, la adición de NAg al primer ortodóncico es eficaz en la disminución de carga bacteriana causante de la desmineralización formando manchas blancas y caries. En virtud de los resultados de este estudio, se concluye que la adición de NAg al primer ortodóncico es eficaz en la disminución de carga bacteriana causante de la desmineralización formando manchas blancas y caries.

REFERENCIAS

1. **Sukontapatipark W, El-Agroudi Ma, Selliseth NJ, Thunold K, Selvig K.A.** Bacterial colonization associated with fixed orthodontic appliances. A scanning electron microscopy study. *Eur J Orthod* 2001; 23: 475-484.
2. **Smiech-Slomkowska G, Jablonska-Zrobek J.** The effect of oral health education on dental plaque development and the level of caries-related *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. *Eur J Orthod* 2007; 29: 157-160.
3. **Derks A, Katsaros C, Frencken JE, van't Hof MA, Kuijpers-Jagtman AM.** Caries-inhibiting effect of preventive measures during orthodontic treatment with fixed appliances. A systematic review. *Caries Research* 2004; 38:413-420.
4. **Marsh Phillip D.** Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. *Dent Clin N Am* 2010; 54: 441-454.
5. **Cohen WJ, Wiltshire WA, Dawes C, Lavelle CL.** Long-term in vitro fluoride release and re-release from orthodontic bonding materials containing fluoride. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2003; 124: 571-576.
6. **Archana B, Abhishek B, Abhinav M, Sohani M, Manjula S, Arvind Kumar S.** Nanotechnology in dentistry: Present and

- future. *J Int Oral Health* 2014; 6(1): 121-126.
7. **Zhang, K, Melo, MAS, Cheng L, Weir MD, Bai Y, Xu HHK.** Effect of quaternary ammonium and silver nanoparticle-containing adhesives on dentin bond strength and dental plaque microcosm biofilms. *Dent Mater* 2012; 28(8): 842-852.
 8. **Cheng L, Zhang K, Weir MD, Liu H, Zhou X, Xu HHK.** Effects of antibacterial primers with quaternary ammonium and nano-silver on *Streptococcus mutans* impregnated in human dentin blocks. *Dent Mater* 2013; 29(4): 462-472.
 9. **Zhang N, Chen C, Weir MD, Bai Y, Xu HH.** Antibacterial and protein-repellent orthodontic cement to combat biofilms and white spot lesions. *J Dent* 2015; 43(12): 1529-1538.
 10. **Sug-Joo A, Shin-Jae L.** Experimental antimicrobial orthodontic adhesives using nanofillers and silver nanoparticles. *Dent Mater* 2009; 25(2): 206-213.
 11. **Mota D, Rawls H, Wagner J.** A novel antimicrobial orthodontic band cement with in situ-generated silver nanoparticles. *Angle Orthod* 2015; 85(2): 175-183.
 12. **Azarsina M, Kasraei S, Yousefi-Mashouf R, Dehghani N, Shirinzad M.** The antibacterial properties of composite resin containing nanosilver against *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus*. *J Contemp Dent Pract* 2013; 14: 1014-1018.
 13. **Holla G, Yeluri R, & Munshi AK.** Evaluation of minimum inhibitory and minimum bactericidal concentration of nano-silver base inorganic anti-microbial agent (Novaron®) against *Streptococcus mutans*. *Contemp Clin Dent* 2012; 3(3): 288-293.
 14. **Wang X, Wang B, Wang Y.** Antibacterial orthodontic cement to combat biofilm and white spot lesions. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2015; 148(6): 974-981.
 15. **Altmann ASP, Collares FM, Ogliaeri FA, Samuel SMW.** Effect of methacrylated-based antibacterial monomer on orthodontic adhesive system properties. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2015; 147(4): S82-S87.
 16. **Ghaselpour M, Molana Z, Alaghemand H, Beirami A, Bijani A, Asghari F.** Evaluation of anti *Streptococcus mutans* effects of non fluoride & fluoride containing sealants after adding nano silver particles. *J Dent Med* 2014; 27(1): 16-23.
 17. **Singh C, Dua V, Vyas M, Verma S.** Evaluation of the antimicrobial and physical properties of an orthodontic photo-activated adhesive modified with an antiplaque agent: an in vitro study. *Indian J Dent Res* 2013; 24: 694-700.
 18. **Ahn SJ, Lee SJ, Kook JK, Lim BS.** Experimental antimicrobial orthodontic adhesives using nanofillers and silver nanoparticles. *Dent Mater* 2009; 25: 206-213.
 19. **Altmann ASP, Collares FM, Leitune VCB, Samuel SMW.** The effect of antimicrobial agents on bond strength of orthodontic adhesives: a meta-analysis of in vitro studies. *Orthod Craniofac Res* 2016; 19(1): 1-9.
 20. **Ryu HS, Bae IH, Lee KG, Hwang HS, Lee KH, Koh JT, Cho JH.** Antibacterial effect of silver-platinum coating for orthodontic appliances. *Angle Orthod* 2011; 82(1): 151-157.
 21. **Cocco AR, da Rosa WLDO, da Silva AF, Lund RG, Piva E.** A systematic review about antibacterial monomers used in dental adhesive systems: Current status and further prospects. *Dent Mater* 2015; 31(11): 1345-1362.
 22. **Moreira D M, Oei J, Rawls HR, Wagner J, Chu L, Li Y, Whang K.** A novel antimicrobial orthodontic band cement with in situ-generated silver nanoparticles. *Angle Orthod* 2014; 85(2): 175-183.

23. **Farhadian N, Mashoof RU, Khanizadeh S, Ghaderi E, Farhadian M, Miresmaeili A.** Streptococcus mutans counts in patients wearing removable retainers with silver nanoparticles vs those wearing conventional retainers: A randomized clinical trial. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2016; 149(2): 155-160.
24. **Gaitán Fonseca C I, González Amaro A M Cruz Gaona R, Flores Reyes H E.** Efecto antimicrobiano del agua potencialmente oxidativa. *Revista Odontológica Mexicana* 2009; 13 (4): 224-228.
25. **Silva Benítez E L, Martínez Castañón G A, Loyola Rodríguez J P, Patiño Marín N, Ruiz F.** Efecto bactericida de nanopartículas de plata incluidas en un adhesivo ortodóntico. *Rev Inv Clin Odont* 2012; 2(2): 21-30.
26. **Marambio-Jones C, Hoek E.** A review of antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implication for human health and the environment. *J Nanopart Res* 2010;12:1531-1551.
27. **Hernández-Sierra JF, Galicia-Cruz O, Angélica SA, Ruiz F, Pierdant-Pérez M.** In vitro cytotoxicity of silver nanoparticles on human periodontal fibroblasts. *J Clin Pediatr Dent* 2011;36(1):37-41.
28. **Van de Voorde K, Nijsten T, Schelfhout K, Moorkens G, Lambert J.** Long-term use of silver containing nose-drops resulting in systemic argyria. *Acta Clin Belg* 2005;60:33-35.