



ARAŞTIRMA / RESEARCH

Farklı Ortodontik Simanların Uzun Dönem Antibakteriyel Etkileri

Long-Term Antibacterial Effects of Different Orthodontic Cements



Yrd.Doç.Dr. Fırat ÖZTÜRK*
Yrd.Doç.Dr. Muhammet YALÇIN**
Yrd.Doç.Dr. Uğur ARSLAN***
Yrd.Doç.Dr. Ruhi NALÇACI****
Dt. Sertaç AKSAKALLI*****

İnönü Üniv. Dişhek. Fak. *Ortodonti ve
**Diş Hast. ve Ted. A.D. Malatya,
*** Selçuk Üniv. Selçuklu Tıp Fak.
Mikrobiyoloji A. D. Konya, **** Süleyman
Demirel Üniv. Dişhek. Fak. Ortodonti A.D.
Isparta, *****Selçuk Üniv. Diş Hek. Fak.
Ortodonti A.D. Konya / *İnönü Univ.
Faculty of Dentistry, Depts. of
*Orthodontics and **Restorative Dentistry,
Malatya, ***Selçuk Univ., Selçuklu Faculty
of Medicine, Dept. of Microbiology, Konya,
**** Süleyman Demirel Univ. Faculty of
Dentistry, Dept. of Orthodontics, Isparta
and ***** Selçuk Univ. Faculty of Dentistry,
Dept. of Orthodontics Konya, Turkey

Yazışma adresi:
Corresponding Author:
Dr. Fırat Öztürk
İnönü Üniversitesi
Diş Hekimliği Fakültesi,
Ortodonti AD 44280
Malatya Turkey
Tel: +90-532-6571572
E-posta: dtfirat@gmail.com

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı, direk kontakt testi (DKT) yöntemiyle farklı ortodontik simanların antibakteriyel özelliklerinin değerlendirilmesidir. **Gereçler ve Yöntem:** Ortodontik amaçla kullanılan 6 farklı ortodontik simanın antibakteriyel özelliği DKT kullanılarak değerlendirildi. DKT için doksan altı kuyucuklu kültür kabının duvarları her grupta 8 örnek olacak şekilde test materyalleri ile (Durelon, Ketac-Cem Radiopaque, GC Fuji Ortho Band LC Paste Pak, Meron, Ultra Band Lok, and 3M Unitek Multi Cure) kaplandı. Streptococcus mutans süspansiyonu örneklerin yüzey alanına uygulanarak 37°C'de bir saat bekletildi. Bakteri üremesi, ısı kontrollü spektrofotometre ile 16 saat boyunca gözlemlendi. Herbir kuyucuktaki üremenin kinetiği her 30 dakikada bir 650 nm düzeyinde sürekli olarak kaydedildi. Test edilen materyaller 1 hafta, 1 ay ve 3 ay bekletilerek ilave deneyler gerçekleştirildi. Veriler tek yönlü ANOVA ve Tamhane'in T2 çoklu karşılaştırma testi ile analiz edildi. **Bulgular:** DKT sonuçları, 3M Multi Cure (P=0.02), GC Fuji Ortho (P=0.04), Meron (P=0.001), ve Durelon (P=0.001) simanların yeni hazırlanmış örneklerinin antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. 1 hafta yaşlandırma sonrasında 3M Unitek Multi Cure (P=0.000), ve Durelon (P=0.03) hala antibakteriyel aktivite göstermiştir. 1 aylık yaşlandırılmış örneklerden yalnızca Durelon (P=0.001) antibakteriyel aktiviteye sahipti. 3 aylık yaşlandırılmış örneklerde ise 3M Multi Cure (P=0.000), GC Fuji Ortho (P=0.001), ve Durelon (P=0.001) antibakteriyel özellik göstermiştir. **Sonuç:** Bu çalışmanın sınırları içerisinde, 3M Unitek Multi Cure, GC Fuji Ortho ve Durelon çalışma periodu esnasında antibakteriyel özellik göstermiştir. (Türk Ortodonti Dergisi 2010;24: 156-169)

Anahtar Kelimeler: Antibakteriyel etki, Simanlar, Direk kontakt testi

Gönderim Tarihi: 01.06.2011
Kabul Tarihi: 26.09.2011

SUMMARY

Aim: The purpose of this study was to evaluate the antibacterial properties of different orthodontic cements using a direct contact test (DCT). **Materials and Methods:** The antibacterial properties of 6 orthodontic cements were evaluated with DCT. For the DCT, wells (n=8) of 96-microtiter plates were coated with the tested cements (Durelon, Ketac-Cem Radiopaque, GC Fuji Ortho Band LC Paste Pak, Meron, Ultra Band Lok, and 3M Unitek Multi Cure). A Streptococcus mutans suspension was placed on the surface of each specimen for 1 hour at 37°C. Bacterial growth was monitored for 16 hours with a temperature-controlled microplate spectrophotometer. The kinetics of the outgrowth in each well was recorded continuously at 650 nm every 30 minutes. Additional experiments were performed in which the tested materials were aged for 1 week, 1 month and 3 months. The data were analyzed by one-way ANOVA, and Tamhane's T2 multiple comparison test. **Results:** The results of the DCT showed that, freshly mixed samples of 3M Multi Cure (P=0.02), GC Fuji Ortho (P=0.04), Meron (P=0.001), and Durelon (P=0.001) showed antibacterial activity. After aging for one week 3M Unitek Multi Cure (P=0.000), Durelon (P=0.03) still showed antibacterial activity. In the experiments with 1 month aged specimens, only Durelon (P=0.001) showed antibacterial activity. In the 3 months aged specimens, 3M Multi Cure (P=0.000), GC Fuji Ortho (P=0.001), and Durelon (P=0.001) showed antibacterial property. **Conclusion:** Within the limitations of this study, 3M Unitek Multi Cure, GC Fuji Ortho, and Durelon, showed antibacterial properties during study period. (Turkish J Orthod 2010;24:156-169)

Key Words: Antibacterial effects, Cements, Direct Contact Test

Date Submitted: 01.06.2011
Date Accepted: 26.09.2011



GİRİŞ

Ortodontik bantlar genellikle headgear tütünün bir parçası olarak ya da hızlı üst çene genişletmesi, lingual arklar gibi sabit apareylerin kullanımı amacıyla molar dişlere simante edilir. Ortodontik bantların çevresinde özellikle de servikal marjin bölgesinde görülen ve beyaz nokta lezyonları olarak da bilinen dekalsifikasyonlar, her klinisyen için problem olmanın yanı sıra zayıf oral hijyene sahip hastalar için potansiyel bir risktir. Ortodontik tedavi gören hastalar tükürük ve plaktaki artmış *Streptococcus mutans* seviyeleri yüzünden çürük gelişimi açısından daha fazla risk altındadır (1-3). Bu negatif durum ortodontik tedavi gören hastaların %50'sinde gözlemlenir (4). Çoğu zaman *Streptococcus mutans* düzeylerindeki artış ile dekalsifikasyon 4 haftalık kısa bir sürede meydana gelir (5,6).

Flor günümüze kadar en çok bilinen antikaryojenik ajandır. Florun antikaryojenik etkisinde birçok mekanizma rol oynar. Bunlar içinde; demineralizasyonun inhibisyonu, remineralizasyonun artırılması, plak oluşumunun engellenmesi ve mikrobiyal artışın ve metabolizmanın durdurulması sayılabilir (7,8). Florun bakteriyel metabolizma ve dental plak asiditesini engelleyebilme mekanizması, bakteriyel kolonizasyonun yanı sıra glikolitik enzim enoleazı ve proton salınımı yapan ATPaz'ın inhibisyonunu içerir. Plak oluşumuyla ilgili enzimler olan asit fosfataz, pirofosfataz, peroksidaz ve katalaz enzimleri flor iyonlarından etkilenebilmektedir (9).

Ortodontik bant simantasyonu için flor salınımı yapan cam iyonmer simanların gelişimi, bantların etrafındaki mine dekalsifikasyonunu engellemesi nedeniyle hayli ilgi çekmiştir (10-11). Başlangıç reaksiyonundaki ve kimyasal yapısındaki çeşitlilik yüzünden cam iyonmer simanlar rezin modifiye CIS (RMCIS) ya da modifiye kompozitler şeklinde sınıflandırılmakta ve ortodontik bantların simantasyonunda kullanılmaktadır. RMCIS'lar asit baz reaksiyonu ve ışıkla başlatılan rezinin serbest radikal polimerizasyonu mekanizmasıyla dual olarak sertleşirler (12). Poliasit modifiye kompozit rezinler (PAMKR) ise ışıkla aktive edilen polimerik matrix içine gömülü kısmen ince cam partikülleri içeren kompozit

INTRODUCTION

Orthodontic bands are often cemented to molars as part of a headgear tube or for use with rapid maxillary expansion, lingual arches, or other fixed appliances. Decalcification around bands, especially at the cervical margins, known as white spot lesions, is a problem for every clinician and a potential risk for patients with poor oral hygiene. Patients undergoing orthodontic treatment are at a higher risk for developing caries due to increased levels of *Streptococcus mutans* in plaque and saliva (1-3). This negative treatment sequel has been observed in 50% of the patients undergoing orthodontic treatment (4). With increased levels of *Streptococcus mutans* decalcification can occur in as little as 4 weeks (5,6).

Fluoride is the most anticariogenic agent known to date (6). A variety of mechanisms are involved in the anticariogenic effects of fluoride, including the inhibition of demineralization, the enhancement of remineralization, the prevention of pellicle and plaque formation, and the inhibition of microbial growth and metabolism (7,8). The mechanisms by which fluoride may interfere with bacterial metabolism and dental plaque acidogenicity include the inhibition of the glycolytic enzyme enolase and the proton-extruding ATPase as well as bacterial colonization and competition. Acid phosphatase, pyrophosphatase, peroxidase, and catalase enzymes, which are the plaque-associated enzymes, may be affected by fluoride ions (9).

The development of fluoride-releasing glass-ionomer cements for orthodontic band cementation has attracted considerable interest because they may inhibit the decalcification of enamel around orthodontic bands by offering fluoride delivery to the environment (10-11). Due to variations in chemical composition and setting reaction, glass-ionomer cements have been categorized as resin-modified GICs (RMGICs) or modified composites, and these have been



materyalleridir (13). Ağız ortamına flor salınımla remineralizasyon önemlidir, ancak florun antibakteriyel özelliği çürük oluşumunu engellemede direk olarak etkilidir (14).

Çinko oksit içeren materyaller antimikrobiyel etkilere sahiptir ve travmatik yara ve yanıkların tedavisinde farmasötik merhem ya da krem gibi farklı şekillerde kullanılır. Endodontik sealer ve sabit restoratif simanlar gibi dental materyaller de yine aynı nedenlerle kullanılır (15).

Direk kontakt testi (DKT) çözünemeyen materyallerin antibakteriyel aktivitelerini değerlendirmek için Weiss ve ark (16) tarafından geliştirilmiştir. Bu metot, bakteriyel üreme kinetiğinde test bakterisi ve test edilen materyal arasındaki fiziksel direk kontakt etkisinin ölçümüne dayanır. DKT endodontik sealerların, pit ve fissür örtücülerin ve bazı simanların antibakteriyel özelliklerini belirlemede kullanılmıştır (16-19).

Literatürde yayınlanan çalışmaların birçoğu farklı simanların antibakteriyel özelliklerini incelemektedir (16,18-25). Ortodonti literatüründe ise farklı ortodontik simanların antibakteriyel özellikleri ile ilgili kapsamlı veri mevcut değildir. Bu çalışmanın amacı DKT kullanılarak çeşitli ortodontik simanların antibakteriyel aktivitelerini değerlendirmek ve karşılaştırmaktır.

GEREÇLER ve YÖNTEM

Bu çalışmada kullanılan simanlar Tablo-1 de gösterilmiştir.

Streptococcus mutans (Refik Saydam National Public Health, 676) deney tasarımına göre örneklerle uygulanmadan önce, 37 °C de 48 saat süreyle 0,5 % basitrasın "brain hearth infusion"(BHI) besi yerinde dondurulmuş kültürlerden logaritmik ve erken sabit fazı geciktirmek için aerobik olarak üretilmiştir.

Direkt Kontakt Test (DKT)

Direkt kontakt testi (14), 96 kuyucuklu kültür kabında bakteriyel büyümenin turbidometrik olarak belirlenmesine dayanır (96-well, flat-bottom Nunclon; Nunc, Kopenhag, Danimarka). Her bir kuyucuktaki büyüme kinetiği ısı kontrollü spektrofotometre cihazı kullanılarak 650 nm dalga boyu düzeyinde her 30 dakikada bir

used for cementing orthodontic bands. RMGICs are dual setting: upon mixing the acid-base reaction occurs and the light-initiated free-radical polymerization of resin also occurs. (12) Polyacid-modified composite resins (PAMCR) are composite materials consisting of partially silanized ion-leachable glass embedded in a light-activated polymeric matrix.(13) Remineralization by the release of fluoride is important, but the antibacterial property of fluoride is a direct strategy to eliminate the cause of dental caries (14).

On the other hand, zinc oxide-containing materials have antimicrobial effects and are used in different ways, including pharmaceutical creams or ointments for the treatment of traumatic wounds and burns. Dental materials such as endodontic sealers and fixed restoration cements have been utilized for this same reason (15).

The direct contact test (DCT) was developed by Weiss et al. (16) to evaluate antibacterial activity of non-soluble materials. This method is based on measuring the effect of physical direct contact between the test bacteria and tested material on the kinetics of bacterial growth. The DCT was used to study the antibacterial properties of endodontic sealers, pit and fissure sealants, and some dental cements (16-19).

A number of published studies have investigated the antibacterial properties of different cements in literature (16,18-25). No comprehensive data are available in the orthodontic literature regarding the antibacterial property of different orthodontic cements. The purpose of the present study was to assess and compare the antibacterial activity of various orthodontic cements using DCT.

MATERIALS and METHODS

The cements used in this study are shown in Table 1:

Streptococcus mutans (Refik Saydam National Public Health, 676, Izmit; Turkey) was grown aerobically to late logarithmic or



Marka/Brand	Cins/Type	İçerik/Component	Kimyasal Bileşim/ Chemical Composition	Uretici firma/Manufacturer	Kalite Numarası/ Lot number
Durelon	Polycarboxylate Cement	Powder	Zinc Oxide, Stannous Fluoride, Tin Dioxide Water, Polyacrylic Acid	3M ESPE, Seefeld, Germany	374808 388421
Ketac-Cem Radiopaque	Glass Ionomer Cement	Powder	Glass Powder Polyethylene Polycarbonic Acid Water, Tartaric Acid	3M ESPE, Seefeld, Germany	358196 354977
Fuji Ortho Band LC Paste Pak	Resin modified glass ionomer	Automix Cartridge	Paste A: Fluoro-alumino-silicate glass, Dimethacrylate, Silicon dioxide, Urethanedimethacrylate Paste B: Polyacrylic acid, Distilled water, Silicon dioxide, Polybasic carboxylic acid, Initiator	GC Corporation, Tokyo, Japan	0807281
Merlon	Glass Ionomer Cement	Powder	Mixture of silicate fillers, polyacrylic acid, tartaric acid and initiators Water, Tartaric Acid	VOCO GmbH, Cuxhaven, Germany	0950487 0946388
Ultra Band Lok	Poly acid modified composite resin	Single Paste	Glass Frit (PNOC), Amorphous Silica, Bisphenol A Diglycidymethacrylate, Sodium Fluoride	Reliance Ortho Prod., Itasca, IL, USA	0904670
3m Unitek Multi Cure	Resin modified glass ionomer	Powder Liquid	Silane Treated Glass, Potassium Persulfate Polycarboxylic Acid Copolymer, Water, 2-Hydroxyethyl Methacrylate	3M Unitek, Monrovia, USA	9FT 9JK

Tablo I. Çalışmada kullanılan ortodontik materyaller.

Table I. Orthodontic materials used in this study

devamlı olarak kaydedilir (µquant, Bio-Tek Instruments Inc., Winooski VT, ABD).

early stationary phase from frozen stock cultures in brain heart infusion (BHI) broth containing 0.5% bacitracin for 48 hours at



Çalışmamızda her bir kuyucukta, kültür kabı dik yönde tutularak yan yüzeyler test materyali ile kaplandı (yani kültür kabının yüzeyi yere dik olacak şekilde). Daha sonra test edilen simanlar 2 gram olacak şekilde tartıldı. Düzgün yüzey alanı sağlamak için, ince bir tabaka siman, düz sonlanan küçük bir siman spatülü ile uygulandı. Test örnekleri üretici firmanın önerilerine tamamen uygun olarak karıştırıldı, sertleşmeye bırakıldı veya ışıkla sertleştirildi. Kimyasal olarak sertleşen cam iyonomer siman örnekleri 5 saat süreyle oda sıcaklığında bekletildi. Kuyucukların yan duvarları boyunca ışık geçişini engelleyerek hatalı okumalara sebep olacağı için, materyalin kuyucukların altına akması için son derece dikkatli davranıldı.

10 mL bakteri süspansiyonu her bir örneğe yerleştirildi ve dik konumda 37° C'de bir saat inkübe edildi. 37° C nemli atmosferde bir saat süreyle inkübasyon periyodunun ardından süspansiyon sıvıları buharlaştırılarak, bütün bakteriler ve test materyalinin yüzeyi arasında direk kontak sağlandı. Bundan sonra her bir kuyucuğa 220 mL BHI besi yeri eklendi ve spektrofotometreye yerleştirildi. Bakteri üremesi 16 saat boyunca her 30 dakikada bir, 650 nm düzeyinde optik okuyucu ile otomatik olarak ölçülerek kaydedildi. Test edilen materyal yokluğunda bakteriyel gelişimi inceleyebilmek için benzer aşılama kullanılarak 8 kaplanmamış kuyucuk pozitif bir kontrol gibi işlev gördü. BHI besi yerinden kaynaklanan mikrobiyal büyüme olmadığını göstermek için, negatif kontrol grubu 220 mL BHI besi yeri içeren kuyucuklardan oluşturuldu.

İlave deneyler test materyalleri 1 hafta, 1 ay ve 3 ay yaşlandırılarak yapıldı. Yaşlandırma her 48 saatte bir değiştirilen 250 µL fosfat tamponlu tuz (PBS) ile sağlandı.

İstatistiksel Analiz

Her bir kuyucuk için bakteriyel büyüme eğrileri analiz edildi ve lineer regresyonu $y=ax+b$ denklemi kullanılarak hesaplandı. Bu denklem, ilgili büyüme hızıyla ilişkili eğim değerini sağladı. Veriler tek yönlü ANOVA testi ve Tamhane'in T2 çoklu karşılaştırma testi ile incelendi. İstatistiksel önem seviyesi $P<0.05$ olarak belirlendi.

BULGULAR

37°C before applying it to the specimens according to the experimental design.

Direct Contact Test (DCT)

The direct contact test (14) is based on the turbidometric determination of bacterial growth in 96-well microtiter plates (96-well, flat-bottom Nunclon; Nunc, Copenhagen, Denmark). The kinetics of the outgrowth in each well was recorded continuously at 650 nm every 30 minutes, using a temperature-controlled spectrophotometer (µquant, Bio-Tek Instruments Inc., Winooski VT, USA). In all wells, the sidewall was coated evenly measured amount of tested material while the plate was held vertically (i.e., the plate's surface was perpendicular to the floor). Tested cements weight on the assay balance, 2 grams. A thin coat of cement was applied with a small, flat-ended dental spatula to ensure a uniform surface area. The test samples were mixed, and allowed to set, or they were light polymerized in strict compliance with the manufacturer's recommendations. The chemically cure glass ionomer cements specimens were set at room temperature for 5 hours. Special care was taken to prevent the material flowing to the bottom of the well, which would have interfere with the light path through the microplate well and result in false readings. A 10µL(106 CFU) bacterial suspension was placed on each sample and incubated while the plate remained in a vertical position for one hour at 37°C. After incubation for 1 hour in a humid atmosphere at 37°C, evaporation of the suspension's liquid was evident and ensured direct contact between bacteria and the tested material surfaces. Then, 220 µL of BHI broth was added to each of the wells and the plate was placed in a spectrophotometer. The bacterial growth was estimated after direct contact with the tested material on the basis of the changes in the readings of optical density at 650 nm, which were recorded by the spectrophotometer every 30 minutes for 16 hours. Eight uncoated wells, using identical inocula size, served as a positive



Yeni hazırlanmış ve yaşlandırılmış simanların DKT sonuçları Şekil 1-4'de gösterilmiştir. Büyüme eğrisinde her nokta Şekil 1-4'de verilen herhangi bir zamanda 8 kuyucukta ölçülen optik yoğunluğun ortalamasıdır. Her eğri 16 saat içinde alınan 32 ölçümü içerir. Hiç bir periyotta negatif kontrol grubunda önemli bir mikrobiyal gelişim gözlenmemiştir (P= 0.02; yeni örnek, 0.000; 1 hafta,0.002; 1 ay, 0.000; 3 ay).

Yedi grup arasında yeni hazırlanan örneklerde önemli farklılıklar bulundu (P=0.000, F=27.576). 3M Multi Cure (P=0.02), GC Fuji Ortho (P=0.04), Meron (P=0.001) ve Durelon'un (P=0.001) yeni hazırlanmış örnekleri antibakteriyel etkinlik gösterdi. Ketac-Cem ve Ultra Band Lok uygulanan grupta ise Streptococcus mutans üreme hızında logaritmik artış gözlemiştir (Şekil 1).

Bir hafta bekletilmiş örnekler arasında da istatistiksel olarak önemli farklılıklar bulundu (P=0.000, F=16.663). Meron, GC Fuji Ortho, Ketac-Cem ve Ultra Band Lok uygulanan gruplarda, pozitif kontrolden bir farklılık tespit edilememesine rağmen, 3M Multi Cure (P=0.000) ve Durelon'un (P=0.03) 1 haftalık yaşlandırma sonrasında bile antibakteriyel etkisinin devam etmekte olduğu gözlenmiştir (Şekil 2).

Bir ay bekletilmiş örneklerle yapılan deneylerde, yalnızca Durelon (P=0.001) antibakteriyel etki göstermiştir. Diğer materyaller pozitif kontrole benzer olarak antibakteriyel etkinlik göstermemiştir (Şekil 3). 3 ay bekletilmiş örneklerde ise 3M Multi Cure (P=0.000), GC Fuji Ortho (P=0.001) ve

control (bacteria with medium) so that bacterial outgrowth could be monitored in the absence of the tested material. To show no microbial growth was derived from BHI broth, the negative control group consisted of a set of wells containing 220 µL of BHI broth.

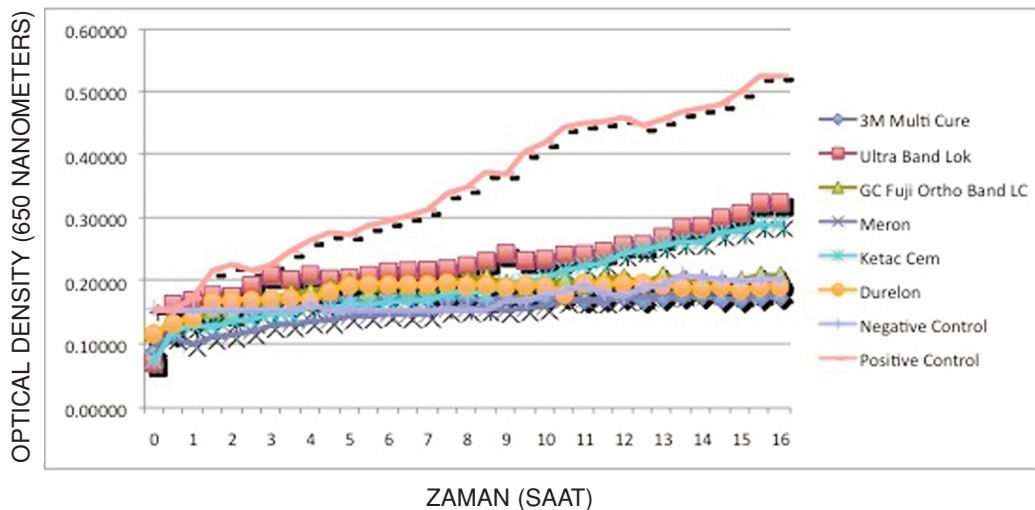
Additional experiments were performed in which the tested materials were aged for 1 week, 1 month and 3 month. Aging was performed with 250 µL of phosphate-buffered saline (PBS), which was replaced every 48 hours.

Statistical Analyses

Bacterial growth curves for each well were analyzed and a regression line on the ascending linear portion of the curve was calculated, using the equation $y = ax + b$. This equation provided the value of the slope corresponding to the growth rate. The data were analyzed by one-way ANOVA, and Tamhane's T2 multiple comparison test. The level of significance was determined as $P < 0.05$.

RESULTS

The results of the DCT for freshly mixed and aged cements are shown in Figure 1 through 4. Each point on the growth curve is the average of the optic density measured in eight wells at any given time in Figure 1-4. Each curve includes 32 measurements taken within 16 hours. There is no microbial growth were observed in the negative control



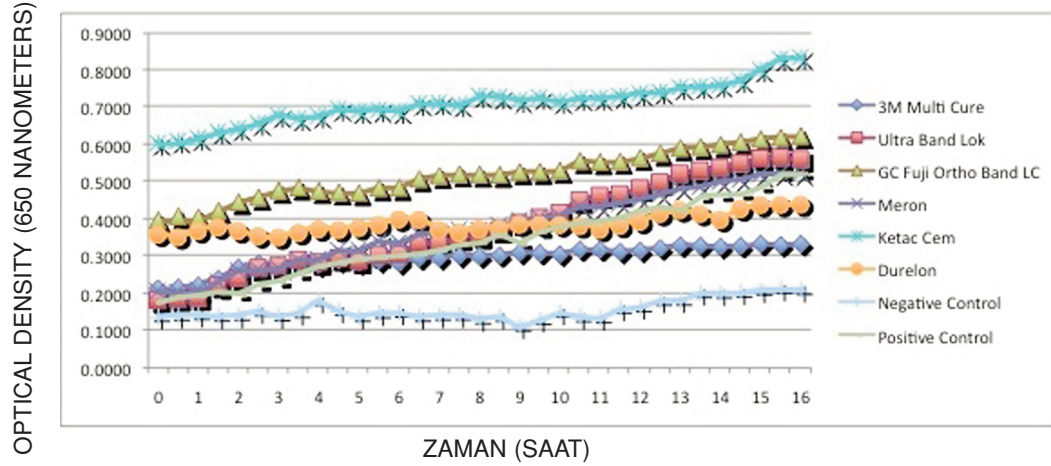
Şekil 1. Yeni hazırlanmış materyal ile direkt kontakt sonrası bakteriyel üreme.

Figure 1. Bacterial growth after direct contact with fresh material.



Şekil 2. 1 hafta yaşlandırılmış materyal ile direk kontakt sonrası bakteriyel üreme.

Figure 2. Bacterial growth after direct contact with 1 week aged material.



Durelon ($P=0.001$) antibakteriyel özellik göstermiştir (Şekil 4).

TARTIŞMA

Ortodontik tedavi gören hastalar, tedavide kullanılan apareylerden dolayı diş temizliklerini sağlamada güçlük çekerler. Ortodontik bantların etrafında, özellikle de servikal marjinlerde görülen mine dekalsifikasyonu, ortodontik tedavi sırasında sık karşılaşılan komplikasyonlardandır (26,27). Artmış plak oluşumu ve eşlik eden bakteriyel asit üretimi mine demineralizasyonuna neden olabilmektedir (28). Sabit apareylerle tedavi edilen hastalarda, Streptococcus mutansın tükürük ve plak seviyelerinde belirgin bir artış gösterdiği belirtilmiştir (2). Çalışmamızda deney mikroorganizması olarak çürüğün birincil etiyolojik etkeni ve çürük lezyonlarından sıklıkla izole edilen Streptococcus mutans kullanılmıştır. Streptococcus mutans, diş hekimliğinde

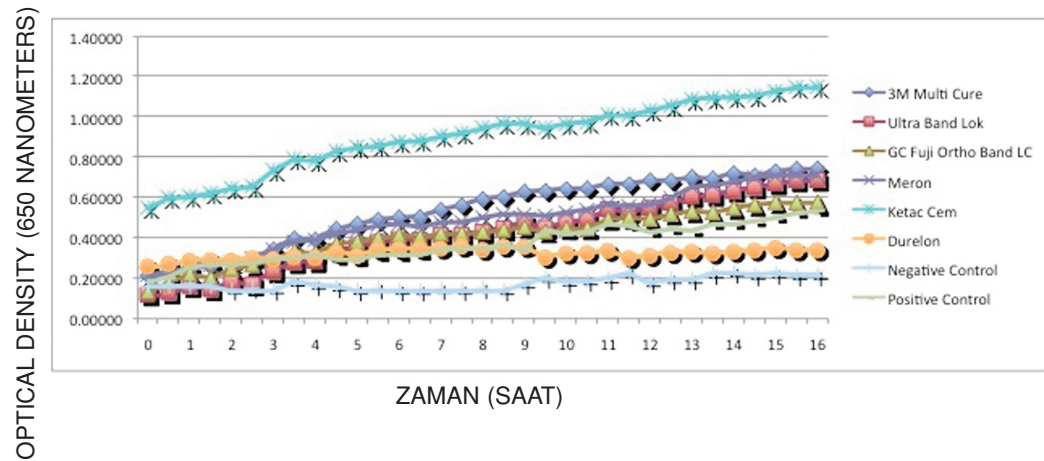
group in all periods ($P=0.02$; fresh sample, 0.000; 1 week, 0.002; 1 month, 0.000; 3 month).

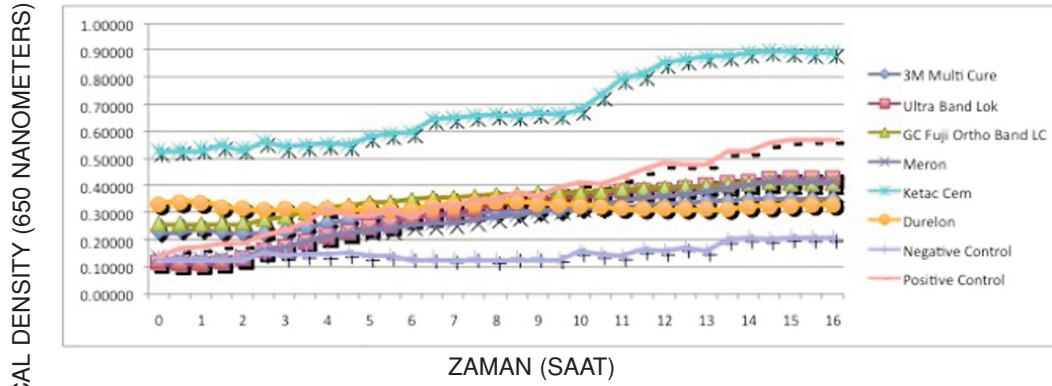
There are significant differences found in freshly mixed samples between seven groups ($P=0.000$, $F=27.576$). Freshly mixed samples of 3M Multi Cure ($P=0.02$), GC Fuji Ortho ($P=0.04$), Meron ($P=0.001$), and Durelon ($P=0.001$) showed antibacterial activity. Ketac-Cem, and Ultra Band Lok showed an increase in the logarithmic growth rate of Streptococcus mutans (Fig. 1).

Significant differences were found in one week aging specimen ($P=0.000$, $F=16.663$). After aging for one week 3M Multi Cure ($P=0.000$), Durelon ($P=0.03$) still showed antibacterial activity although the Meron, GC Fuji Ortho, Ketac-Cem, and Ultra Band Lok did not differ from positive control (Fig. 2). In the experiments with 1 month aged specimens, only Durelon ($P=0.001$) showed

Şekil 3. 1 ay yaşlandırılmış materyal ile direk kontakt sonrası bakteriyel üreme.

Figure 3. Bacterial growth after direct contact with 1 month aged material.





Şekil 4. 3 ay yaşlandırılmış materyal ile direk kontakt sonrası bakteriyel üreme.

Figure 4. Bacterial growth after direct contact with 3 month aged material.

restoratif materyallerin antimikrobiyal etkilerini test etmede yaygın şekilde kullanılmaktadır (20-22,29). Streptococcus mutans üremesi, bu araştırmada DKT kullanılarak değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmalarda, dental materyallerin antimikrobiyal etkinliği hem agar difüzyon test (ADT) hem de DKT kullanılarak incelenmiştir (16-18,25). DKT, dental materyallerin antibakteriyel etkisini belirlemede ADT'den daha etkili bulunmuştur (18). Isı kontrollü spektrofotometre ve uygun yazılım ile DKT, büyüme eğrilerine uygun olarak direk kontakt inkübasyon periyodu sonunda yaşayabilen bakterilerin sayısının belirlenmesini sağlar.

Geleneksel cam iyonomer simanlar başlangıçta oldukça asidiktir (pH 1,6 – 3,7). Simanlar tamamen sertleştiklerinde pH'ları 5,4 ve 7,3 arasındadır. Bakteriler üzerinde oluşabilecek olası yan etkilerden kaçınmak için simanların tam olarak sertleşmesi amacı ile bakteri süspansiyonu simanlar üzerine ortalama 5 saat sonra uygulanmıştır.

Çalışmamız geleneksel CIS (Meron), RMCIS (GC Fuji, 3M Multi Cure) ve polikarboksilat simanın (Durelon) yeni karıştırılmış örneklerde antibakteriyel özellikte olduğunu göstermektedir. Dahl (30), polikarboksilat ve çinkofosfat simanın kısa dönemde antibakteriyel etkisi üzerinde çalışmış ve ADT'de polikarboksilat simanın in vivo şartlarda Streptococcus mutans'a karşı en güçlü antibakteriyel özellik gösterdiğini bulmuştur. Spencer ve ark (15), çinko oksitin ortodontik bonding materyaline ilavesiyle oluşan antimikrobiyal özelliklerini karşılaştırmıştır. Çalışmanın sonuçları

antibakteriyel aktivite. The other materials showed no antibacterial activity and were similar to the positive control (Fig. 3). In the 3 months aged specimens, 3M Multi Cure (P=0.000), GC Fuji Ortho (P=0.001), and Durelon (P=0.001) showed antibacterial property (Fig. 4).

DISCUSSION

Patients generally have difficulty maintaining adequate oral hygiene with orthodontic appliances. Decalcification of the enamel surface around orthodontic bands, especially at the cervical margins, is a common adverse effect of orthodontic treatment (26,27). Increased biofilm formation and concomitant bacterial acid production results in enamel demineralization adjacent to orthodontic attachments (28). There is a significant increase in the salivary and plaque levels of Streptococcus mutans in patients undergoing fixed appliance treatment (2). Streptococcus mutans, the primary etiologic agent of caries and a frequent caries-lesion isolate, was used as the test microorganism. Streptococcus mutans has been used widely for testing the antimicrobial activity of restorative materials (20-22,29).

Streptococcus mutans growth was evaluated using the DCT in this study. The antibacterial activity of dental materials has been intensively tested using both the agar diffusion test (ADT) and the DCT (16,18-25).



bonding materyaline çinko oksit ilavesinin, materyalin antimikrobiyal etkinliğini artırdığını göstermiştir. Osinaga ve ark (31), cam iyonomer simana çinko sülfat ilave edildiğinde, *Streptococcus mutans* üzerinde olan etkilerini incelemişler ve çinko ilavesinin mikroorganizmaların büyümesini azalttığını bulmuşlardır. ADT kullanılarak bazı cam iyonomer simanların, dentin bonding sistemlerin ve luting ajanların antibakteriyel etkinliği araştırılmış; amalgam, kompozitler, luting ajanlar ve bonding sistemlerin bakteriyel üremeyi etkilemediği, cam iyonomer simanlarda ise belirgin antibakteriyel etkinliğin olduğu bulunmuştur (32). Da Silva ve ark. (33), in vitro şartlarda 4 cam iyonomer simanın (Fuji IX, Ketac Molar, Vidrion R, and Vitromolar) antibakteriyel etkisini incelemiştir. Çalışmanın sonuçları, tüm cam iyonomer simanların antibakteriyel etkinlik göstermesine rağmen, Fuji IX and Ketac Molar'ın en iyi antibakteriyel etkiyi sahip olduğunu göstermiştir. Cam iyonomer simanlar diş minesine kimyasal adezyon göstermekte ve flor iyonları açığa çıkarmaktadır. Florun, materyallerin antibakteriyel etki göstermesinde en önemli faktör olduğu düşünülmektedir (34). Çinko oksit içeren materyaller antibakteriyel etkilere sahiptir (35). Çinko 0,5 ppm'den düşük konsantrasyonlarda mikroplara toksik etkisi olan enzimlerin aktivatörü gibi iş görür (36).

Kuvvetli ve ark. (37), PAMKR (Ultra BandLok), RMGIC (Multicure) ve geleneksel cam iyonomer siman (Meron)'dan açığa çıkan flor düzeylerini karşılaştırmış ve Ultra Band-Lok'ın, Multicure ve Merondan büyük ölçüde daha az flor açığa çıkardığını bulmuştur. 28 gün gözlem periodu sonunda RMCIS, PAMKR'den %75 daha fazla birikmiş flor açığa çıkarmıştır. Çalışmamızda da poliasit modifiye simanın *Streptococcus mutans* üzerinde antibakteriyel etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Düşük flor salınımı bu duruma sebep olabilir.

Lewinstein ve ark. (18), DCT kullanarak Durelon, Ketac-Cem ve Harvard simanın antibakteriyel özelliklerini değerlendirdikleri çalışmalarında, Ketac-Cem antibakteriyel özellik göstermezken, Durelon ve Harvard simanın antibakteriyel etkinlik gösterdiğini belirtmişlerdir. Çalışmamızda, Lewinstein ve

The DCT was found to be more effective in detecting the antibacterial properties of dental materials than the ADT (18). With a temperature-controlled spectrophotometer and the appropriate software, the DCT allows the evaluation of the number of viable bacteria at the end of the direct contact incubation period in accordance with the calibration growth curves.

Conventional glass ionomer cements are very acidic in initial (pH 1.6-3.7). Completely set cements reveal a pH between 5.4 and 7.3. To avoid possible side effect on bacteria, bacterial suspension applied on the GICs after 5 hours later.

Our study showed that conventional GICs (Meron), RMGICs (GC Fuji, 3M Multi Cure), and polycarboxylate cement (Durelon) showed antibacterial properties in freshly mixed samples. Dahl (30) studied the short-acting antibacterial effect of polycarboxylate cement and zinc phosphate cement and found that, in the ADT, polycarboxylate cement exhibited the strongest antibacterial properties against *Streptococcus mutans* in vivo. Spencer et al. (15) compared the antimicrobial properties of zinc oxide when incorporated into an orthodontic bonding material. The results of the study showed that the incorporation of zinc oxide into bonding materials increased antimicrobial activity. Osinaga et al. (31) evaluated the growth inhibition effects of zinc sulfate added to glass ionomer cement on *Streptococcus mutans* and found that the addition of zinc decreased microorganism growth. The antibacterial activity of several glass ionomer cements, dentin bonding systems, and luting agents were investigated using the ADT, and marked antibacterial activity was found with the glass ionomer cement, while amalgam, composites, luting agents, and bonding systems did not affect bacterial growth (32). Da Silva et al. (33) assessed the in vitro antibacterial activity of four glass ionomer cements (Fuji IX, Ketac Molar, Vidrion R, and Vitromolar). The results of the study showed



ark. sonuçlarına benzer olarak Ketac-Cem cam iyonomer siman, antibakteriyel etki göstermemiştir. Meron ve Ketac-Cem her ikisi de geleneksel cam iyonomer siman olmasına rağmen, *Streptococcus mutans* üzerinde farklı etkileri gözlenmiştir. Bu farklılık, test edilen materyallerin kimyasal yapısından ortaya çıkmış olabileceği düşünülmektedir.

Geleneksel cam iyonomer simanlar çalışmamızın başlangıç safhasında antibakteriyel özellik göstermesine rağmen, bekletilmiş örneklerde benzer aktivite gözlenmemiştir. Bununla birlikte, çalışmamızda polikarboksilat ve RMCIS'ların yaşlandırılmış örneklerinin hala antibakteriyel özellik gösterdiği tespit edilmiştir. Dos Santos ve ark (39), simanların maksimum flor salınımını başlangıçtan sonraki ilk 24 saat içinde gerçekleştirdiğini göstermişlerdir. Ayrıca CIS ve RMGIC'lardan 1, 3, 10 ve 20. günlerde tükürüğe salınan flor miktarı karşılaştırıldığında yalnızca ilk gün CIS'dan daha fazla flor salındığı gösterilmiştir (40).

Ortodontik materyallerin antibakteriyel özellikleri ortodonti literatüründe yalnızca bir çalışmada değerlendirilmiştir. Metalon ve ark. (19) DKT kullanarak, geleneksel cam iyonomer siman (CX-Plus), rezin ile güçlendirilmiş cam iyonomer siman (GC Fuji Ortho LC), kompozit rezin (Transbond XT) ve flor salımlı kompozit rezinin (Transbond Plus) antibakteriyel özelliklerini değerlendirmiştir. GC Fuji Ortho LC ve Transbond Plus polimerizasyondan sonraki 16 saat içinde antibakteriyel özellik göstermiştir. Test edilen materyallerden hiçbiri bekletildikten sonraki 1 ay içerisinde antibakteriyel özelliğini sürdürememiştir.

Flor salınımı yapan materyaller flor rezervuarı gibi rol oynayıp plak ve tükürükteki flor düzeyini artırıyor olmasına rağmen, (27,41) zamanla ortodontik materyallerden salınan flor oranını karşılaştıran çalışmalar, ortalama flor salınımının zamanla azaldığını göstermektedir. Çalışmamızın sonuçları GC Fuji Ortho ve 3M Multi Cure'un 1 ay bekletilen örneklerde antibakteriyel özellik göstermemesine rağmen, yaşlandırmanın 3. ayından sonra tekrar antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Mcneill ve ark (27) ile Cacciafesta ve ark (41), GC Fuji Ortho

that, although all glass ionomer cements demonstrated antibacterial activity, Fuji IX and Ketac Molar showed the best antibacterial activity. Glass ionomer cements exhibited chemical adhesion to tooth enamel and the release of fluoride ions. Fluoride is considered to be an important factor in the anti-bacterial property of these materials (34). Materials containing zinc oxide have antibacterial effects (35). Zinc serves as an activator of enzymes that can be toxic to microbes at concentrations as low as 0.5 ppm (36).

Kuvvetli et al. (37) compared the fluoride levels released from a PAMCR (Ultra BandLok), a RMGIC (Multicure), and a conventional GIC (Meron) and found that Ultra Band-Lok released significantly less fluoride than Multicure and Meron. RMGIC released 75% more accumulated fluoride than PAMCR over the 28-day observation period. (38) Poly acid modified cement showed no antibacterial effects on *Streptococcus mutans* in the present study. Its low fluoride release rate might cause this situation.

Lewinstein et al. (18) evaluated the antibacterial properties of Durelon, Ketac-Cem, and Harvard cement using the DCT. The authors found that Durelon and Harvard cement had antibacterial effects, while Ketac-Cem exhibited no antibacterial properties. Ketac-Cem glass ionomer cements showed no antimicrobial effects in our study, similarly to Lewinstein et al. Although Meron and Ketac-Cem were conventional GICs, different effects were observed on *Streptococcus mutans*. This difference may arise from chemical compositions of the tested material. Although conventional GICs showed antibacterial activity in the initial part of the study, such activity was not observed in the aging specimens. However, Polycarboxylate and RMGIC cements showed antibacterial properties after aging in the present study. Dos Santos et al. (39) showed that, In the initial 24 h period, fluoride released from





ve 3M Multi Cure'den salınan flor oranının 1 ila 30 gün arasında azaldığını, fakat 1 den 3 aya kadar tekrar arttığını gözlemlemiştir.

McNeill ve ark. (27) ile Cacciafesta ve ark. (41) zamanla salınan flor oranındaki artışın difüzyonun kinetiği ile açıklanabileceği sonucuna varmışlardır. Başlangıç testi sırasında, en dıştaki flor iyonları ilk olarak solüsyon içine difüze olduğundan, diskin merkezinden kenarlarına doğru difüzyon eğilimi vardır. Düzenli test periyotları esnasında solüsyona salınan flor miktarının azalmasıyla, zamanla disk içinde flor difüzyonu stabil olur. Belli bir süre sonra solüsyonu değişince, daha yüksek flor konsantrasyonu yeniden disk çevresinde görülebilir. Ve bir sonraki test periyodunda flor salınım hızını artırabileceğini belirtmişlerdir.

SONUÇLAR

- 3M Multi Cure, GC Fuji Ortho, Meron ve Durelon'ın yeni hazırlanan örnekleri antibakteriyel etki göstermiştir.
- 7. gün sonunda, 3M Multi Cure ve Durelon antibakteriyel etkinlik göstermiştir.
- 1 ay bekletilmiş örneklerle yapılan deneylerde, yalnızca Durelon antibakteriyel etkinlik göstermiştir.
- 3 ay süreyle bekletildikten sonra, 3M Multi Cure, GC Fuji Ortho ve Durelon antibakteriyel etkinlik göstermiştir.

Bu çalışmanın sınırları içinde; RMCIS ve polikarboksilat siman Streptococcus mutans'lara karşı daha çok antibakteriyel etkinlik göstermiştir. RMCIS ve polikarboksilat simanlar çürük açısından yüksek risk grubundaki ortodonti hastalarına tavsiye edilmektedir.

TEŞEKKÜR

3M Unitek, 3M ESPE, Reliance, Dentsply, VOCO ve GC Fuji'ye bu çalışmada kullanılan adezivleri sağladıkları için teşekkür ederiz.

ionomer cements was higher than that of the first hour, indicating that these cements achieved maximum fluoride release within 24 h after the initial setting. Furthermore, the amount of fluoride released in saliva on day 1 compared to that of days 3, 10, and 20 within the GICs and RMGICs showed that the GICs released more fluoride in first day compared to RMGICs. (40)

The antibacterial properties of orthodontic materials were evaluated by only one study in the orthodontic literature. Metalon et al. (19) evaluated the antibacterial properties of conventional glass ionomer cement (CX-Plus), resin forced glass ionomer cement (GC Fuji Ortho LC), composite resin (Transbond XT), and fluoride-releasing composite resin (Transbond Plus) using the DCT. The authors found that GC Fuji Ortho LC and Transbond Plus showed antibacterial properties in the 16 hours immediately after polymerization. The authors showed that none of the tested materials maintained their antibacterial property after aging for 1 month. Though fluoride-releasing materials may act as a fluoride reservoir and increase the fluoride level in saliva and plaque, studies (27,41) comparing the rates of fluoride release from orthodontic materials over time have shown that the mean fluoride release rate declined with time. Although GC Fuji Ortho and 3M Multi Cure did not show antibacterial property in 1-month aged specimens, our results indicated that these materials showed antibacterial activity after 3 months of aging. McNeill et al. (27) and Cacciafesta et al. (41) observed that the fluoride release rate from GC Fuji Ortho and 3M Multi Cure decreased between 1 and 30 days, but it increased again at 1 to 3 months. McNeill et al. (27) and Cacciafesta et al. (41) concluded that a possible explanation for this increase in the rate of fluoride release with time involves the kinetics of diffusion. Early during the initial test, there was a diffusion gradient from the center of the disc sample toward the edges because the outermost fluoride ions diffuse into the solution first.



With time, the fluoride diffusion within the disc stabilizes, exposing gradually decreasing amounts of fluoride to solution during regular testing periods. After a lapse in changing the solution, a higher concentration of F would again be present at the periphery of the disc. The increased concentration would then increase the rate of fluoride release at the start of the next test period.

CONCLUSIONS

- Freshly mixed samples of 3M Multi Cure, GC Fuji Ortho, Meron, and Durelon showed antibacterial activity.
- At the end of the seven days, 3M Multi Cure, Durelon showed antibacterial activity.
- In the experiments with 1 month aged specimens, only Durelon showed antibacterial activity.
- After aging for 3 months, 3M Multi Cure, GC Fuji Ortho, and Durelon showed antibacterial property.

Within the limitations of the study RMGICs and polycarboxylate cement showed more efficiency on Streptococcus mutans. RMGIC and polycarboxylate cements are recommended for orthodontic patients who are at high risk of caries.

ACKNOWLEDGMENT

We thank 3M Unitek, 3M ESPE, Reliance, Dentsply, VOCO, and GC Fuji for providing the adhesives tested in this study.



KAYNAKLAR/REFERENCES

1. Wenderoth CJ, Weinstein M, Borislow AJ. Effectiveness of a fluoride-releasing sealant in reducing decalcification during orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1999;116:629-34.
2. Al-Musallam TA, Evans CA, Drummond JL, Matasa C, Wu CD. Antimicrobial properties of an orthodontic adhesive combined with cetylpyridinium chloride. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006;129:245-51.
3. Kocak MM, Ozcan S, Kocak S, Topuz O, Erten H. Comparison of the efficacy of three different mouthrinse solutions in decreasing the level of streptococcus mutans in saliva. *Eur J Dent* 2009;3:57-61.
4. Jorelick L, Geiger AM, Gwinnett AJ. Incidence of white spot formation after banding and bonding. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1982;81:93-8.
5. Ogaard B, Rølla G, Arends J. Orthodontic appliances and enamel demineralization. Part 1: lesion development. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1988;94:68-73.
6. O'Reilly M, Featherstone J. Demineralization and remineralization around orthodontic appliances: an in vivo study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1987;92:33-40.
7. Hamilton IR, Bowden GHW. Fluoride effects on oral bacteria. In: Fejerskov O, Ekstrand J, Burt BA, editors. *Fluoride in dentistry*. Copenhagen: Munksgaard; 1996. p.230-51.
8. Wiegand A, Buchalla W, Attin T. Review on fluoride-releasing restorative materials--fluoride release and uptake characteristics, antibacterial activity and influence on caries formation. *Dent Mater* 2007;23:343-62.
9. Hamilton IR. Biochemical effects of fluoride on oral bacteria. *J Dent Res* 1990;69:660-7.
10. Mitchell L. An investigation into the effects of fluoride-releasing adhesive on the prevalence of enamel surface changes associated with directly bonded orthodontic attachments. *Br J Orthod* 1992;19:207-14.
11. Turner PJ. Clinical evaluation of a fluoride-containing orthodontic material. *Br J Orthod* 1992;201:307-13.
12. Rejman DJ, Eliades T, Bradley TG, Eliades G. Polymerization efficiency of glass-ionomer and resin adhesives under molar bands. *Angle Orthod*. 2008;78:549-52.
13. Meyer JM, Cattani-Lorente MA, Dupuis V. Compomers: between glass-ionomer cements and composites. *Biomaterials*. 1998;19:529-39.
14. Imazato S. Antibacterial properties of resin composites and dentin bonding systems. *Dent Mater* 2003. 19:449-57.
15. Spencer CG, Campbell PM, Buschang PH, Cai J, Honeyman AL. Antimicrobial effects of zinc oxide in an orthodontic bonding agent. *Angle Orthod* 2008;79:317-22.
16. Weiss EI, Shalhav M, Fuss Z. Assessment of antibacterial activity of endodontic sealers by a direct contact test. *Endod Dent Traumatol* 1996;12:179-84.
17. Matalon S, Slutzky H, Mazor Y, Weiss EI. Surface antibacterial properties of fissure sealants. *Pediatr Dent* 2003;25:43-8.
18. Lewinstein I, Matalon S, Slutzkey S, Weiss EI. Antibacterial properties of aged dental cements evaluated by direct-contact and agar diffusion tests. *J Prosthet Dent* 2005;93:364-71.
19. Matalon S, Slutzky H, Weiss EI. Antibacterial properties of 4 orthodontic cements. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2005;127:56-63.
20. Herrera M, Carrion P, Baca P, Liebana J, Castillo A. In vitro antibacterial activity of glass-ionomer cements. *Microbios* 2001;104:141-8.
21. Eli I, Cooper Y, Ben-Amar A, Weiss E. Antibacterial activity of three dental liners. *J Prosthodont* 1995;4:178-82.
22. Tobias RS. Antibacterial properties of dental restorative materials: a review. *Int Endod J* 1988;21:155-60.
23. Duran I, Sengun A, Hadimli HH, Ulker M. Evaluation of Antibacterial Effectiveness of Desensitizers against Oral Bacteria. *Eur J Dent* 2008;2:43-7.
24. Meryon SD, Johnson SG. The modified model cavity method for assessing antibacterial properties of dental restorative materials. *J Dent Res* 1989; 68:835-9.
25. Herrera M, Castillo A, Bravo M, Liebana J, Carrion P. Antibacterial activity of resin adhesives, glass ionomer, and resin-modified glass ionomer cements and a compomer in contact with dentin caries samples. *Oper Dent* 2000;25:265-9.
26. Geiger AM, Gorelick L, Gwinnett AJ, Griswold PG. The effect of a fluoride program on white spot formation during orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1988;93:29-37.
27. McNeill CJ, Wiltshire WA, Dawes C, Lavelle CL. Fluoride release from new light-cured orthodontic bonding agents *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2001;120:392-7
28. Benson PE, Parkin N, Millett DT, Dyer FE, Vine S, Shah A. Fluorides for the prevention of white spots on teeth during fixed brace treatment. *Cochrane Database Syst Rev* 2004;(3): CD003809.
29. Herrera M, Castillo A, Baca P, Carrion P. Antibacterial activity of glass-ionomer restorative cements exposed to cavity-producing microorganisms. *Oper Dent* 1999;24:286-91.
30. Dahl BL. Antibacterial effect of two luting cements on prepared dentin in vitro and in vivo. *Acta Odontol Scand* 1978;36:363-9.



31. Osinaga PW, Grande RH, Ballester RY, Simionato MR, Delgado Rodrigues CR, Muench A. Zinc sulfate addition to glass-ionomer-based cements: influence on physical and antibacterial properties, zinc and fluoride release. *Dent Mater* 2003;19:212-7.
32. Prati C, Fava F, Di Gioia D, Selighini M, Pashley DH. Antibacterial effectiveness of dentin bonding systems. *Dent Mater* 1993;9:338-43
33. da Silva RC, Zuanon AC, Spolidorio DM, Campos JA. Antibacterial activity of four glass ionomer cements used in atraumatic restorative treatment. *J Mater Sci Mater Med* 2007;18:1859-62.
34. Eminkahyagil N, Korkmaz Y, Gokalp S, Baseren M. Shear bond strength of orthodontic brackets with newly developed antibacterial self-etch adhesive. *Angle Orthod* 2005;75:843-8.
35. Lookingbill DP, Miller SH, Knowles RC. Bacteriology of chronic leg ulcers. *Arch Dermatol* 1978;114:1765-8.
36. Bates D, Navia J. Chemotherapeutic effect of zinc on *Streptococcus mutans* and rat dental caries. *Arch Oral Biol* 1979; 24:799-805.
37. Kuvvetli SS, Tuna EB, Cildir SK, Sandalli N, Gençay K Evaluation of the fluoride release from orthodontic band cements. *Am J Dent*. 2006;19:275-8.
38. Rix D, Foley TF, Banting D, Mamandras A. A comparison of fluoride release by resin-modified GIC and polyacid-modified composite resin. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2001;120:398-405.
39. Dos Santos RL; Pithon MM, Vaitsman DS, Araujo MT; de Souza MM, NojimaMG. Long term Fluoride release from resin-reinforced orthodontic cements following recharge with fluoride solution. *Braz Dent J*. 2010;21:98-103.
40. Endang Suprastiwi, Anggraeni, dan Dewa Ayu Npa Analysis of fluoride released from gic and rmgic in saliva and dentino-enamel substance *Seri Kesehatan* 2009;13;53-8.
41. Cacciafesta V, Sfondrini MF, Tagliani P, Klersy C. In-vitro fluoride release rates from 9 orthodontic bonding adhesives. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2007;132:656-62.

