

Biofuncionalização e Aumento da Atividade Anticariogênica em um Sistema Adesivo para Uso Ortodôntico

Alexandre Ehrhardt ¹, Letícia Carolina da Cruz ¹, Régis Adriel Zanette ^{1,*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil.

* Correspondência: regnitro@yahoo.com.br.

Resumo: O tratamento ortodôntico pode ser um fator predisponente para o desenvolvimento de placa dentária formada por biofilme multiespécies, causando assim lesões de mancha branca e, conseqüentemente, cáries. O desenvolvimento de novos biomateriais pode ajudar a minimizar essa condição. Este estudo teve como objetivo avaliar a capacidade inibitória da formação de biofilme por meio da modificação de um sistema adesivo ortodôntico (SA) com a inserção de compostos com atividade antimicrobiana. Cloreto de cetilpiridínio (CPC), sal de imidazol (IMS), clorexidina (CHG), triclosano ou cloramina T foram incorporados ao SA Transbond® XT. Os SAs foram testados ex vivo para verificar a proteção contra *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* em corpos de prova estruturados a partir de dentes bovinos e bráquetes metálicos. Os SAs modificados com CPC, IMS ou CHG apresentaram atividade antibiofilme satisfatória. Os SAs modificados não demonstraram efeito irritante no teste da membrana corioalantóide, e os testes de resistência ao cisalhamento e de microdureza não mostraram diferença significativa entre o SA na composição original e os SAs modificados. A adição de CPC, IMS ou CHG à formulação do SA ortodôntico mostra-se promissora na prevenção da formação de biofilme, mantendo a força de adesão e sem causar danos teciduais, sugerindo potencial aplicabilidade na odontologia.

Citação: Ehrhardt A, Cruz LC, Zanette RA. Aplicação de Ozônio e Fotobiomodulação no Tratamento de Complicações Cirúrgicas: Relato de Caso. Brazilian Journal of Dentistry and Oral Radiology. 2025 Jan-Dec;4:bjd63.

doi: <https://doi.org/10.52600/2965-8837.bjdor.2025.4.bjd63>

Recebido: 23 Junho 2025

Aceito: 26 Julho 2025

Publicado: 30 Julho 2025

Palavras-chave: Agentes anti-infecciosos; Materiais biocompatíveis; Biofilmes; *Candida*; *Streptococcus*.

1. Introdução

A microbiota da cavidade oral é caracterizada por uma grande diversidade de microrganismos em estado de simbiose. No entanto, diversos fatores podem causar um desequilíbrio nessa condição. A principal doença relacionada a esse desequilíbrio é a cárie dentária, de natureza multifatorial, resultante da formação da placa bacteriana, originada de um biofilme multiespécies. Esse biofilme surge a partir da interação dinâmica entre microrganismos e componentes da dieta, formando estruturas complexas de alta eficiência metabólica e um sofisticado sistema de quorum sensing. Destaca-se a interação entre *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* na cavidade oral, que favorece mutuamente sua colonização e presença em biofilmes e placas [1, 2, 3]. O uso de aparelhos ortodônticos também pode ser um fator de colonização por esses dois patógenos, devido à dificuldade de higienização do dispositivo.

Têm sido realizados esforços para reduzir os fatores que favorecem o desenvolvimento de cáries associadas ao tratamento ortodôntico por meio da incorporação de compostos com efeitos anticariogênicos em sistemas adesivos (ASs). Esses compostos incluem o cloreto de cetilpiridínio (CPC), um composto de amônio quaternário que afeta o equilíbrio elétrico da membrana; sais de imidazol (IMS), que apresentam atividade antimicrobiana e antifúngica por meio da alteração da permeabilidade



Direitos autorais: Este trabalho está licenciado sob uma Licença Internacional Creative Commons Atribuição 4.0 (CC BY 4.0).

da membrana e inibição do sistema enzimático citocromo P450; digluconato de clorexidina (CHG), um bisbiguanida que altera a permeabilidade da membrana; triclosan (TCL), uma molécula não iônica que inibe a síntese de ácidos graxos e altera a permeabilidade da membrana; e a cloramina T (CAT), um composto à base de cloro que promove reações oxidativas e consequente hidrólise de proteínas [4, 5, 6, 7]. Essas modificações estruturais envolvem uma ampla faixa de concentrações, com alguns compostos sendo ativos em concentrações muito baixas, enquanto outros requerem níveis potencialmente tóxicos para alcançar eficácia.

Notavelmente, a modificação estrutural de um cimento de ionômero de vidro comercialmente disponível pela incorporação do sal de imidazólio 1-n-hexadecil-3-metilimidazólio cloreto ($C_{16}MImCl$) a uma concentração de 10 ppm resultou no desenvolvimento de um novo biomaterial com atividade antifúngica contra biofilme e sem toxicidade detectável [8]. De forma semelhante, IMS à base de esteroides demonstraram atividade de amplo espectro contra patógenos humanos e ausência de efeitos citotóxicos dentro da faixa de concentração de 5–100 $\mu g/mL$ [9]. Para preencher essa lacuna, o objetivo deste estudo foi avaliar a inibição da formação de biofilme por meio da modificação de um sistema adesivo ortodôntico comercialmente disponível. Essa modificação envolveu a incorporação de cinco compostos com atividades antibacteriana e antifúngica previamente descritas, visando ao desenvolvimento de um novo biomaterial considerando a relação entre o tratamento ortodôntico e o desenvolvimento de cáries.

2. Materiais e Métodos

2.1 Dentes bovinos

Foram utilizados 120 dentes bovinos no experimento. Esses dentes apresentavam coroas íntegras e sem defeitos de esmalte na superfície vestibular. Utilizando um disco de diamante de baixa rotação (KG Sorensen, Brasil) com refrigeração intensa, as raízes e as superfícies lingual/palatina e incisal/oclusal de 72 dentes foram removidas, utilizando-se a parte central da superfície vestibular dos dentes incisivos (10 mm x 10 mm). Dos 48 dentes restantes, apenas as raízes foram removidas, preservando-se toda a coroa dentária. Após os preparos iniciais, os dentes foram imersos em solução de NaCl a 0,9% e esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos [10].

2.2 Sistemas adesivos e bráquetes

O sistema adesivo ortodôntico fotopolimerizável utilizado foi o Transbond™ XT (3M Unitek, Califórnia, EUA). O ácido fosfórico a 37% foi obtido da Fusion Duralink - Angelus® (Londrina, Brasil), e os bráquetes metálicos tradicionais com malha de retenção mecânica para incisivos centrais 11-21 foram adquiridos da Abzil® (São José do Rio Preto, Brasil). Cinco modificações do AS original foram preparadas por meio da incorporação de CPC ($C_{21}H_{38}ClN$, Labsynth) (AS1); IMS (1-hexadecil-3-metilimidazólio - $C_{16}MImCl$, Iolitec) (AS2); CHG ($C_{20}H_{30}Cl_2N_{10}$, Sigma-Aldrich) (AS3); TCL ($C_{12}H_7Cl_3O_2$, Sigma-Aldrich) (AS4); ou CAT hidratada ($CH_3C_6H_4SO_2NClNa$, Acros) (AS5). Um sistema adesivo não modificado foi utilizado como controle (AS6). Cada composto (pureza >95%) foi incorporado à resina em 1000 ppm (p/p) e espatulado até obter uma consistência uniforme. Nenhuma mudança visível de cor foi observada nos ASs modificados.

2.3 Cepas e teste de formação de biofilme

Foram utilizadas as cepas *S. mutans* ATCC 25175® e *C. albicans* ATCC 10321®. A cepa de *C. albicans* foi cultivada em ágar HiCrome Candida por 24 h a 37 °C, e a cepa de *S. mutans* foi cultivada em ágar Mitis Salivarius por 48 h a 35 °C em ambiente microaerofílico. Após o crescimento inicial, colônias jovens de cada cultura foram adicionadas a uma solução estéril de NaCl 0,9% para obtenção de um inóculo padrão

contendo $1,5 \times 10^8$ células/mL. Esse procedimento foi repetido semanalmente para garantir a viabilidade das cepas utilizadas. As suspensões bacterianas e fúngicas para os testes foram preparadas com 0,1 mL do inóculo padrão de *C. albicans* ou *S. mutans*, 2 mL de caldo tripticase de soja, 0,5 mL de solução estéril de sacarose a 5% e 2,4 mL de solução salina a 0,9%.

A formação de biofilme foi avaliada segundo metodologia previamente descrita [8], com modificações. Os corpos de prova (TS1-TS6) foram confeccionados utilizando os AS1-AS6, respectivamente, juntamente com dentes bovinos (12 para cada AS) e bráquetes. As superfícies dentárias preparadas foram secas em capela de fluxo laminar. Em seguida, realizou-se o condicionamento ácido com ácido fosfórico a 37% por 30 segundos, seguido por lavagem com água destilada, secagem com ar comprimido e colagem dos bráquetes utilizando o AS por fotopolimerização. A ativação da luz foi realizada por 40 segundos com uma unidade LED RadiiCal (SDI, Bayswater, VIC, Austrália).

Cada TS foi subdividido aleatoriamente nos grupos A, B e C, e colocado em tubos Falcon contendo as suspensões previamente preparadas: o grupo A recebeu suspensão de *S. mutans*, o grupo B recebeu *C. albicans*, e o grupo C uma suspensão mista de *S. mutans* e *C. albicans*. Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 35 °C. As suspensões bacterianas e fúngicas foram trocadas semanalmente durante um período de quatro semanas, com verificação de crescimento nos meios utilizados. Após o período de incubação, os TSs foram lavados três vezes com solução salina estéril a 0,9%, colocados em tubos de ensaio com 5 mL de água peptonada e submetidos à ultrassonicação a 40 kHz por 10 minutos (Quimis, Brasil) para remoção das células sésseis. Após esse procedimento, foram realizadas diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}), e 20 µL de cada diluição foram incubados conforme os procedimentos iniciais. A inibição do crescimento foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo com aumento de 2.000x em toda a área do TS, utilizando o microscópio eletrônico de varredura FEI Inspect S50.

2.4 Avaliação da resistência adesiva ao cisalhamento

O teste de resistência adesiva ao cisalhamento foi realizado com adaptações [11] e de acordo com o protocolo ISO/TS 1140518, utilizando uma máquina de ensaio universal (Odeme Dental Research Corporation, EUA) com célula de carga de 500 N. Os 48 dentes, dos quais as raízes haviam sido previamente removidas, foram posicionados em uma estrutura circular de policloreto de vinila com 25 mm de diâmetro. Essa estrutura foi preenchida com resina acrílica (Clássico, Jet, Brasil), deixando a face vestibular exposta para colagem ortodôntica direta. Os TSs foram preparados com secagem das superfícies dentárias em capela de fluxo laminar. Em seguida, realizou-se o condicionamento ácido com ácido fosfórico a 37%. Os bráquetes foram colados utilizando o AS proposto por fotopolimerização, conforme instruções do fabricante.

2.5 Avaliação da deformação plástica (microdureza)

Doze TSs de cada AS foram preparados a partir de um molde com dimensões de 5 mm de diâmetro por 3 mm de altura. Após o processo de fotopolimerização, foram embutidos em base epóxi plana (Poxipol, Uruguai). Em cada espécime, foram feitas cinco indentações, analisadas em triplicata, utilizando um microdurômetro Vickers da Shimadzu (modelo HVM-G 20ST), com carga de 200 gf por 15 segundos, conforme adaptações da American Society for Testing and Materials [12].

2.6 Avaliação de hiperalergenicidade - Teste HET-CAM

A avaliação da biocompatibilidade dos ASs propostos foi realizada por meio do teste HET-CAM, baseado na análise do desenvolvimento de reações irritativas na membrana corioalantóica (CAM). No 10º dia de incubação, a casca dos ovos na região da câmara de ar foi cuidadosamente removida. Em seguida, a CAM foi exposta a 300

mg do AS em forma de pó, obtido por abrasão com broca diamantada após a fotopolimerização. Controles negativo e positivo foram avaliados com adição de 300 μ L de solução salina a 0,9% e solução de NaOH 0,1 M (padronizada com $C_8H_5KO_4$). Foram observados os sinais de hemorragia, vasoconstrição e coagulação em cada grupo para determinação do índice de irritação (IS), conforme Luepke (1985) [13], sendo classificados como: não irritante [0–0,9]; levemente irritante [1,0–4,9]; moderadamente irritante [5–8,9]; e extremamente irritante [9–21]. Todos os procedimentos foram conduzidos conforme as diretrizes da ISO 10993 para avaliação biológica de dispositivos médicos.

2.7 Análise estatística

Para avaliar a resistência adesiva ao cisalhamento e a deformação plástica dos ASs, os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e à análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Dunnett para comparação das médias dos ASs modificados com o controle. O software GraphPad Prism versão 8.0 (Boston, EUA) foi utilizado para a análise.

3. Resultados

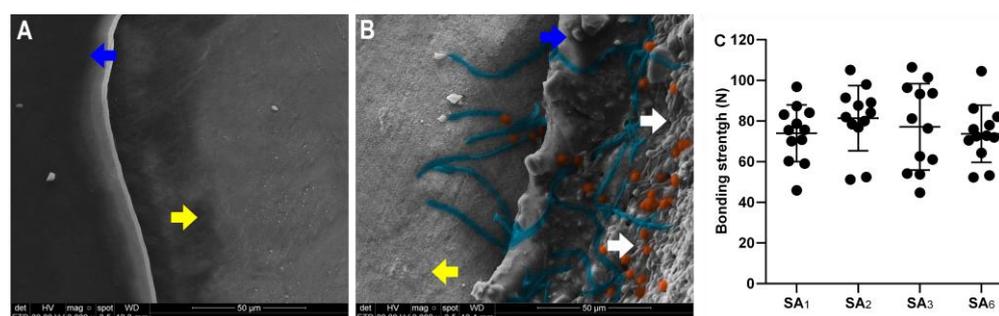
3.1 Teste de formação de biofilme

Os sistemas adesivos (ASs) modificados com CPC (AS1), IMS (AS2) e CHG (AS3) mostraram-se eficazes na inibição da formação de biofilme. No entanto, AS4 e AS5, modificados com TCL e CAT, respectivamente, assim como o AS6 (controle não modificado), não foram capazes de inibir a formação de biofilme nas condições propostas durante o período de incubação de quatro semanas (Tabela 1). Esse resultado foi confirmado por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (Figura 1A), revelando inibição completa da formação de biofilme em TS1. Em contraste, TS5 demonstrou a presença de pseudohifas e blastoconídios de *C. albicans*, bem como células de *S. mutans*, confirmando a formação de uma matriz extracelular (Figura 1B).

3.2 Avaliação da resistência adesiva ao cisalhamento

Os testes para avaliação da resistência adesiva ao cisalhamento e da deformação plástica foram realizados apenas nos ASs modificados que apresentaram inibição satisfatória da formação de biofilme, bem como no controle. Os resultados referentes à carga aplicada nos corpos de prova (TSs) não apresentaram alterações significativas quando comparados entre si ou ao AS original (Figura 1C).

Figura 1: Microscopia eletrônica de varredura (aumento de 2000x) indicando a superfície do corpo de prova (TS) – sistema adesivo (AS) (seta azul) e dente bovino (seta amarela). A. visualização da superfície do AS e do dente em TS1 com inibição total da formação de biofilme; B. visualização da formação de biofilme misto de *Streptococcus mutans* (vermelho), *Candida albicans* (verde) e matriz extracelular/biofilme (seta branca) em TS6; C. resultados obtidos do teste de resistência adesiva ao cisalhamento. Os dados são apresentados como média \pm DP. Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA de uma via; $p = 0,65$).



3.3 Avaliação da deformação plástica (microdureza)

Ao comparar os resultados médios das três análises obtidas no teste de microdureza, não houve diferença na deformação da estrutura dos ASs modificados em relação ao AS6 (não modificado) (Tabela 1).

Tabela 1: Resultados dos ensaios de formação/inibição de biofilme e do teste de microdureza (média \pm DP).

Corpo de prova	Biofilme A			Biofilme B			Biofilme eC			Microdureza (Vickers)
	<i>S. mutans</i>			<i>C. albicans</i>			<i>S. mutans</i> + <i>C. albicans</i>			
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
TS ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	46.29 \pm 0.74
TS ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	43.83 \pm 1.3
TS ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	47.17 \pm 2.29
TS ₄	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	NA
TS ₅	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	NA
TS ₆	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	NA

Legenda: - crescimento negativo; +++ crescimento > 5 colônias.

3. Discussão e Conclusão

Nesta pesquisa, avaliamos a incorporação de diferentes compostos com atividade antibacteriana e antifúngica em um sistema adesivo (SA) comercial amplamente utilizado na odontologia, explorando o potencial para o desenvolvimento de novos biomateriais com atividade antibiofilme. No campo do desenvolvimento de biomateriais odontológicos, além da melhoria da função básica de um SA, têm sido realizados esforços para reduzir efetivamente a formação de biofilme por meio da incorporação de diversos compostos visando o desenvolvimento de novas formulações biocompatíveis. Nossos resultados demonstraram um efeito inibitório distinto na formação de biofilme, com inibição completa dos biofilmes formados por *S. mutans* e *C. albicans*, bem como inibição do biofilme misto desses dois microrganismos pelos SA1 contendo CPC, SA2 contendo IMS e SA3 contendo CHG.

A presença de *S. mutans*, associada a variações individuais nas condições salivares, está bem descrita na patogênese da cárie dentária, sendo atribuída à formação de biofilmes e placa dentária. SAs têm sido relatados como ineficazes na inibição da formação de biofilmes [14]. Além do *S. mutans*, o tratamento ortodôntico pode levar a uma alteração na microbiota oral, resultando em um aumento na taxa de colonização por espécies de *Candida*, especialmente *C. albicans* [15]. Um outro estudo demonstrou que crianças de 4 a 10 anos apresentavam uma prevalência de 8,3% de colonização por *C. albicans* no início do tratamento ortodôntico [16]. Quando reavaliadas após seis meses, essa prevalência aumentou para 18,4%. Uma meta-análise avaliando o perfil de resistência de *C. albicans* isolada da cavidade oral mostrou baixa resistência a antifúngicos, exceto em pacientes com comorbidades [17]. No entanto, não há estudos que avaliem o perfil de resistência em pacientes durante o tratamento ortodôntico. Todos esses achados reforçam a relevância desse microrganismo no processo patogênico da cárie.

O CPC e a CHG são amplamente utilizados na odontologia com finalidades profiláticas ou terapêuticas [3]. Diversos estudos demonstraram a eficácia do CPC na inibição de biofilme causado por *S. mutans* quando incorporado a SAs. Um estudo demonstrou a eficácia do CPC incorporado ao SA Transbond™ XT na inibição de *S. mutans* por até 180 dias, sem comprometer a resistência à tração do composto [18]. O

CPC também apresenta atividade inibitória eficaz contra *C. albicans*, mas principalmente quando associado a formulações de enxaguantes bucais. Uma solução contendo 0,05% de CPC e 0,12% de CHG mostrou-se eficiente como agente descontaminante por meio de experimentos em próteses removíveis, inibindo o crescimento de *C. albicans* [5]. Modificações em SAs ortodônticos com a inserção de CHG encapsulada em nanopartículas de sílica indicaram eficácia na inibição de biofilme de *S. mutans* [19], no entanto, em concentrações mais elevadas (5%) do que as utilizadas em nosso estudo (0,1%). Não foram encontrados relatos na literatura sobre a inserção de CPC em SA fotopolimerizável contra *C. albicans*, o que torna os resultados encontrados neste estudo promissores como possibilidade de desenvolvimento de um novo biomaterial.

Líquidos iônicos apresentam ampla variação estrutural, o que garante um vasto espectro de aplicações com ação eficaz contra fungos e bactérias. A atividade anti-Candida do IMS já foi previamente demonstrada quando inserido no cimento de ionômero de vidro Ketac® Cem Easymix em proporção de 10 ppm [8]. O IMS avaliado, agora na forma de enxaguante bucal, demonstrou efeito inibitório sobre *C. albicans* [6]. Além disso, estudos demonstraram a possibilidade de inserção do composto em questão no polietileno de alta densidade usado como biomaterial na área médica, mais especificamente na regeneração óssea [7]. Um IMS derivado de ácido litólico demonstrou, além de atividade inibitória contra bactérias e *C. albicans*, efeito inibitório sobre fungos filamentosos patogênicos [9]. Uma modificação estrutural nas cadeias laterais do IMS também apresentou resultado promissor devido à ação inibitória eficaz in vitro contra biofilmes dentários bacterianos mono e multiespécies [20]. Nossos achados são promissores, pois o efeito inibitório do C₁₆MImCl contra *S. mutans*, bem como sua incorporação em sistemas adesivos ortodônticos, ainda não havia sido previamente relatado.

O SA4, com inclusão de TCL, SA5 com CT, e SA6 (sem modificações), não apresentaram capacidade de inibir nenhum dos três biofilmes propostos nas concentrações testadas e, portanto, não foram incluídos nos ensaios subsequentes. O teste de cisalhamento, que avalia a força por unidade de área necessária para romper uma união adesiva com falha ocorrendo na interface adesiva ou adjacente a ela, indicou que as modificações propostas nos SAs não causaram alterações nessa propriedade. Além disso, a avaliação da deformação plástica não mostrou variação entre o SA comercial (SA6) e os SAs modificados, indicando que a concentração proposta de 1000 ppm não alterou sua estrutura física. A ação antibacteriana da CHG foi previamente avaliada com a inserção do composto em forma líquida, em concentração de 18%, na estrutura do cimento de ionômero de vidro de cura química Ketac® Cem Easymix [21]. Essa modificação estrutural foi capaz de inibir a microbiota residente sem comprometer as características físico-químicas do composto. Por fim, os resultados do teste da membrana corioalantóide (CAM), que é uma excelente alternativa para avaliar o potencial dos biomateriais em causar dano celular e/ou tecidual, demonstraram que os SAs modificados não apresentaram toxicidade, uma vez que não houve alterações na CAM que indicassem hemólise, lise celular ou coagulação.

Em resumo, a adição de CPC, IMS ou CHG à formulação do adesivo ortodôntico demonstrou potencial promissor na prevenção da formação de biofilmes por patógenos de relevância clínica, como *S. mutans* e *C. albicans*, e, conseqüentemente, na redução do risco de lesões de mancha branca e cáries associadas ao tratamento ortodôntico. Outro aspecto favorável foi a manutenção das propriedades físicas dos SAs modificados, bem como a ausência de evidências de danos celulares e/ou teciduais. No entanto, apesar desses resultados promissores, este estudo possui limitações que devem ser reconhecidas. O delineamento experimental baseou-se em modelos ex vivo, que, embora úteis para triagem inicial e avaliação de biocompatibilidade, não reproduzem completamente as condições biológicas complexas da cavidade oral, como variações no fluxo salivar, pH, dieta e interações microbianas. Além disso, a avaliação da inibição do biofilme foi limitada a modelos específicos mono e duais de

espécies, o que pode não refletir toda a diversidade microbiana presente in vivo. Portanto, são necessários estudos adicionais, incluindo ensaios in vivo de longo prazo em pacientes ortodônticos, para confirmar a eficácia clínica, segurança e durabilidade desses sistemas adesivos modificados em condições reais.

Financiamento: Nenhum.

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa: O paciente assinou um termo de consentimento livre e esclarecido, que autoriza o uso dos dados para publicações com fins científicos, e a investigação aderiu aos padrões éticos delineados na Declaração de Helsinki.

Agradecimentos: Régis A. Zanette agradece ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida.

Conflitos de Interesse: Nenhum.

Materiais Suplementares: Nenhum.

Referências

1. Bielefeld KA, Amini-Nik S, Alman BA. Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. *Cell Mol Life Sci.* 2013 Jun; 70(12):2059-81. doi: 10.1007/s00018-012-1152-9.
2. Kim D, Sengupta A, Niepa THR, Lee BH, Weljie A, Freitas-Blanco VS, Murata MM, Stebe KJ, Lee D, Koo H. *Candida albicans* stimulates *Streptococcus mutans* microcolony development via cross-kingdom biofilm-derived metabolites. *Sci Rep.* 2017 Jan;7:41332. doi: 10.1038/srep41332.
3. Garcia BA, Acosta NC, Tomar SL, Roesch LFW, Lemos JA, Mugayar LRF, Abranches J. Association of *Candida albicans* and Cbp+ *Streptococcus mutans* with early childhood caries recurrence. *Sci Rep.* 2021 May;11(1):10802. doi: 10.1038/s41598-021-90198-3.
4. Albuquerque IG, Furtado MA, Nunes NLT, Sousa LHT, Linhares CMV, Freitas MTM. Antimicrobial effect of medicinal plants against *Streptococcus mutans*: A literature review. *Braz J Dent Oral Radiol.* 2024 Jan-Dec;3:bjd51. doi: <https://doi.org/10.52600/2965-8837.bjdor.2024.3.bjd51>.
5. Verma T, Sharma P, Kumar P, Tyagi K, Bhatnagar S, Raza M. Evaluation of antimicrobial property of modified acrylic resin-containing cetylpyridinium chloride. *J Orthod Sci.* 2020 Feb;12(9):1-7.
6. Aoun G, Cassia A, Berberi A. Effectiveness of a chlorhexidine digluconate 0.12% and cetylpyridinium chloride 0.05% solution in eliminating *Candida albicans* colonizing dentures: A randomized clinical in vivo study. *J Contemp Dent Pract.* 2015 Jun;16(6):433-436. doi: 10.5005/jp-journals-10024-1702.
7. Bergamo VZ, Donato RK, Nemitz MC, Acasigua GAX, Selukar BS, Lopes W, Dalla Lana DF, Teixeira ML, Teixeira HF, Schrekker HS, Fuentefria AM. Assessing an imidazolium salt's performance as antifungal agent on a mouthwash formulation. *J Appl Microbiol.* 2016 Dec;121(6):1558-1567. doi: 10.1111/jam.13283.
8. Schrekker CML, Sokolovicz YCA, Raucci MG, Leal CAM, Ambrosio L, Teixeira ML, Fuentefria AM, Schrekker HS. Imidazolium salts for *Candida* spp. antibiofilm high-density polyethylene-based biomaterials. *Polymers (Basel).* 2023 Mar;15(5):1259. doi: 10.3390/polym15051259.
9. Ehrhardt A, Mandelli JZA, Bérnago V, Lopes W, Donato RK, Zanette RA, Fuentefria AM. Glass ionomer cement modified by an imidazolium salt: adding antifungal properties to a biomaterial. *Braz J Microbiol.* 2021;52(3):1347-1352.
10. Malinowska M, Sawicka D, Niemirowicz-Laskowska K, Wielgat P, Car H, Hauschild T, Hryniewicka A. Steroid-functionalized imidazolium salts with an extended spectrum of antifungal and antibacterial activity. *Int J Mol Sci.* 2021;22(22):12180.
11. Ccahuana-Vásquez RA, Cury JA. *S. mutans* biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. *Braz Oral Res.* 2010 Apr-Jun;24(2):135-141. doi: 10.1590/s1806-83242010000200002.

12. Di Guida LA, Benetti P, Corazza PH, Della Bona A. The critical bond strength of orthodontic brackets bonded to dental glass–ceramics. *Clin Oral Investig*. 2019;23(12):4345-4353.
13. American Society for Testing and Materials. Standard test method for microindentation hardness of materials. ASTM Standard E384 - 16. West Conshohocken: ASTM International; 2016.
14. Luepke NP. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food Chem Toxicol*. 1985;23(2):287-291.
15. Schneider BJ, Hiers RD, Currier GF, Kadioglu O, Johnston SE, Zhao YD, Florez FLE, Khajotia SS. Assessment of *Streptococcus mutans* biofilms on orthodontic adhesives over 7 days. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2021;160(1):50-57.
16. Grzegocka K, Krzyściak P, Hille-Padalis A, Loster JE, Talaga-Ćwiertnia K, Loster BW. Candida prevalence and oral hygiene due to orthodontic therapy with conventional brackets. *BMC Oral Health*. 2020;20(1):277. <https://doi.org/10.1186/s12903-020-01267-4>.
17. Hernández-Solís SE, Rueda-Gordillo F, Flota-Alcocer AD, Aguilar-Ayala FJ, Rodríguez-Fernández MDSC, Lama-González EM. [Influence of orthodontic appliances on the occurrence of *Candida* spp. in the oral cavity]. *Rev Chilena Infectol*. 2016;33(3):293-297.
18. Kessler SQS, Lang PM, Dal-Pizzol TS, Montagner F. Resistance profiles to antifungal agents in *Candida albicans* isolated from human oral cavities: systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig*. 2022;26(11):6479-6489.
19. 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(2):245-251.
20. Deng W, Tian Xu T, Li X, Dong W, Liang Y. In vitro study of chlorhexidine acetate compound mesoporous silica orthodontic modified binder resin. *J Prev Treat Stomatol Dis*. 2022;30(3):178-184.
21. Pan T, Liu FS, Lin H, Zhou Y. Anti-biofilm studies of synthetic imidazolium salts on dental biofilm in vitro. *J Oral Microbiol*. 2022;14(1):2075309.
22. Araújo JLDS, Alvim MMA, Campos MJDS, Apolônio ACM, Carvalho FG, Lacerda-Santos R. Analysis of chlorhexidine modified cement in orthodontic patients: a double-blinded, randomized, controlled trial. *Eur J Dent*. 2021;15:639-46.