



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Thaís Soares Bezerra Santos Nunes

Efetividade de soluções desinfetantes associadas ou não à escovação no controle do biofilme de uma resina impressa para base de prótese total

Araraquara
2023



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Thaís Soares Bezerra Santos Nunes

Efetividade de soluções desinfetantes associadas ou não à escovação no controle do biofilme de uma resina impressa para base de prótese total

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Doutor em Reabilitação Oral, na Área de Prótese.

Orientador: Ana Carolina Pero

Araraquara
2023

N972e Nunes, Thaís Soares Bezerra Santos
Efetividade de soluções desinfetantes associadas ou não à escovação no controle do biofilme de uma resina impressa para base de prótese total / Thaís Soares Bezerra Santos Nunes. -- Araraquara, 2023
90 f. : il., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Orientadora: Ana Carolina Pero

1. Impressão tridimensional. 2. Bases de dentadura. 3. Biofilmes. 4. Higienizadores de dentadura. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Thaís Soares Bezerra Santos Nunes

Efetividade de soluções desinfetantes associadas ou não à escovação no controle do biofilme de uma resina impressa para base de prótese total

Comissão julgadora

Tese para obtenção do grau de doutora em Reabilitação Oral

Presidente e orientador: Profa. Dra. Ana Carolin Pero

2º Examinador: Profa. Dra. João Neudenir Arioli Filho

3º Examinador: Profa. Dra. Andrea Candido dos Reis

4º Examinador: Profa. Dra. Juliê Marra de Paula

1º Suplente: Prof. Dr. Francisco de Assis Mollo Junior

2º Suplente: Profa. Dra. Cláudia Helena Lovato da Silva

3º Suplente: Profa. Dra. Karin Hermana Neppelenbroek

Araraquara, 10 de fevereiro de 2023

DADOS CURRICULARES

Thaís Soares Bezerra Santos Nunes

NASCIMENTO: 07/08/1991 Maceió, Alagoas

FILIAÇÃO: José Helder Pessoa Nunes
Betania Soares Bezerra Santos Nunes

2010-2014 Graduação pela Universidade Federal de Alagoas- UFAL

2013-2014 Bolsista CNPq pelo projeto de iniciação científica na disciplina de
Dentística restauradora da Universidade Federal de Alagoas- UFAL.

Monitoria em Prótese Fixa pela Universidade Federal de Alagoas- UFAL.

2015-2016 Experiência profissional em clínicas odontológicas, Maceió- AL

2016-2017 Especialização em Prótese dentária pela Universidade de São Paulo-
USP Bauru

2017-2017 Estágio docência na disciplina de Prótese Parcial Removível II na
Faculdade de Odontologia de Araraquara- FOAR.

2017-2019 Mestrado acadêmico em Reabilitação Oral, na área de Prótese pela
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita e Filho”, Faculdade de
Odontologia de Araraquara - FOAR.

2018-2018 Estágio docência na disciplina de Prótese Parcial Removível I na
Faculdade de Odontologia de Araraquara- FOAR.

2020-2021 Profa. Me. Nas disciplinas de Prótese parcial fixa e Oclusão na
Universidade Mário Jucá- UMJ, Maceió- AL

2021-2022 Profa. Me. Nas disciplinas de Prótese Parcial Removível e Clínica estágio
em Reabilitação Oral II, na Universidade de Santo Amaro-UNISA, São Paulo-SP

Dedico este trabalho

Á Deus, por alimentar minha fé e nunca desistir. Sei que seus planos são maiores do que posso imaginar.

Aos meus pais, Betania e Helder, minha fonte inesgotável de amor. Vocês são a minha inspiração, o meu alicerce. Obrigada por dividirem, novamente, esse sonho comigo.

À minha irmã, Tainá. Minha fortaleza, decidida, corajosa mãe do Heitor. Sou eternamente grata por ser sua irmã, eu amo você.

Ao Ricardo, meu amor, obrigada por me incentivar nos momentos de cansaço e por tornar as dificuldades mais simples. A vida é muito mais leve e feliz ao seu lado.

Heitor, meu pitoco. Você chegou para iluminar nossos dias. Seu carisma nos contagia e me impulsiona a ser uma pessoa melhor.

Minha Vó Odete, sua presença é muito forte em todos os meus dias e em todas as minhas decisões. Sei que daí de cima a senhora está me protegendo e me guiando.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” por me acolher tão bem, e pela oportunidade de concluir meu tão sonhado curso de doutorado.

À minha orientadora, Profa. Dra. Ana Carolina Pero, obrigada por ser uma orientadora tão humana, por me receber de braços abertos, confiar no meu trabalho e no meu potencial. Sou imensamente grata pelo seu apoio. A senhora é inspiradora.

À minha amiga Marcela Dantas, impossível pensar em Araraquara e não passar um filme em minha mente de tudo que vivemos. Foram momentos memoráveis, repletos de descobertas e companheirismo. Nossa convivência se transformou em uma amizade verdadeira e cheia de amor.

Ao meu amigo Diego Dantas, amigo que o mestrado me deu. Sempre carinhoso e atencioso. Hoje meu parceiro de trabalho. Você é muito especial.

À minha amiga Déborah Laurindo, eternamente minha anfitriã. Obrigada por todo o carinho e por trazer “o cheirinho” de Maceió para Araraquara.

À Bianca Núbia, Marina Miranda, Luana Solera, as odontopediatras mais animadas, leves e descontraídas.

Às minhas amigas, Amanda Palmeira e Izadora Quintela. Obrigada por serem verdadeiras amigas-irmãs, e por sempre incentivar a busca dos meus sonhos.

Ao meu grupo de pesquisa, **Marcela Dantas, Vivían Policastro, Andressa Leite, Hamile Viotto, Thaís Santana, Pedro Ewerton, Sabrina Romão, Marília Popts, Danny Mendoza**, por serem tão unidos e parceiros.

Aos meu eterno grupo de pesquisa, **Jefferson Trigo, Vinícius Sakima e Yuliana Vega**, meu carinho por vocês é imenso.

À Bruna Pimentel e Luana Dias. Minhas pesquisadoras inspiradoras, tenho um carinho enorme por vocês.

Aos meus eternos amigos da turma do mestrado. **Mônica Tinajero, Camila Jabor, Bruna Valerrini, Carlos Moura, Laís Cardoso, Fernanda Mercante e Mariana Citta**.

Aos amigos do laboratório de microbiologia. **Sabrina Ribeiro, Erick Dante Cláudia Jordão, Camila Tasso, Lucas Portela, Elkin Florez, Carmélia Lobo**, por tornarem os experimentos mais leves e divertidos.

Aos professores Paula Barbugli, Marlise Klein e Ewerton Mima, pesquisadores inteligentes e capacitados, que contribuíram para o meu senso crítico nas pesquisas.

Aos professores da banca, por aceitarem o convite e dedicarem sua atenção e conhecimentos para o crescimento deste trabalho.

Aos professores do departamento de Prótese Dentária, obrigada pela dedicação diária em transmitir seus conhecimentos e paciência ao ensinar.

À CAPES, pelo apoio financeiro. O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

“A vida é construída nos sonhos e concretizada no amor”
Chico Xavier*

* Xavier C. Oração: Que eu jamais me esqueça que Deus me ama infinitamente.

Nunes TSBS. Efetividade de soluções desinfetantes associadas ou não à escovação no controle do biofilme de uma resina impressa para base de prótese total [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2023.

RESUMO

A formação de biofilme nas bases das próteses é um problema clínico frequente, favorecendo o desenvolvimento da estomatite protética. Entretanto não há estudos avaliando um protocolo de higiene adequado para próteses totais confeccionadas com uma resina impressa para base de dentadura. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da imersão em hipoclorito de sódio 0,25%, clorexidina 2% e peróxido alcalino, associada ou não à escovação em solução de sabonete, no controle do biofilme formado sobre uma resina para base de dentadura confeccionada pela impressão 3D. Espécimes circulares (10 mm diâmetro x 1,2 mm espessura) de duas resinas [Cosmos (COS-grupo experimental) e Clássico (CLA-grupo controle)] foram contaminados in vitro com cepas de *Candida albicans* para formação de biofilme de 48 horas, em seguida foram submetidos aos protocolos de higiene envolvendo a imersão em soluções desinfetantes (hipoclorito de sódio 0,25%, clorexidina 2%, peróxido alcalino e PBS- controle) associados ou não com a escovação mecânica com solução de sabonete Lifebuoy 0,78%. A efetividade desses protocolos foi avaliada por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL, n=9), avaliação do metabolismo celular (ensaio de XTT, n=9), MEV (n=4) e microscopia confocal a laser (n=2) para avaliar arquitetura dos biofilmes sobre os espécimes. A rugosidade foi avaliada antes e após os protocolos de higiene (imersão + escovação) por meio de um rugosímetro digital (n=9). Todos os dados foram analisados pelos testes de T de student, ANOVA/Welch e pos-hoc de Tukey/Gomes-Howell ($\alpha = 0,05$), exceto as imagens de MEV e microscopia confocal, que foram avaliadas de maneira descritiva. Sem ser exposto as técnicas de higiene, a resina COS apresentou um biofilme mais espesso e com maior quantidade de hifas em relação a CLA. A rugosidade superficial da COS foi inferior à CLA, entretanto foi observado um comportamento recorrente de maior UFC/mL na resina COS. Imersão em hipoclorito 0,25% e clorexidina 2%, associado ou não com a escovação, apresentaram significativa redução metabólica (XTT) e redução completa de UFC/mL. Apenas a imersão em peróxido alcalino conseguiu reduzir inicialmente o metabolismo (XTT), mas não a redução de UFC/mL, a redução de UFC/mL só foi possível quando associada à escovação. Com relação a rugosidade após os ciclos de escovação e imersão, a CLA aumentou sua rugosidade superficial, já a COS não. Após os ciclos de escovação e imersão a COS manteve um biofilme mais espesso, com maior número de células vivas e maior presença de hifas em relação à CLA. Imersão em hipoclorito 0,25%, associada ou não a escovação, foi o melhor protocolo de higiene, além de eliminar as UFC/mL, removeu, quase que completamente, as células mortas sobre os espécimes. Para próteses removíveis com a presença de estrutura metálica, o protocolo mais indicado é a imersão em clorexidina 2%, associada ou não a escovação, em seguida a imersão em peróxido alcalino associado à escovação. Apesar da resina COS obter uma boa resposta aos protocolos de higiene, o maior número de hifas de *C. albicans* aderidos a sua superfície é um fato que merece atenção e futuras investigações.

Palavras – chave: Impressão tridimensional. Bases de dentadura. Biofilmes. Higienizadores de dentadura.

Nunes TSBS. Effectiveness of disinfectant solutions associated or not with brushing on the biofilm control of a 3D printed-denture base resin [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2023.

ABSTRACT

The formation of biofilm on the bases of dentures is a frequent clinical problem, favoring the development of denture stomatitis. However, there are no studies on an adequate hygiene protocol for cleaning complete dentures made of a 3D-printed denture base resin. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of immersion in 0.25% sodium hypochlorite, 2% chlorhexidine and alkaline peroxide, associated or not with brushing in soap solution, on the biofilm control formed on a denture base resin made by 3D printing. Circular specimens (10 mm diameter x 1.2 mm thickness) of two resins [Cosmos (COS-experimental group) and Clássico (CLA-control group)] were contaminated in vitro with strains of *Candida albicans* to form a 48-hour biofilm, then submitted to hygiene protocols involving immersion in disinfectant solutions (sodium hypochlorite 0.25%, 2% chlorhexidine, alkaline peroxide and PBS-control) associated or not with mechanical brushing with Lifebuoy 0.78% soap solution. The effectiveness of these protocols was evaluated by counting colony forming units (CFU/mL, n=9), evaluating cell metabolism (XTT assay, n=9), SEM (n=4) and confocal laser microscopy (n=2) to evaluate biofilm architecture on the specimens. Roughness was evaluated before and after hygiene protocols (immersion + brushing) using a digital roughness meter (n=9). All data were analyzed by T student; ANOVA/Welch and Tukey/Gomes–Howell pos-hoc tests ($\alpha = 0.05$), except for SEM images and confocal microscopy, which were descriptively evaluated. Without being exposed to hygiene techniques, the COS resin presented a thicker biofilm and a greater amount of hyphae compared to CLA. The surface roughness of the COS was lower than that of the CLA, however a recurrent behavior of higher CFU/mL was observed in the COS resin. Immersion in 0.25% hypochlorite and 2% chlorhexidine, associated or not with brushing, showed similar metabolic reduction (XTT) and complete reduction of CFU/mL. Only alkaline peroxide immersion was able to initially reduce metabolism (XTT), but not the CFU/mL reduction. The reduction in CFU/mL was only possible when associated with brushing. Regarding roughness after brushing and immersion cycles, CLA increased its surface roughness, while COS did not. After the brushing and immersion cycles, COS maintained a thicker biofilm, with a greater number of living cells and a greater presence of hyphae than CLA. Immersion in hypochlorite 0.25%, with or without brushing, was the best hygiene protocol, in addition to eliminating the CFU/mL, it removed, almost completely, the dead cells on the specimens. For removable partial denture, with a metallic structure, the most indicated protocol is immersion in 2% chlorhexidine, with or without brushing, followed by immersion in alkaline peroxide associated with brushing. Although the COS resin obtained a good response to hygiene protocols, the greater number of *C. albicans* hyphae adhered to its surface is a fact that deserves attention and future investigations.

Keywords: Printing, three-dimensional. Denture bases. Biofilms. Denture cleansers.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	09
2 PROPOSIÇÃO	14
3 REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1 Polimetilmetacrilato (PMMA).....	15
3.2 Resinas para Impressão 3D	18
3.3 Estomatite Protética	23
3.4 Protocolos de Higienização de Prótese Total.....	27
4 MATERIAL E MÉTODO.....	33
4.1 Material	33
4.2 Método	33
4.2.1 Distribuição dos espécimes	33
4.2.1.1 <i>Confecção dos espécimes de resina CLA</i>	34
4.2.1.2 <i>Confecção dos espécimes de resina COS</i>	35
4.2.1.3 <i>Caracterização da rugosidade dos espécimes</i>	38
4.2.2 Avaliação da efetividade dos protocolos de higiene	39
4.2.2.1 <i>Micro-organismos e condições de cultivo</i>	39
4.2.2.2 <i>Formação do biofilme maduro</i>	41
4.2.2.3 <i>Protocolos de higienização</i>	42
4.2.2.4 <i>Contagem de unidades formadoras de colônia por mililitro</i>	44
4.2.2.5 <i>Avaliação do metabolismo celular (ensaio de XTT)</i>	45
4.2.2.6 <i>Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	46
4.2.2.7 <i>Análise por microscopia de varredura confocal a laser</i>	46
4.3 Rugosidade Antes e Depois dos Ciclos de Imersão e Escovação	47
4.4 Análise Estatística	47
5 RESULTADO	48
5.1 Caracterização de Rugosidade dos Espécimes	48
5.2 UFC/mL das Amostras Submetidas à Imersão.....	48
5.3 XTT das Amostras Submetidas à Imersão	49
5.4 UFC/mL das Amostras Submetidas à Escovação e Imersão....	51
5.5 XTT das Amostras Submetidas à Escovação e Imersão	53
5.6 Diferença do Metabolismo por XTT do Grupo Controle Submetido à Imersão e o Grupo Controle Submetido à Associação da Escovação com Imersão	54
5.7 Diferença de Rugosidade Antes e Após a Escovação Associado com a Imersão em Soluções Desinfetantes	55
5.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	57
5.9 Microscopia de Varredura Confocal a Laser.....	58

6 DISCUSSÃO	61
7 CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS	74
APÊNDICES	83

1 INTRODUÇÃO

Próteses totais removíveis são tradicionalmente confeccionadas com poli (metil) metacrilato (PMMA), um composto orgânico classificado como polímero, que apresenta qualidade estética, facilidade de manipulação¹ custo acessível, biocompatibilidade e facilidade de reparos². Entretanto é um potencial substrato para a formação de biofilme, podendo desencadear estomatite protética e até pneumonia por aspiração quando essas peças são más higienizadas³⁻⁵. Essas limitações podem comprometer o sucesso clínico da prótese em longo prazo^{1,6,7}.

A técnica para confecção de bases protéticas com o PMMA envolve procedimentos clínicos e laboratoriais que demandam tempo e custo. Dessa forma, há uma tendência em buscar materiais que superem as limitações químicas e mecânicas do PMMA, e apresentem um método mais simplificado para sua confecção, a fim de reduzir custos diretos e indiretos da fabricação das próteses totais removíveis⁸⁻¹⁰. A tecnologia digital atingiu a odontologia em diversas áreas como: ortodontia, implantodontia, dentística e prótese dentária. Esse avanço possibilitou a confecção de próteses totais removíveis pela técnica subtrativa (fresagem) ou aditiva (impressão 3D)¹¹, reduzindo consideravelmente o número de sessões clínicas e custos a longo prazo¹².

Após uma busca aprofundada na literatura, fica claro que muitos estudos comparam a técnica subtrativa (fresagem) com a convencional (PMMA) para a confecção de próteses removíveis quanto à adaptação¹³, precisão das bases¹⁴, adesão a materiais reembasadores¹⁵, rugosidade superficial¹⁶, resistência à flexão^{17,18}, dureza¹⁷, monômeros residuais¹⁷ e colonização por *C.albicans*¹⁹, mas poucos estudos avaliaram essas variáveis na técnica aditiva. Dentre os estudos que avaliaram a acurácia da técnica aditiva²⁰⁻²³, todos foram unânimes ao afirmar a necessidade de pesquisas investigando propriedades mecânicas e biológicas das resinas impressas, a fim de possibilitar o uso seguro desse material. Na literatura já é possível encontrar publicações da técnica e casos clínicos de próteses removíveis (totais e parciais) confeccionadas através da impressão 3D^{24,25}, mas a carência de dados baseados em evidências científicas permanece.

Uma revisão de literatura comparando as técnicas digitais para confecção de próteses dentárias, destacou as seguintes vantagens da impressão 3D em relação à fresada: economia financeira; maior número de próteses por impressão; impressão

de peças maiores; formas complexas são reproduzidas sem a necessidade de ferramentas de corte especial; impressão de geometrias ilimitadas; técnica mais rápida e sem desperdício¹¹. Entretanto a literatura atual não permite uma conclusão absoluta da superioridade de uma técnica em relação a outra, essa conclusão foi relatada em uma revisão sistemática atual²⁶.

Por se tratar de um material novo no mercado odontológico, onde muitos dos produtos encontram-se patenteados, há muita dificuldade em acessar a composição dessas resinas impressas. Entretanto sabe-se que existem diferentes modalidades de impressão 3D e para cada uma delas um tipo de resina mais apropriada²⁷. Na área odontológica as impressoras mais utilizadas são a SLA (estereolitografia a laser) e DLP (processamento de luz digital), as quais exigem a utilização de uma resina líquida fotopolimerizável²⁷. Trata-se de uma resina híbrida, polimerizada por luz UV e composta por uma base, fotoiniciadores, estabilizantes e pigmentos²⁷. A base é constituída por monômeros ou oligômeros²⁷. Monômeros epóxis e monômero acrilatos são as bases mais comuns, entretanto monômero vinil e éter e outros tipos também são encontrados^{28,29}. Os monômeros devem ter viscosidade baixa a moderada, para possibilitar uma polimerização rápida e a produção de polímeros reticulados com propriedades adequadas para as demandas mecânicas impostas²⁸. Outro componente importante é o fotoiniciador, presente em concentrações relativamente altas (3-5% em peso), com o objetivo de atingir uma polimerização rápida²⁸. A viscosidade baixa a moderada das bases das resinas impressas e o uso de monômeros acrilatos de cura rápida geram uma resistência mecânica um tanto limitada, ao passo que bases compostas por metacrilatos análogos oferecem polímeros de maior resistência e melhor biocompatibilidade²⁷.

A perda do elemento dental desencadeia aos pacientes edêntulos uma microbiota diferente dos dentados. Há uma menor quantidade de micro-organismos anaeróbios e uma maior presença de leveduras e lactobacilos. Essa diferença na microbiota gera sobre as bases acrílicas de próteses removíveis um biofilme diferente do encontrado na superfície dental. Biofilme é o nome dado a uma comunidade complexa de micro-organismos incorporados em uma matriz extracelular, aderida a uma superfície inerte ou viva³⁰⁻³². A estrutura de um biofilme maduro proporciona vantagens para os micro-organismos em comparação com sua forma planctônica (livre), pois a organização em comunidade facilita a captação de nutrientes, maior proteção contra desidratação e resistência a antimicrobianos³³. Os

biofilmes são responsáveis por boa parte das infecções humanas e têm ligação com a exacerbação ou amenização dos sintomas, tornando as infecções persistentes difíceis de serem eliminadas por antimicrobianos e pelo sistema imunológico³⁰.

Os biofilmes formados sobre bases acrílicas de próteses removíveis são facilmente colonizados em profundidade pela presença de irregularidades e porosidades deste material^{34,35}. Dessa forma, próteses removíveis são consideradas um reservatório de patógenos respiratórios dentro da cavidade oral³⁶⁻³⁸. A proximidade dessas próteses com o trato respiratório aumenta o risco de aspiração dos patógenos do biofilme protético para os pulmões³⁶, da mesma forma, o contato constante desse biofilme com a mucosa do paciente pode predispor o aparecimento de estomatite protética (EP) quando associado a fatores etiológicos (próteses mal adaptadas; uso contínuo e noturno das próteses removíveis; má higiene; tabagismo; xerostomia; diabetes; deficiência nutricional)³⁹.

A literatura aponta que a saúde bucal precária pode ser o maior fator de risco para pneumonia por aspiração em pacientes idosos³⁻⁵. A higiene bucal adequada nessa população pode evitar uma em cada dez mortes⁴. Pacientes mais idosos são os principais usuários de próteses removíveis⁴⁰ e boa parte dessa população não consegue higienizar as próteses adequadamente^{41,42}, há uma correlação positiva entre próteses removíveis má higienizadas e a prevalência de *C. albicans*⁴¹, logo é fácil concluir que esses usuários merecem uma atenção especial.

A EP, é uma infecção associada à colonização de diversos micro-organismos, especialmente *C. albicans*, o principal patógeno³⁰. A capacidade de adesão e a formação de biofilmes estruturados de *Candida spp.* na resina da base protética vem sendo apontada como um dos principais responsáveis pelo desenvolvimento da EP⁴³ que é tradicionalmente tratada com medicamentos tópicos ou sistêmicos³⁰. Na cavidade bucal a concentração dos medicamentos tópicos é reduzida a valores subterapêuticos devido ao efeito diluente da saliva, necessitando de múltiplas doses⁴⁴. Os medicamentos sistêmicos, por sua vez, podem promover efeitos colaterais hepatotóxicos e/ou nefrotóxicos, que exige muita cautela durante sua prescrição⁴⁴, além do risco de desenvolver cepas resistentes pelo uso indiscriminado desse antifúngico⁴⁵. Embora os antifúngicos aliviem os sinais e sintomas clínicos da EP, eles podem não erradicar completamente os micro-organismos, ocasionando reinfecção após o tratamento, isso tem sido atribuído ao ressurgimento da cepa infectante inicial impregnada na base das próteses⁴⁶.

Dessa forma, é imprescindível a realização de um método de higiene eficaz para a remoção do biofilme sobre próteses totais removíveis. Dentre os métodos de higiene, destacam-se: (1) mecânicos, através da escovação manual e limpeza com ultrassom; (2) químicos, por imersão em agentes de limpeza, desinfetantes e enxaguatórios bucais e (3) físicos, por irradiação em micro-ondas, laser de baixa intensidade e terapia fotodinâmica⁴². Custo mais baixo, acessibilidade e simplicidade fazem com que a portadores de próteses removíveis utilizem com maior frequência a escovação com dentífrico⁴², sabonete ou água⁴⁷. Sabonetes antissépticos têm sido uma alternativa de bom custo-benefício e eficiente^{48,49}. Dentre as soluções de sabonetes líquidos desinfetantes destaca-se o sabonete Lifebuoy, como uma alternativa acessível, efetiva no controle de biofilme de *C. albicans* formado sobre espécimes de resina acrílica, isentos de citotoxicidade, sem alterações das propriedades físicas e mecânicas dos espécimes após seu uso^{48,49} e efetivo na redução *C. albicans* e *C. tropicalis* coletadas da superfície interna de usuários de próteses⁵⁰. O uso do sabonete Lifebuoy associado à escovação reduziu UFC/mL de *C. albicans*⁵¹.

A escovação isoladamente é insuficiente para remover o biofilme protético^{42,52}, sobretudo quando o paciente apresenta destreza manual comprometida e perda de percepção visual, características encontradas frequentemente nos usuários de próteses totais⁴². Na tentativa de aumentar a eficácia da remoção do biofilme protético, tem sido recomendado a associação dos métodos mecânicos com os químicos⁴².

A imersão de próteses removíveis em hipoclorito de sódio e peróxido alcalino são os métodos químicos mais utilizados^{42,53-55}. O hipoclorito é um produto facilmente encontrado no comércio, custo acessível e propriedades de limpeza superiores aos demais produtos químicos desta categoria, mesmo quando utilizados em curto período de imersão e em baixa concentração⁵⁶. Um estudo in vitro simulando a imersão por 20 minutos durante 5 anos do hipoclorito de sódio em menores concentrações (0,5%) além de apresentar bons resultados microbiológicos, não alterou a cor nem a resistência a flexão do PMMA, e a alteração de rugosidade foi clinicamente aceitável⁵⁶. Um estudo clínico randomizado concluiu que a imersão em hipoclorito de sódio 0,25% foi o protocolo mais eficaz no controle de *Candida spp.* quando comparado com Ricinus communis 10% e cloramina-T 0,5%⁵⁷. Sucessivas desinfecções com hipoclorito de sódio de baixa concentração (1%) e

peróxido alcalino não alteraram as propriedades físicas e mecânicas das resinas de base de prótese^{58,59} e dentes artificiais⁶⁰. Estudos mais recentes, envolvendo concentrações de hipoclorito de sódio ainda menores (0,25%), apresentaram uma redução eficaz na contagem de UFC/mL nos espécimes de próteses^{61,62}. Menor citotoxicidade⁶³ e ausência de odor residual vêm impulsionando a utilização do peróxido alcalino como um método químico no controle antimicrobiano^{64,65}. Já o uso de digluconato de clorexidina a 2% por imersão durante 10 minutos pode proporcionar uma desinfecção duradoura em próteses totais colonizadas por *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina⁶⁶.

Nenhum estudo, até o momento, avaliando protocolos de higienização em resinas para base protética impressas pela tecnologia 3D foi encontrado. Logo, nossa proposta visa estabelecer um protocolo de higiene seguro e eficaz, reunindo as vantagens de cada método de desinfecção, bem como a associação do método mecânico (escovação) e químico (imersão) no controle do biofilme formado sobre as bases de próteses dessa nova categoria de resina, confeccionadas pela tecnologia de impressão 3D.

2 PROPOSIÇÃO

Avaliar a efetividade de protocolos de higiene por imersão (hipoclorito de sódio 0,25%, digluconato de clorexidina 2% e peróxido alcalino), associado ou não com a escovação em solução de sabonete Lifebuoy 0,78% de uma resina de impressão 3D para base protética após a realização desses protocolos por meio da:

- a) Rugosidade, antes e após a associação dos métodos de imersão e escovação (μm);
- b) Contagem de unidades formadoras e colônia por mL (UFC/mL);
- c) Metabolismo celular (ensaio de XTT)
- d) Avaliação descritiva do biofilme por microscópio confocal de varredura a laser
- e) Avaliação descritiva da morfologia biofilme sobre os espécimes utilizando microscopia eletrônica de varredura;

Considera-se como hipóteses nulas deste estudo, no que diz respeito a:

- a) Efetividade dos protocolos de higiene, a hipótese nula considera que a formação de biofilme de *C. albicans*: (a) não é influenciada pelo tipo de resina para base protética utilizada; (b) os protocolos de higiene não são efetivos; (c) não há benefícios na associação do método de escovação e imersão.
- b) Rugosidade, a hipótese nula considera que não há alteração na rugosidade superficial das resinas para base protética após a associação da escovação e imersão.
- c) Estrutura do biofilme formado sobre os espécimes e a morfologia celular deste biofilme, a hipótese nula considera que não há diferença entre o biofilme sobre as resinas.
- d) Avaliação descritiva do biofilme sobre os espécimes após os ciclos de escovação e imersão, a hipótese nula considera que não há diferença entre as soluções de imersão e não há diferença entre as resinas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão de literatura desta tese foi estruturada segmentando o tema central em tópicos chaves, a fim de possibilitar uma compreensão lógica do tema.

3.1 Polimetilmetacrilato (PMMA)

O primeiro relato na literatura do polimetilmetacrilato (PMMA) é 1843, como um polímero de ácido acrílico⁶⁷. Seu uso como um biomaterial foi crescendo paulatinamente, e na década de 40 passou a ser indispensável dentro da prática laboratorial e odontológica. Hoje o PMMA é um material amplamente utilizado na odontologia, sua aplicação inclui: base de próteses removíveis, dentes artificiais, coroas provisórias, reparo e reembasamento de próteses dentárias removíveis, moldeira individual, aparelho ortodôntico móvel, placa oclusal e prótese obturadora de palato². O PMMA é o material mais utilizado para confecção de próteses removíveis, esse fato se deve ao custo acessível, estética satisfatória, biocompatibilidade, fácil manipulação, facilidade de reparos².

Entretanto é válido pontuar que a cavidade oral representa um ambiente hostil, desfavorável e desafiador para todos os materiais dentários, inclusive o PMMA⁶⁸. O PMMA em ambiente oral está constantemente exposto a saliva, carga mastigatória, alterações térmicas e químicas, que resultam na biodegradação deste material⁶⁸. A literatura aponta como as principais consequências da biodegradação do PMMA a liberação de compostos potencialmente tóxicos, alteração das propriedades físicas e mecânicas⁶⁸. Atrelado à biodegradação, o PMMA apresenta algumas características negativas que limitam seu uso, como: (1) baixa resistência ao desgaste em ambiente úmido, como a cavidade oral^{1,2}; (2) contração de polimerização; (3) redução da força flexural devido à sorção de água^{1,6,2}; (4) facilidade de adesão microbiana^{3-5,19}; (5) adsorção de corantes, resultando em manchamento⁶⁸; (6) baixa condutibilidade térmica², fato que limita a sensibilidade térmica do paciente com os alimentos².

Diante das limitações mecânicas e químicas do PMMA, há uma busca incessante por materiais que minimizem essas restrições, seja por uma alteração do processo de polimerização^{7,16,69}, alteração dos componentes químicos^{1,6,70}, ou até mesmo pela criação de um novo material⁷¹⁻⁷³. O PMMA é convencionalmente polimerizado em banho de água quente⁶⁹. A polimerização por micro-ondas tem

resultados compatíveis em relação à porosidade, sorção de água e solubilidade com a técnica convencional quando realizado em ciclos mais longos (25 min)⁶⁹. Entretanto, o PMMA pode sofrer alterações de porosidade quando são expostos a técnica de micro-ondas, independentemente do tempo do ciclo, com espessuras finas⁷. No cenário do fluxo digital, o PMMA passou por uma alteração no seu processo de polimerização, já que passaram a ser utilizados blocos de resina pré-polimerizada a base de PMMA para serem fresadas no sistema CAD/CAM¹⁶. Uma pesquisa in vitro avaliando propriedades superficiais (hidrofobicidade, rugosidade da superficial e microdureza) de dois blocos de PMMA para CAD/CAM em comparação com o PMMA convencional, conclui que os blocos de PMMA para CAD/CAM apresentaram dureza superficial e hidrofobicidade significativamente maior que o PMMA convencional¹⁶. Entretanto o maior valor de rugosidade superficial, ficou por conta do PMMA convencional¹⁶. A porosidade inferior do PMMA para CAD/CAM diminui consideravelmente a possibilidade de micro-organismos como *C. albicans* se desenvolverem sobre a superfície da prótese¹².

Uma pesquisa in vitro adicionou partículas de borracha nitrílica butadieno (NBR) e carga cerâmica ao PMMA com o objetivo de melhorar as propriedades mecânicas do PMMA¹. O NBR atua como modificador de impacto enquanto as cargas cerâmicas melhoram os mecanismos de tenacidade¹. Dentre as várias combinações avaliadas, a associação de 10% em peso de NBR e 5% Al₂O₃ produziu a densidade ideal (1,049 g/cm³), apresentou aumento da resistência ao impacto e diminuiu a tenacidade à fratura¹. Outro estudo in vitro, por sua vez, adicionou diferentes polímeros como o politetrafluoretileno (PTFE) ao PMMA com o objetivo de melhorar as propriedades mecânicas do mesmo⁶. A adição do PTFE não alterou a dureza superficial e prejudicou a resistência à flexão, resistência ao impacto e carga de ruptura⁶. Logo, a adição de politetrafluoretileno obteve êxito na melhoria das propriedades mecânicas. Na tentativa de minimizar a adesão microbiana à base da prótese removível, a literatura estuda a incorporação de compostos, como foi o caso do metacrilato de 2 tert-butylaminoethyl (TBAEMA)⁷⁰. A expectativa é que presença de grupos de amino possibilitem uma ação antimicrobiana à base da prótese⁷⁰. Entretanto foi verificado que a incorporação do TBAEMA afetou a força flexural, a depender da concentração do TBAEMA⁷⁰.

Além dessas limitações inerentes ao biomaterial PMMA, a técnica convencional para confecção de próteses removíveis utilizando este material

demanda alguns atendimentos clínicos e laboratoriais que representam um custo considerável. Dessa forma há vários relatos na literatura que buscam simplificar os passos clínicos da prótese removível, ou simplificar o passo-a-passo laboratorial de sua confecção⁸⁻¹⁰, ou pela implantação do fluxo digital^{11-13,74}. Como simplificação do passo-a-passo clínico é relatado a troca do arco facial pela mesa de camper⁸⁻¹⁰, utilização de apenas uma moldagem⁸⁻¹⁰. Na implantação do fluxo digital no tratamento com próteses totais removíveis, o tratamento pode ser realizado em dois atendimentos¹²: (1) coleta sistemática de dados (scaneamento, dimensão vertical oclusal (DVO), relações maxilomandibulares e seleção de dentes; (2) instalação e ajuste de próteses, enquanto que a técnica convencional leva no mínimo cinco sessões¹². Vantagens como rapidez na execução, ausência de espaço físico para armazenar os modelos, facilidade em duplicar, repetir as próteses, são pontos positivos que merecem destaque¹². Entretanto algumas limitações e desvantagens significativas devem ser pontuadas, que é a ausência do paciente na determinação da dimensão vertical, relação central, suporte labial e posição da borda incisal dos dentes superiores, plano oclusal inferior, custo elevado desse sistema¹².

Com o surgimento do fluxo digital, surgiu a possibilidade da prótese removível ser confeccionada de duas formas: (1) fresada, também chamada de tecnologia subtrativa ou (2) impressa pela tecnologia 3D, também chamada de tecnologia aditiva¹². Como já foi dito anteriormente, na técnica fresada é utilizado um bloco de PMMA pré-polimerizado¹⁶, ao passo que na impressão 3D é utilizada uma resina líquida, híbridas, com viscosidade de baixa a moderada polimerizada por luz UV²⁷.

Na literatura já é possível encontrar estudos comparando a próteses removíveis confeccionada pela técnica fresada com a técnica convencional. Quanto à adaptação, as próteses fresadas foram adequadas e com menor ajuste em relação à técnica convencional¹³. Quanto à precisão das bases de prótese, a prótese fresada foi superior ao convencional¹⁴. Quanto a adesão da base da prótese com materiais reembasadores, as próteses confeccionadas pela tecnologia CAD/CAM apresentaram forças de união mais fracas expostas à tração¹⁵.

Apesar de diferentes marcas comerciais do PMMA para CAD/CAM apresentarem variações, há uma tendência deles apresentarem hidrofobicidade superior e rugosidade superficial inferior ao PMMA convencional¹⁶. Na resistência flexural, foram encontrados resultados conflitantes: ora os blocos de PMMA convencionais apresentaram maior resistência flexural em relação aos blocos para

CAD/CAM¹⁷, hora apresentaram menor resistência flexural¹⁸. A dureza do PMMA fresado é superior ao convencional^{16,17}. Com relação a liberação de monômeros residuais, o grupo convencional apresentou maior liberação¹⁷ e maior colonização por *C. albicans*¹⁹.

O fato é que há uma carência de relatos na literatura à respeito da técnica aditiva, há uma unanimidade ao afirmar a necessidade de pesquisas investigando propriedades mecânicas e biológicas das resinas impressas²⁰⁻²³.

3.2 Resinas para Impressão 3D

Uma revisão de literatura acerca da impressão 3D mostra como definição de impressão 3D uma tecnologia onde determinado objetivo é construído camada por camada⁷⁵. A Seção Americana da organização internacional de padrões da Associação Internacional de Materiais de Teste (ASTM) é um comitê que estabelece normas técnicas de vários materiais, produtos, sistemas e serviços, a ASTM categorizou 7 formas de impressoras 3D⁷⁵. Na odontologia as impressoras mais utilizadas são a SLA (estereolitografia a laser) e DLP (processamento de luz digital), que demandam a utilização de uma resina líquida fotopolimerizável²⁷. A resina utilizada para impressão de peças utilizadas na odontologia é uma classe nova de materiais, onde a maioria desses produtos encontram-se patenteados, logo as empresas não divulgam sua composição química.

A informação disponível acerca da composição química das resinas impressas utilizadas na odontologia é restritas e não há artigos publicados sobre a composição química dessa nova classe de materiais. Sabe-se apenas que são compostos de monômeros baseados em ésteres acrílicos ou material híbrido preenchido⁷⁵. As resinas impressas são consideradas híbrida, polimerizada por luz UV e composta por: uma base, fotoiniciadores, estabilizantes e pigmentos²⁷. Sua base é constituída por monômeros ou oligômeros²⁷. Onde os mais comuns são os monômeros epóxis e monômeros acrilatos, entretanto outros também são encontrados como é o caso de monômero vinil éter^{28,29}. Os monômeros devem apresentar viscosidade em um grau baixo a moderado, para permitir uma polimerização rápida e a produção de polímeros reticulados com propriedades adequadas para as demandas mecânicas impostas²⁸. Outro componente importante é o fotoiniciador, presente em concentrações relativamente altas (3-5% em peso), com o objetivo de atingir uma polimerização rápida²⁸. A resistência mecânica dessa

categoria de resinas é um tanto limitada, devido a viscosidade baixa a moderada das bases das da resina impressa e o uso de monômeros acrilatos de cura rápida²⁷. As bases compostas por metacrilatos análogos oferecem polímeros de maior resistência e melhor biocompatibilidade²⁷. Não é possível concluir se a composição química da resina impressa é diferente ou semelhante aos materiais dentários provisórios convencionais, já que apresentam processos de fabricação distintos⁷⁵.

Com relação a avaliação de propriedades mecânicas, um artigo in vitro, comparou descritivamente, já que não foi realizado estatística dos resultados, a precisão e a força retentiva de uma base de prótese dentária confeccionada pela por uma impressora 3D com sistema DLP com a técnica convencional de polimerização térmica²⁰. A precisão foi analisada a partir de um software (GOM Inspect 3D data test software) que mediu a distância da margem do modelo até a base da prótese em 20 pontos distintos²⁰. A força retentiva foi analisada utilizando um medidor de tração utilizado para remover as bases da prótese do modelo²⁰. A base de prótese impressa pela tecnologia 3D foi mais precisa e com maior força retentiva que a base confeccionada pela técnica convencional²⁰.

Outro estudo in vitro avaliou a precisão das próteses impressas pela tecnologia 3D por uma impressora DLP, dessa vez comprando com a técnica fresada²¹. Para essa avaliação foi utilizado um programa de software de comparação 3D, que media a distância da modelo até a base interna das próteses em pontos específicos de interesse (crista alveolar posterior, abóbada palatina, limite palato duro-palato mole, tuberosidade, crista anterior, fundo de vestibulo e rafe palatina)²¹. O estudo concluiu que a técnica fresada apresentou maior precisão em todas as áreas avaliadas, em relação a técnica de impressão 3D²¹. Outro estudo in vitro, por sua vez, concluiu que a precisão e adaptação interna de próteses removíveis confeccionadas técnica de impressão 3D (impressora DLP) foi estatisticamente semelhante a técnica fresada²³. Um estudo clínico escrito por Yoon et al. 2020²², comparou a adaptação de uma base de prótese confeccionada por uma impressora 3D do tipo DLP, com uma base de prótese confeccionada por uma fresadora de 5 eixos e uma base de prótese confeccionada pela técnica convencional²². Essa precisão mensurada colocando silicone fluído na porção interna das próteses removíveis e levando para a boca do paciente e solicitando que o mesmo mantivesse ocluído na dimensão vertical e na posição de relação central que que o material polimerizasse²². Por fim o material foi removido da porção interna das

próteses e realizado a mensuração de pontos padronizados²². As três técnicas apresentaram valores de adaptação absoluta da superfície tecidual estatisticamente semelhantes²².

Scotti et al.⁷⁶ (2020) compararam in vitro a estabilidade de cor, resistência flexural de 3 pontos, dureza de knoop e rugosidade superficial de três resinas para coroas provisórias de prótese fixa: impressa 3D, PMMA autopolimerizável e resina composta⁷⁶. A resina composta apresentou os maiores valores de resistência flexural e dureza, seguido pela resina impressa e por fim a resina autopolimerizável⁷⁶. Quanto a rugosidade, a resina composta foi semelhante ao PMMA autopolimerizável e inferiores à impressa⁷⁶. Quanto a estabilidade de cor, a resina composta foi a mais estável, seguida da autopolimerizável e da impressão 3D, com menor estabilidade⁷⁶. Ainda em relação às propriedades mecânicas, outro estudo in vitro comparou dois tipos de resinas impressas, PMMA autopolimerizável e PMMA termopolimerizável, todas utilizadas para confecção de coroas provisórias de prótese fixa⁷⁷. As resinas impressas em 3D obtiveram melhores resultados nos testes de compressão e flexão em relação ao PMMA termopolimerizável⁷⁷. Outro estudo in vitro avaliou a rugosidade superficial, dureza e resistência à flexão de 3 resinas utilizadas para provisórios de coroa total (fresadas em CAD/CAM, impressão 3D e técnica convencional)⁷⁸. Resinas impressas apresentaram resistência flexural e dureza compatível com a resina fresada (CAD-CAM), e a rugosidade superficial superior que o PMMA fresado e convencional⁷⁸.

Jain et al.⁷⁹ (2022) realizaram uma revisão sistemática com metanálise a respeito de propriedades físicas e mecânicas de 3 modalidades de resinas para confecção de provisórios de prótese fixa: PMMA autopolimerizável, impressa 3D e fresada⁷⁹. Coroas provisórias impressas 3D têm propriedades mecânicas (resistência a fratura, dureza, rugosidade, resistência ao desgaste, resistência flexural) superiores as demais, entretanto apresentam propriedades físicas (estabilidade de cor, sorção e solubilidade da água) inferiores em comparação com o PMMA para CAD/CAM e o PMMA convencional para provisório⁷⁹. De maneira geral independente da composição da resina impressa utilizada em cada estudo, as resinas impressas apresentaram estabilidade de cor inferior ao PMMA fresado e o PMMA convencional⁷⁹. As resinas impressas 3D apresentaram maiores níveis de sorção de água e solubilidade em relação ao PMMA fresado e a resina bisacrílicas, entretanto o PMMA convencional para provisório obteve os maiores índices de

sorção de água e solubilidade⁷⁹. A alta sorção e solubilidade da resina impressa, possivelmente está relacionado ao seu processo de polimerização, impressão por camadas, tornando a interface mais susceptível a penetração de água⁷⁹. Outra hipótese é a presença de monômeros residuais, que aumentam a sorção de água⁷⁹. Essas duas hipóteses levam a alterações dimensionais desses materiais⁷⁹. Comparando as propriedades mecânicas do PMMA fresado e do PMMA autopolimerizável convencional, as resinas impressas apresentam: superiores em relação a resistência a fratura, resistência flexural, resistência ao desgaste e módulo elástico; inferiores em relação a dureza e resiliência; contraditórios em relação a rugosidade superficial⁷⁹.

Na busca por estudos avaliando as características biológicas de resinas impressas é possível encontrar algumas pesquisa^{73,80-82}, entretanto todas a respeito de resinas impressas para confecção de provisórios de coroa total, exceto uma única pesquisa⁸². Dessa forma há uma carência por estudos a respeito das características biológicas de bases de prótese total.

O acúmulo de biofilme de *Streptococcus mutans*, a citotoxicidade com fibroblastos gengivais e a rugosidade superficial foram avaliadas em uma pesquisa in vitro com resinas para coroas provisórias confeccionados pelo método convencional (PMMA autopolimerizável), tecnologia aditiva (impressão 3D) e subtrativa (fresada)⁸⁰. O PMMA autopolimerizável apresentou a maior rugosidade, já a rugosidade das resinas impressas e fresadas foram estatisticamente semelhantes⁸⁰. Quanto ao acúmulo de *S. mutans*, a resina impressa apresentou-se taxas significativamente superior as demais resinas, o grupo convencional e fresados foram estatisticamente semelhantes quanto a essa variável⁸⁰. Na citotoxicidade, a resina impressa apresentou viabilidade celular significativamente maior do que a fresada, entretanto o PMMA autopolimerizável foi semelhante a resina impressa e fresada⁸⁰.

Simoneti et. al.⁸¹ (2022), avaliaram acúmulo de biofilme de *S. mutans*, resistência flexural, microdureza vickers, teste de fadiga, resistência a compressão e rugosidade superficial antes e depois do polimento e formação de biofilme de 4 modalidade de resina para provisórios de prótese fixa: PMMA autopolimerizável, resina bisacrílica, resina 3D por impressora estereotipografia a laser (SLA) e resina 3D por impressora de sinterização a laser seletivo (SLS)⁸¹. A maior dureza foi obtida no PMMA autopolimerizável, a resina impressa SLA foi estatisticamente semelhante

à resina bisacrílica⁸¹. A resina impressa SLA apresentou os menores valores de resistência flexural, seguida do PMMA, resina bisacrílica e resina impressa SLS⁸¹. No teste de fadiga, o único grupo que fraturou foi a resina impressa SLA⁸¹. Com relação ao módulo de elasticidade, os menores valores foram obtidos pelas duas resinas impressas (SLA e SLS), que corresponderam a aproximadamente a metade do módulo de elasticidade do PMMA e da bisacrílica⁸¹. A resina impressa SLA obteve os menores valores de rugosidade superficial, estatisticamente semelhantes a resina bisacrílica. O PMMA autopolimerizável e a resina bisacrílica tiveram rugosidade superficial semelhante, e os maiores valores de rugosidade superficial ficaram por conta da resina impressa SLS, estatisticamente diferentes dos demais grupos⁸¹. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para a formação de biofilme entre as resinas avaliadas⁸¹. Dessa forma, o estudo em questão concluiu que a resina SLS apresentou resultados favoráveis para a microdureza, maior resistência flexural, maior resistência a fratura e formação de biofilme em comparação com o PMMA e a resina de bisacrílica. A resina impressa SLA apresentou resultados favoráveis apenas para rugosidade superficial⁸¹.

Arutyunov et al.⁷³ (2022) avaliaram a adesão microbiana de isolados clínicos in vitro sobre quatro modalidades de resinas para provisórios de prótese fixa: resina bisacrílica, PMMA curado termicamente, PMMA fresado e resina impressa 3D⁷³. A menor taxa de adesão da microbiota fúngica (*C. albicans* e *C. krusei*) foi observada nos espécimes confeccionados pela tecnologia aditiva (impressão 3D), seguido dos PMMAs curados termicamente, PMMA fresado e por fim, resina bisacrílica⁷³.

O único estudo encontrado na literatura investigando biofilme de *C. albicans* sobre espécimes de resina impressa para base de prótese removível foi descrito recentemente por Meirowitz et al.⁸² (2021). Trata-se de um estudo in vitro avaliando rugosidade superficial, hidrofobicidade (pelo ângulo de contato), adsorção de mucina (pelo ensaio de Bradford) e adesão de *C. albicans* (avaliado descritivamente por microscopia eletrônica de varredura-MEV)⁸². Nesse estudo foram avaliados quatro tipos de resina para base de próteses removíveis: impressa 3D, fresada, PMMA curado a quente e PMMA curado a frio⁸². Quanto a rugosidade superficial o PMMA curado a frio obteve a maior rugosidade em relação aos demais grupos⁸². Quanto a hidrofobicidade, o PMMA curado à fria foi significativamente maior em comparação aos demais grupos⁸². Com relação à adsorção de mucina as resinas a base de PMMA (de cura fria ou quente) apresentaram maior absorção em relação às resinas

impressas e fresadas⁸². Já em relação a adesão microbiana, a resina impressa 3D apresentou adesão significativamente superior em relação ao PMMA de cura quente e resina fresada⁸². A resina fresada apresentou a menor adesão microbiana de todos os grupos⁸². O PMMA de cura a frio obteve adesão significativamente superior que o PMMA de cura a quente⁸². A maior adesão de *C. albicans* obtida pelas resinas impressas 3D, neste estudo, não foi associada à rugosidade superficial, já que os espécimes impressos apresentaram menor rugosidade⁸². O estudo revelou uma correlação moderada com a hidrofobicidade dos espécimes, pois os grupos impressos e de cura fria apresentaram maiores valores de hidrofobicidade e valores mais altos de adesão de *C. albicans* e significativa correlação da adesão de *C. albicans* com os níveis de adsorção de mucina nas superfícies testadas⁸².

Os resultados citados acima sustentam a utilização de resinas para próteses removíveis confeccionadas pela impressão 3D do ponto de vista de adaptação e precisão²⁰⁻²³. É possível encontrar inclusive publicações acerca da técnica e casos clínicos de próteses removíveis confeccionadas pela impressão 3D^{24,25}. Entretanto, do ponto de vista físico e mecânico os estudos encontrados são acerca das resinas impressas destinadas para confecção de provisórios de prótese fixa^{76,77,79}. Logo há uma necessidade na literatura por estudos avaliando as propriedades físicas e mecânicas para resinas impressas destinadas a confecção de base de próteses removíveis. Da mesma forma, as pesquisas envolvendo propriedades biológicas sobre resinas impressas estão concentradas nas resinas impressas destinadas a confecção de provisórios de próteses fixas^{73,80,81}. Apenas um estudo⁸² avaliou propriedades biológicas sobre resinas impressas destinadas a confecção de base de próteses removíveis. Esse fato deixa claro a necessidade de investigar as características biológicas dessa nova modalidade de resina, bem como relatos acerca das técnicas de higienização a fim de possibilitar o uso mais seguro e consciente desse material.

3.3 Estomatite Protética

A estomatite protética é um processo inflamatório que afetam usuários de próteses removíveis^{35,39}. É caracterizado por áreas eritematosas, principalmente no palato, nas áreas da mucosa oral onde a prótese recobre³⁵. Estudos epidemiológicos revelam que 15% até mais de 70% dos usuários de prótese total apresentam estomatite protética, sendo a população idosa e mulheres as mais afetada³⁹. A razão

para essa grande variação possivelmente está na amostra populacional, que foi bem variada³⁹. A etiologia da estomatite protética é multifatorial, dentre os principais fatores relatados estão: má higiene da dentadura; uso contínuo e noturno de dentaduras removíveis; acúmulo de biofilme na dentadura; contaminação bacteriana e levedura da superfície de dentadura; próteses com adaptação deficiente podem aumentar o trauma mucosa; tabagismo; xerostomia; diabetes; deficiência nutricional³⁹. O principal micro-organismo envolvido na estomatite é a *C. albicans*, embora outras espécies de *Candida spp.* também possam estar envolvidas nesse processo^{30,35}.

Algumas características da *C. albicans* transformam esse micro-organismo comensal em um patógeno oportunista objeto de tantas pesquisas³¹. Sua capacidade de alterar a forma, de levedura para pseudo-hifa e hifa verdadeira é uma das características mais importantes³¹. As leveduras unicelulares crescem por brotamento; nas pseudo-hifas, as células alongam-se sem se separar da célula mãe, produzindo filamentos de botões alongados, mas retendo constrições nas junções septais; já as hifas verdadeiras consistem em cadeias de células semelhantes a tubos, sem constrições nas junções septais. Apesar da forma semelhante da pseudo-hifa com as hifas verdadeiras, há uma série de diferenças no modo de crescimento e organização do ciclo celular³¹. O crescimento de hifas, morfologia de maior virulência, é consequência de uma variedade de condições ambientais, como temperatura (37° C), pH neutro, alta concentração de CO₂³¹. Já as leveduras tem seu crescimento favorecido a 30° C e pH ácido³¹. Pseudo-hifas ocorre quando as condições ambientais se aproximam daquela que favorece o crescimento de hifas, por exemplo: 35 ° C ou pH 5,5³¹.

Candida spp. causam infecções frequentemente devido à sua capacidade de formar biofilmes³². A formação do biofilme é um processo cíclico que: (1) inicia-se com a adesão leveduras a um substrato; (2) em seguida as leveduras se proliferam através da superfície e produzem projeções alongadas que crescem em formas filamentosas, incluindo hifas ou pseudo-hifas; (3) a fase da maturação é caracterizada pela expansão da biomassa, na qual a matriz extracelular se acumula, o que gera uma resistência a medicamento; (4) por fim a fase de dispersão, onde as células não aderidas são liberadas do biofilme para o meio³².

Um grande diferencial desta doença é justamente o uso da prótese removível pelo hospedeiro. Chau et al.³⁴ (1995) demonstraram a capacidade que o micro-

organismos apresentam em penetrar em profundidade na resina acrílica³⁴. A revisão escrita por Pereira-Cenci et al.³⁵ (2008), descreve os fatores envolvidos na adesão e penetração da *Candida spp.* à superfície de resina acrílica para base protética³⁵. Dentre eles, pode-se destacar: carga superficial, energia livre de superfície, hidrofobicidade, rugosidade, composição de biomateriais³⁵. A respeito da energia livre de superfície foi observado uma relação linear entre o ângulo de contato da resina acrílica e a adesão à *Candida albicans*³⁵. Logo, quanto maior a energia livre da superfície, maior a adesão de micro-organismos³⁵. Com relação a hidrofobicidade, quanto mais hidrofóbica a superfície, menor será a adesão³⁵. Quanto maior a rugosidade de uma superfície, maior será a quantidade de micro-organismos aderidos, pois as irregularidades funcionam como um reservatório, aumentando a retenção e protegendo contra forças de cisalhamento que tendem a remover as células durante a limpeza³⁵. A capacidade da *Candida spp.* de aderir-se e formar biofilmes estruturados em resina para base protética vem sendo apontada como um dos principais responsáveis pelo desenvolvimento da estomatite protética⁴³, já que esses os micro-organismos ficam em contato constante com a mucosa o paciente⁴³.

Hilgert et al.⁴³ (2016) realizaram uma revisão sistemática seguido de metanálise de estudos clínicos randomizados para avaliar a eficácia de diferentes medicamentos no tratamento da estomatite protética⁴³. Nesta revisão sistemática os resultados sustentam o uso da nistatina associado a agentes desinfetantes no tratamento da estomatite protética⁴³. Rautema et al.³⁰ (2011) escreveram uma revisão de literatura a respeito do impacto da candidose oral em pacientes com imunidade medicamentosa comprometida³⁰. Esta revisão esclarece que a candidose oral se origina do biofilme bacteriano (placa dentária), em associação com a *Candida spp.*, entretanto o agente causal mais comum é a *C. albicans*³⁰. Antifúngicos azólicos devem ser evitados em pacientes que apresentam infecções recorrentes, devido ao risco de seleção de cepas resistentes. É preciso ficar atento pois a Candidose oral pode ser um sintoma de uma doença sistêmica não identificada, como HIV ou diabetes³⁰.

Um fato importante a ser frisado é que *C. albicans* quando avaliada in vitro, na sua forma planctônica (livre) é suscetível a todos os antifúngicos comumente usados, entretanto quando está na forma de biofilme é altamente resistente à maioria dos antifúngicos disponíveis³⁰. Dessa forma, para o tratamento ser efetivo é

necessária uma destruição mecânica do biofilme, associado ao uso de componentes químicos^{30,35}.

O'Donnell et al.³⁶ (2016) realizaram uma pesquisa clínica envolvendo 130 usuários de prótese total. A prótese total dos pacientes foi sonicada para remoção o biofilme aderido a elas³⁶. Em seguida o DNA foi extraído das amostras e avaliado para a presença de patógenos respiratórios por PCR (reação quantitativa da cadeia de polimerase)³⁶. 64,6% das próteses sonicadas estavam colonizadas por patógenos respiratórios conhecidos, como: *Streptococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae B*, *Streptococcus pyogenes* e *Moraxella catarrhalis*³⁶. Sendo a *P. aeruginosa* a espécie mais abundante seguida por *S. pneumoniae* e *S. aureus*³⁶. Dos pacientes participantes, 37% sofreram de estomatite de dentadura, entretanto não foi encontrado diferença significativa na prevalência de patógenos respiratórios entre os pacientes com e sem estomatite protética³⁶. Da mesma forma, Sumi et al.³⁷ (2002) e Sumi et al.³⁸ (2003) coletaram por meio de cultura, o biofilme de 50 usuários de próteses removíveis³⁷ e nesse biofilme encontraram bactérias aderidas à prótese que comumente causam infecções respiratória³⁷. Foi observado uma concordância de 68,5% entre as espécies das próteses e as espécies da mucosa faríngea³⁸. O fato é que a prótese atua como um reservatório de patógenos respiratórios dentro da cavidade oral³⁶, realzade que aumenta o risco de pneumonia aspirativa³⁶.

Janssens et al.³ (2004) citaram em sua revisão de literatura, a respeito de pneumonia, a saúde bucal precária como um fator de risco ao surgimento da doença³. Da mesma forma, Sjögren et al.⁴ (2008) em sua revisão sistemática a cerca de estudos clínicos randomizados avaliando o efeito preventivo da higiene bucal na pneumonia e infecção do trato respiratório de idosos em hospitais e asilos⁴. Os estudos clínicos randomizados revelaram que a prevenção com a higiene bucal obteve um efeito positivos na pneumonia e infecção do trato respiratório, com reduções absolutas de risco da doença de 6,6% a 11,7% e redução de 8,6 a 15,3 no números de indivíduos com necessidade de serem tratados⁴. Aproximadamente um em cada 10 casos de morte por pneumonia em idosos residentes em asilos pode ser evitado melhorando a higiene bucal⁴. Compactuando da mesma ideia, Terpenning et al.⁵ (2005) concluíram em seu estudo que o risco de pneumonia aspirativa é maior quando doença periodontal, cárie dentária e má higiene bucal estão presentes⁵.

Os principais usuários de prótese removível são os idosos⁴⁰, e boa parte desses idosos não conseguem higienizar as próteses adequadamente^{41,42}. Kanli et al.⁴¹ (2005) em seu estudo clínico encontraram uma correlação positiva entre próteses removíveis má higienizadas e a prevalência de *C. albicans*⁴¹. Esses achados da literatura nos permitem concluir que os usuários de prótese removível merecem uma atenção especial, pois a correta higienização da prótese é um fator importantíssimo na manutenção da saúde bucal, prevenção da estomatite protética⁴². Importante frisar que não foi encontrado nenhum estudo relatando a estomatite protética em usuários de prótese removível confeccionadas pela técnica de impressão 3D.

3.4 Protocolos de Higienização de Prótese Total

Uma revisão sistemática descrita por Papadiochou et al.⁴² (2018) a respeito da eficiência dos protocolos de higiene de próteses removíveis e hábitos dos pacientes em relação à higiene, revelou que a associação de um método mecânico (escovação convencional ou ultrassom) com um agente químico, levou aos resultados mais eficazes na redução da porcentagem do biofilme aderido a dentadura e/ou UFC/mL⁴². No que diz respeito aos hábitos dos pacientes, a escovação é o método mais comumente aplicado⁴². Com relação aos agentes químicos mais comumente utilizados, destacam-se: peróxido alcalino, hipoclorito de sódio, digluconato de clorexidina⁴².

Silva et al.⁸³ (2011) estudaram o efeito da imersão do hipoclorito de sódio (1% e 2%) e gluconato de clorexidina (4%) na viabilidade celular, remoção de biofilme e morfologia do biofilme de *C. albicans* formando sobre espécimes de resina acrílica para base protética através da microscopia confocal e microscopia eletrônica de varredura (MEV)⁸³. Apesar de todas as soluções apresentarem efeito fungicida sobre as células de *C. albicans*, o gluconato de clorexidina não foi capaz de eliminar as células mortas aderidas à superfície sem alterações morfológicas⁸³. Segundo este estudo, o hipoclorito de sódio (1% e 2%) foi capaz não só de matar como também de eliminar quase que completamente as células de *C. albicans* mortas aderidas na resina acrílica⁸³. Como uma possível explicação para a remoção das células mortas pelas soluções de hipoclorito, o estudo cita o pH⁸³. O biofilme natural é formado em um pH próximo ao neutro, dessa forma valores superiores ou inferiores a esses alteram o metabolismo e as propriedades superficiais do micro-organismo, bem

como da superfície ao qual o micro-organismo se aderiu, aumentando a repulsão eletrostática entre eles e consequentemente a adesão do micro-organismo à superfície em questão⁸³. O hipoclorito apresenta um pH alcalino ($\text{pH} > 11$), enquanto que a clorexidina é vendida em pH neutro, isso possivelmente explica o fato das células permanecerem aderidas à superfície com o uso da clorexidina⁸³.

Badaró et al.⁸⁴ (2021) realizaram uma pesquisa in vitro onde biofilmes de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* foram formados sobre resinas acrílicas para base de dentadura polimerizadas termicamente. Em seguida esses espécimes foram submetidos a imersão por 20 minutos em quatro soluções químicas: água destilada, hipoclorito 0,25%, Ricinus communis 10% e Cloromina T 0,5%⁸⁴. O estudo avaliou: (1) UFC/mL, (2) metabolismo celular por XTT, (3) microscopia de fluorescência para avaliar a remoção do biofilme e as células vivas/mortas aderidas aos espécimes, (4) produção de protease e fosfolipase e (5) formação de hifas⁸⁴. O hipoclorito de sódio 0,25% reduziu completamente o metabolismo celular (XTT) de todas as espécies avaliadas, reduziu completamente o UFC/mL e removeu quase que completamente as células vivas/mortas sobre espécimes de resina acrílica⁸⁴. Não houve diferença na produção de fosfolipase pela *Candida spp.* após a imersão nas diferentes soluções desinfetantes⁸⁴. Esse estudo conclui indicando o uso da concentração de 0,25% de hipoclorito como uma solução de padrão-ouro para ser utilizada em futuras pesquisas⁸⁴.

Silva et al.⁸⁵ (2008) avaliaram o efeito in vitro da imersão por 10 min de seis soluções desinfetantes na descontaminação de espécimes de resina acrílica para base protética contaminados por *C. albicans*, *S. mutans*, *S. aureus* e *Escherichia coli* e o efeito dessas soluções na rugosidade superficial⁸⁵. As soluções utilizadas foram: hipoclorito de sódio 1%, digluconato de clorexidina 2%, glutaraldeído 2%, vinagre 100%, pastilha efervescente à base de perborato de sódio e perborato de sódio 3,8%⁸⁵. A metodologia utilizada para contabilizar a redução microbiana foi por uma análise de regressão linear por curva padrão para correlacionar a densidade óptica de cada microrganismo com o valor de UFC/mL⁸⁵. A maior redução microbiana foi obtida pela imersão dos espécimes em hipoclorito de sódio, glutaraldeído e digluconato de clorexidina⁸⁵. Seguido pelo vinagre, perborato de sódio 3,8% e pastilha efervescente à base de perborato de sódio⁸⁵. Após 10 ciclos de imersão de 10 minutos cada, observou-se que a maior rugosidade foi encontrada nos espécimes

submetidos à desinfecção em perborato de sódio de 3,8% e menor rugosidade após os ciclos com digluconato de clorexidina⁸⁵.

Na busca por pesquisas clínicas, foi encontrado uma pesquisa desenvolvida por Gornitsky et al.⁸⁶ (2002). Esse estudo avaliou a eficácia de três marcas comerciais de limpadores de próteses removíveis: (1) Denture Brite, pH 1,8, um pó efervescente que produz oxigênio e composto por peroximonossulfato de potássio, bissulfato de potássio, sulfato de potássio e peroxibissulfato de potássio; (2) Polident Overnight, pH 7,0, pastilha efervescente que produz dióxido de carbono e composto por ácido cítrico, bicarbonato de sódio e monossulfato de potássio; (3) efferdent New Concentrated Blue Tablet, pH 7,5, pastilha efervescente que produz dióxido de carbono e composto por ácido cítrico, bicarbonato de sódio e monossulfato de potássio⁸⁶. Foram coletadas amostras microbiológicas de próteses totais utilizadas por idosos de um hospital antes e após um período de 3 semanas de uso dos limpadores avaliados na investigação. As próteses tratadas com Denture Brite apresentaram maior redução estatística de UFC/mL *Candida spp.* em relação ao Efferdent. Denture Brite e Polident foram estatisticamente semelhantes, enquanto que o Efferdent não apresentou redução de UFC/mL em relação ao grupo controle.

Vieira et al.⁸⁷ (2010) avaliaram in vitro a eficácia de soluções desinfetantes contra a recolonização de biofilme de *C. albicans* e *C. glabrata* sobre a superfície de uma resina para reembasamento de próteses removíveis⁸⁷. Na investigação utilizaram a imersão em: peróxidos alcalinos por 3 minutos, peróxidos alcalinos por 15 minutos e hipoclorito 0,5% por 10 minutos. O estudo avaliou ainda a rugosidade superficial antes e após os tratamentos⁸⁷. Os resultados da pesquisa demonstraram que todas as soluções imersão resultaram em um aumento da rugosidade superficial, esse fato sugere que essas mudanças provavelmente ocorrem com a prótese em boca, considerando que ela está imersa em saliva durante seu uso. Com relação a eficácia das soluções desinfetantes, o estudo concluiu que o peróxido alcalino, 3 e 15 minutos de imersão, não foram eficientes na remoção do biofilme de *Candida spp.* sobre os espécimes de resina para reembasamento de base de prótese e não impediram a recolonização do biofilme⁸⁷. Já o hipoclorito 0,5% foi único tratamento eficaz, já que não foi observado crescimento celular *Candida spp.*⁸⁷.

Rossato et al.⁸⁸ (2011), realizaram um estudo clínico onde os participantes foram instruídos a utilizar um aparelho maxilar removíveis por um dia, sem higienizá-lo. Após esse período os aparelhos foram submetidos a 6 métodos de higiene: (1)

lavagem em água corrente por 20 s; (2) peróxido alcalino- Corega por 5 min; (3) peróxido alcalino- Corega por 30 min; (4) escovação com água e sabão líquido por 40 s; (5) hipoclorito alcalino por 10 minutos; (6) cloro 0,45% por 10 min. A imersão em hipoclorito alcalino foi o método de higiene com a maior redução da placa bacteriana, seguido pela solução de cloro 0,48% e escovação com água e sabão líquido. Um fato interessante é que a imersão do peróxido alcalino- Corega por 30 min obteve uma eficácia semelhante à do hipoclorito alcalino, entretanto o tempo de imersão recomendado pelo fabricante é de 10 minutos.

No que diz respeito ao uso da escovação no controle do biofilme aderido à resina acrílica para base protética, Panariello et al.⁶⁴ (2016) avaliaram in vitro a contaminação de biofilme de *C. albicans*, *C. glabrata*, e *S. mutans*⁶⁴. Após a contaminação, os espécimes foram submetidos a escovação ou imersão por 10 segundos em seis soluções desinfetantes: água destilada, ácido peracético 0,2%, digluconato de clorexidina 1%, solução de dentrífcio na proporção 1:1 água/dentífrice, hipoclorito de sódio 1% e perborato de sódio/corega de sódio. O efeito das soluções de imersão foi avaliado pelo ensaio de XTT (metabolismo) e contagem de colônias (UFC/mL). Os melhores resultados foram obtidos pela ação combinada da escovação com agentes químicos. A escovação utilizando hipoclorito de sódio 1%, reduziu 99,9% do metabolismo e a escovação utilizando o digluconato de clorexidina 1%, que reduziu 99,5%⁶⁴. Entretanto o estudo faz questão de frisar o resultado eficiente da imersão por 10s em ácido peracético 0,2% e hipoclorito de sódio 1%, achado importantíssimo principalmente para paciente com dificuldade motora para escovação da prótese⁶⁴.

Pellizzaro et al.⁵⁵ (2012) realizaram um estudo in vitro com o objetivo de avaliar eficácia da associação da escovação com a imersão em agentes desinfetantes na redução do biofilme de *C. albicans* aderidos sobre espécimes de resina acrílica por meio do ensaio XTT (metabolismo celular)⁵⁵. Na metodologia os espécimes contaminados foram submetidos a 10 protocolos de higiene: 5 apenas de imersão e 5 de imersão e escovação⁵⁵. As soluções avaliadas foram: água destilada, solução de dentífrico colgate, gluconato de clorexidina 2%, hipoclorito de sódio 1%, solução de dentífrico polident⁵⁵. A associação das técnicas foi significativamente mais eficaz na redução da viabilidade do biofilme do que a imersão isolada. Escovação com Clorexidina e hipoclorito resultou na remoção de 100% do biofilme⁵⁵. A imersão nos agentes reduziu significativamente a viabilidade do biofilme, a

associação com a escovação se mostrou o método mais eficiente na redução do biofilme *C. albicans*, sendo a clorexidina 2% e o hipoclorito de sódio 1% as soluções mais eficazes⁵⁵.

Zoccolotti et al.⁴⁸ (2018) contaminaram in vitro com biofilme de *C. albicans* espécimes de resina acrílica para base protética em seguida submeteu a quatro protocolos distintos de desinfecção, o grupo controle e três grupos experimentais envolvendo sabonetes antissépticos líquidos⁴⁸: (1) água destilada a 37°C- grupo controle); (2) imersão em solução de sabonete Dettol a 0,39% por 8 horas, seguido de imersão em água destilada por 16 horas; (3) imersão em solução de sabonete Protex a 3,12% por 8 horas, seguido de imersão em água destilada por 16 horas; (4) imersão em solução de sabonete Lifebuoy a 0,78% por 8 horas, seguido de imersão em água destilada por 16 horas⁴⁸. A escolha da concentração dos sabonetes foi tomada após a determinação da concentração mínima inibitória (MIC)⁴⁸. O estudo avaliou a fase de adesão por biofilme de *C. albicans*, redução de biofilmes fúngicos maduro, citotoxicidade, rugosidade superficial, dureza e mudança de cor⁴⁸. Nenhum dos grupos foi capaz impedir a adesão de células de levedura após a fase de adesão⁴⁸. Com relação a redução do biofilme após 8 horas de imersão nos sabonetes antissépticos o grupo protex apresentou uma leve redução do biofilme em relação ao grupo controle, já os grupos imersos em Dettol e Lifebuoy apresentaram eliminação total do biofilme sobre os espécimes. Nenhum dos sabonetes avaliados foram classificados com citotóxicos. Os sabonetes não influenciaram na rugosidade dos espécimes, mas o lifebuoy alterou a dureza dos espécimes.

Zoccolotti et al.⁴⁹ (2019), avaliaram a dureza, a rugosidade e a estabilidade da cor de três marcas comerciais de dentes artificiais de resina acrílica (Vipi, Biolux e Artiplus) após ciclos de imersão em sabonetes desinfetantes líquidos expostos a 0, 7, 14, 21 e 28 dias de imersão⁴⁹. A pesquisa envolveu ao todo 4 grupos, 3 experimentais e um controle: (1) água destilada a 37°C- grupo controle); (2) imersão em solução de sabonete Dettol a 0,39% por 8 horas, seguido de imersão em água destilada por 16 horas; (3) imersão em solução de sabonete Protex a 3,12% por 8 horas, seguido de imersão em água destilada por 16 horas; (4) imersão em solução de sabonete Lifebuoy a 0,78% por 8 horas, seguido de imersão em água destilada por 16 horas⁴⁹. Os dentes da Vipi apresentaram redução da dureza e da rugosidade antes do 7º dia de imersão em todos os quatro grupos avaliados e os valores se mantiveram durante os 28 dias⁴⁹. Os dentes da Biolux não alteraram a dureza em

nenhum dos tempos avaliados e tiveram sua rugosidade aumentada após 21 e 28 dias, em todas as soluções⁴⁹. Já os dentes da artiPlus mantiveram rugosidade e dureza em todo o tempo da avaliação, em todas as soluções expostas. Com relação a alteração de cor, todas foram consideradas clinicamente aceitáveis⁴⁹. Como conclusão o estudo indicado o uso de sabonetes antissépticos líquidos como uma alternativa para desinfecção de próteses removíveis⁴⁹.

Ribas et al.⁵¹ (2022) avaliaram in vitro o efeito da escovação com sabonete Lifebuoy na rugosidade, dureza, estabilidade de cor e propriedades biológicas de uma resina para base de prótese termopolimerizada⁵¹. Não foi observado alteração quanto nas propriedades superficiais. Entretanto o Lifebuoy, associado a escovação, reduziu o biofilme formado sobre os espécimes (UFC/mL)⁵¹.

É interessante observar que as soluções de higiene avaliadas nos estudos acima se repetem na maioria estudos, deixando claro quais são as soluções mais utilizadas rotineiramente: hipoclorito de sódio, digluconato de clorexidina, peróxido alcalino. Os artigos cuidadosamente revisados acima permitem concluir que há uma necessidade em investigar o efeito dessas principais soluções de higiene sobre espécimes de resina impressa 3D para base de prótese removível. Estudos envolvendo escovação são mais restritos, o que torna relevante investigar a escovação em resina impressa para base protética, bem como a associação da escovação com a imersão. Dessa forma, baseado nos achados da literatura, o presente estudo foi planejado e conduzido.

4 MATERIAL E MÉTODO

A seguir foi descrito detalhadamente os materiais utilizados neste estudo, bem como a metodologia aplicada a cada etapa da pesquisa.

4.1 Material

Todos os materiais utilizados para a metodologia deste projeto, incluindo equipamentos e instrumentais, estão relatados no Anexo A desta tese, juntamente com informações da marca e cidade, estado e país de fabricação.

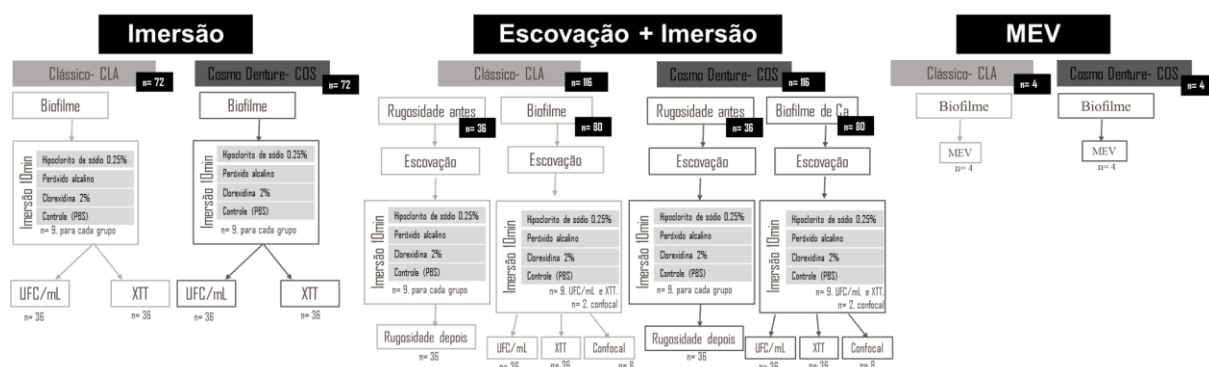
4.2 Método

Cada etapa da metodologia desenvolvida neste estudo foi descrita nos tópicos abaixo.

4.2.1 Distribuição dos espécimes

Foram confeccionados 192 espécimes do grupo experimental (resina impressa Cosmos Denture-COS) e 192 do grupo controle (resina acrílica ativada termicamente da Clássico-CLA), distribuídos aleatoriamente conforme Figura 1. Os experimentos de imersão (72 COS e 72 CLA); escovação + imersão (72 COS e 72 CLA) e rugosidade (36 COS e 36 CLA); microscopia confocal a laser (8 COS e 8 CLA); microscopia eletrônica de varredura (4 COS e 4 CLA).

Figura 1- Esquema para distribuição dos espécimes para os experimentos

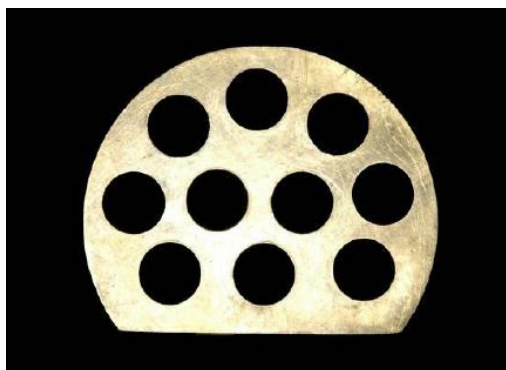


Fonte: Elaboração própria.

4.2.1.1 Confeção dos espécimes de resina CLA

Para a obtenção dos espécimes da resina CLA, uma matriz metálica⁸⁹ (Figura 2) contendo 10 orifícios com 10 mm de diâmetro e 1,2 mm de espessura, foi incluída em mufla metálica com gesso pedra tipo III sobre uma lâmina de vidro previamente jateadas com óxido de alumínio para padronizar a rugosidade da superfície das amostras em aproximadamente $3,0 \mu\text{m}^{90}$, simulando a superfície interna das próteses. Após a cristalização do gesso da mufla, uma nova lâmina de vidro jateada foi posicionada sobre o conjunto matriz metálica/gesso tipo III, a contra-mufla foi posicionada e foi vazado nova porção de gesso tipo III, completando-se assim a fase de inclusão⁹¹.

Figura 2- Matriz metálica



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Após a abertura da mufla (Figura 3), e isolamento com Cel-lac, procedeu-se com a prensagem da resina acrílica CLA para base protética. A resina CLA foi manipulada na proporção em volume pó/líquido (3:1), seguindo as recomendações do fabricante. O pó será pesado em uma balança de precisão eletrônica e o líquido mensurado com o auxílio de uma pipeta.

Figura 3- Mufla aberta para prensagem da resina



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

A prensagem foi realizada sob prensa hidráulica em duas etapas, inicial e final. A prensagem inicial foi realizada com uma carga de 0,5 tonelada-força. Logo após, a mufla será aberta, e o excesso de resina foi removido com auxílio de Le Cron. Na prensagem final, cargas de 0,5, 0,75 e 1,25 toneladas-força foram exercidas sobre a mufla metálica.

Foi aguardado um período de 30 minutos sob prensa, a fim de possibilitar uma correta acomodação da resina no interior da matriz metálica, bem como uma agregação adequada do monômero ao polímero da resina⁷⁰. Passado esse período, as muflas foram fechadas com auxílio de parafusos específicos e, então, levadas para polimerização no ciclo estabelecido de 1 ½ horas a 73°C + ½ hora a 100°C em banho de água em termopolimerizadora automática (banho Maria SL- 150). Ao final da polimerização, a mufla foi resfriada na bancada por uma noite e, então, os espécimes foram desincluídos.

4.2.1.2 Confeção dos espécimes de resina COS

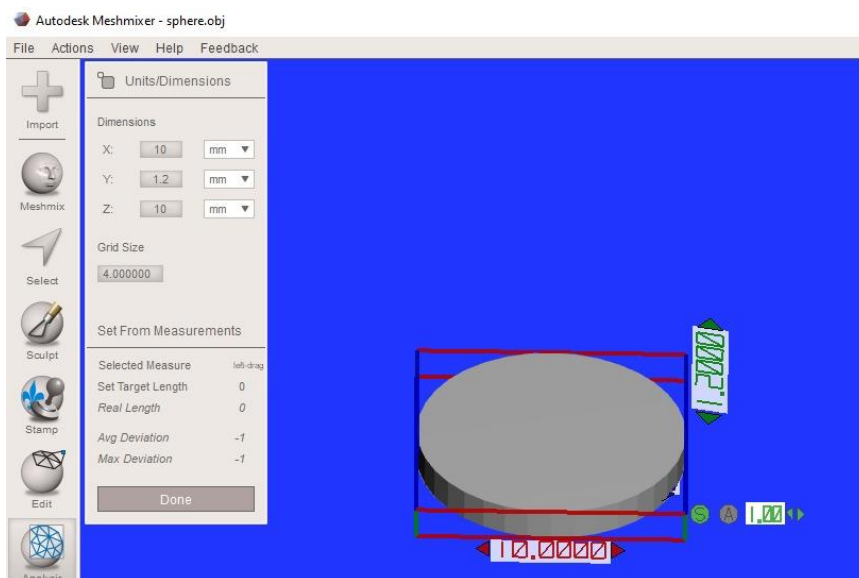
Os espécimes dos grupos experimentais COS foram confeccionados pela técnica de impressão aditiva com a impressora Flashforge Hunter DLP Resin 3D Printer (Figura 4) com diâmetro 10 mm e espessura 1,2 mm. O desenho virtual dos espécimes foi realizado no software Adobe Meshmixer (Figura 5), no formato do próprio software FlashDLPrint. Um arquivo stl foi preparado e carregado no software próprio da impressora (FlashDLPrint v. 3.28.0) (Figura 6), para possibilitar o desenho de suportes e impressão dos espécimes com angulação de 0° em relação à plataforma, seguindo orientações da literatura atual, a fim de proporcionar melhor qualidade dos espécimes, adequada rugosidade superficial⁷¹. Os espécimes foram impressos em parceria com a Done 3D (Ribeirão Preto-SP).

Figura 4- Impressora Flashforge – Hunter DLP Resin 3D Printer



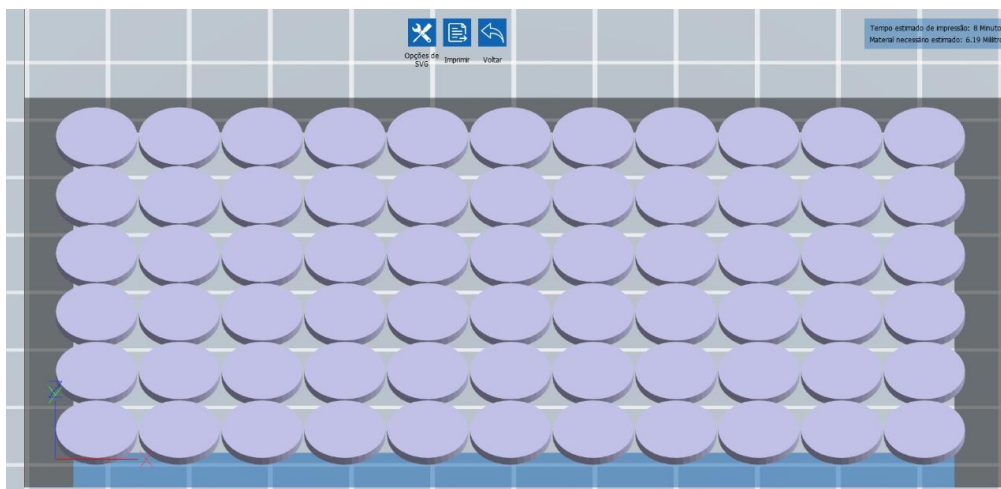
Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Figura 5- Desenho virtual dos espécimes será realizado no software Adobe Meshmixer



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Figura 6- Layout dos espécimes para impressão no software FlashDLPrint



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

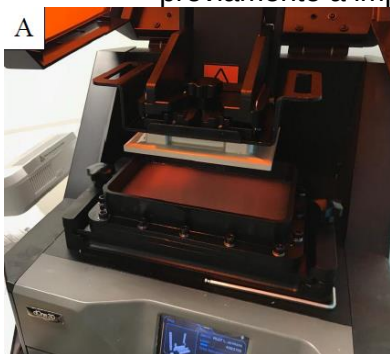
Com o desenho e o fatiamento dos espécimes, a resina para base protética Cosmos Denture (COS), Figura 7, foi depositada no tanque da impressora antes da impressão dos espécimes (Figura 8). A impressão dos espécimes sob a plataforma do equipamento aconteceu por meio da polimerização com luz ultravioleta (painel LED, $\lambda = 405\text{nm}$). O processo de impressão dos espécimes foi realizado conforme as recomendações do fabricante (ex.: tempo de polimerização por camada, intervalo e % de energia), usando-se uma espessura de camada de 50 μm , coerente com os parâmetros atuais da literatura.

Figura 7- Resinas nacionais para impressão 3D Cosmos Denture (base protética)



Fonte: Imagem retirada do site da empresa Yllers e autorizada para a reprodução desta imagem.

Figura 8- Resina para base protética depositada no tanque próprio da impressora previamente à impressão



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Após a impressão, removeu-se a plataforma da impressora e destacou-se os espécimes aderidos. Os espécimes foram lavados em álcool isopropílico 99% e secos, em seguida submetidos a polimerização complementar por luz UV (imersos em água) no equipamento Curing Box (Figura 9) por 10 minutos.

Figura 9- Equipamento Curing Box para polimerização adicional em luz UV



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

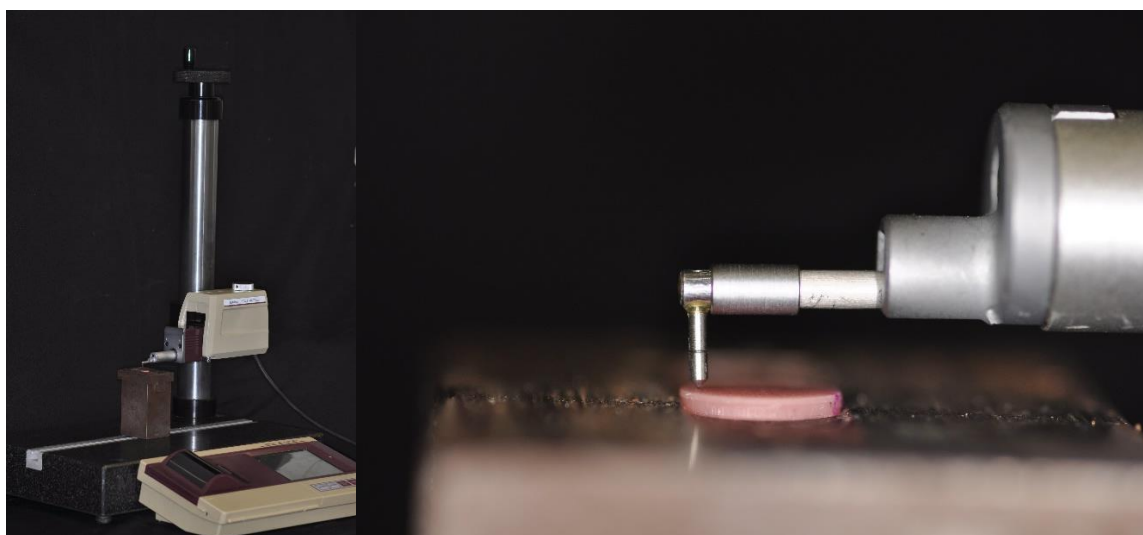
4.2.1.3 Caracterização da rugosidade dos espécimes

Os espécimes (CLA e COS), após sua confecção, foram avaliados no rugosímetro digital portátil modelo SJ-400 (Mitutoyo Corporation, Japão) de precisão de 0,01 μm (Figura 10). O percurso do rugosímetro foi de 2,4 mm, com velocidade

de 0,5 mm/s da ponta ativa, e o raio de 5 μm . Foram realizadas três mensurações por espécime, em regiões distintas, obtendo-se a rugosidade média em Ra (μm). Não foi possível padronizar as duas categorias de resinas para uma mesma rugosidade pois a resina obtida pela técnica de impressão 3D apresenta uma rugosidade inerente ao seu processo de confecção e não permite alteração de sua rugosidade superficial. Todas as medidas foram realizadas por um único operador.

Antes da avaliação da rugosidade, os espécimes foram lavados com detergente e água destilada durante 1 minuto na cuba ultrassônica, em seguida ficaram imersos em água destilada na estufa por 48 horas.

Figura 10- Rugosímetro digital portátil medindo a rugosidade de um espécime



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

4.2.2 Avaliação da efetividade dos protocolos de higiene

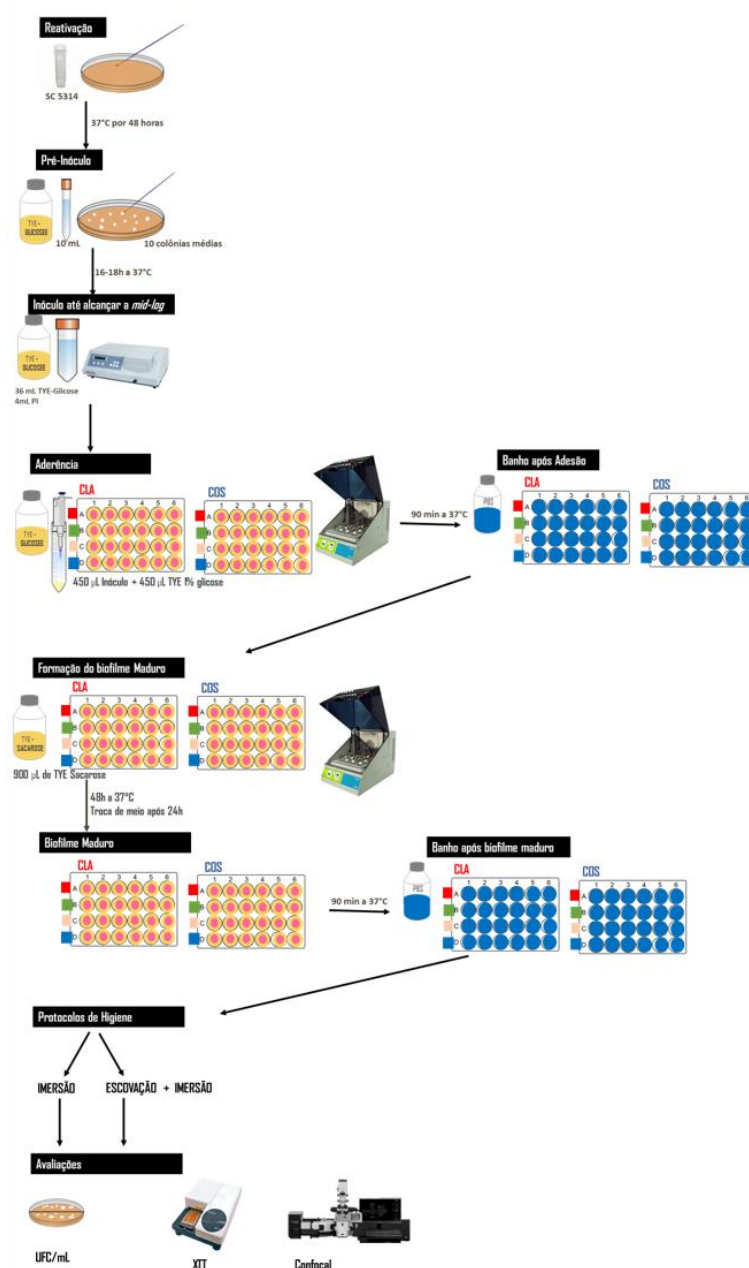
Inicialmente foi feita a descrição das condições de cultivo do micro-organismo, bem como o processo de formação do biofilme para então detalhar os protocolos de higiene avaliados.

4.2.2.1 Micro-organismos e condições de cultivo

Uma cepa padrão de *C. albicans* (SC5314, Ca) foi descongelada e reativada em meio de cultura SDA a 37°C por 48 h. Após a reativação, foi realizado o pré-inóculo, onde cinco colônias foram transferidas para o meio TYE (Tryptone and Yeast Extract) suplementado com 1% de glicose e incubadas a 37°C por overnight (16-18 h)³⁵. Após incubação, a suspensão fúngica foi diluída nas razões de 1:10 no

mesmo meio de cultura fresco para a confecção do inóculo, o qual foi incubado novamente a 37 °C até que a densidade óptica em 540 nm (DO_{540}) atingisse a metade da fase de crescimento exponencial (mid-log) do micro-organismo, aproximadamente 8h de acordo com sua curva de crescimento, a fim de que o mesmo apresentasse uma concentração média de aproximadamente $6,5 \times 10^6$ UFC/mL. Os experimentos para avaliação dos protocolos de higiene sobre culturas de *C. albicans* seguiram a sequência ilustrada na Figura 11.

Figura 11 - Fluxograma para análise do efeito dos protocolos de higiene sobre biofilmes maduros formados sobre resinas para base de próteses removíveis



Fonte: Elaboração própria.

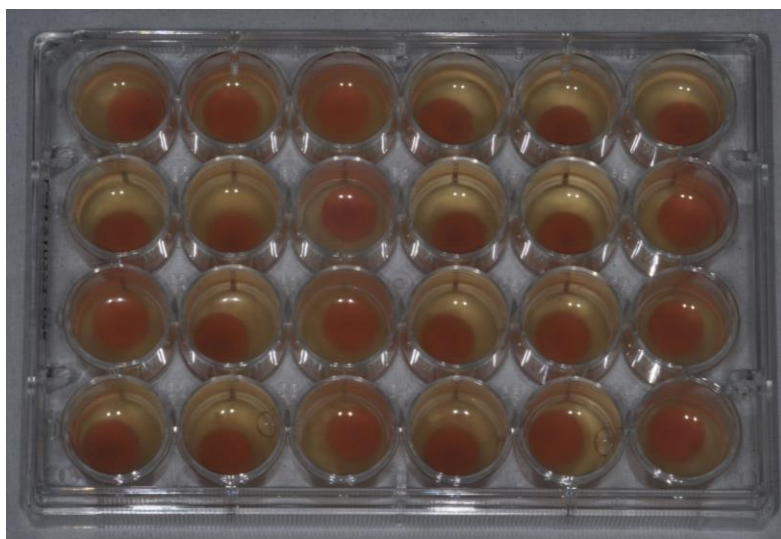
4.2.2.2 Formação do biofilme maduro

Os espécimes foram previamente desinfetados por exposição a luz UV, durante 20 minutos em cada lado⁹¹, posteriormente foram alocados nas suas respectivas posições em uma placa de 24 poços. Sobre esses espécimes foram pipetados 450 μL da suspensão fúngica na concentração de 1×10^7 UFC/mL e 450 μL de meio TYE + 1% glicose, para um volume final de 900 μL por poço (Figura 12). Esse conjunto foi incubado por 90 minutos em agitador orbital (75 rpm a 37°C)³³.

Após a fase de adesão, todos os discos foram removidos da placa, lavados cuidadosamente uma vez com PBS, para remoção das células não aderidas. Os espécimes com os micro-organismos aderidos foram levados para uma nova placa de 24 poços contendo 900 μL de meio TYE + 1% sacarose fresco por poço, para serem então incubados em agitador orbital (75 rpm a 37°C) para a obtenção dos biofilmes maduros. Após 24 horas o meio de cultura foi trocado a fim de possibilitar um melhor desenvolvimento do biofilme. Após 48 horas de incubação em agitador orbital, os espécimes contendo os biofilmes maduros foram cuidadosamente lavados uma vez com PBS, para remoção das células não aderidas.

Essa etapa foi repetida em 3 ocasiões distintas em triplicata para UFC/mL ($n=9$)⁹² e XTT ($n=9$) e uma ocasião em duplicata para confocal ($n=2$) e uma ocasião em triplicata para MEV ($n=3$). No anexo A consta a figura 29 com uma ilustração da metodologia acima referenciada.

Figura 12- Placa de 24 poços contendo os espécimes e a suspensão fúngica



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

4.2.2.3 Protocolos de higienização

Após serem lavados 1 vez com PBS para a remoção das células não aderidas sobre os espécimes, estes foram submetidos aos protocolos de higiene (Tabela 1). Os grupos experimentais 1, 2, 3 e 4 (Tabela 1) foram submetidos a imersão durante 10 minutos em placas de 24 poços contendo 900 µL das respectivas soluções de higiene. Já os grupos experimentais 5, 6, 7 e 8 foram submetidos inicialmente à escovação com solução de sabonete Lifebuoy (0,78 %) e em seguida imersão por 10 min em placas de 24 poços contendo 900 µL das respectivas soluções. No anexo A consta a figura 30 com uma ilustração da metodologia acima referenciada.

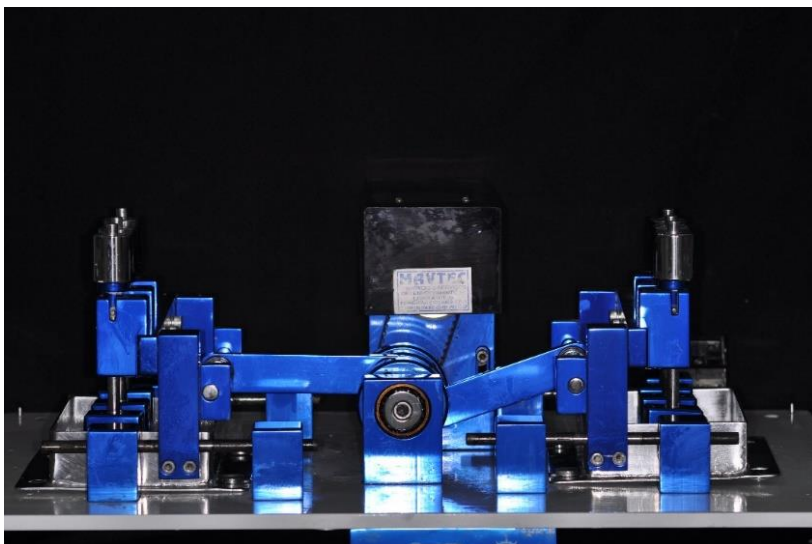
A escovação foi realizada em uma máquina de escovação com seis pontos de teste⁶⁴ (Figura 13). No centro da máquina está o motor sobre o qual se adaptam dois braços metálicos principais (um a direita e outro a esquerda) (Figura 14). Cada braço metálico principal movimenta três braços metálicos secundários. Sob esses braços metálicos secundários foi encaixado a parte ativa das escovas dentais. Acima dos braços metálicos secundários, existe um cilindro de latão exercendo força constante de 200g sobre cada escova durante a escovação.

Os três braços metálicos secundários, da direita e da esquerda, ficam no interior de uma bandeja retangular de 33mm de altura cada, essa bandeja permite o aprisionamento dos agentes de limpeza. Dentro de cada bandeja adapta-se uma placa horizontal removível contendo três cavidades retangulares na posição referente aos respectivos braços metálicos secundários. Cada cavidade retangular permite o encaixe adequado de três espécimes durante o ciclo de escovação (Figura 15).

Cada bandeja foi preenchida com 100 mL da solução de sabonete desinfetante Lifebuoy na concentração de 0,78%⁴⁸. Para alcançar essa concentração, foi realizado uma diluição de 7,8 mL do sabonete Lifebuoy em 1L de solução PBS. Foi utilizada uma escova dental (Escova Macia Sorriso- Colgate Palmolive Ind.e Com. Ltda., São Paulo, SP, Brazil) a cada 3 espécimes. Todas as escovas foram previamente esterilizadas em luz UV por 20 min, assim como os dispositivos onde os espécimes foram encaixados (esterilizados em micro-ondas por 3 minutos a 650 W). Ao acionar o motor, inicia-se a movimentação dos dois braços metálicos principais e consequentemente a movimentação cíclica de amplitude controlada dos 6 braços secundários, onde as escovas dentais estão encaixadas. O ciclo de escovação resultou em um deslocamento linear de 18 mm para cada lado

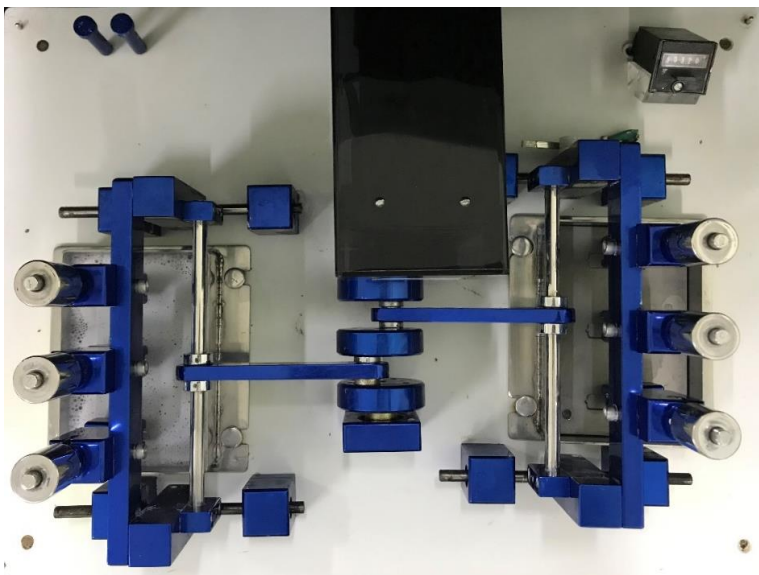
da escova dental. A escovação foi realizada em uma câmara de fluxo laminar, previamente esterilizada com raios ultravioleta por 20 minutos⁹¹. No anexo A consta a figura 31 com uma ilustração da metodologia acima referenciada.

Figura 13- Máquina de escovação - vista anterior



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Figura 14- Máquina de escovação - vista superior



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Figura 15- Bandeja com sua respectiva placa horizontal removível contendo três cavidades retangulares na posição referente aos respectivos braços metálicos secundários. Em cada cavidade retangular é possível adaptar 3 espécimes para o ciclo de escovação



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

4.2.2.4 Contagem de unidades formadoras de colônia por mililitro

Os espécimes, após serem submetidos aos protocolos de higienização, com ou sem a associação da escovação, foram transferidos para uma nova placa de 24 poços (contendo 900 µL de PBS) para a raspagem do biofilme. O biofilme maduro residual aderido a esses espécimes foram raspados por 1 min com a ponteira da pipeta, em seguida 100 µL desse biofilme suspenso foi transferido para um eppendorf contendo 900 µL de PBS para a diluição seriada. As diluições seriadas foram semeadas em placas com meios de cultura ágar SDA+Cloranfenicol, e incubadas por 48 horas a 37°, para sequencialmente quantificar as UFC/mL.

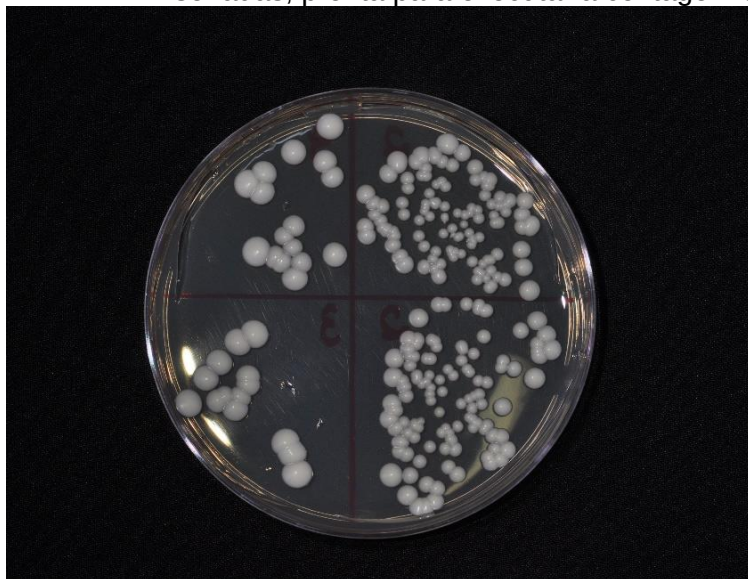
Após 48 horas de incubação a 37°C, as placas de SDA+Cloranfenicol foram submetidas à contagem de colônias (Figura 16), obtendo-se a médias entre as duplicatas de cada amostra. O número de UFC/mL foi calculado utilizando a fórmula a seguir:

$$\text{UFC/mL} = (\text{número de colônias} \times 10^n) / q$$

Onde “n” equivale ao valor absoluto da diluição (1, 2, 3 ou 4), e “q” equivale à quantidade, em mL, pipetada para cada diluição quando nas semeaduras das placas (0,025 mL).

Para esta etapa foram realizadas 3 ocasiões em triplicata, n=9. ⁹² No anexo A consta a figura 32 com uma ilustração da metodologia acima referenciada.

Figura 16- Placas de SDA+Clorofenicol 48h após serem semeadas com as diluições seriadas, pronta para executar a contagem de UFC/mL



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

4.2.2.5 Avaliação do metabolismo celular (ensaio de XTT)

A avaliação do metabolismo foi realizada utilizando a solução de XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl) - 5 - [(phenylamino) carbonyl] - 2H - tetrazolium hydroxide) a uma concentração de 2,5 mg/mL, utilizando PBS glicosado e menadiona. Esta solução foi mantida -80°C até o momento do experimento. A menadiona foi preparada em acetona a 0,4 mM, imediatamente antes de cada experimento.

Após serem submetidos aos protocolos de higienização, com ou sem a associação da escovação, os espécimes foram lavados em PBS, para remoção de resquícios do agente de higiene e transferidos para uma placa de 24 poços contendo 500 µL da seguinte solução de XTT: 1,5 µL de menadiona, 5mL de XTT. As placas de 24 poços foram incubadas no escuro a 37°C por 3 horas. Passado esse período, uma alíquota de 200 µL do conteúdo de cada poço foi transferido em duplicata para uma placa de 96 poços. A leitura foi realizada em leitor de eliza a 492 nm. Foi calculado a média da duplicata, esta média corresponde ao valor de XTT de cada espécime. Para esta etapa foram realizadas 3 ocasiões em triplicata, n=9. No anexo A consta a figura 33 com uma ilustração da metodologia acima referenciada.

4.2.2.6 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Passadas as 48h para a formação do biofilme maduro sobre os espécimes, procedeu-se com a lavagem em PBS para remoção das células de Ca não aderidas aos espécimes, estes foram submetidos a um processo de fixação e desidratação progressiva para serem analisados em MEV. O biofilme aderido aos espécimes foi fixado imergindo os espécimes em glutaraldeído 2,5% por uma hora em temperatura ambiente⁹³. Após o processo de fixação, os espécimes foram lavados três vezes com PBS e submetidos em seguida à uma desidratação progressiva em soluções de etanol: álcool 70% (1 hora), álcool 90% (1 hora) e álcool absoluto (5 lavagens de 30 minutos cada)⁹³. Após o processo de desidratação, os espécimes permaneceram em um dessecador à vácuo com sílica por uma semana⁹³. Em seguida os espécimes foram metalizados com carbono (Denton Vacuum, Moorestown, Nova Jersey, EUA) e posicionados no microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-6610LV, Akishima, Japão), para obtenção das imagens utilizando ampliações de 500×, 1000× e 2000×.

4.2.2.7 Análise por microscopia de varredura confocal a laser

Após a formação do biofilme de 48 horas, os espécimes foram submetidos à associação da escovação com a imersão nos agentes de higiene (Figura 3) (n=2 por grupo), em seguida foram lavados uma vez com PBS e analisados descritivamente quanto a viabilidade celular e a estrutura da matriz extracelular, nos dois tipos de resina (CLA e COS).

As amostras foram coradas com o kit de viabilidade Live/Dead contendo SYTO-9 e iodeto de propídeo sobre placas estéreis de 24 poços com 900µL de PBS, permanecendo incubadas no escuro por 30 minutos, conforme instruções do fabricante. Após coradas, as amostras foram lavadas uma vez com PBS e ressuspensas em 900µL de PBS para proceder com a leitura. Os comprimentos de onda máximos para excitação/emissão utilizados para esses corantes foram de, aproximadamente, 480/500 nm para SYTO-9 e 490/635 nm para iodeto de propídeo. O SYTO-9 cora todas as células (íntegras ou com dano) já o Iodeto penetra somente nas células que apresentam algum dano, causando a redução da fluorescência do SYTO 9. Dessa forma, células viáveis com membrana intactas emitiram fluorescência verde e aquelas com dano, fluorescência vermelha. As imagens foram adquiridas no Microscópio de Fluorescência Confocal Carl Zeiss LSM 800 com

Airyscan. No anexo A consta a figura 34 com uma ilustração da metodologia acima referenciada.

4.3 Rugosidade Antes e Depois dos Ciclos de Imersão e Escovação

Os espécimes foram avaliados quanto a sua rugosidade superficial em rugosímetro digital, conforme descrito no item 4.2.1.3. Em seguida foram submetidos a ciclos de 10 segundos de escovação e imersão nas respectivas soluções, conforme descrito no item 4.2.2.3. Após esse processo, os espécimes receberam um banho em solução de PBS e foram encaminhados para uma nova análise da rugosidade. A diferença entre a rugosidade superficial registrada antes e após os protocolos de higiene foram registradas e avaliadas. Para esta etapa foram realizadas três ocasiões em triplicata, n=9. No anexo A consta a figura 35 com uma ilustração da metodologia acima referenciada.

4.4 Análise Estatística

Esse é um estudo experimental *in vitro* com as seguintes variáveis manifestas, dependentes e quantitativas contínuas: UFC/mL, absorbância (XTT), rugosidade (Ra). Como variáveis qualitativas: morfologia celular (confocal e MEV). Como variáveis manifestas, independentes e qualitativas nominais tivemos os protocolos de higienização e o tipo da resina para base protética [impressa (COS) e termopolimerizável (CLA)].

Os experimentos com biofilmes de *C.albicans* para avaliação de UFC/mL, XTT foram realizados em triplicata com o mínimo de três ocasiões distintas (n= 9). A avaliação de rugosidade antes e depois dos ciclos de escovação foram realizadas em triplicata com três ocasiões distintas (n=9). O MEV em quadruplicada com uma ocasião (n=4), o confocal foi realizado em duplicata em uma ocasião (n= 2).

Os dados foram tabulados e submetidos a testes estatísticos adequados de acordo com aderência à normalidade. A análise estatística foi realizada por meio do programa SPSS for Windows (versão 15.0; SPSS Inc.), com nível de significância de 5%.

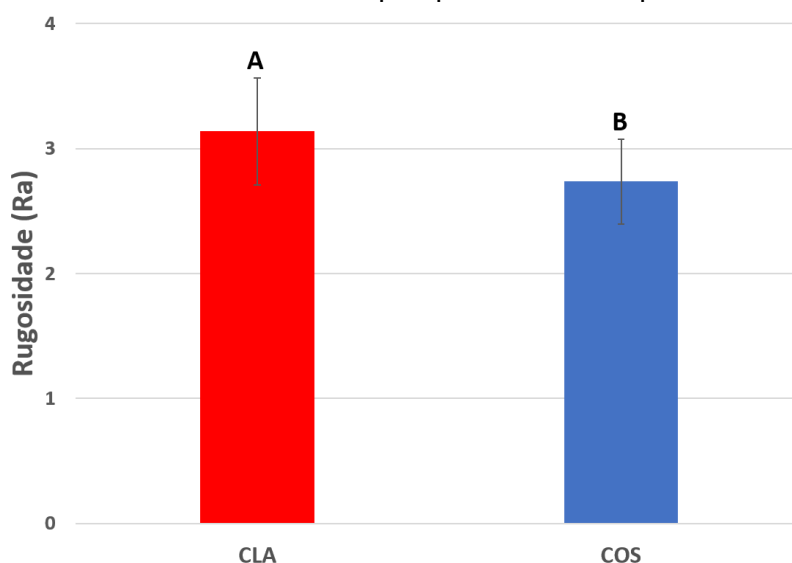
5 RESULTADO

A descrição detalhada dos resultados de cada etapa foi descrita nos tópicos abaixo.

5.1 Caracterização de Rugosidade dos Espécimes

Todos os espécimes utilizados na pesquisa foram avaliados quanto a sua rugosidade superficial. O teste estatístico de T de student apontou para uma rugosidade superficial média da resina CLA ($Ra\ 3,13 \pm 0,42\ \mu m$) estatisticamente superior ($p=0,002$) à rugosidade superficial média da resina COS ($Ra\ 2,73 \pm 0,33\ \mu m$) (Fig. 17).

Figura 17- Valores médios de rugosidade superficial (μm) dos espécimes da resina CLA e COS utilizados na pesquisa e seus respectivos desvios padrão



Diferentes letras maiúsculas denotam diferença significativa ($p = 0,002$) entre a rugosidade superficial média das resinas CLA e COS.

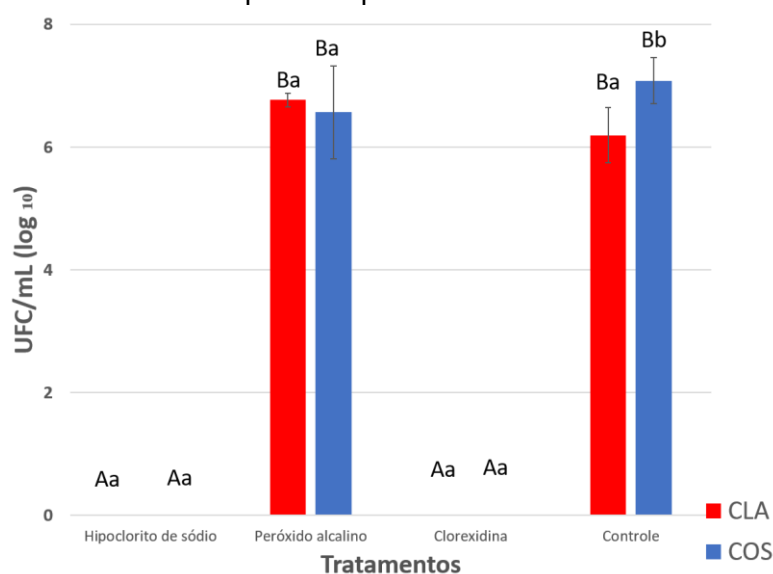
Fonte: Elaboração própria.

5.2 UFC/mL das Amostras Submetidas à Imersão

Quando submetidos à ANOVA two way, foi observado que as soluções de imersão ($p=0,000$) e as resinas ($p=0,036$) interferiram na UFC/mL, e houve interação entre as soluções de imersão e as resinas ($p=0,000$) na avaliação da viabilidade (UFC/mL). Dessa forma, a contagem total de UFC/mL de todos os espécimes de COS foi estatisticamente superior à CLA, avaliando apenas o tipo de resina, sem

levar em consideração a solução avaliada. Comparando as duas resinas dentro de cada solução de imersão, observa-se que a resina impressa COS apresentou uma média de UFC/mL estatisticamente superior à resina CLA quando submetidas à imersão em PBS (grupo controle) ($p=0,007$) (Figura 18). Biofilmes tratados por imersão em hipoclorito de sódio e clorexidina possibilitaram a eliminação completa das UFC/mL, sendo que as duas soluções foram estatisticamente semelhantes, tanto dentro da mesma resina como entre as duas resinas ($p= 1,00$). As resinas CLA e COS foram estatisticamente semelhantes quando imersas em peróxido alcalino ($p=0,989$). Peróxido alcalino apresentou uma média de UFC estatisticamente semelhante ao grupo controle tanto para a resina CLA, como para resina COS ($p= 0,062$ e $p=0,615$ respectivamente).

Figura 18- Valores médios de UFC/mL ($\log_{10}$) (viabilidade celular) de *C. albicans* do biofilme maduro formado sobre as amostras de resinas CLA e COS e seus respectivos desvios padrão após serem submetidos à imersão em soluções desinfetantes



Diferentes letras maiúsculas denotam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos por imersão para a mesma resina. Diferentes letras minúsculas denotam uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre as resinas para um mesmo tratamento de imersão.

Fonte: Elaboração própria.

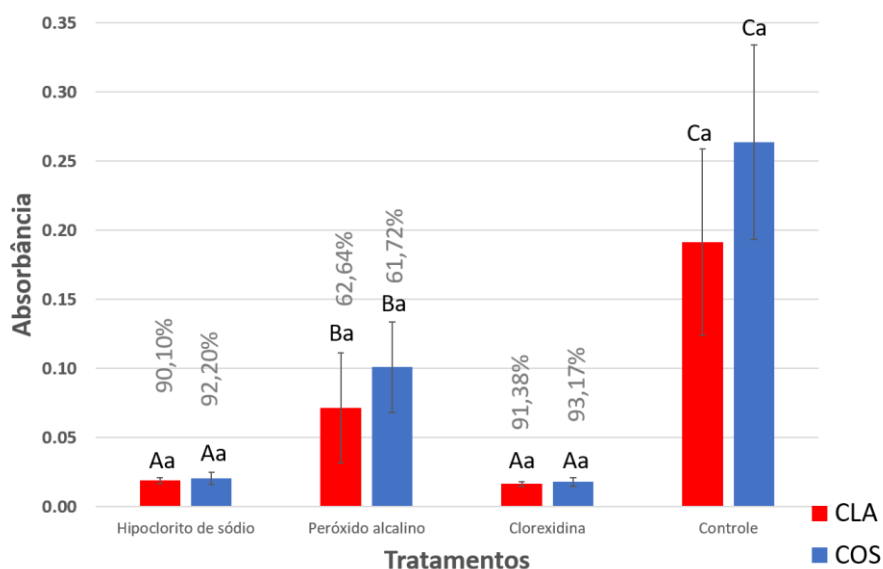
5.3 XTT das Amostras Submetidas à Imersão

Quando submetidos à ANOVA two way, foi observado que as soluções de imersão ($p=0,000$) e as resinas ($p=0,006$) interferiram no metabolismo, e houve interação entre as soluções de imersão e as resinas ($p=0,026$) na avaliação do metabolismo. Logo é possível concluir que o biofilme formado sobre a resina COS

apresentou metabolismo total superior à CLA, sem levar em consideração a solução avaliada. Entretanto, comparando as duas resinas dentro de cada solução de imersão, estas apresentaram metabolismo estatisticamente semelhante (Figura 19). Hipoclorito de sódio e clorexidina apresentaram redução estatisticamente significativa do metabolismo em relação ao grupo controle (CLA: $p=0,001$. COS: $p=0,00$) e em relação ao peróxido alcalino (CLA: $0,049$. COS: $p=0,001$). Hipoclorito de sódio e clorexidina 2% foram estatisticamente semelhantes quanto ao metabolismo (CLA: $0,293$. COS: $p=0,857$). Biofilmes tratados por imersão com peróxido alcalino tiveram o metabolismo significativamente reduzido em relação ao grupo controle em ambas as resinas avaliadas (CLA: $0,009$. COS: $0,001$).

Calculando a porcentagem de redução das soluções de imersão em relação ao seu respectivo grupo controle, foi observado que o hipoclorito reduziu 90,10% para a CLA e 92,20% para a COS. A imersão em peróxido alcalino da resina CLA reduziu 62,64% em relação ao grupo controle e 61,72% para o grupo controle COS. Já a clorexidina 2%, reduziu 91,38% para a CLA e 93,17% para a COS.

Figura 19- Valores médios de absorbância pelo ensaio de XTT (metabolismo celular) de *C. albicans* do biofilme maduro sobre as amostras de resinas CLA e COS e seus respectivos desvios padrão após serem submetidos à imersão em soluções desinfetantes



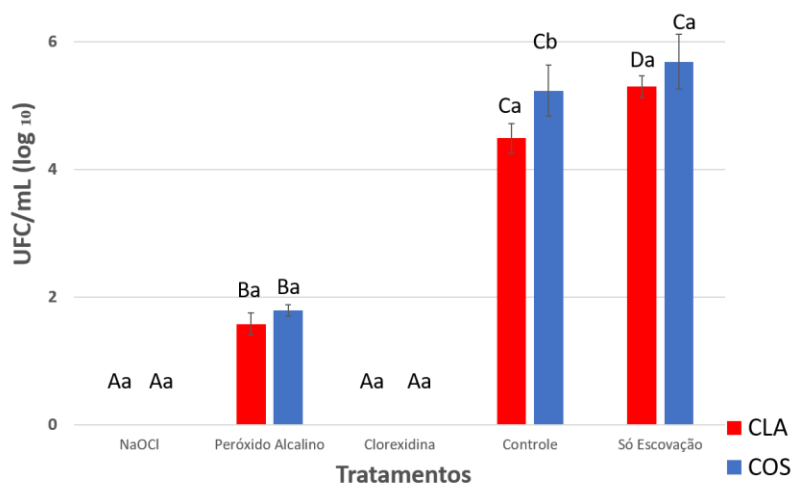
O valor de porcentagem acima de cada grupo representa a percentual de redução em relação ao grupo controle da sua respectiva resina. Diferentes letras maiúsculas denotam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos por imersão para a mesma resina. Diferentes letras minúsculas denotam uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre as resinas para um mesmo tratamento de imersão.

Fonte: Elaboração própria.

5.4 UFC/mL das Amostras Submetidas à Escovação e Imersão

O teste estatístico de ANOVA two way para os espécimes submetidos à associação de escovação e imersão concluiu que as soluções de imersão ($p=0,000$) e as resinas ($p=0,000$) interferiram na UFC/mL, e houve interação entre as soluções de imersão e as resinas ($p=0,000$) na avaliação da viabilidade (UFC/mL). Logo a contagem de UFC/mL de todos os espécimes da COS, sem levar em consideração à solução de imersão, apresentou UFC/mL estatisticamente superior à CLA. Comparando as duas resinas dentro de cada solução de imersão utilizada, observa-se que a resina impressa COS possibilitou uma média de UFC/mL estatisticamente superior à resina CLA quando submetidos à escovação e imersão em PBS (grupo controle) ($p=0,008$) (Figura 20). Os espécimes submetidos à escovação e imersão em hipoclorito e clorexidina, resultaram na eliminação completa das UFC/mL, dessa forma as duas soluções foram estatisticamente semelhantes, tanto dentro da mesma resina como entre as duas resinas ($p= 1,00$). Para a resina CLA, a adição da imersão em PBS (grupo controle) após o ciclo de escovação possibilitou uma redução estatisticamente significativa de UFC em relação ao grupo exposto apenas à escovação ($p=0,000$). Associando a escovação à imersão em peróxido alcalino, resultou em uma redução estatisticamente significativa em relação aos grupos controle (PBS) e só escovação ($p=0,00$ em todos os grupos) para as resinas CLA e COS.

Figura 20- Valores médios de UFC/mL ($\log_{10}$) (viabilidade celular) das células de *C. albicans* referentes ao biofilme maduro sobre as amostras das resinas CLA e COS e respectivos desvios padrão após serem submetidos à escovação em solução Lifebuoy e imersão em soluções desinfetantes

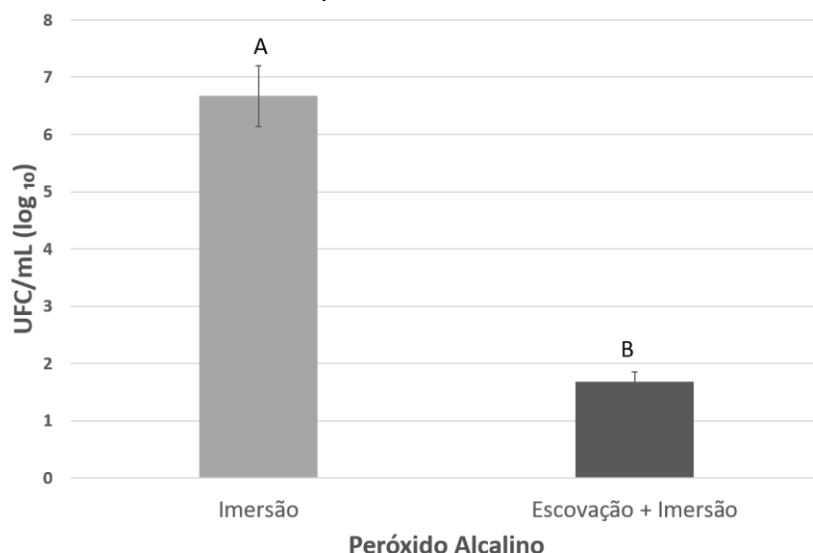


Diferentes letras maiúsculas denotam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos por imersão para a mesma resina. Diferentes letras minúsculas denotam uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre as resinas para um mesmo tratamento de imersão.

Fonte: Elaboração própria.

Em virtude da redução de UFC/mL dos espécimes expostos à associação da escovação e imersão em peróxido alcalino em relação ao grupo controle (PBS), foi realizado um teste estatístico para avaliar o efeito deste protocolo em relação à imersão em peróxido alcalino isoladamente. A Figura 21 mostra, para ambas as resinas (CLA e COS), a efetividade da associação da escovação com solução de Lifebuoy e imersão em peróxido alcalino comparada com apenas a imersão em peróxido alcalino. O teste T de student apontou uma redução estatisticamente significativa das UFC/mL nas amostras expostas à essa associação ($p=0,04$).

Figura 21- Valores médios de UFC/mL ($\log_{10}$) (viabilidade celular) das células de *C. albicans* referentes ao biofilme maduro sobre as amostras das resinas CLA e COS agrupadas e respectivos desvios padrão após serem submetidos apenas à imersão em peróxido alcalino e escovação em solução Lifebuoy associada à imersão em peróxido alcalino



Diferentes letras maiúsculas denotam diferença significativa ($p=0,04$) entre os métodos.

Fonte: Elaboração própria.

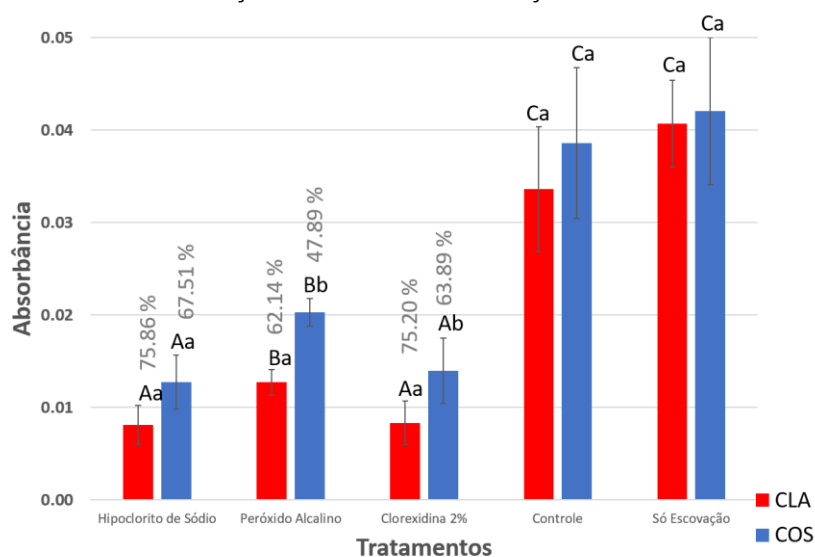
5.5 XTT das Amostras Submetidas à Escovação e Imersão

O teste de ANOVA two way, revelou que pelo menos umas das soluções de imersão alterou o metabolismo ($p=0,00$) e que avaliando as duas resinas, sem levar em consideração à solução de imersão, foram estatisticamente distintas ($p=0,00$), ou seja, o metabolismo total de todos os espécimes de resina COS foi superior ao metabolismo total de todos os espécimes de resina CLA, sem levar em consideração à solução de imersão. Entretanto não houve interação entre os dois fatores (solução de imersão e Resina) ($p=0,482$). Comparando o metabolismo das resinas CLA e COS dentro das soluções avaliadas, a resina COS apresentou metabolismo superior à CLA apenas no peróxido alcalino ($p=0,00$) e na clorexidina 2% ($p=0,018$) (Figura 22). Nas demais soluções, o metabolismo da CLA e COS foram semelhantes.

Avaliando as soluções de imersão, concluiu-se que o hipoclorito de sódio e a clorexidina foram estatisticamente semelhantes quanto ao metabolismo (CLA: 1,00 e COS: 0,997). O peróxido alcalino reduziu o metabolismo em relação ao grupo controle e só escovação (CLA: 0,000 e 0,000) (COS: 0,003 e 0,001). A imersão em PBS após a escovação (grupo controle) foi estatisticamente semelhante ao grupo exposto apenas a escovação (CLA: 0,326 e COS: 0,995).

Calculando a porcentagem de redução das soluções de imersão em relação ao seu respectivo grupo controle, foi observado que o hipoclorito reduziu 75,86% para a CLA e 67,51% para a COS. A imersão em Peróxido alcalino da resina CLA reduziu 62,14% em relação ao grupo controle e 47,89% para o grupo controle COS. Já a clorexidina 2%, reduziu 75,20% para a CLA e 63,89% para a COS (Figura 22).

Figura 22- Valores médios de absorbância pelo ensaio de XTT (metabolismo celular) das células de *C. albicans* referentes ao biofilme maduro sobre as amostras das resinas CLA e COS e respectivos desvios padrão após serem submetidos à escovação e imersão em soluções desinfetantes



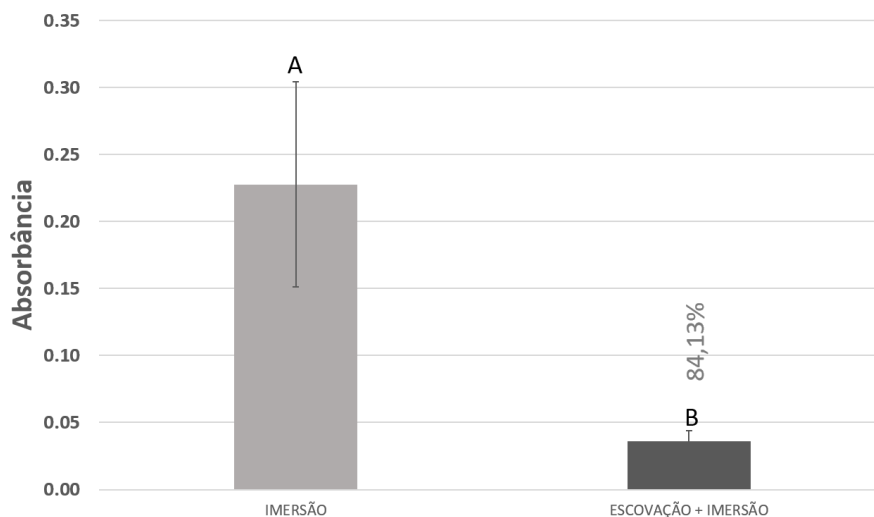
O valor de porcentagem acima de cada grupo representa a percentual de redução em relação ao grupo controle da sua respectiva resina. Diferentes letras maiúsculas denotam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos por imersão para a mesma resina. Diferentes letras minúsculas denotam uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre as resinas para um mesmo tratamento de imersão.

Fonte: Elaboração própria.

5.6 Diferença do Metabolismo por XTT do Grupo Controle Submetido à Imersão e o Grupo Controle Submetido à Associação da Escovação com a Imersão

Comparando o metabolismo por XTT dos espécimes submetidos à imersão em PBS (grupo controle da imersão) com os submetidos à associação da escovação e imersão em PBS (grupo controle da escovação+ imersão) é observado uma redução estatística ($p=0,00$) de 84,13% nas duas resinas quando expostas à associação (Figura 23).

Figura 23- Valores médios de absorbância pelo ensaio de XTT (metabolismo celular) das células de *C. albicans* referentes ao biofilme maduro sobre as amostras das duas resinas juntas (CLA e COS) e respectivos desvios padrão após serem submetidos à imersão em PBS e à associação da escovação com a imersão em PBS



Método

Diferentes letras maiúsculas denotam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os métodos de imersão e escovação + imersão das duas resinas.

Fonte: Elaboração própria.

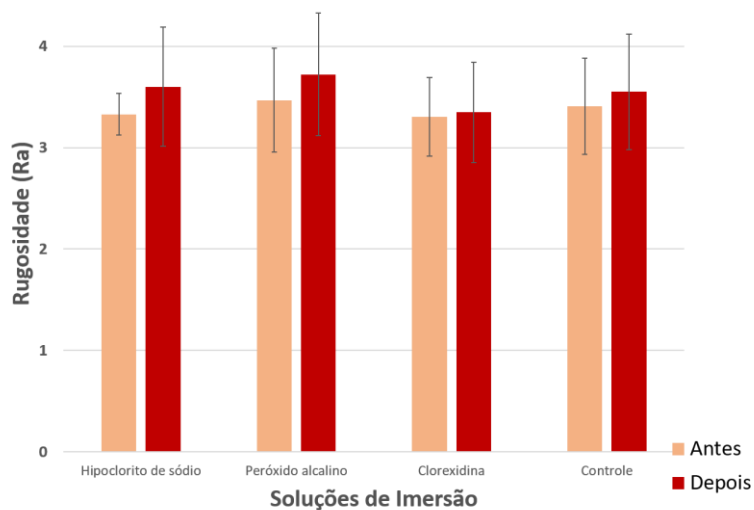
5.7 Diferença de Rugosidade Antes e Após a Escovação Associado com a Imersão em Soluções Desinfetantes

Ao avaliar a rugosidade dos espécimes de resina CLA antes e após serem submetidos à associação da escovação com a imersão em soluções desinfetantes (Figura 24), foi observado um aumento dos valores médios de rugosidade após a associação da escovação e imersão, em todas as soluções avaliadas. Entretanto o teste de ANOVA 1 way de medidas repetidas não detectou diferença estatística na rugosidade antes e depois entre as diferentes soluções desinfetantes utilizadas ($p=0,577$), detectou uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,008$) entre a rugosidade antes e depois de todos os grupos juntos. Logo, a solução desinfetante não foi um fator de alteração da rugosidade. Foi realizado teste T de student pareado, com os valores de rugosidade antes da associação da escovação e imersão e depois, independente da solução desinfetante, e constatou-se que a rugosidade após foi estatisticamente superior à rugosidade antes ($p=0,007$) (Figura 25).

Na resina COS, houve uma redução dos valores médios de rugosidade após serem expostos à associação da escovação com a imersão em todas as soluções

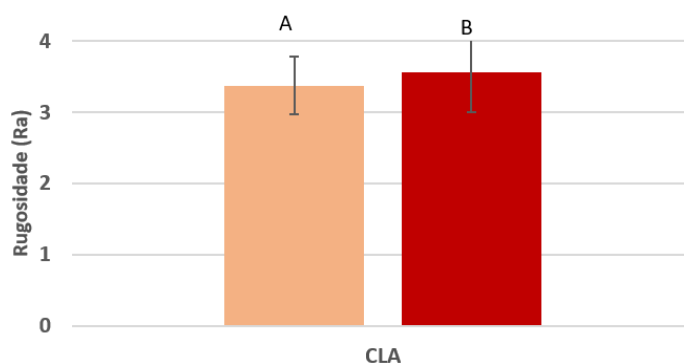
avaliadas, exceto hipoclorito de sódio. Entretanto o teste 1way de medidas repetidas concluiu que não teve diferença estatística na rugosidade antes e após a associação ($p=0,537$), e não houve interação entre a solução avaliada e a rugosidade (antes e depois) ($p=0,736$) (Figura 26).

Figura 24- Valores médios de rugosidade ($Ra \mu m$) e respectivos desvios padrão dos espécimes da resina CLA antes e após associação da escovação e imersão em soluções desinfetantes



Fonte: Elaboração própria.

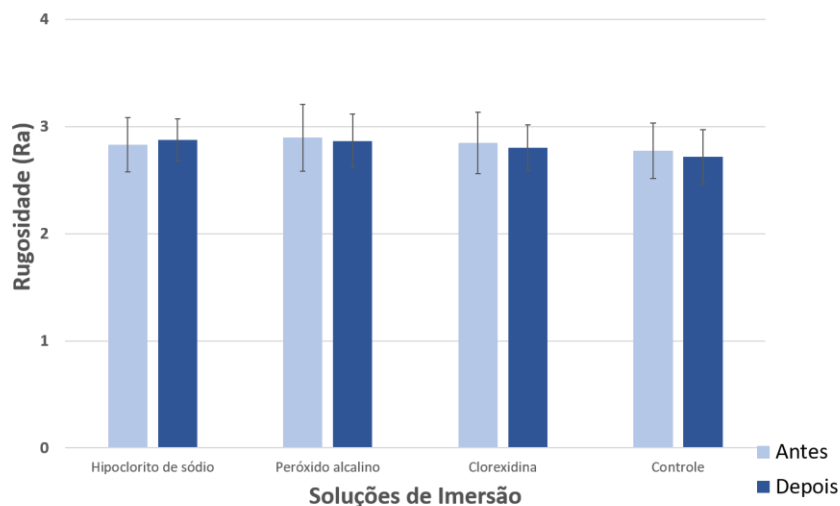
Figura 25- Valores médios de rugosidade ($Ra \mu m$) e respectivos desvios padrão dos espécimes de resina CLA antes e após associação da escovação e imersão em soluções desinfetantes



Diferentes letras maiúsculas denotam diferença significativa ($p= 0,007$) na rugosidade dos espécimes antes e após a associação da escovação e imersão.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 26- Valores médios de rugosidade (R_a μm) e respectivos desvios padrão dos espécimes da resina COS antes e após associação da escovação e imersão em soluções desinfetantes

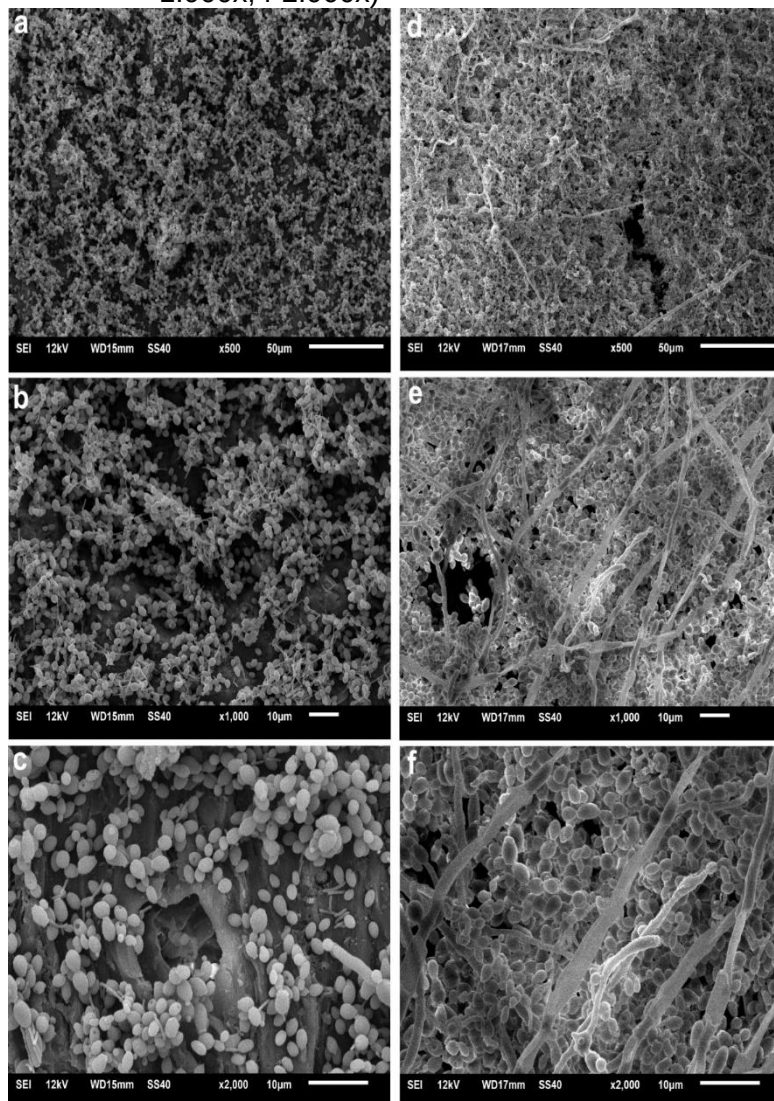


Fonte: Elaboração própria.

5.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Foram coletadas imagens de áreas distintas de 4 espécimes diferentes de resina CLA e COS contaminados com biofilme de *C. albicans* nas ampliações de 500x, 1000x e 2000x. Na microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi possível ter uma avaliação global da disposição do biofilme sobre os espécimes e morfologia celular do biofilme, entre leveduras, pseudo-hifas e hifas verdadeiras. A Figura 27 mostra as imagens de MEV dos espécimes de CLA (Figura 27 a,b,c) e COS (Figura 27 d,e,f). Na resina CLA há uma predominância de células com morfologia de leveduras e uma presença discreta de pseudo-hifas e hifas curtas. Já na resina COS, apesar de também apresentar predominância de leveduras, é possível observar a presença de pseudo-hifas e hifas em quantidade mais expressiva que na CLA, inclusive a presença de hifas alongadas entremeadas no biofilme. No que diz respeito à disposição espacial do biofilme de *C. albicans* sobre as resinas CLA e COS, apesar de ambos os grupos se apresentarem fortemente contaminados com biofilme bem distribuído ao longo de todo o espécime, a resina COS apresentou um biofilme mais robusto aderido ao espécime.

Figura 27- Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) do biofilme maduro sobre os espécimes de resina CLA (a-500x, b-1.000x, c-2.000x) e COS (d-500x, e-1.000x, f-2.000x)



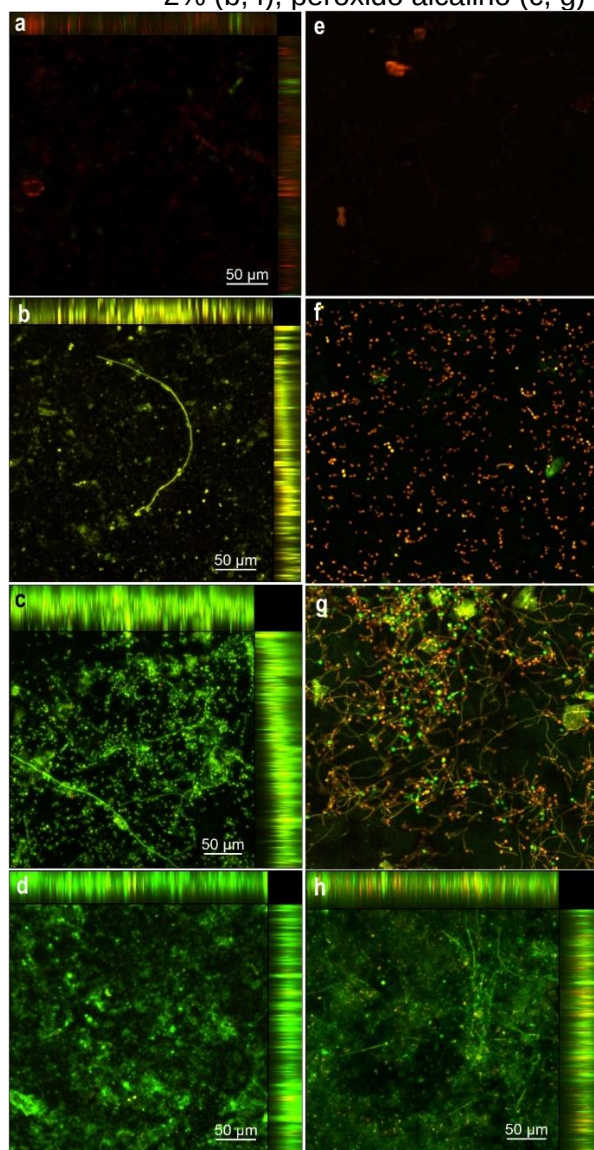
Fonte: Arquivo pessoal da autora.

5.9 Microscopia de Varredura Confocal a Laser

A Figura 28 mostra as imagens capturadas da microscopia de varredura confocal a laser realizada sobre os espécimes de resina CLA (Figura 28 a, b, c) e COS (Figura 28 d, e, f). Células viáveis com membranas intactas emitiram fluorescência verde (syto9), enquanto que células com dano, fluorescência vermelha (iodeto de propídeo). Os grupos submetidos à associação da escovação e imersão em hipoclorito de sódio ou clorexidina 2% apresentaram uma espessura menor de biofilme sobre os espécimes de ambas resinas, quando comparados com os grupos submetidos a associação com o peróxido alcalino e com o grupo controle (imersão em PBS). Os espécimes submetidos a imersão em hipoclorito de sódio (CLA e COS,

Figura 28 a, e) possibilitaram a maior redução de biofilme sobre os espécimes, apesar de discreta, ainda é possível a visualização de fluorescência vermelha e não foi observada diferença entre as resinas CLA e COS. Avaliando criteriosamente os espécimes submetidos a imersão em clorexidina 2% (Figura 28 b, f), é observado uma redução considerável de biofilme quando comparado com a imersão em peróxido alcalino e grupo controle. Ainda é observado uma ligeira fluorescência verde nas duas resinas de forma similar. Um fato importante a ser abordado é que na resina COS, a clorexidina 2% teve mais dificuldade em eliminar as células mortas aderidas à superfície, o que é representado pela fluorescência vermelha. No que diz respeito aos espécimes tratados com escovação e imersão em peróxido alcalino (Figura 28 c, g), é observada uma redução do biofilme em relação ao grupo controle, entretanto ainda está presente uma fluorescência verde relevante, indicando a presença de células viáveis. Um fato interessante nos espécimes expostos ao peróxido alcalino é a presença de hifas em ambas as resinas, entretanto há uma predominância de hifas na resina COS em relação à CLA. Comparando o grupo experimental da resina CLA e COS (Figura 28 d, h) não foi observado diferença entre eles em relação à espessura do biofilme ou emissão de fluorescência verde. Mas um fato digno de nota é a presença mais significativa de hifas na resina COS em relação à CLA do grupo controle.

Figura 28- Imagens de microscopia de varredura confocal a laser do biofilme maduro sobre os espécimes de resina CLA (a, b, c, d) e COS (e, f, g, h) após serem expostos à associação de escovação e imersão em: hipoclorito de sódio (a, e), clorexidina 2% (b, f), peróxido alcalino (c, g) e PBS-Controle (d, h)



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo a rugosidade média dos espécimes da resina CLA ($Ra\ 3,13 \pm 0,42\ \mu m$) está em conformidade com o descrito na literatura, de aproximadamente $3,0\ \mu m$ ⁹⁰, essa rugosidade tem por objetivo simular a superfície interna de próteses totais⁹⁴. Já a rugosidade superficial média dos espécimes confeccionados com a resina impressa COS ($Ra\ 2,73 \pm 0,33\ \mu m$) foi estatisticamente inferior à resina CLA ($p=0,002$). Optamos por não intervir nessa variável, por se tratar da rugosidade real que as bases protéticas apresentam após o processo de impressão 3D, essa escolha foi tomada com o objetivo de manter os espécimes com a rugosidade fiel ao que é produzido clinicamente. Apesar da diferença de rugosidade entre as duas resinas, ambas estão acima de $0,2\ \mu m$, apontado por uma revisão de literatura como o limiar para adesão bacteriana⁹⁵.

Espécimes de resina acrílica com maior rugosidade geralmente apresentam maior contagem de leveduras, pois a superfície irregular possibilita a retenção de micro-organismos e proteção contra forças de cisalhamento, mesmo com a limpeza mecânica das próteses⁹⁶. Esse fato fortalece o entendimento do comportamento clínico, onde os biofilmes são colonizados em profundidade nas bases acrílicas de próteses devido a presença de irregularidades e porosidades do material^{34,35}. Entretanto, apesar da resina CLA apresentar maior rugosidade superficial em relação à COS, a CLA apresentou UFC/mL estatisticamente inferior ($p=0,007$) após imersão em PBS (grupo controle negativo), o que vai de encontro ao fato anteriormente exposto. Uma pesquisa in vitro avaliando o acúmulo de biofilme de *Streptococcus mutans* sobre espécimes de resinas para coroas provisórias confeccionados pelo método convencional (PMMA), tecnologia aditiva e subtrativa, detectou uma rugosidade estatisticamente superior no grupo convencional em relação aos demais, entretanto o maior acúmulo de biofilme foi encontrado nos espécimes confeccionados pela tecnologia aditiva (rugosidade inferior)⁸⁰. Da mesma forma, Simoneti et. al.⁸¹, também observaram maior rugosidade superficial no grupo convencional, em relação ao impresso e maior acúmulo de biofilme de *S. mutans* sobre espécimes impressos, em relação ao grupo convencional⁸¹. Apesar desses dois estudos^{80,81} não utilizarem o mesmo micro-organismo, esse achado corrobora com nossa pesquisa, onde percebe-se que a rugosidade não foi fator determinante na adesão e acúmulo de biofilme. Em contrapartida, outro estudo in vitro, publicado

recentemente⁷³, observou uma menor adesão da microbiota fúngica (*C. albicans* e *C. krusei*) nos espécimes confeccionados por resina impressa 3D de provisório de prótese fixa, seguido dos polímeros curados termicamente e fabricados pela técnica subtrativa e por fim, PMMA curado à frio⁷³.

Os espécimes de resina impressa 3D para base de prótese total apresentaram maior adesão de *C. albicans* em comparação com os fresados e PMMA, achado que também corrobora com nossos resultados⁸². Esse resultado não foi associado à rugosidade superficial, já que os espécimes impressos apresentaram menor rugosidade; revelaram uma correlação moderada com a hidrofobicidade dos espécimes, já que os grupos impressos e curados a frio apresentaram maiores valores de hidrofobicidade e valores mais altos de adesão de *C. albicans*; significativa correlação da adesão de *C. albicans* com os níveis de adsorção de mucina nas superfícies testadas⁸². A mucina está associada à hidrofobicidade da superfície, já que ela é um importante mediador na adesão de *C. albicans* à superfície⁹⁷, dessa forma atua no processo de formação e maturação do biofilme. Minagi et al.⁹⁸ (1985) avaliando a relação da energia livre de superfície (ELS) na aderência de *C. albicans* e *C. tropicalis*, observaram que os microrganismos com maiores valores de ELS aderem preferencialmente às superfícies de alta ELS, da mesma forma que micro-organismos com baixa ELS apresentam predileção de aderir-se à superfícies com baixa ELS⁹⁸. Ou seja, os micro-organismos apresentam maior aderência às superfícies com ELS próximas as suas⁹⁸. A revisão desenvolvida por An YH em 1998⁹⁹, por sua vez, explicou o processo de adesão microbiana através da ligação direta dos microrganismos com propriedades hidrofóbicas às superfícies hidrofóbicas⁹⁹. A hidrofobicidade da superfície celular contribui para a patogênese do fungo oportunista *C. albicans*¹⁰⁰. A cepa SC 5314, mesma cepa padrão de *C. albicans* utilizada no presente estudo, foi classificada como uma cepa hidrofóbica¹⁰⁰, logo superfícies hidrofóbicas, ou de baixa hidrofiliidade, apresentam condições mais favoráveis para a adesão dessa cepa¹⁰¹.

Sabe-se que vários fatores estão envolvidos na adesão da *C. albicans* à base de uma resina acrílica, e possivelmente um ou mais de um desses fatores possibilitaram um valor de UFC/mL superior nos espécimes da COS. Dentre os fatores envolvidos, a literatura permite citar: carga superficial, energia livre de superfície, hidrofobicidade⁹⁸, estrutura e a composição da superfície dos biomaterial^{102,75}. No que diz respeito à composição química dos materiais, esse fator

altera as características microbiológicas⁷⁵ bem como a capacidade de determinado material obter determinado grau de lisura^{72,103}. Entretanto, a discussão direta deste fator não foi possível, em virtude de os fabricantes não fornecerem informações adequadas sobre o conteúdo exato da matriz orgânica, inorgânica, agentes de união, fotoiniciadores, estabilizantes da resina de impressão 3D. Sabe-se apenas que as resinas impressas são resinas híbridas, polimerizadas por luz UV, cuja composição envolve uma base, fotoiniciadores, estabilizantes e pigmentos²⁷. Diferentemente do PMMA, as resinas impressas precisam ter viscosidade baixa a moderada, assim como um fotoiniciador com concentração relativamente alta (3-5% em peso) para permitir uma polimerização rápida²⁸.

A escovação sozinha é falha na remoção do biofilme protético^{42,52}, principalmente quando essa higienização é realizada por um paciente de idade avançada com habilidade motora deficiente e visão limitada⁴². Por esse motivo, há a necessidade de utilizar meios químicos para a higienização de próteses removíveis. A escolha das soluções de imersão avaliadas nesta pesquisa levou em consideração a disponibilidade desses produtos no mercado e evidência científica na literatura: hipoclorito 0,25%^{42,56,57,61,62,83,84}; clorexidina 2%^{42,55,64,83}, peróxido alcalino^{42,64,85-88}. A ação do hipoclorito de sódio é atribuída aos íons de hidroxila e cloro, que causam uma inativação irreversível de enzimas, dissolução de mucina e outras substâncias orgânicas⁴². Já a ação da clorexidina se dá ao fato de ser uma molécula catiônica, que se liga à célula de *C. albicans*, esse contato provoca severas degenerações ao citoplasma, fragmentação e descamação da parede celular, devido a um desequilíbrio osmótico da célula, resultando em morte celular⁴². A escolha da clorexidina a uma concentração de 2%, foi tomada baseada na literatura juntamente com o uso comercial dessa concentração para desinfecção de próteses, superfícies e instrumentais que entram em contato com a cavidade oral. Os peróxidos alcalinos são comercializados como pastilhas efervescentes, quando dissolvidos em água, transformam-se em uma solução de peróxido de hidrogênio alcalino. Essa solução promove oxidação e liberação de bolhas de oxigênio, possibilitando uma ação química e mecânica na limpeza das próteses⁴².

A viabilidade (UFC/mL) de células de *C. albicans* sobre os espécimes submetidos à imersão em nosso estudo demonstrou que a resina COS apresentou mais UFC/mL que a CLA, independente da solução avaliada. Comparando essas duas resinas de acordo com cada solução de imersão utilizada, observou-se que a

resina COS apresentou viabilidade (UFC/mL) estatisticamente superior à CLA após imersão em PBS (grupo controle), entretanto essas resinas foram estatisticamente semelhantes quanto a viabilidade quando submetidos à imersão em hipoclorito de sódio e clorexidina. As resinas CLA e COS também foram estatisticamente semelhantes quando imersas em peróxido alcalino. Um ponto importante a ser abordado é que a utilização do peróxido alcalino foi estatisticamente semelhante ao grupo controle, em ambas as resinas, logo não há diferença estatística entre imergir os espécimes contaminados com biofilme em peróxido alcalino ou em uma solução inerte (PBS) para controlar a contaminação. Esse resultado está em consonância com os achados de Silva et al.⁸⁵ (2008), onde a imersão por 10 minutos em Corega Tabs foi menos eficiente na UFC/mL que a imersão por igual período em hipoclorito de sódio 1%, clorexidina 2% e outras soluções. Da mesma forma, outros estudos concluíram que este produto não reduziu UFC/mL do biofilme⁸⁶, foram ineficientes na remoção de biofilme de *Candida spp.* sobre espécimes de resina para base de prótese e não impediram a recolonização do biofilme⁸⁷. A imersão em peróxido alcalino por 30 minutos foi apontada com eficiência semelhante à do hipoclorito de sódio⁸⁸. Entretanto esse estudo clínico avaliou a eficácia da descontaminação do biofilme formado sobre aparelho removível maxilar de pacientes dentados após apenas um dia sem higienizá-lo⁸⁸, situação completamente distinta da utilizada em nossa investigação. Além de que, o tempo de imersão recomendado pelo fabricante é de 10 minutos.

Já os biofilmes maduros tratados apenas por imersão em hipoclorito de sódio 0,25% e clorexidina 2% foram estatisticamente semelhantes e efetivos na eliminação completa das UFC/mL na atual investigação, tanto para a CLA como para a COS. A escolha da concentração de 0,25% para o hipoclorito de sódio levou em consideração os relatos da literatura atestando seu o ótimo desempenho da redução do biofilme de Ca, bem como a ausência de alterações físicas e mecânicas sobre a resina acrílica convencional^{56,57,61,62,84}. Os resultados obtidos pela imersão em hipoclorito de sódio 0,25%, na presente investigação, corroboram com a literatura, onde essa mesma concentração apresentou excelentes reduções de UFC/mL^{56,57,61,62, 84}.

Uma revisão sistemática recente investigando evidências científicas sobre as práticas de higiene das próteses removíveis em relação à redução de UFC/mL, cor e estabilidade dimensional⁴², corrobora com nossos resultados em diversos aspectos:

(1) imersão em digluconato de clorexidina 0,2% e hipoclorito de sódio 0,5% levam a reduções significativas de UFC/mL; (2) imersão em peróxido alcalino apenas alcançou ótimos resultados de higienização quando associado à escovação mecânica; (3) associação da escovação à imersão com soluções de hipoclorito de sódio ou gluconato de clorexidina apresentaram eficiência significativamente superior à escovação isoladamente, fato este que também corrobora com nossos resultados⁴².

No estudo desenvolvido por Silva et al.⁸³ (2011) mostrou que a imersão em hipoclorito de sódio (1 e 2%) e o gluconato de clorexidina 4% apresentaram efeito fungicida sobre as células de *C. albicans*. O hipoclorito de sódio (1% e 2%) também foi capaz de eliminar quase que completamente as células mortas de *C. albicans* que estavam aderidas à resina acrílica, já a clorexidina não, as células mortas mantiveram-se aderidas aos espécimes⁸³. Esse fato se deve possivelmente ao pH, pois o biofilme naturalmente apresenta um pH próximo ao neutro, logo valores superiores ou inferiores a esses alteram o metabolismo e as propriedades superficiais do micro-organismo, bem como da superfície sólida, aumentando a repulsão eletrostática entre eles e consequentemente a adesão do micro-organismo à superfície⁸³. O hipoclorito tem pH alcalino (pH > 11), a clorexidina um pH neutro, a neutralidade do pH da clorexidina favoreceu a permanência das células aderidas à superfície⁸³. As imagens fornecidas pelo MEV não detectaram alterações morfológicas nas células de *C. albicans* nos espécimes tratados com clorexidina 4%, já no hipoclorito 1% as leveduras e hifas remanescentes apresentaram alterações morfológicas como invaginações, essa alteração foi atribuída à perda da integridade da membrana celular e liberação do conteúdo citoplasmático⁸³.

O metabolismo celular dos espécimes submetidos à imersão, avaliado por XTT, em nosso estudo demonstrou que a resina COS apresentou metabolismo total superior à CLA, independente da solução avaliada. Esse fato corrobora com os dados obtidos de UFC/mL dos espécimes expostos à imersão desta investigação. Entretanto, quando comparadas dentro de cada solução de imersão, as duas resinas foram estatisticamente semelhantes. Todas as soluções avaliadas (hipoclorito, clorexidina e peróxido alcalino) reduziram significativamente o metabolismo em relação ao grupo controle, entretanto a redução foi maior nos espécimes submetidos ao hipoclorito e a clorexidina, estas duas soluções foram estatisticamente semelhantes, seguido do peróxido alcalino. Um fato interessante é que a imersão em

peróxido alcalino não alterou o UFC/mL, mas reduziu o metabolismo no teste de XTT, isso provavelmente aconteceu porque o peróxido alcalino causou danos imediatos aos micro-organismos, gerando uma redução de seu metabolismo nas 3 h de incubação do teste XTT, porém, os danos causados não foram irreversíveis e possibilitou que os micro-organismos se reproduzissem nos meios de cultura ágar, onde foram plaqueados, após as 48 h de incubação.

Em nosso estudo, a imersão em hipoclorito de sódio reduziu o metabolismo em relação ao controle em 90,1% para a CLA e 92,2% para a COS, já a clorexidina reduziu 91,23% para a CLA e 93,17% para a COS. Comparando os achados do nosso estudo em relação ao metabolismo celular (XTT) com a literatura foi observado em uma pesquisa *in vitro* recente⁸⁴ que a imersão por 20 minutos em hipoclorito de sódio 0,25% reduziu completamente o metabolismo celular de todas as espécies avaliadas (*C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*), bem como reduziu completamente o UFC/mL sobre espécimes de resina acrílica⁸⁴. Resultado semelhante foi obtido em outra pesquisa *in vitro*⁶⁴, onde a imersão por 10 segundos de espécimes de resina acrílica contaminados em hipoclorito de sódio 1% reduziu 99,9% do metabolismo e 99,5% com digluconato de clorexidina a 1%⁶⁴. Da mesma forma, outra investigação demonstrou uma redução de 88% do metabolismo de um biofilme de *C. albicans* sobre espécimes de resina acrílica após imersão por 90 segundos em hipoclorito 1%⁵⁵.

A higienização adequada da prótese é importantíssima para a manutenção da saúde bucal e prevenção da estomatite protética, com o objetivo de potencializar a eficácia da remoção do biofilme protético, a literatura recomenda a associação dos métodos mecânicos com os químicos⁴². Para avaliar o efeito dessa associação sobre os espécimes de resina CLA e COS, foi realizado um ciclo de escovação em solução do sabonete líquido Lifebuoy 0,78%^{48,49} seguido pela imersão nas respectivas soluções de higiene (hipoclorito de sódio 0,25%, clorexidina 2%, peróxido alcalino e grupo controle- PBS). Na literatura não há um consenso quanto ao tempo de escovação de próteses, um estudo clínico prévio revelou que o tempo médio de escovação de uma arcada com dentes naturais deve ser 2 minutos¹⁰⁴. A escolha por 10 segundos levou em consideração metodologias relatadas na literatura^{55,59,64}, juntamente com o tamanho dos espécimes de 10mm x 2 mm.

A contagem de UFC/mL de todos os espécimes submetidos à escovação e imersão da resina COS, sem levar em consideração a solução de imersão avaliada,

apresentou mais UFC/mL que a CLA. A presença de mais UFC/mL em resinas impressas em relação à termopolimerizável é sustentado por estudos prévios⁸⁰⁻⁸². Na avaliação das duas resinas em relação à cada solução de imersão utilizada, a resina COS apresentou UFC/mL estatisticamente superior à CLA nos espécimes submetidos à escovação e imersão em PBS (grupo controle), para as demais soluções de imersão, a resina CLA e COS foram estatisticamente semelhantes (Figura 20). Tanto os espécimes da CLA como os da COS submetidos à escovação e imersão em hipoclorito e clorexidina, resultaram na eliminação completas das UFC/mL, logo as duas soluções e as duas resinas foram estatisticamente semelhantes. A escovação seguida da imersão em peróxido alcalino possibilitou uma redução estatisticamente significativa de UFC/mL em relação ao grupo controle em ambas as resinas. Vale lembrar que apenas a imersão em peróxido alcalino não causou uma redução estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, tanto da CLA como na COS, em contrapartida a associação da escovação à imersão em peróxido alcalino possibilitou uma redução estatisticamente significativa em relação à UFC/mL nas duas resinas (Figura 21). A literatura corrobora com este achado, pois a escovação com peróxido alcalino foi capaz de reduzir o UFC/mL, mas só a imersão nesta solução, não⁶⁴. Na atual investigação, o metabolismo dos espécimes contaminados por *C. albicans* e expostos à associação da escovação e imersão em peróxido alcalino também seguiu o mesmo comportamento do UFC/mL e reduziu significativamente em relação ao grupo controle, mas foi estatisticamente inferior ao hipoclorito e a clorexidina.

Com relação ao metabolismo celular dos espécimes descontaminados pela associação da escovação e imersão nas respectivas soluções, foi observado que o metabolismo total de todos os espécimes de resina COS, sem levar em consideração à solução imersa, foi superior ao metabolismo total de todos os espécimes da resina CLA. Esse fato corrobora com os dados obtidos de UFC/mL dos espécimes expostos à escovação e imersão desta investigação. Ao comparar as duas resinas de acordo com a solução de imersão, ao contrário do que foi observado no XTT dos espécimes submetidos à imersão, onde as duas resinas foram semelhantes em todas as soluções de imersão, quando realizado associação da escovação e imersão a COS teve metabolismo superior à CLA no peróxido alcalino e na clorexidina 2%, nas demais soluções de imersão (hipoclorito e grupo controle) essa associação resultou em um metabolismo estatisticamente semelhante

nas duas resinas. Os espécimes de CLA submetidos à escovação e imersão em hipoclorito apresentaram metabolismo semelhantes àqueles imersos em clorexidina 2%, esse mesmo comportamento foi observado nos espécimes de COS. Apesar de não apresentar a mesma redução de metabolismo que o hipoclorito e a clorexidina apresentaram, em ambas as resinas, o peróxido alcalino provocou uma redução do metabolismo estatisticamente significativa em relação ao grupo controle e só escovação, em ambas as resinas. Quanto ao metabolismo, não houve diferença entre o grupo controle e os grupos expostos apenas a escovação, em ambas as resinas. Estudos prévios apresentam semelhança de comportamento com a atual investigação, pois a escovação por 10 segundos com clorexidina 1%⁶⁴, clorexidina 2%⁵⁵ e hipoclorito de sódio 1%^{64,55}, foram responsáveis pela maior redução de metabolismo de *C. albicans* sobre espécimes de resina acrílica avaliados por XTT.

É importante observar que o grupo controle exposto apenas à imersão em PBS apresentou um metabolismo estatisticamente superior ao grupo controle exposto à associação da escovação com a imersão, comparando esses dois métodos. Dessa forma, fica claro que adicionar escovação à imersão proporciona uma redução estatística do metabolismo de 84,13% em relação ao controle expostos apenas à imersão em PBS (Figura 23). Esse fato mais uma vez comprova que a associação da técnica de escovação e imersão proporcionam melhores resultados⁴². A literatura a respeito sustenta esses dados, pois a escovação em água, ausente de efeitos químicos antimicrobianos, resultou em uma redução de 96,1%⁶⁴ e 96%⁵⁵ do metabolismo por XTT de biofilme sobre espécimes de resina acrílica em relação ao grupo controle (sem escovação). Por esse motivo que a associação da escovação com a imersão em hipoclorito (CLA:75,86% e COS:67,51%) e a clorexidina (CLA:75,20% e COS:63,89%) apresentaram uma redução metabólica em porcentagem em relação ao seu grupo controle (escovação + imersão em PBS) numericamente menor quando comparado com os espécimes submetidos apenas à imersão em hipoclorito (CLA:90,10% e COS:92,20%) e clorexidina (CLA:91,38% e COS:93,17%) em relação ao seu grupo controle (imersão em PBS). Pois o grupo controle exposto à associação da escovação com a imersão resultou em um valor numérico bem inferior ao grupo controle exposto apenas à imersão. Mas numericamente, a simples imersão em hipoclorito (CLA:0,019 e COS:0,021) e clorexidina (CLA:0,017 e COS:0,018), por si só resultou em um valor de metabolismo

médio por XTT semelhante quando associados com a escovação (hipoclorito-CLA:0,008 e COS:0,013) (Clorexidina- CLA:0,008 e COS:0,014).

Apesar do teste XTT ter apontado alguma atividade metabólica nos espécimes expostos à imersão ou escovação e imersão em hipoclorito e clorexidina, a contagem de colônias (UFC/mL) mostrou que a *C. albicans* não foi capaz de sobreviver e se reproduzirem nos meios de cultura (ágar) após 48h de incubação. Provavelmente, o hipoclorito e a clorexidina continuam agindo sobre o biofilme mesmo após o período de 3 horas de incubação do teste de XTT, o que possivelmente levou a sua completa inativação na avaliação de UFC/mL.

É preciso ficar atento a rugosidade superficial das resinas para base protética após ciclos de escovação e imersão. Na atual investigação, a resina CLA, após ser exposta à ciclos de escovação e imersão, apresentou um aumento da rugosidade superficial, sem levar em consideração à solução de imersão a qual foi exposta. Já a resina impressa COS, apesar de apresentar uma tendência numérica à redução de sua rugosidade, de acordo com os valores médios de rugosidade, não foi estatisticamente significativa. É possível que ciclos mais longos de imersão e escovação resultem em diferenças mais notáveis neste comportamento.

Em nosso estudo, a microscopia eletrônica de varredura observou a presença mais expressiva de células com morfologia de hifas sobre a resina impressa COS, em comparação com a CLA. Além disso, a COS apresentou um biofilme mais robusto aderido ao espécime que o da CLA. Sabe-se que o polimorfismo (leveduras, pseudo-hifas e hifas) de *C. albicans* é um importante fator de virulência, especialmente as hifas¹⁰⁵. Hifas de *C. albicans* representam a morfologia de maior potencial patogênico, pois têm capacidade de exercer força mecânica, que auxilia na penetração no tecido epitelial do hospedeiro, danifica os tecidos endoteliais e assim possibilita a disseminação da infecção na corrente sanguínea do organismo¹⁰⁵. Na busca de uma literatura que justifique nossos achados, foi encontrado uma pesquisa *in vitro*¹⁰⁶ comparando o desenvolvimento de biofilme de *C. albicans* sobre espécimes de resina acrílica para base protética originado de hifas e de leveduras¹⁰⁶. Nesse estudo¹⁰⁶ o biofilme originado das hifas resultou em um biofilme de maior massa e mais resistente a remoção em comparação com o biofilme formado por leveduras¹⁰⁶. Os espécimes de resina acrílica com maior rugosidade superficial apresentaram maior número de células após a remoção dos biofilmes de hifas e de leveduras, ou seja, a rugosidade favoreceu a retenção de hifas e

leveduras ao espécime¹⁰⁶. Espécimes contaminados com biofilme de hifas apresentaram maior metabolismo (ensaio de XTT) em relação ao biofilme de levedura, após serem expostos à desinfecção por imersão em uma solução a base de percarbonato de sódio¹⁰⁶, produto semelhante ao utilizado na atual investigação¹⁰⁶. Esse resultado se deve possivelmente a maior presença de hifas e biofilme mais espesso. Isso nos permite considerar que a resina COS favorece a presença de mais hifas que a CLA, conseqüentemente a presença de um biofilme mais robusto, de mais difícil remoção, de maior metabolismo e de mais células vivas após exposição em soluções de higiene.

A remoção das células mortas da superfície é um achado clínico importantíssimo, pois as células mortas que permanecem aderidas à superfície de uma prótese atuam como um agente de adesão para novos micro-organismos⁸⁴. Na nossa avaliação de microscopia confocal, foi possível detectar visualmente o efeito da associação da escovação e imersão em soluções de higiene sobre espécimes de resina CLA e COS contaminados com biofilme de *C. albicans*. Os espécimes tratados pela associação da escovação e imersão em hipoclorito de sódio, tanto da resina CLA como COS, reduziram consideravelmente a espessura do biofilme, eliminaram quase que em sua totalidade as células mortas aderidas ao espécime, bem como a matriz polimérica extracelular, pois é observado uma fluorescência vermelha (células mortas) bem restrita sobre a superfície do espécime (Figura 28 a, e). Esse comportamento do hipoclorito 0,25% também é relatado em uma análise qualitativa em microscópio confocal, onde esta concentração removeu quase 100% das células de diferentes espécies de *Candida spp*, e as células que ficaram aderidas, estavam mortas⁸⁴. Já os espécimes imersos em clorexidina 2%, apesar de apresentarem espessura reduzida em relação ao grupo controle, foi observado um valor maior de fluorescência tanto verde (células vivas) quando vermelha (células mortas) em relação ao hipoclorito, fruto de células que permaneceram aderidas ao espécime (Figura 28 b, f). Como esperado, o peróxido alcalino (Figura 28 c, g) reduziu a espessura do biofilme em relação ao grupo controle, mas bem menos do que a redução observada pelo hipoclorito e pela clorexidina, já que é observado uma fluorescência verde (células vivas) expressiva. É importante destacar que nos espécimes expostos ao peróxido alcalino foi observada a presença de hifas em ambas as resinas, com maior predominância destas na resina COS.

Apesar de não utilizar a escovação em sua metodologia⁸³, apenas imersão, a avaliação de confocal e MEV de um estudo in vitro utilizando hipoclorito de sódio (1% e 2%) e gluconato de clorexidina (4%) na viabilidade celular, remoção de biofilme e morfologia do biofilme de *C. albicans* sobre espécimes de resina acrílica para base protética corroborou com nossa pesquisa. O artigo⁸³ cita que a imersão em hipoclorito de sódio eliminou quase que completamente as células de *C. albicans* mortas aderidas na resina acrílica⁸³. Isso ocorre porque o hipoclorito de sódio dissolve mucina e substâncias orgânicas, como é o caso da matriz polimérica extracelular⁴². Outro estudo in vitro¹⁰⁷ também corrobora com nossos achados, onde a microscopia de varredura confocal a laser de espécimes de resina acrílica para base de prótese contaminados com biofilme de *C. albicans* e exposto à imersão por 10 minutos em clorexidina 4% conseguiu reduzir o biofilme, mas não obteve mesmo desempenho do hipoclorito 2%, que praticamente removeu por completo as células fúngicas¹⁰⁷.

Dentro das limitações desse estudo, importantes resultados foram apresentados quanto ao comportamento de uma resina para impressão 3D frente à sua capacidade de reduzir a formação de biofilme de *C. albicans*, quando submetida à imersão, e à escovação combinada com a imersão em soluções desinfetantes comumente indicadas em usuários de próteses removíveis. Uma importante limitação desse estudo foi a avaliação de apenas uma resina para impressão 3D e a ausência de uma avaliação de propriedades de superfície da resina que possam ter influenciado nos resultados, já que a menor rugosidade não interferiu nos resultados. Ainda como limitação deste estudo podemos citar a utilização de apenas um micro-organismo (cepa padrão SC5314), o que nos impede de observar possíveis relações de antagonismo e sinergismo entre outros micro-organismos, que certamente possibilitaria um maior espectro de conclusões, além da ausência de película salivar, que pode afetar a adesão inicial da *C. albicans* à superfície. Outra limitação é o formato dos espécimes, discos, o que contraria a forma geométrica complexa obtida para uma base de prótese total real.

Dessa forma, sugere-se que estudos futuros incluam a avaliação da hidrofobicidade e da energia livre de superfície dessas resinas, buscando elucidar a explicação dos resultados obtidos em função desses fatores, além da rugosidade. A avaliação em biofilmes mistos, com a influência da película salivar, é sem dúvida

muito relevante, o que pode ser investigado em espécimes com geometria semelhante à uma base de prótese real.

7 CONCLUSÃO

Segundo a metodologia e condições experimentais executadas na atual investigação, foi possível concluir que:

- a. Apesar da resina impressa apresentar um biofilme mais espesso e com mais hifas, sua exposição aos protocolos de higiene possibilitou um controle efetivo desse biofilme.
- b. Imersão em hipoclorito 0,25%, associada ou não a escovação, foi o melhor protocolo de higiene, além de eliminar as UFC/mL, removeu, quase que completamente, as células mortas sobre os espécimes.
- c. Para próteses removíveis com a presença de estrutura metálica, o protocolo mais indicado é a imersão em clorexidina 2%, associada ou não à escovação em solução lifebuoy, em seguida a imersão em peróxido alcalino associado à escovação prévia com lifebuoy.
- d. Na ausência de uma solução química para imersão, a escovação em uma solução inerte traz resultados interessantes para o controle do biofilme.

REFERÊNCIAS*

1. Alhareb AO, Akil HM, Ahmad ZA. PMMA denture base composites reinforced by nitrile rubber and ceramic fillers. *Polym Polym Compos*. 2016; 24(1): 71–9.
2. Zafar MS. Prosthodontic applications of polymethyl methacrylate (PMMA): an update. *Polymers (Basel)*. 2020; 12(10): 1–35.
3. Janssens J-P, Krause K-H. Pneumonia in the very old. *Lancet Infect Dis*. 2004; 4(2): 112–24.
4. Sjögren P, Nilsson E, Forsell M, Johansson O, Hoogstraate J. A systematic review of the preventive effect of oral hygiene on pneumonia and respiratory tract infection in elderly people in hospitals and nursing homes: effect estimates and methodological quality of randomized controlled trials. *J Am Geriatr Soc*. 2008; 56(11): 2124–30.
5. Terpenning M. Geriatric oral health and pneumonia risk. *Clin Infect Dis*. 2005; 40(12): 1807–10.
6. Straioto FG, Ricomini Filho AP, Fernandes Neto AJ, del Bel Cury AA. Polytetrafluorethylene added to acrylic resins: mechanical properties. *Braz Dent J*. 2010; 21(1): 55–9.
7. Pero AC, Barbosa DB, Marra J, Ruvolo-Filho AC, Compagnoni MA. Influence of microwave polymerization method and thickness on porosity of acrylic resin. *J Prosthodont Off J Am Coll Prosthodont*. 2008; 17(2): 125–9.
8. Regis RR, Cunha TR, Della Vecchia MP, Ribeiro AB, Silva-Lovato CH, De Souza RF. A randomised trial of a simplified method for complete denture fabrication: patient perception and quality. *J Oral Rehabil*. 2013; 40(7): 535–45.
9. Vecchia MP Della, Regis RR, Cunha TR, de Andrade IM, da Matta JCS, de Souza RF. A randomized trial on simplified and conventional methods for complete denture fabrication: cost analysis. *J Prosthodont Off J Am Coll Prosthodont*. 2014; 23(3): 182–91.
10. Cunha TR, Della Vecchia MP, Regis RR, Ribeiro AB, Muglia VA, Mestriner W, et al. A randomised trial on simplified and conventional methods for complete denture fabrication: masticatory performance and ability. *J Dent*. 2013; 41(2): 133–42.
11. Alghazzawi TF. Advancements in CAD/CAM technology: options for practical implementation. *J Prosthodont Res*. 2016; 60(2): 72–84.
12. Bidra AS, Dds DT, Agar JR. Computer-aided technology for fabricating complete dentures : systematic review of historical background, current status, and future perspectives. *J Prosthet Dent*. 2012; 109(6): 361–6.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

13. McLaughlin JB, Ramos VJ, Dickinson DP. Comparison of fit of dentures fabricated by traditional techniques versus CAD/CAM technology. *J Prosthodont Off J Am Coll Prosthodont*. 2019; 28(4): 428–35.
14. Lee S, Hong S, Paek J, Pae A, Kwon K, Noh K. Comparing accuracy of denture bases fabricated by injection molding, CAD / CAM milling, and rapid prototyping method. 2019; 2015: 55–64.
15. Choi JE, Ng TE, Leong CKY, Kim H, Li P, Waddell JN. Adhesive evaluation of three types of resilient denture liners bonded to heat-polymerized, autopolymerized, or CAD-CAM acrylic resin denture bases. *J Prosthet Dent*. 2018; 120(5): 699–705.
16. Al-dwairi ZN, England M, Glasgow M, Edinburgh M. A Comparison of the surface properties of CAD / CAM and conventional polymethylmethacrylate (PMMA). 2019; 28: 452–7.
17. Ayman AD. The residual monomer content and mechanical properties of CAD\CAM resins used in the fabrication of complete. *Electron physician Clin*. 2017; 9: 4766–72.
18. Al-dwairi ZN, England M, Glasg M, Ed M, Tahboub KY, Baba NZ, et al. A comparison of the flexural and impact strengths and flexural modulus of CAD / CAM and conventional heat-cured polymethyl methacrylate (PMMA). 2018; 1–9.
19. Al-Fouzan AF, Al-Mejrad LA, Albarrag AM. Adherence of Candida to complete denture surfaces in vitro: a comparison of conventional and CAD/CAM complete dentures. *J Adv Prosthodont*. 2017; 9(5): 402–8.
20. Tasaka A, Matsunaga S, Odaka K, Ishizaki K, Ueda T, Abe S, et al. Accuracy and retention of denture base fabricated by heat curing and additive manufacturing. *J Prosthodont Res*. 2019; 63(1): 85–9. <https://doi.org/10.1016/j.jpor.2018.08.007>.
21. Kalberer N, Mehl A, Schimmel M, Müller F, Srinivasan M. CAD-CAM milled versus rapidly prototyped (3D-printed) complete dentures: an in vitro evaluation of trueness. *J Prosthet Dent*. 2019;121(4):637–43.
22. Yoon SN, Oh KC, Lee SJ, Han JS, Yoon HI. Tissue surface adaptation of CAD-CAM maxillary and mandibular complete denture bases manufactured by digital light processing: a clinical study. *J Prosthet Dent*. 2020; 124(6): 682–9. <https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2019.11.007>.
23. Yoon HI, Hwang HJ, Ohkubo C, Han JS, Park EJ. Evaluation of the trueness and tissue surface adaptation of CAD-CAM mandibular denture bases manufactured using digital light processing. *J Prosthet Dent*. 2018; 120(6): 919–26. <https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2018.01.027>.
24. Nishiyama H, Taniguchi A, Tanaka S, Baba K. Novel fully digital workflow for removable partial denture fabrication. *J Prosthodont Res*. 2020; 64(1): 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.jpor.2019.05.002>.

25. Unkovskiy A, Wahl E, Zander AT, Huettig F, Spintzyk S. Intraoral scanning to fabricate complete dentures with functional borders: a proof-of-concept case report. *BMC Oral Health*. 2019; 19(1): 1–7.
26. Wang C, Shi YF, Xie PJ, Wu JH. Accuracy of digital complete dentures: a systematic review of in vitro studies. *J Prosthet Dent*. 2021; 125(2): 249–56. <https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2020.01.004>.
27. Stansbury JW, Idacavage MJ. 3D printing with polymers: challenges among expanding options and opportunities. *Dent Mater*. 2016; 32(1): 54–64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2015.09.018>.
28. Berg GJ, Gong T, Fenoli CR, Bowman CN. A dual-cure, solid-state photoresist combining a thermoreversible diels-alder network and a chain growth acrylate network. *Macromolecules*. 2014; 47(10): 3473–82.
29. Yan C, Shi Y, Yang J, Liu J. Multiphase polymeric materials for rapid prototyping and tooling technologies and their applications. *Compos Interfaces*. 2010; 17(2–3): 257–71.
30. Rautemaa R, Ramage G. Oral candidosis-clinical challenges of a biofilm disease. *Crit Rev Microbiol*. 2011; 37(4): 328–36.
31. Kim J, Sudbery P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *J Microbiol*. 2011; 49(2): 171–7.
32. Finkel JS, Mitchell AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. Vol. 9, *Nature reviews. Microbiology*. England; 2011. p. 109–18.
33. Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. In vitro growth and analysis of *Candida* biofilms. *Nat Protoc*. 2008; 3(12): 1909–24.
34. Chau VB, Saunders TR, Pimsler M, Elfring DR. In-depth disinfection of acrylic resins. *J Prosthet Dent*. 1995; 74(3): 309–13.
35. Pereira-Cenci T, Del Bel Cury AA, Crielaard W TCJ. Development of *Candida*-associated denture stomatitis: new insights. *J Appl Oral Sci*. 2008; 16(2): 86–94.
36. O'Donnell LE, Smith K, Williams C, Nile CJ, Lappin DF, Bradshaw D, et al. Dentures are a reservoir for respiratory pathogens. *J Prosthodont Off J Am Coll Prosthodont*. 2016; 25(2): 99–104.
37. Sumi Y, Miura H, Sunakawa M, Michiwaki Y, Sakagami N. Colonization of denture plaque by respiratory pathogens in dependent elderly. *Gerodontology*. 2002; 19(1): 25–9.
38. Sumi Y, Kagami H, Ohtsuka Y, Kakinoki Y, Haruguchi Y, Miyamoto H. High correlation between the bacterial species in denture plaque and pharyngeal microflora. *Gerodontology*. 2003; 20(2): 84–7.
39. Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont Off J Am Coll Prosthodont*. 2011; 20(4): 251–60.

40. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJL, Marcenes W. Global burden of severe tooth loss: a Systematic review and meta-analysis. *J Dent Res*. 2014; 93: 20S-28S.
41. Kanli A, Demirel F, Sezgin Y. Oral candidosis, denture cleanliness and hygiene habits in an elderly population. *Aging Clin Exp Res*. 2005; 17(6): 502–7.
42. Papadiochou S, Polyzois G. Hygiene practices in removable prosthodontics: a systematic review. *Int J Dent Hyg*. 2018; 16(2): 179–201.
43. Hilgert JB, Giordani JM do A, de Souza RF, Wendland EMDR, D'Avila OP, Hugo FN. Interventions for the management of denture stomatitis: a systematic review and meta-Analysis. *J Am Geriatr Soc*. 2016; 64(12): 2539–45.
44. Appleton SS. Candidiasis: pathogenesis, clinical characteristics, and treatment. *J Calif Dent Assoc*. 2000; 28(12): 942–8.
45. Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2011; 75(2): 213–67.
46. Banting DW, Hill SA. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. *Spec care Dent Off Publ Am Assoc Hosp Dent Acad Dent Handicap Am Soc Geriatr Dent*. 2001; 21(1): 4–8.
47. Apratim A, Shah SS, Sinha M, Agrawal M, Chhaparia N, Abubakkar A. Denture hygiene habits among elderly patients wearing complete dentures. *J Contemp Dent Pract*. 2013;14(6):1161–4.
48. de Oliveira Zoccolotti J, Tasso CO, Arbeláez MIA, Malavolta IF, da Silva Pereira EC, Esteves CSG, et al. Properties of an acrylic resin after immersion in antiseptic soaps: low-cost, easy-access procedure for the prevention of denture stomatitis. *PLoS One*. 2018; 13(8): 1–22.
49. Zoccolotti J de O, Suzuki RB, Rinaldi TB, Pellissari CVG, Sanitá PV, Jorge JH. Physical properties of artificial teeth after immersion in liquid disinfectant soaps. *Am J Dent*. 2019; 32(1): 14–20.
50. Tasso C, de Oliveira Zoccolotti J, Ferrisse T, Malavolta I, Jorge J. Effectiveness of disinfectant liquid soaps in the reduction of candida spp present in complete dentures: a crossover randomized clinical trial. *Int J Prosthodont*. 2020; 33(6): 620–8.
51. Ribas BR, Tasso CO, Ferrisse TM, Jorge JH. Influence of brushing with antiseptic soap solution on the surface and biological properties of an acrylic denture base resin. *Am J Dent*. 2022; 35(5): 238–44.
52. Aslanimehr M, Mojarad N, Ranjbar S, Aalaei S. In vitro comparison of the effects of microwave irradiation and chemical and mechanical methods on the disinfection of complete dentures contaminated with *Candida albicans*. *Dent Res J (Isfahan)*. 2018; 15(5): 340–6.

53. Buergers R, Rosentritt M, Schneider-Brachert W, Behr M, Handel G, Hahnel S. Efficacy of denture disinfection methods in controlling *Candida albicans* colonization in vitro. *Acta Odontol Scand*. 2008; 66(3): 174–80.
54. Pavarina AC, Machado AL, Giampaolo ET, Vergani CE. Effects of chemical disinfectants on the transverse strength of denture base acrylic resins. *J Oral Rehabil*. 2003; 30(11): 1085–9.
55. Pellizzaro D, Polyzois G, Machado AL, Giampaolo ET, Sanitá PV, Vergani CE. Effectiveness of mechanical brushing with different denture cleansing agents in reducing in vitro *Candida albicans* biofilm viability. *Braz Dent J*. 2012; 23(5): 547–54.
56. Arruda CNF, Sorgini DB, De Oliveira VC, Macedo AP, Lovato CHS, De Paranhos HFO. Effects of denture cleansers on heat-polymerized acrylic resin: a five-year-simulated period of use. *Braz Dent J*. 2015; 26(4): 404–8.
57. Badaró MM, Bueno FL, Arnez RM, Oliveira V de C, Macedo AP, de Souza RF, et al. The effects of three disinfection protocols on *Candida* spp., denture stomatitis, and biofilm: a parallel group randomized controlled trial. *J Prosthet Dent*. 2020; 124(6): 690–8.
58. Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Vergani CE, Giampaolo ET. Hardness of heat-polymerized acrylic resins after disinfection and long-term water immersion. *J Prosthet Dent*. 2005; 93(2): 171–6.
59. Panariello BHD, Izumida FE, Moffa EB, Pavarina AC, Jorge JH, Giampaolo ET. Effects of short-term immersion and brushing with different denture cleansers on the roughness, hardness, and color of two types of acrylic resin. *Am J Dent*. 2015; 28(3): 150–6.
60. Pero AC, Scavassin PM, Nunes ÉM, Policastro VB, Giro G, Compagnoni MA. bond strength of artificial teeth attached to a microwave-polymerized denture base resin after immersion in disinfectant solutions. *J Prosthodont Off J Am Coll Prosthodont*. 2016; 25(7): 576–9.
61. Badaró MM, Salles MM, Leite VMF, de Arruda CNF, Oliveira VDC, do Nascimento C, et al. Clinical trial for evaluation of *Ricinus communis* and sodium hypochlorite as denture cleanser. *J Appl Oral Sci*. 2017; 25(3): 324–34.
62. Salles MM, Oliveira VDC, de Souza RF, da Silva CHL, Paranhos HDFO. Antimicrobial action of sodium hypochlorite and castor oil solutions for denture cleaning – in vitro evaluation. *Braz Oral Res*. 2015; 29(1): 1–6.
63. Masetti P, Arbeláez MIA, Pavarina AC, Sanitá PV, Jorge JH. Cytotoxic potential of denture base and relined acrylic resins after immersion in disinfectant solutions. *J Prosthet Dent*. 2018; 120(1): 155.e1-155.e7.
64. Panariello BHD, Izumida FE, Moffa EB, Pavarina AC, Jorge JH, Giampaolo ET. Effect of mechanical toothbrushing combined with different denture cleansers in reducing the viability of a multispecies biofilm on acrylic resins. *Am J Dent*. 2016; 29(3): 154–60.

65. Pavarina AC, Pizzolitto AC, Machado AL, Vergani CE, Giampaolo ET. An infection control protocol: effectiveness of immersion solutions to reduce the microbial growth on dental prostheses. *J Oral Rehabil.* 2003; 30(5): 532–6.
66. Altieri KT, Sanitá PV, Machado AL, Giampaolo ET, Pavarina AC VC. Effectiveness of two disinfectant solutions and microwave irradiation in disinfecting complete dentures contaminated with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Am Dent Assoc.* 2012; 143(3): 270–7.
67. J R. Ueber die zerlegungsprodukte des glyceryloxydes durch trockene destillation. *Justus Liebig's AnnChem.* 1843; 47(2): 113–48.
68. Bettencourt AF, Neves CB, de Almeida MS, Pinheiro LM, Oliveira SA e, Lopes LP, et al. Biodegradation of acrylic based resins: a review. *Dent Mater.* 2010; 26(5): e171-80.
69. Figuerôa RMS, Conterno B, Arrais CAG, Sugio CYC, Urban VM, Neppelenbroek KH. Porosity, water sorption and solubility of denture base acrylic resins polymerized conventionally or in microwave. *J Appl Oral Sci.* 2018; 26: 1–7.
70. Paleari AG, Marra J, Pero AC, Rodriguez LS, Ruvolo-Filho A, Compagnoni MA. Effect of incorporation of 2-tert-butylaminoethyl methacrylate on flexural strength of a denture base acrylic resin. *J Appl Oral Sci.* 2011; 19(3): 195–9.
71. Shim JS, Kim JE, Jeong SH, Choi YJ, Ryu JJ. Printing accuracy, mechanical properties, surface characteristics, and microbial adhesion of 3D-printed resins with various printing orientations. *J Prosthet Dent.* 2020; 124(4): 468–75. <https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2019.05.034>.
72. Gantz L, Fauxpoint G, Arntz Y, Pelletier H, Etienne O. In vitro comparison of the surface roughness of polymethyl methacrylate and bis-acrylic resins for interim restorations before and after polishing. *J Prosthet Dent.* 2021; 125(5): 833.e1-833.e10.
73. Arutyunov S, Kirakosyan L, Dubova L, Kharakh Y, Malginov N. Microbial adhesion to dental polymers for conventional , computer-aided subtractive and additive manufacturing : a comparative in vitro study. 2022; 11; 13(2):42. doi: 10.3390/jfb13020042.
74. Lee S, Hong SJ, Paek J, Pae A, Kwon KR, Noh K. Comparing accuracy of denture bases fabricated by injection molding, CAD/CAM milling, and rapid prototyping method. *J Adv Prosthodont.* 2019; 11(1): 55–64.
75. Revilla-León M, Meyers MJ, Zandinejad A, Özcan M. A review on chemical composition, mechanical properties, and manufacturing work flow of additively manufactured current polymers for interim dental restorations. *J Esthet Restor Dent.* 2019; 31(1): 51–7.
76. Scotti CK, Velo MM de AC, Rizzante FAP, Nascimento TR de L, Mondelli RFL, Bombonatti JFS. Physical and surface properties of a 3D-printed composite resin for a digital workflow. *J Prosthet Dent.* 2020; 124(5): 614.e1-614.e5.

77. Pantea M, Ciocoiu RC, Greabu M, Totan AR, Imre M, Țâncu AMC, et al. Compressive and flexural strength of 3d-printed and conventional resins designated for interim fixed dental prostheses: an in vitro comparison. *Materials (Basel)*. 2022; 15(9): 3075. doi: 10.3390/ma15093075.
78. Al-Qahtani AS, Tulbah HI, Binhasan M, Abbasi MS, Ahmed N, Shabib S, et al. Surface properties of polymer resins fabricated with subtractive and additive manufacturing techniques. *Polymers (Basel)*. 2021; 13(23): 4077. doi: 10.3390/polym13234077.
79. Jain S, Sayed ME, Shetty M, Alqahtani SM, Hussain M, Al D, et al. physical and mechanical properties of 3d-printed provisional crowns and fixed dental prosthesis resins compared to CAD / CAM milled and conventional provisional resins : a systematic review and meta-analysis. 2022; 14(13): 2691. doi: 10.3390/polym14132691.
80. Giti R, Dabiri S, Motamedifar M, Derafshi R. Surface roughness, plaque accumulation, and cytotoxicity of provisional restorative materials fabricated by different methods. *PLoS One*. 2021; 16(4): 1–12.
81. Simoneti DM, Pereira-Cenci T, Dos Santos MBF. Comparison of material properties and biofilm formation in interim single crowns obtained by 3D printing and conventional methods. *J Prosthet Dent*. 2022; 127(1): 168–72.
82. Meirowitz A, Rahmanov A, Shlomo E, Zelikman H, Dolev E, Sterer N. Effect of denture base fabrication technique on *candida albicans* adhesion in vitro. *Materials (Basel)*. 2021; 14(1): 1–8.
83. da Silva PMB, Acosta EJTR, Pinto L de R, Graeff M, Spolidorio DMP, Almeida RS, et al. Microscopical analysis of *Candida albicans* biofilms on heat-polymerised acrylic resin after chlorhexidine gluconate and sodium hypochlorite treatments. *Mycoses*. 2011; 54(6): e712-7.
84. Badaró MM, Bueno FL, Makrakis LR, Araújo CB, Oliveira V de C, Macedo AP, et al. Action of disinfectant solutions on adaptive capacity and virulence factors of the candida spp. Biofilms formed on acrylic resin. *J Appl Oral Sci*. 2021; 29: 1–11.
85. da Silva FC, Kimpara ET, Mancini MNG, Balducci I, Jorge AOC, Koga-Ito CY. Effectiveness of six different disinfectants on removing five microbial species and effects on the topographic characteristics of acrylic resin. *J Prosthodont*. 2008; 17(8): 627–33.
86. Gornitsky M, Frcd C, Paradis I, Landaverde G, Malo A, Velly AM. A Clinical and Microbiological Evaluation of Denture Cleansers for Geriatric Patients in. *J Can Dent Assoc*. 2002; 68(1): 39–45.

87. Vieira APC, Senna PM, da Silva WJ, Del Bel Cury AA. Long-term efficacy of denture cleansers in preventing *Candida* spp. Biofilm recolonization on liner surface. *Braz Oral Res.* 2010; 24(3): 342–8.
88. Rossato MB, Unfer B, May LG, Braun KO. Analysis of the effectiveness of different hygiene procedures used in dental prostheses. *Oral Health Prev Dent.* 2011; 9(3): 221–7.
89. Marra J, Paleari AG, Rodriguez LS, Leite ARP, Pero AC, Compagnoni MA. Effect of an acrylic resin combined with an antimicrobial polymer on biofilm formation. *J Appl Oral Sci.* 2012; 20(6): 643–8.
90. Izumida FE, Moffa EB, Vergani CE, Machado AL, Jorge JH, Giampaolo ET. In vitro evaluation of adherence of *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Streptococcus mutans* to an acrylic resin modified by experimental coatings. *Biofouling.* 2014; 30(5): 525–33.
91. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Pavarina AC, Machado AL, Carlos IZ. Effect of microwave postpolymerization treatment and of storage time in water on the cytotoxicity of denture base and reline acrylic resins. *Quintessence Int.* 2009; 40(10): e93-100.
92. Dias K de C, Barbugli PA, Vergani CE. Influence of different buffers (HEPES/MOPS) on keratinocyte cell viability and microbial growth. *J Microbiol Methods.* 2016; 125: 40–2.
93. Panariello BHD, Klein MI, Mima EGDO, Pavarina AC. Fluconazole impacts the extracellular matrix of fluconazole-susceptible and -resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *J Oral Microbiol.* 2018; 10(1). <https://doi.org/10.1080/20002297.2018.1476644>.
94. Zissis AJ, Polyzois GL, Yannikakis SA, Harrison A. Roughness of denture materials: a comparative study. *Int J Prosthodont.* 2000; 13(2): 136–40.
95. Curd M. L. Bollenl, Paul Lambrechts MQ. Bollenl-1997-Comparison-of-surface-roughness-of-.pdf. *Dent Mater.* 1997; 258–69.
96. Pereira-Cenci T, Cury AADB, Cenci MS, Rodrigues-Garcia RCM. In vitro *Candida* colonization on acrylic resins and denture liners: influence of surface free energy, roughness, saliva, and adhering bacteria. *Int J Prosthodont.* 2007; 20(3): 308–10.
97. Bürgers R, Hahnel S, Reichert TE, Rosentritt M, Behr M, Gerlach T, et al. Adhesion of *Candida albicans* to various dental implant surfaces and the influence of salivary pellicle proteins. *Acta Biomater.* 2010; 6(6): 2307–13.
98. Minagi S, Miyake Y, Inagaki K, Tsuru H, Suginaka H. Hydrophobic interaction in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* adherence to various denture base resin materials. *Infect Immun.* 1985; 47(1): 11–4.
99. An YH, Friedman RJ. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res.* 1998; 43(3): 338–48.

100. Masuoka J, Hazen KC. Cell wall mannan and cell surface hydrophobicity in *Candida albicans* serotype A and B strains. *Infect Immun*. 2004; 72(11): 6230–6.
101. Katsikogianni M, Missirlis YF, Harris L, Douglas J. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cells Mater*. 2004;8:37–57.
102. Lee MJ, Kim MJ, Oh SH, Kwon JS. Novel dental poly (methyl methacrylate) containing phytoncide for antifungal effect and inhibition of oral multispecies biofilm. *Materials (Basel)*. 2020; 13(2): 371. doi: 10.3390/ma13020371.
103. Paolone G, Moratti E, Goracci C, Gherlone E, Vichi A. Effect of finishing systems on surface roughness and gloss of full-body bulk-fill resin composites. *Materials (Basel)*. 2020; 13(24): 1–9.
104. Paraskevas S, Rosema NAF, Versteeg P, Timmerman MF, van der Velden U, van der Weijden GA. the additional effect of a dentifrice on the instant efficacy of toothbrushing: a crossover study. *J Periodontol*. 2007; 78(6): 1011–6.
105. Kumamoto CA, Vines MD. Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cell Microbiol*. 2005; 7(11): 1546–54.
106. Jackson S, Coulthwaite L, Loewy Z, Scallan A, Verran J. Biofilm development by blastospores and hyphae of *Candida albicans* on abraded denture acrylic resin surfaces. *J Prosthet Dent*. 2014 ;112(4): 988–93.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.prosdent.2014.02.003>.
107. Gama MCM, de Oliveira DG, da Silva PMB, Ordinola-Zapata R, Duarte MH, Porto VC. Antifungal activity of 4% chlorhexidine and 2% sodium hypochlorite against *Candida albicans* biofilms. *Gen Dent*. 2015; 63(5): 43–7.

APÊNDICE A – MATERIAIS

- Resina acrílica termopolimerizável Clássico (São Paulo, SP, Brasil)
- Cosmos Denture (COS- Yller Digital, Pelotas, RS, Brasil).
- Silicona laboratorial (Zetalabor, Zhermack, Badia Polesine, Rovigo, Itália)
- Adesivo instantâneo (Super Bonder, Loctite, Henkel Ltda, Itapevi, SP, Brasil)
- Cel lac (S.S. White Duflex, Rio de Janeiro, RJ, Brasil)
- Gesso pedra tipo III (Asfer, São Caetano do Sul, SP, Brasil)
- Gesso pedra tipo IV (Durone, Brasil)
- Água MilliQ (Merck Group, Darmstadt, Alemanha)
- Água destilada (Quimidrol, Florianópolis, SC, Brasil)
- Alça de Drigalsky (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil).
- Alça de inoculação 10 µL, estéril (Plastbio, Curitiba, PR, Brasil).
- Cepas de *C. albicans* [SC5314, Rockville, MD, EUA].
- Cloreto de Potássio (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil).
- Cloreto de Sódio (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil).
- Solução salina divisora de fosfato estéril – PBS (NaCl 100 mM, NaH₂PO₄ 100 mM, pH 7,2)
- Cubeta de 2 mL (Cartel, SP, Brasil).
- Glicose (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil).
- Meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar com 0,1 g/L de cloranfenicol (SDA, Acumedia Manufacturers Inc., Baltimore, MD).
- Álcool isopropílico 99%
- Glutaraldeído tamponado a 2,5%
- TYE (Tryptone and Yeast Extract)
- Placa de 96 poços de fundo “chato” (TPP, Trasadingen, Suíça)
- Placa de 24 poços de fundo “chato” (TPP, Trasadingen, Suíça)
- Microtubos tipo Eppendorfs Graduado de 2 mL (Axygen, Curitiba, PR, Brasil).
- Parafilm (Laboratory film 38m X 10cm) (BOECO).
- Placas de Petri 90 X 15 mm descartáveis e estéreis (J Prolab Indústria e Comércio de Produtos para Laboratório Ltda., São José dos Pinhais, PR, Brasil).

- Ponteiras amarelas para micropipeta 20-200 μ L (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA).
- Ponteiras azuis para micropipeta 100-1000 μ L (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA).
- Ponteiras para micropipeta 5 mL (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA).
- Ponteiras para micropipeta 10 mL (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA).
- Sistema de filtração de 500 mL (Kasvi, China) k15-1500.
- Tubos tipo Falcon de 15 mL, estéril (TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça).
- Tubos tipo Falcon de 50 mL, estéril (TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça).
- Hipoclorito de sódio 0,25% (Biofarma, Araraquara, SP)
- Clorexidina 2% (Periogard, Colgate Palmolive Ind.e Com. Ltda., São Paulo, SP, Brasil).
- Tablete de Corega Tabs (GlaxoSmithKline Brasil Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil)
- Escova Sorriso Original Macia (Colgate Palmolive Ind. e Com. Ltda., São Paulo, SP, Brasil)

Instrumentais

- Mufla metálica (MAC, São Paulo, SP, Brasil)
- Béquer graduado (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil).
- Bico de Bunsen (J.Prolab, São José do Pinhal, Paraná, Brasil).
- Micropipetas de 0,5 – 10 μ L, 100-1000 μ L e de 20-200 μ L (BOECO, Hamburgo, Alemanha).
- Pipetas de 1-10 mL e 1-5 mL (PZ HTL AS, Warsaw, Polônia).
- Provetas graduadas (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil).
- Pinça clínica (Golgran, São Caetano do Sul, SP, Brasil)
- Ponta do tipo Maxicut (Lesfils de August Malleifer SA, Ballaigues, Suíça)

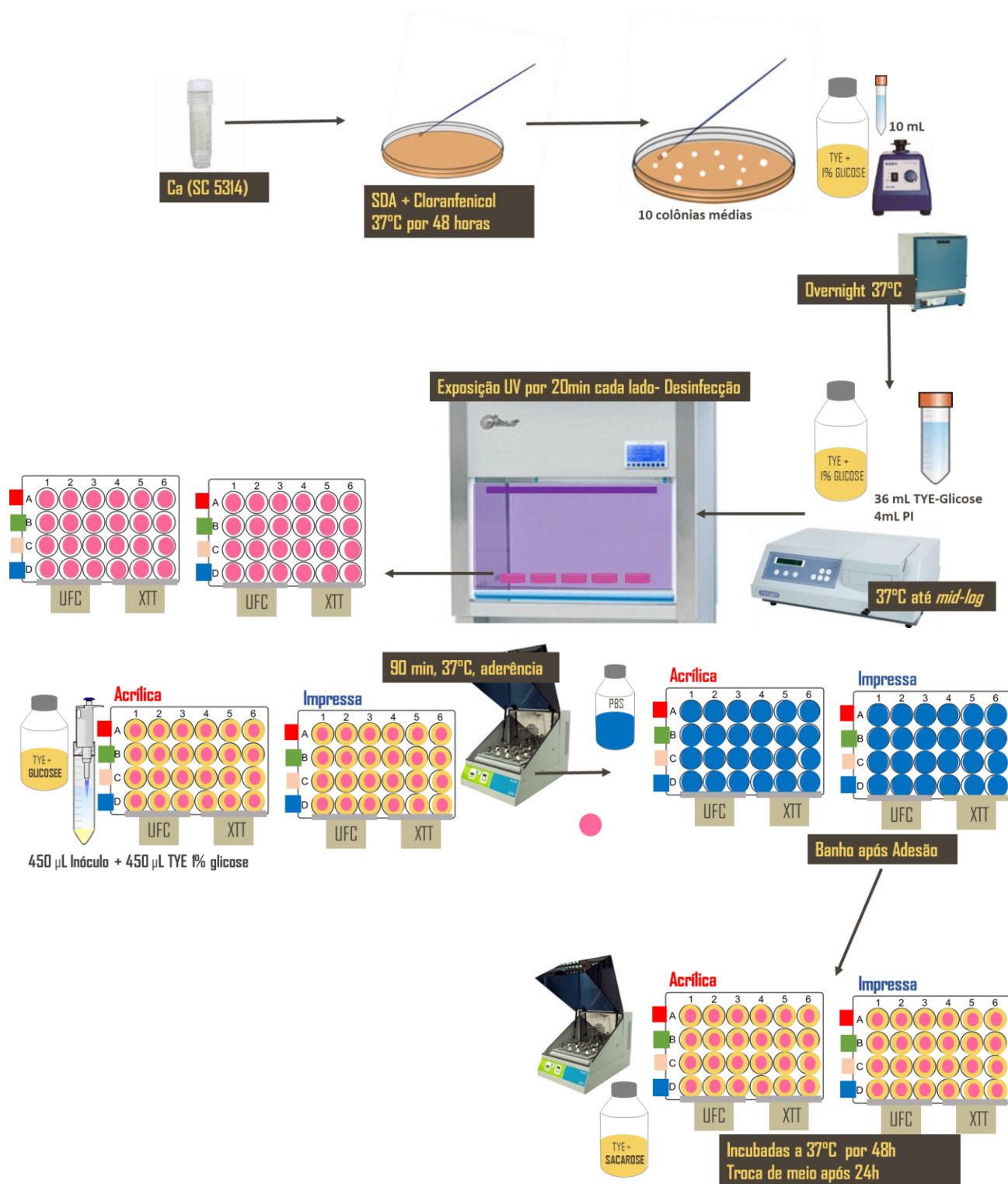
Equipamentos

- Termopolimerizadora automática (Solab Equipamentos para laboratórios Ltda, Piracicaba, SP).

- Impressora Flashforge Hunter DLP Resin 3D Printer (Zhejiang Flashforge3D technology Co., Jinhua City, ZheJiang, China)
- Software Adobe Meshmixer v. 3.5 (Autodesk Inc, San Rafael, CA, EUA)
- Software FlashDLPrint (Zhejiang Flashforge3D technology Co., Jinhua City, ZheJiang, China)
- Curing Box (Done 3D, Ribeirão Preto, SP, Brasil)
- Autoclave vertical Modelo: AV 60. No6614 (Phoenix Ind. e Com. De Equipamentos Científicos Ltda, Araraquara, SP, Brasil).
- Balança de precisão Modelo: BG 400. No016450 (GEHAKA – Ind. e Com. Eletroeletrônica Gehaka Limitada, São Paulo, SP, Brasil).
- Câmara de fluxo (BIOSAFE B2, Brasil).
- Centrífuga, Modelo: 5810R (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha).
- Espectrofotômetro – Biospectro Modelo: SP-220 (Equipar Ltda, Curitiba, PR, Brasil).
- Estufa bacteriológica Modelo – MA 0324. Série – 9819011 (Marconi Equipamentos Laboratoriais Ltda, Piracicaba, SP, Brasil).
- Freezer -80°C (Thermo Scientific, EUA).
- Incubadora de bancada orbital (shaker Modelo: Q816M20) (Quimis Aparelhos Científicos Ltda, Diadema, SP, Brasil)
- Leitor de Microplacas (FLUOstar Omega S-N 4152596, BMG Labtech, Alemanha)

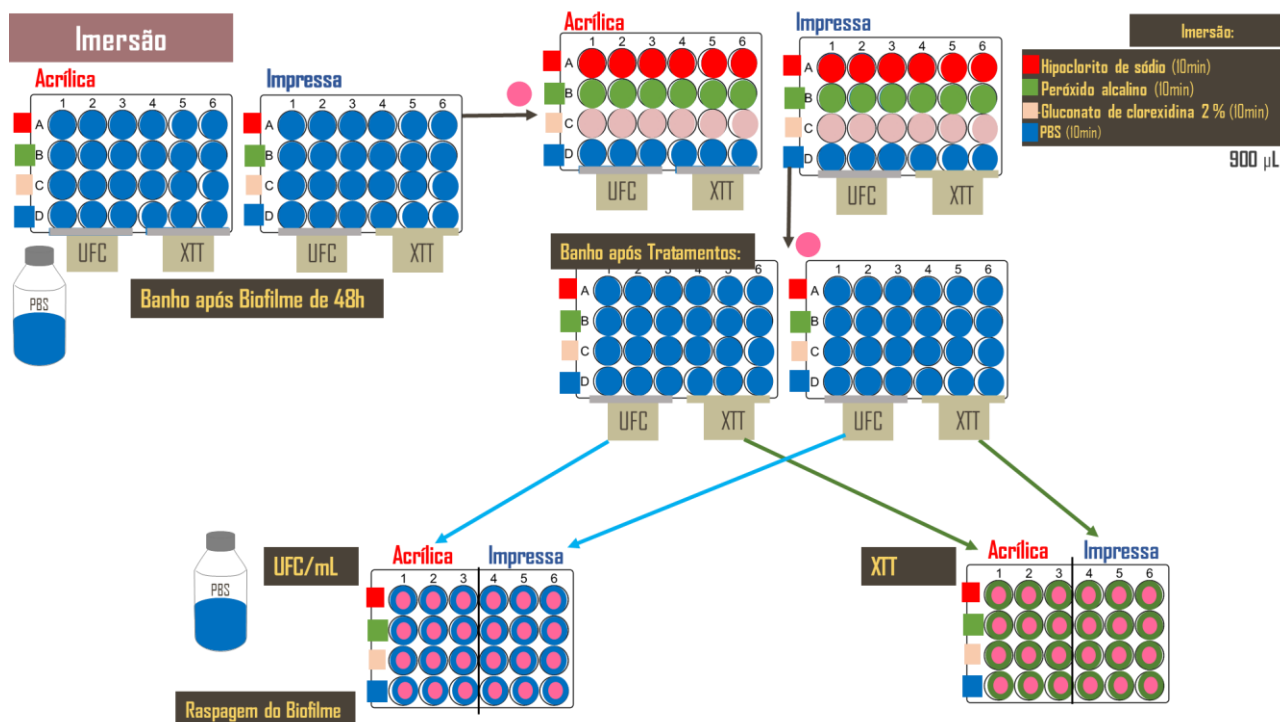
APÊNDICE B – ILUSTRAÇÃO DA METODOLOGIA

Figura 29- Ilustrações referente a metodologia executada para formação do biofilme maduro sobre os espécimes



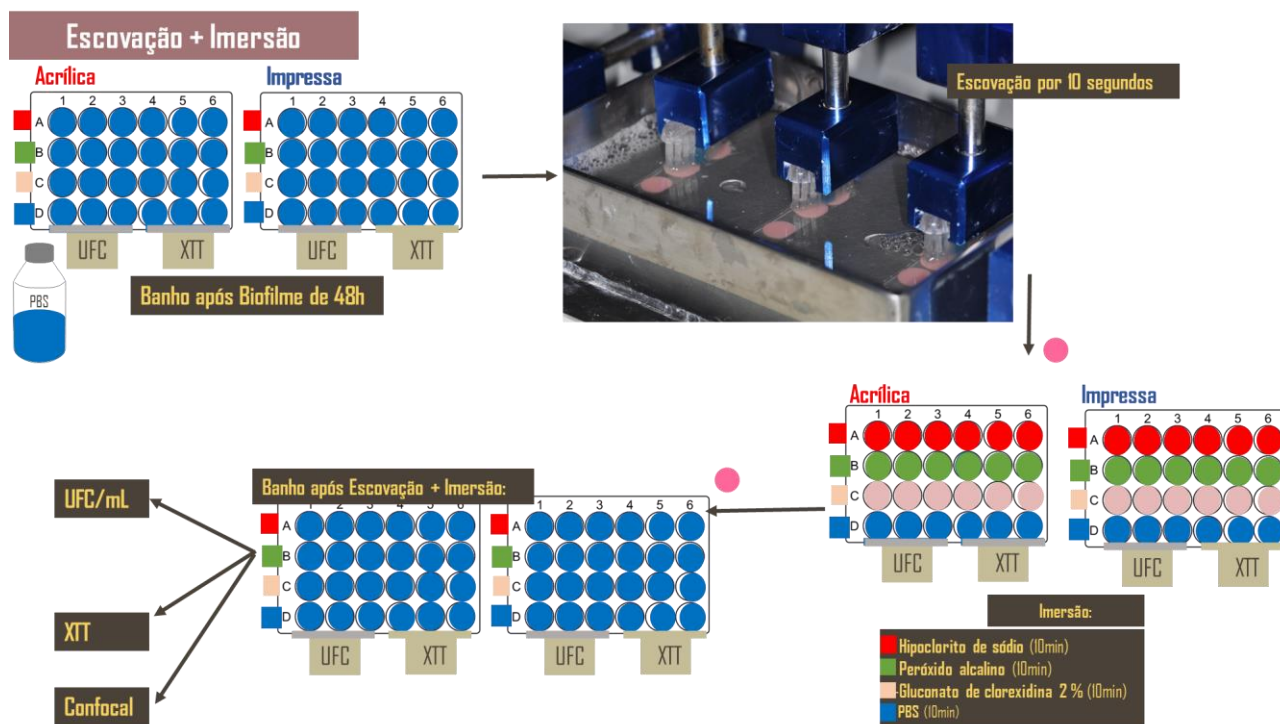
Fonte: Elaboração própria.

Figura 30- Ilustração referente a metodologia executada para imersão dos espécimes contaminados com biofilme maduro



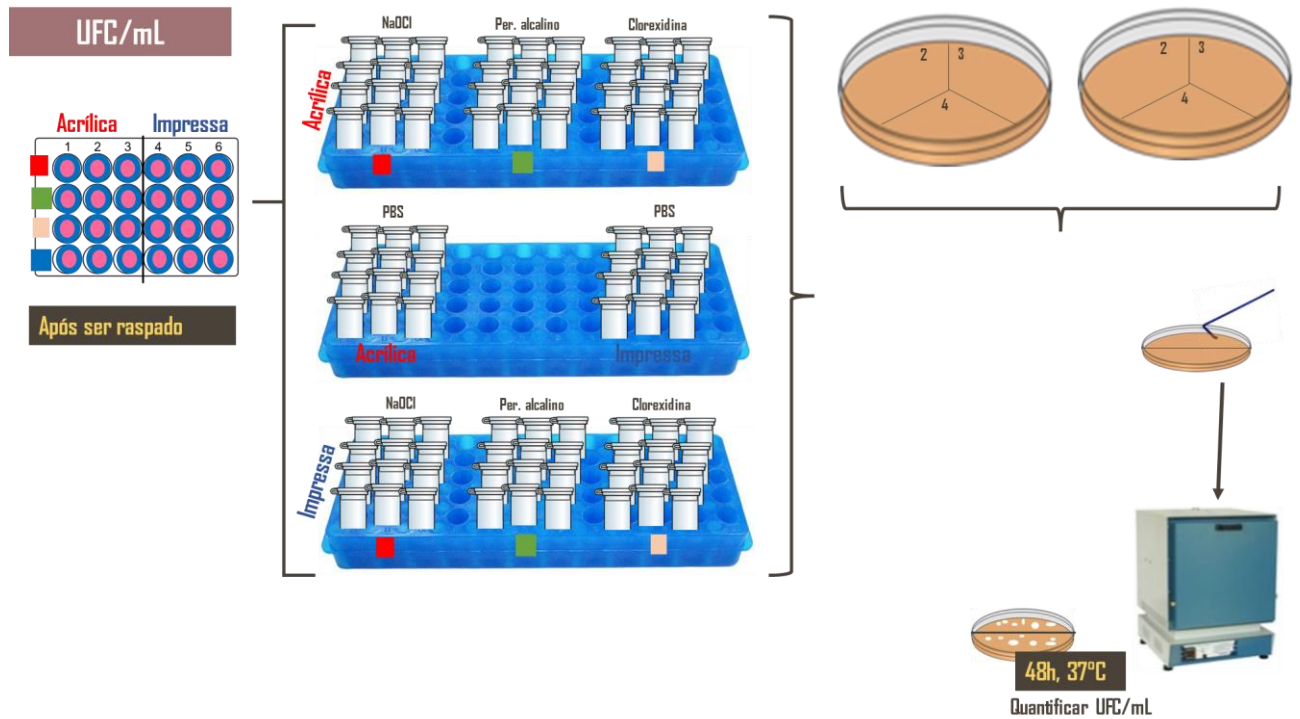
Fonte: Elaboração própria.

Figura 31- Ilustração referente a metodologia executada para associação da escovação e imersão dos espécimes contaminados com biofilme maduro



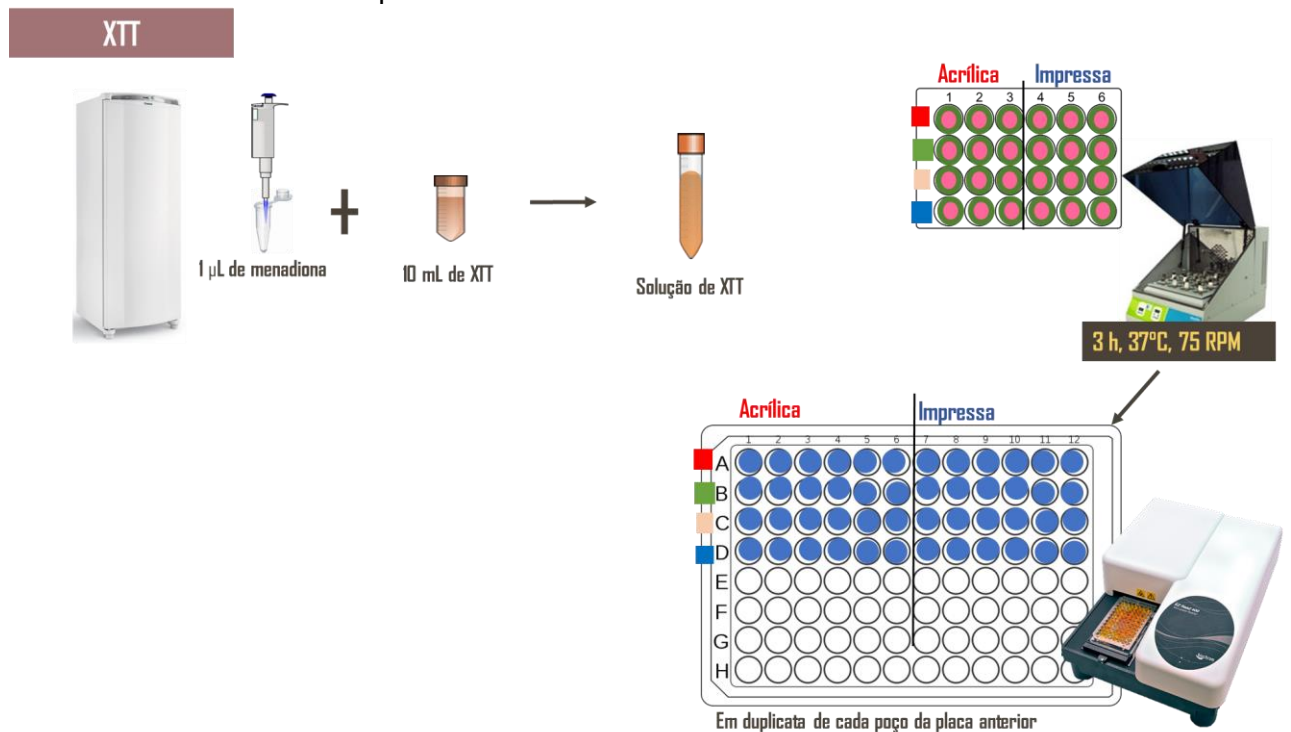
Fonte: Elaboração própria.

Figura 32- Ilustração referente a metodologia executada para contagem de UFC/mL dos espécimes contaminados com biofilme maduro após os protocolos de higiene



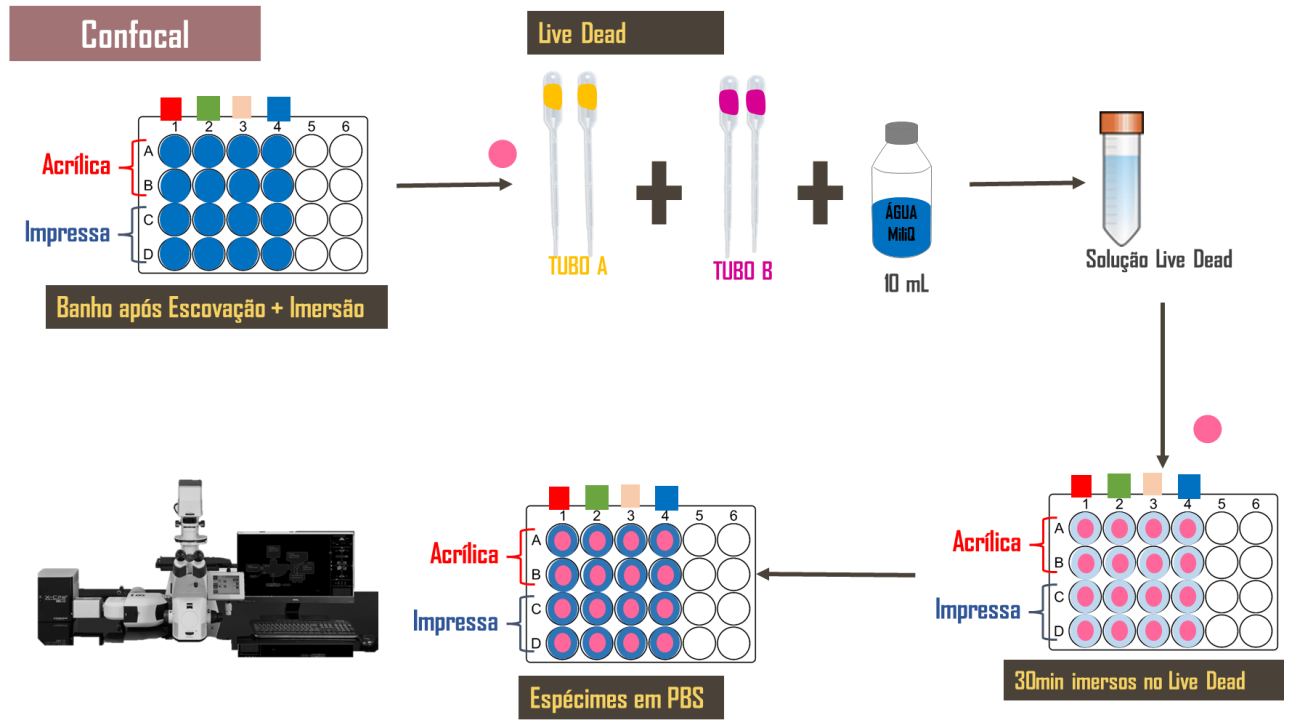
Fonte: Elaboração própria.

Figura 33- Ilustração referente a metodologia executada para associação da escovação e imersão dos espécimes contaminados com biofilme maduro



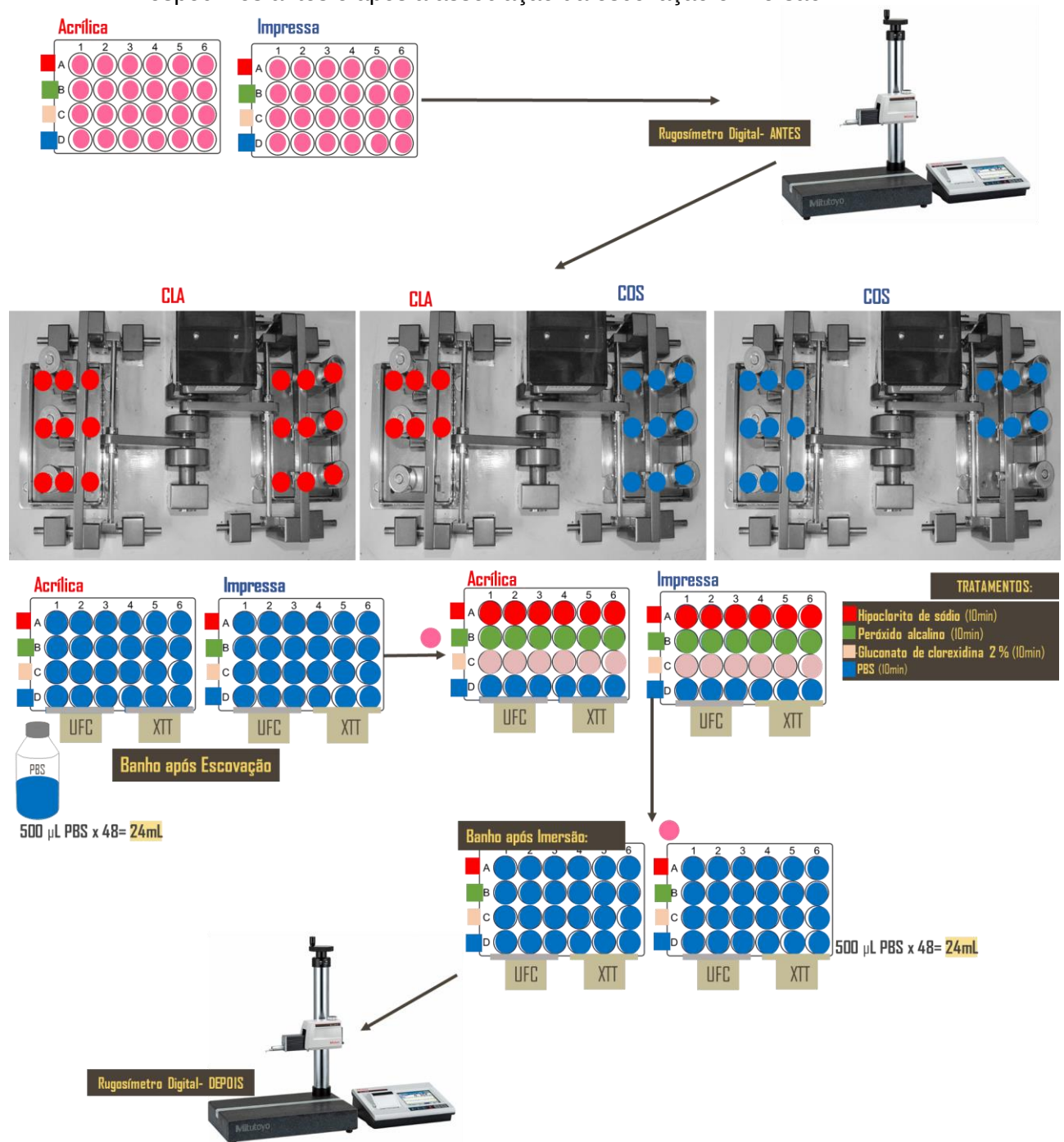
Fonte: Elaboração própria.

Figura 34- Ilustração referente a metodologia executada para o confocal realizado sobre os espécimes contaminados após a associação da escovação e imersão



Fonte: Elaboração própria.

Figura 35- Ilustrações referente a metodologia executada para avaliar a rugosidade dos espécimes antes e após a associação da escovação e imersão



Fonte: Elaboração própria.

Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de 2 anos após a data da defesa.

Araraquara, 10 de fevereiro de 2023.

Thaís Soares Bezerra Santos Nunes