



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



Marcela Dantas Dias da Silva

**Propriedades mecânicas, físicas e microbiológicas de materiais para base
protética e dentes artificiais utilizados na técnica de impressão 3D**

Araraquara

2023



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



Marcela Dantas Dias da Silva

**Propriedades mecânicas, físicas e microbiológicas de materiais para base
protética e dentes artificiais utilizados na técnica de impressão 3D**

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

Orientadora: Profa. Dra. Ana Carolina Pero
Coorientador: Prof. Dr. Raphael Freitas de Souza

Araraquara

2023

S586p

Silva, Marcela Dantas Dias da

Propriedades mecânicas, físicas e microbiológicas de materiais para base protética e dentes artificiais utilizados na técnica de impressão 3D / Marcela Dantas Dias da Silva. -- Araraquara, 2023
74 f. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara

Orientadora: Ana Carolina Pero

Coorientador: Raphael Freitas de Souza

1. Impressão tridimensional. 2. Bases de dentadura. 3. Dente artificial. 4. Placa dentária. 5. Escovação dentária. 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.

Marcela Dantas Dias da Silva

**Propriedades mecânicas, físicas e microbiológicas de materiais para base
protética e dentes artificiais utilizados na técnica de impressão 3D**

Comissão julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutor em Reabilitação Oral

Presidente e orientadora: Profa. Dra. Ana Carolina Pero

2º Examinador: Prof. Dr. Francisco de Assis Mollo Júnior

3º Examinador: Prof. Dra. Carolina Noronha Ferraz de Arruda

4º Examinador: Profa. Dra. Cláudia Helena Silva Lovato

Araraquara, 14 de fevereiro de 2023

DADOS CURRICULARES

Marcela Dantas Dias da Silva

NASCIMENTO:	03/01/1991 – Salvador – Bahia
FILIAÇÃO:	Paulo Vianna Dias da Silva Ana Adelaide Dantas Dias da Silva
2009 – 2014	Graduação em Odontologia pela Universidade Federal da Bahia, UFBA, Brasil.
2014 – 2016	Curso de Especialização em Prótese Dentária, Faculdade Mozarteum de São Paulo, FAMOSP, Brasil.
2017 – 2019	Pós-graduação em Reabilitação Oral – Área de Prótese, curso de Mestrado da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.
2019 – 2023	Pós-graduação em Reabilitação Oral – Área de Prótese, curso de Doutorado da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

Dedico este trabalho,

Aos meus pais Paulo e Ana Adelaide

Que sempre me ensinaram a voar mais alto, mesmo com os tombos e que me deram um solo firme e seguro para pousar sempre que necessário. Obrigada por apoiarem nas minhas decisões, por se fazerem presentes na distância e acompanhar o passo a passo de cada conquista na minha vida. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço

À Deus

Por não soltar a minha mão nos momentos que pensei em desistir. Pela fé que eu deposito em dias melhores e por cuidar de mim durante toda essa caminhada que é a vida.

À Rodrigo

Por ter compartilhado esse processo comigo durante esses seis anos, a maior parte dele a distancia fisicamente. Hoje temos uma relação mais consolidada e forte após tantas histórias e momentos vividos. Obrigada pela amizade, carinho e amor.

Ao meu irmão Renato

Pelo exemplo de dedicação profissional e na paternidade que me inspiram a ser sempre melhor.

À minha orientadora Profa. Dra. Ana Carolina Pero

Pelo acolhimento durante toda a pós-graduação e pela paciência principalmente durante a pandemia e no meu ingresso a Marinha. Tive uma tremenda sorte no dia 29 de novembro de 2016 em ser escolhida por essa professora tão especial para trilhar essa jornada de seis anos juntas. Hoje finalizo essa etapa muito agradecida por sua amizade e pela forma leve que você tornou esse período da minha vida.

Aos amigos da Pós-Graduação, em especial a Thaís, Luciana, Déborah e Renato

Normalmente nos momentos de dificuldades que encontramos verdadeiros anjos em nossas vidas. Obrigada pela companhia e por me colocarem dentro da casa de vocês até em reuniões familiares. A amizade de vocês é um presente que quero levar para a vida inteira.

Aos colegas do grupo de pesquisa: Vivian, Hamile, Thaís e Sabrina.

Pelo companheirismo durante os estudos e trabalhos. Pela ajuda nos momentos em que os prazos e os horários dos experimentos eram apertados. Obrigada pela convivência diária, foi muito gratificante trabalhar com vocês.

Aos professores da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Obrigada pelos ensinamentos transmitidos durante este período, pela atenção e disponibilidade em ajudar. Obrigada também pela convivência amigável.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Pelo convívio, respeito e por todos os serviços prestados.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior): O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez.”
George Bernard Shaw*

*Shaw and Einstein Speeches. The New York Times; 1930.

Silva MDD. Propriedades mecânicas, físicas e microbiológicas de materiais para base protética e dentes artificiais utilizados na técnica de impressão 3D [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2023.

RESUMO

A confecção de próteses removíveis atualmente compreende a utilização de novas resinas e tecnologias por meio de impressão 3D, o que representa uma técnica inovadora. A impressão por projeção de luz digital (DLP) é um método de fabricação digital aditiva ágil e com um aumento gradativo de aplicação na odontologia. A investigação das propriedades de diferentes resinas para próteses removíveis digitais/impressão 3D pelo método DLP é necessária para consolidar sua aplicação clínica, sendo compreendidas suas vantagens e limitações frente aos materiais convencionais. O objetivo dos estudos foi: (I) avaliar propriedades de superfície e adesão/formação de biofilme por *Candida albicans* em resinas à base de próteses usadas em impressão DLP; (II) avaliar a resistência à abrasão e rugosidade de superfície de resinas impressas em DLP após escovação simulada, representando até cinco anos de uso de próteses. Três resinas de base [NextDent Denture 3D+, Cosmos Denture, Lucitone 550 (controle)] foram avaliadas em ambos estudos (I e II) e duas resinas de dentes [Cosmos TEMP e Duralay 62 (controle)] foram avaliadas apenas no estudo II. No estudo I, os espécimes foram analisados quanto a rugosidade de superfície (Ra), energia livre de superfície (erg cm^{-2}) e ensaios microbiológicos (Contagem de colônias, metabolismo celular e análise por microscopia confocal a laser) de adesão e formação de biofilme por *C. albicans*. No estudo II, foram avaliadas a perda de massa (g) e rugosidade de superfície (Ra e Rz, em μm) em espécimes submetidos à escovação in vitro por períodos que representam seis meses, 1, 3 e 5 anos. Os dados foram analisados por meio de testes paramétricos e não paramétricos ($\alpha=0,05$). No estudo I, Lucitone 550 apresentou maior rugosidade de superfície que NextDent Denture 3D+, mas ambos foram semelhantes ao Cosmos Denture. Lucitone 550 apresentou menor energia livre de superfície que Cosmos Denture e NextDent Denture 3D+. As resinas Cosmos Denture e NextDent Denture 3D+ apresentaram maior colonização e metabolismo celular por *C. albicans* do que Lucitone 550 nos períodos de 90 min e 48 horas. No estudo II, todas resinas impressas 3D apresentaram menor perda de peso do que as resinas dos grupos controle, independentemente do período, embora todas as resinas tenham perdido peso ao longo do tempo. Ra para Cosmos Denture e NextDent Denture 3D+ aumentou significativamente apenas após 3 anos de escovação, enquanto Cosmos TEMP aumentou apenas após 5 anos. Rz permaneceu semelhante a Cosmos Denture e Cosmos TEMP mesmo após 5 anos de escovação, mas aumentou para NextDent Denture 3D+ após 3 anos. Lucitone 550 apresentou maiores Ra e Rz para todos os períodos em relação à NextDent Denture 3D+ e Cosmos Denture. Para Duralay 62 e Cosmos TEMP, Ra e Rz mostraram diferença somente após 3 anos de escovação. Pode-se concluir que as resinas de base de próteses impressas em 3D são mais propensas à colonização por *C. albicans*, e que sua energia livre de superfície está diretamente associada a essa colonização. Além disso, bases de próteses impressas em DLP e resinas de dentes artificiais apresentam maior resistência à abrasão à escovação do que os materiais convencionais.

Palavras chave: Impressão tridimensional. Bases de dentadura. Dente artificial. Placa dentária. Escovação dentária.

Silva MDD. Mechanical, physical and microbiological properties of materials for denture base and artificial teeth used in the 3D printing technique [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2023.

ABSTRACT

The manufacture of removable dentures currently comprises the use of new resins and technologies through 3D printing, which represents an innovative technique. Digital Light Projection (DLP) printing is agile additive digital fabrication method with a gradual increase application in dentistry. The investigation of the properties of different resins for 3D printing removable dentures by the DLP method is necessary to consolidate their clinical application, understanding their advantages and limitations in relation to conventional materials. The objectives of the studies carried out were: (I) to evaluate the surface properties and adhesion/biofilm formation by *Candida albicans* on denture-base resins used in DLP printing; (II) to evaluate the abrasion resistance and surface roughness of resins printed on DLP after simulated brushing, representing up to five years of denture use. Three base resins [NextDent Denture 3D+, Cosmos Denture, Lucitone 550 (control)] were evaluated in both studies (I and II) and two dental resins [Cosmos TEMP and Duralay 62 (control)] were evaluated in study II only. In study I, specimens were analyzed for surface roughness (Ra), surface free energy (erg cm⁻²) and microbiological assays (Colony count, cellular metabolism and confocal laser microscopy analysis) of adhesion and biofilm formation by *C. albicans*. In study II, weight loss (g) and surface roughness (Ra and Rz, in µm) were evaluated in specimens submitted to in vitro brushing for periods of six months, 1, 3 and 5 years. Data were analyzed using parametric and non-parametric tests ($\alpha=0.05$). In study I, Lucitone 550 showed higher surface roughness than NextDent Denture 3D+, but both were similar to Cosmos Denture. Lucitone 550 had lower surface free energy than Cosmos Denture and NextDent Denture 3D+. The resins Cosmos Denture and NextDent Denture 3D+ showed greater colonization and cellular metabolism by *C. albicans* than Lucitone 550 in the periods of 90 min and 48 hours. In Study II, all 3D-printed resins showed less weight loss than resins in the control groups, regardless of time period, although all resins lost weight over time. Ra for Cosmos Denture and NextDent Denture 3D+ increased significantly only after 3 years of brushing, while Cosmos TEMP only increased after 5 years. Rz remained similar to Cosmos Denture and Cosmos TEMP even after 5 years of brushing, but increased to NextDent Denture 3D+ after 3 years. Lucitone 550 showed higher Ra and Rz for all periods compared to NextDent Denture 3D+ and Cosmos Denture. For Duralay 62 and Cosmos TEMP, Ra and Rz showed a difference only after 3 years of brushing. It can be concluded that 3D-printed denture base resins are more prone to colonization by *C. albicans*, and that their surface free energy is directly associated with this colonization. In addition, denture bases printed on DLP and artificial tooth resins have greater resistance to brushing abrasion than conventional materials.

Keywords: Printing, three-dimensional. Denture bases. Tooth, artificial. Dental plaque. Toothbrushing.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 PROPOSIÇÃO	15
3 PUBLICAÇÕES	16
3.1 Artigo 1	16
3.2 Artigo 2	36
4 DISCUSSÃO	50
5 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53
APÊNDICES	56
ANEXO	74

1 INTRODUÇÃO

Os materiais para confecção de próteses removíveis estão em constante evolução, partindo dos primórdios com a utilização de vulcanite e celuloide, chegando a diferentes polímeros termoativados. Dentre estes, destacam-se os materiais a base de ácido acrílico e derivados, como o poli (metil) metacrilato (PMMA), amplamente utilizado na confecção de próteses removíveis desde 1932¹. Ao decorrer dos anos notou-se algumas desvantagens inerentes ao próprio material do PMMA, como a baixa resistência mecânica e ao desgaste, baixa condutividade térmica, porosidade, baixa estabilidade dimensional, solubilidade (lixiviação do material) e susceptibilidade à absorção de fluidos e corantes provenientes do meio bucal, comprometendo a estética²⁻⁴. Materiais restauradores estão sujeitos à biodegradação em ambiente bucal devido a fatores como: hidrólise e enzimas salivares, fadiga devido a cargas repetitivas durante a mastigação, bem como mudanças térmicas e químicas da dieta alimentar⁵. A biodegradação da resina acrílica PMMA pode consequentemente levar à liberação de monômeros residuais ou aditivos tóxicos na cavidade oral, como também causar mudanças das propriedades físicas e mecânicas desses materiais⁵.

Além disso, a confecção de próteses removíveis a base de PMMA pela técnica convencional envolve uma série de procedimentos clínicos e laboratoriais, o que demanda tempo e custos adicionais invariavelmente repassados para o paciente. Por isso, além da constante busca por um material com melhores propriedades, a necessidade dos profissionais em simplificar a técnica convencional de confecção de próteses removíveis foi relatada em estudos anteriores⁶⁻⁸ para diminuição de custos diretos e indiretos, sem que houvesse uma desvantagem para os pacientes, em relação à aqueles em que a técnica completa de confecção é utilizada⁶⁻⁸.

Com o avanço da tecnologia “Computer Aided Design, Computer Aided Manufacture” conhecida como CAD/CAM, novos métodos de confecção de próteses removíveis através da fabricação digital subtrativa (fresagem) e fabricação digital aditiva (impressão 3D) impactaram a odontologia principalmente nas áreas de prótese dentária e odontologia restauradora⁹. Estes métodos de confecção digitais consistem, na grande maioria das vezes, em apenas duas etapas clínicas: em uma primeira consulta são coletados dados sobre moldagens, relações maxilomandibulares e seleção de dentes; e a segunda consulta para instalação e ajustes¹⁰. Além da eliminação de alguns passos clínicos, apresentam benefícios de custos, hora clínica,

arquivamento digital dos dados da prótese, eliminação de problemas relacionados a moldagens convencionais, maior conforto ao paciente, avaliação e ajustes prévios das imagens digitalizadas e melhor selamento marginal, em relação as próteses convencionais⁹.

A fabricação digital aditiva ou impressão 3D ou tecnologia de prototipagem rápida, destaca-se devido a reprodução mais detalhada; mais econômica que a técnica da fresagem; maior produção em massa (maior número de unidades); consegue produzir objetos maiores (ex: prótese facial); melhor produção passiva (sem aplicação de força); pode reproduzir formas complexas sem exigir ferramenta de corte especial; opções de geometria ilimitadas; mais rápida que a técnica da fresagem e imprime exatamente como projetado sem desperdício⁹.

Desde o ano de 2019, é possível notar uma quantidade crescente de estudos indexados ao PubMed, aproximadamente 200 publicações, avaliando a técnica e propriedades de resinas utilizadas na impressão 3D para próteses removíveis parciais e totais através do uso do descritor “3D-printing” adicionado ao descritor “Dentures”. No entanto, em 2015 Chen et al.¹¹ já chamaram a atenção para um novo paradigma no uso do CAD/CAM na odontologia otimizando o uso da fabricação aditiva, através de um estudo in vitro com elementos finitos¹¹.

Pouco se sabe sobre a composição das resinas utilizadas na impressão 3D, devido a patente envolvida. Nos websites da Yller Biomaterials* abrange-se a composição como oligômeros, monômeros, fotoiniciadores, estabilizante e pigmento. A bula disponível no website da NextDent** chama atenção apenas para os compostos perigosos durante a produção das próteses dentárias que são: metacrilato 2-hidroxietílico e óxido de difenil(2,4,6-trimetilbenzoil)-fosfatina.

As primeiras impressoras 3D conhecidas como “stereolithography” (SLA) foram inventadas por Charles Hull em 1983¹². A tecnologia do SLA usa um laser ultravioleta (UV) na polimerização de camadas que variam de 15 a 150µm, para isso o laser é direcionado a dois espelhos chamados de galvanômetro que orientam o feixe de laser preciso para o reservatório onde as resinas sensíveis aos raios UV são depositadas, para solidificar a camada através de uma varredura^{13,14}. Em seguida, a plataforma de construção se move uma distância equivalente à espessura de uma camada, e a

* Cf. <https://www.yller.com.br/bulas/cosmos-denture/>,
<https://www.yller.com.br/bulas/cosmos-temp/>

** Cf. <https://nextdent.com/products/denture-3dplus/>

resina não polimerizada recobre a camada anterior e esse processo se perpetua até a construção do objeto pretendido^{13,14}. Nos últimos 4 anos, propriedades de resinas impressas por meio da técnica de SLA são relatadas na literatura, como: resistência a flexão 3 pontos^{15,16}, módulo de elasticidade¹⁶, dureza^{15,16} e adesão de *Candida albicans*¹⁷, resistência ao desgaste com antagonistas de zircônia/metál^{18,19}, temperatura de pós-cura²⁰, união de dente artificial e base de dentadura²¹, resistência de união na tração de materiais de reembasamento de próteses removíveis duras e macias²², resistência a flexão, impacto, dureza e rugosidade de superfície após envelhecimento de um ano²³, rugosidade de superfície de resinas após envelhecimento por ciclagem térmica, escovação mecânica e imersão em bebidas²⁴, estabilidade de cor de dentes após imersão em diferentes agentes de coloração²⁵, propriedades mecânicas, características de superfície e adesão microbiana variando as orientações de impressão²⁶.

Outro tipo de impressora que está sendo extensamente utilizada na odontologia é a “digital light projection” (DLP). Esta consiste em uma fonte de luz do tipo LED de alta potência que se projetam em um arranjo retangular de espelhos, chamado de dispositivo microrrefletor digital^{14,27}. Cada espelho representa um pixel e a resolução da imagem projetada depende do número de espelhos. A luz emitida pela fonte de luz é refratada pelo microespelho e então projetada na superfície para ser impressa como um pixel¹⁴. A capacidade de fotopolimerizar simultaneamente qualquer parte selecionada de todo o espaço de trabalho x/y simultaneamente, torna a técnica DLP mais rápida em relação ao tempo de ciclos de polimerização das camadas em relação a SLA²⁷.

Estudos mais recentes iniciaram uma investigação das propriedades das resinas impressas em DLP tecnologia. Investigações quanto: efeito do tempo de pós-polimerização na resistência à flexão, o módulo de elasticidade e a dureza da superfície¹⁶; o efeito da pós-polimerização em diferentes dispositivos nas propriedades de resistência à flexão, módulo de elasticidade, tenacidade à fratura, trabalho de fratura, sorção em água e solubilidade em água²⁸; a biocompatibilidade, propriedades mecânicas e rugosidade de superfície de resinas para próteses totais²⁹; comparação quanto a resistência de flexão, módulo de elasticidade e dureza de uma mesma resina impressa em tecnologia DLP e SLA²⁹; a estabilidade de cor utilizando diferentes tratamentos de superfície de dentes artificiais impressos³⁰; ao tratamento de superfície para reparo de prótese³¹, a adesão de *C. albicans* e adsorção de

mucina³²; a liberação de monômero residual³³, adesão de compósitos de caracterização³⁴; a rugosidade de superfície e brilho após acabamento e polimento³⁵; a sorção de água, solubilidade e translucidez de resinas impressas em tecnologia DLP e SLA³⁶; as propriedades ópticas, dureza Vickers, e rugosidade de superfície de dentes de próteses após um envelhecimento de 24 meses e exposição a bebidas e um limpador de prótese³⁷; a resistência de união ao cisalhamento entre o dente artificial e base da prótese³⁸; a adesão de *C. albicans* em diferentes ângulo de construção de resinas impressas em tecnologia DLP e SLA³⁹.

Uma crescente avaliação das propriedades das resinas impressas através da tecnologia DLP pode ser observada na literatura devido à importância que esse material tem para a odontologia quanto a sustentabilidade com menor desperdício de material e menores custos, maior conforto e agilidade de confecção das próteses removíveis para o profissional e para o paciente. Sendo assim, é fundamental que se caracterize essas resinas frente aos materiais tradicionalmente usados com mesma indicação, a fim de se estimar seu desempenho.

As hipóteses nulas dos estudos foram: (a) As resinas seriam semelhantes independentemente do período de incubação (adesão ou formação de biofilme) e tipo de resina para base protética, em relação às seguintes variáveis: contagem de colônias e metabolismo de *C. albicans*, rugosidade e energia livre de superfície; (b) Não haveria diferença na rugosidade de superfície e no peso dos espécimes influenciado pelo período de escovação artificial simulada e o tipo de resina (impressa 3D DLP e convencional).

2 PROPOSIÇÃO

Nossa proposta visou avaliar:

a) As propriedades físicas de rugosidade e energia livre de superfície; e as propriedades microbiológicas (contagem de colônias, metabolismo celular e análise por microscopia confocal a laser) dos períodos de adesão e formação de biofilme de *C. albicans*; em duas resinas impressas na técnica DLP, em comparação com uma resina termopolimerizável convencional;

b) A resistência à abrasão (perda de massa) e rugosidade de superfície de resinas fotopolimerizáveis usadas para técnica DLP após escovação simulada correspondente a seis meses, 1 ano, 3 anos e 5 anos.

3 PUBLICAÇÕES

Esta tese de doutorado originou duas publicações. A primeira publicação intitulada “Microbial adhesion and biofilm formation by *Candida albicans* on 3D-printed denture base resins” foi submetida à revista PLOS ONE, fator de impacto 3,24, no dia 19 de julho de 2022 e encontra-se no status de “Under Review”. A segunda publicação intitulada “Brushing-induced abrasion of 3D-printed denture base and artificial teeth resins: an in vitro study” foi submetida à revista Journal of Prosthodontics Research (JPR), fator de impacto 4,33, no dia 11 de janeiro de 2023 e encontra-se no status de “Manuscript Submitted”.

3.1 Artigo 1*

Microbial adhesion and biofilm formation by *Candida albicans* on 3D-printed denture base resins

Abstract

This study evaluated surface properties and adhesion/biofilm formation by *Candida albicans* on light-cured denture base resins used in 3D printing. Two 3D-printed resins (NextDent Denture 3D+, NE; and Cosmos Denture, CO) and a heat-cured resin (Lucitone 550, LU, control) were analyzed for surface roughness (Ra) and surface free energy (erg cm⁻²). Microbiologic assays (90-min adhesion and 48-h biofilm formation by *C. albicans*) were performed five times in triplicate, with the evaluation of the specimens' surface for: (i) colony forming units count (CFU/mL), (ii) cellular metabolism (XTT assay), and (iii) fluorescence and thickness of biofilm layers (confocal laser scanning microscopy). Data were analyzed using parametric and nonparametric tests ($\alpha=0.05$). LU presented higher surface roughness ($0.329\pm0.076\ \mu\text{m}$) than NE ($0.295\pm0.056\ \mu\text{m}$), but both were similar to CO ($0.315\pm0.058\ \mu\text{m}$). LU showed lower surface free energy ($47.47\pm2.01\ \text{erg cm}^{-2}$) than CO ($49.61\pm1.88\ \text{erg cm}^{-2}$) and NE ($49.23\pm2.16\ \text{erg cm}^{-2}$). The CO and NE resins showed greater colonization and cellular metabolism by *C. albicans* than LU in the 90-min and 48-hour periods. It can be concluded that both 3D-printed denture base resins are more prone to colonization by *C. albicans*, and that their surface free energy may be associated with that colonization.

* Artigo segue as normas do periódico PLOS ONE (ISSN: 1932-6203), ao qual foi submetido.

Introduction

Candida albicans is a yeast-like fungus present in the human body that is frequently related to oral infectious diseases, dubbed oral candidiases. Complete denture wearers are especially susceptible to *C. albicans*-associated infections, with denture stomatitis being the most frequent [1]. Denture stomatitis has a multifactorial etiology, with its main causes being poor denture fit, poor denture hygiene and colonization of the denture surface and oral mucosa by *C. albicans* [2]. The presence of a denture base in the mouth, besides acting as a physical reservoir for biofilm, fosters the expression of virulence factors and greater adhesion to oral epithelial cells by *C. albicans* [3].

Complete dentures wearers are mostly elderly individuals, who often present poor manual dexterity for self-care and oral hygiene, and may be at greater risk for systemic diseases [4]. Overnight denture wearing is frequent but dangerous for the elderly, due to the higher risk of aspiration pneumonia [5]. Systemic status can influence the colonization and virulence of *C. albicans* as well. *C. albicans* isolates from immunosuppressed individuals (e.g., HIV carriers) show intense exoenzymatic activity [6], and even controlled type II diabetes mellitus promotes the expression of candidal proteinase [7]. Those individuals, as well as patients undergoing cancer treatment, present a higher risk of oral and systemic candidiasis [8]. This raises the need for denture base materials to be minimally susceptible to fungal colonization.

The penetration of *C. albicans* in polymethylmethacrylate (PMMA) denture base resins can be a source of oral reinfection [9]. Even with the attempts to develop better protocols of hygiene, traditional base materials will be prone to *C. albicans* biofilm formation [10,11]. It is known that denture base materials vary in terms of adhesion and development of *C. albicans*, according to their roughness, hydrophobicity and their surface free energy [2,12–14].

Novel denture base materials should ideally combine a set of properties that may mitigate biofilm formation. Probably the most promising among novel materials are those used for CAD (computer-aided design)/CAM (computer aided-manufacturing). CAM denture base materials have remarkable advantages, including the elimination of some clinical steps, lower costs and reduced clinical/laboratory time. CAM systems can be subtractive (milling) or additive, i.e., 3D printing [15,16]. The latter has been increasingly used worldwide and employs polymers with more remarkable

differences when compared to traditional resins. As novel materials, still little is known about their interaction with oral microorganisms [15], especially in the case of 3D printed resins.

The 3D printing of denture base resins can use two main techniques: stereolithography (SLA) and digital light processing (DLP). Both types of 3D printers can manufacture denture bases or artificial teeth layer by layer polymerizing light-curing resins [17], with being faster and less expensive[16] than conventional pack-and-press technique. However, the few studies on DLP denture resins do not provide sufficient evidence to understand their interaction with oral biofilms. Even if a study showed no difference between SLA and DLP on the adhesion of *C. albicans* to the 3D printed base dentures [18], another study found that a DLP resin can increase early microbial adhesion compared to a conventional heat-cured material [19]. Different DLP resins may vary in surface properties and *C. albicans* adhesion, thus changing clinical performance, and deserve further investigation.

Therefore, this study evaluated adhesion and biofilm formation of *C. albicans* on two light-curing resins manufactured by DLP, compared to a heat-cured resin. The surface roughness and free energy were also evaluated to explain differences in *Candida* adhesion. The null hypothesis was that the resins would be similar irrespective of the incubation period (adhesion or biofilm formation) and type of denture base resin, in terms of the following variables: formation and metabolism of *C. albicans*, average roughness (Ra) and surface free energy. The results of this study will be relevant in the choice of more favorable parameters for the 3D printing of denture bases with greater longevity and clinical performance, thus promoting oral health to denture wearers.

Materials and methods

This *in vitro* study compared the NextDent Denture 3D+ (NextDent B.V., Soesterberg, Netherlands) and Cosmos Denture (Yllar Digital, Pelotas, RS, Brazil) DLP resins to a control material, i.e., the heat-cured acrylic resin Lucitone 550 (Dentsply Ind. e Com. Ltda, Petrópolis, RJ, Brazil).

Specimen fabrication

Discs (15mm in diameter and 3mm in thickness) [20] were prepared for each material (n=64 each): NextDent Denture 3D+ (NE), Cosmos Denture (CO) and Lucitone 550 (LU). Group NE and CO specimens were virtually designed as .stl files (Adobe Meshmixer v. 3.5; Autodesk Inc, San Rafael, CA, USA), and loaded in the 3D printer software (FlashDLPrint v. 3.28.0; Flashforge3D Co., Jinhua City, China) for support design and slicing. The printing process was carried out in 90° printing orientation (disks placed with flat surfaces upright) by a DLP printer (Flashforge Hunter; Flashforge3D Co), using ultraviolet light (LED, $\lambda = 405\text{nm}$, layer thickness of 50 μm). In turn, discs were removed from the platform, washed in 99% isopropyl alcohol (5 min) and taken for post curing in UV light (FormCure; Formlabs, Inc., Somerville, MA, USA) for 5 minutes for each of the two sides [21].

LU specimens (control group) were obtained by the conventional pack-press technique. Metal matrices with cavities with the disc dimensions were included in denture flasks, arranged between glass sheets. The LU acrylic resin was manipulated in the manufacturer's powder/liquid ratio and inserted into the cavities for pressing. After pressing, the flasks were placed in water bath for 1 ½ hour at 73°C + ½ hour at 100°C in an automatic polymerization tank (Solab Equipamentos para laboratorios Ltda, Piracicaba, SP, Brazil). After polymerization, the flasks were bench cooled, and the specimens were deflasked.

Regardless of the group, all specimens were finished and polished by a sequence of sandpapers with 220, 400 and 600 grits. Before measuring the surface roughness and free energy, the specimens were stored in distilled water at 37°C for 50±2 hours.

Surface Roughness evaluation

The average surface roughness in Ra (μm) of all specimens was calculated from three measurements, on a portable digital roughness meter model SJ-400 (Mitutoyo Corporation, Japan) with an accuracy of 0.01 μm and active tip at 0.5 mm/sec speed.

Surface free energy evaluation

Surface free energy evaluation used a goniometer (Model 200, Ramé-Hart Instrument co., Netcong, New Jersey, USA) coupled to a computer system that has software (DROPImage Standard, Ramé-Hart Instrument co., Netcong, New Jersey,

USA). Distilled water (polar component) and diiodomethane (nonpolar component) were dripped using the same volume and time interval under each specimen. Afterwards, the right and left contact angles between the specimen surface and the drops of each liquid were measured. The final contact angle was calculated using the Laplace-Young equation [22]. These values were used to calculate the surface free energy using the OWRK (Owens–Wendt–Rabel–Kaelble) method [22].

Microbiological assay

Inoculum preparation

The microbial strain of *C. albicans* used (SC5314) was stored at -80°C and reactivated by the depletion method in plates containing 65g of Sabouraud Dextrose agar + 0.1g Chlorophenicol (SDA) (incubation: 37°C for 48 hours). Then, the pre-inoculum was formed by collecting ten colonies of the reactivated strain, which were transferred to 10 ml of liquid culture medium of Tryptone and Yeast Extract (TYE) supplemented with 1% glucose. After incubation (37° C for 16 hours), the cultures were diluted 1:10 in TYE medium + 1% glucose and the initial optical density (OD) at 540nm was read in a spectrophotometer (CMC Laboratório Ltda., Brazil). The period corresponding to the midlog growth phase was approximately 8 h with $OD_{540nm}=1.07(\pm 0.07)$ and microbial concentration of $2.31 \times 10^7 (\pm 3.55 \times 10^6)$ CFU/mL [23].

Saliva collection

Stimulated saliva was collected from eight volunteers for use in forming a salivary glycoprotein film on specimens. This step was approved by the Ethics Committee of the Araraquara School of Dentistry, São Paulo State University (CAAE: 26410519.0.0000.5416). Volunteers were selected regardless of sex/gender and age based on the following inclusion criteria: no debilitating systemic disease, fasting for at least and no use of toothpaste or antiseptic mouthwash for two hours before collection; they would be excluded if had taken antibiotics in the last three months.

A total of 400 mL of saliva stimulated by paraffin chewing was collected. The salivary pool was distributed in 50 mL falcon tubes and combined with an adsorption buffer (AB buffer - 50 mM KCl, 1 mM KPO₄, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, in MiliQ water, pH 6.5) in 1:1 proportion. The solution was centrifuged (4°C, 4000RPM, for 10 minutes - Centrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg, Germany) and the supernatant (clarified

saliva) was filtered using a 0.22µm polyethersulfone membrane filter (Rapid Flow, Nalgene, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Aliquots of saliva were kept at -80°C until use [23].

Sterilization of specimens and planning of microbiological assays

After the surface roughness and surface free energy readings, the specimens were sonicated (1440DA, Odontobrás Equipamentos Médicos e Odontológicas Ltda., Araraquara, SP, Brazil) for 20 minutes in distilled water. Then, both sides of the discs were sterilized for 20 minutes in ultraviolet light in a vertical laminar flow chamber (Model: PA 115, nº 12898, Pachane Indústria e Comércio Ltda., Piracicaba, SP, Brazil) [23].

The specimens were randomly assigned to the microbiological assays, i.e., counting colony forming units per milliliter (CFU/mL) and evaluating cell metabolism (XTT assay), and inoculation periods. Those two assays were performed in triplicate, on five experiments in different occasions. Analysis by confocal laser scanning microscopy was performed in duplicate only on the fifth occasion.

Adhesion of *C. albicans* and 48-hour biofilm

All specimens underwent salivary film formation before inoculation. The discs were distributed in sterile 12-well plates and immersed in 2 mL of salivary solution and incubated in an orbital shaker (37°C, 75RPM) for 90 minutes.

New sterile 12-well plates received 1 mL of microbial inoculum at the concentration described in topic “Inoculum preparation”, completed with 1 mL of TYE medium + 1% glucose per well. The discs with salivary pellicle were immersed in the wells of the plates and incubated for 90 minutes for the adhesion phase under orbital shaking (37°C, 75RPM).

Half of the discs underwent CFU/mL count and adhesion phase XTT assay immediately after the 90-minute incubation. Specimens were washed once with phosphate-buffered sterile saline (PBS - 0.136 M NaCl, 1 mM KH₂PO₄, 2 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7.4) after the 90-minute incubation period and placed on new plates. New 12-well plates were used to prepare the microbial suspension for CFU/mL quantification, each disc was immersed in 2 mL of PBS per well and the surface was scraped individually with a pipette tip for one minute. Finally, serial dilutions of the microbial suspension per specimen disc in each well were plated in SDA culture

medium. The other half of the discs were used to assess biofilm formation within 48 hours. It was done immediately after the 90-minute incubation (adhesion phase). The medium was removed and a new sterile TYE culture medium supplemented with 1% sucrose was added to the wells of the same plate, which was kept under orbital shaking (37°C, 75RPM) for 48 hours, with exchange of TYE medium + 1% sucrose in the first 24 hours. After this period, the same washing, scraping and plating protocol was used to quantify the CFU/mL of the adhesion period and the XTT assay was performed [23].

The CFU/mL calculation was obtained by the following formula:

$$\frac{CFU}{mL} = \frac{\text{number of colonies} \times 10^n}{q}$$

n : absolute value of dilution (1, 2, 3, 4, 5, 6 or 7); chosen for counting that is possible to visualize between 30 to 300 colonies;

q : amount, in mL, pipette for each dilution when seeding the plates;

CFU/mL : calculate obtained in scientific notation and then arithmetic mean of the triplicate values of each sample. Then, the data obtained for the counts was transformed according to the formula $\log (CFU+1)/mL$.

XTT assay

Cell metabolism analysis was performed using the XTT assay. XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide) solution was prepared using PBS, at a concentration of 0.5 g/L, filtered with 0.22µm membrane and stored at -20°C until use. A 10 mM menadione solution was prepared in PA acetone and stored at -20°C until use.

Immediately before the XTT assay, the solution was prepared with 1 µL of menadione added to 10 mL of XTT solution, at a final concentration of 1 µM. After the 48-hour adhesion and biofilm phase, samples that were randomly assigned to the XTT assay were washed once in PBS and placed in sterile 24-well plates. The discs were immersed with 500 µL of the solution in each well, incubated in an orbital shaker (37°C, 75RPM) for 3 hours in a dark environment. Then, 100 µL of the XTT degradation product (supernatant) from each well was pipetted in duplicate to another sterile 96-well plate. The plate was placed in the ELISA reader (Biochrom Ez, Cambourne, UK) to read the absorbance (nm) using the 492 nm filter. Absorbance data represents the optical density of light absorbed at 492nm wavelength. Higher the absorbance, higher the cellular metabolism.

Confocal laser scanning microscopy

Cell viability analysis of *C. albicans* was performed using confocal laser scanning microscopy (Lsm 800 with Airyscan with GaAsp detector, Carls Zeiss, Germany). After the 48-hour adhesion and biofilm phases, samples randomly assigned to this assay were washed once in PBS and stained with the Live/Dead™ BacLight™ Bacterial Viability Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) containing SYTO-9 and propidium iodide (excitation/emission at 488/400–540 nm and 488/600–700 nm, respectively). For all image's captures, 3% power and pinhole opening of 60µm were used. The resin discs were immersed in 1.5 mL of the dye solution in sterile 12-well plates and incubated in the dark for 45 minutes, as instructed by the manufacturer. After the incubation period, the specimens were washed once in PBS to be observed under confocal laser scanning microscopy. Fluorescence measurement was performed by capturing five images in random fields per disk, totaling ten images per group. Biofilm thickness was determined with z-stack readings at 1 µm [24].

Statistical analysis

All data collected was verified for normality assumptions (Shapiro-Wilk) and homoscedasticity (Levene). Data analysis of surface roughness (Ra) was performed using the Kruskal-Wallis test followed by the Bonferroni post-hoc test, whereas surface free energy (erg cm^{-2}) was analyzed by one-way ANOVA and Tukey HSD. For the microbiological assay, the CFU/mL values were converted into $\log_{10}$ for statistical analysis. CFU/mL $\log_{10}$ and XTT data were analyzed by two-way ANOVA (factors: type of resin and incubation period). The Tukey HSD post-test was used for the CFU/mL $\log_{10}$ and the Bonferroni data for the XTT assay. A descriptive analysis, with confidence intervals, was performed for the fluorescence live/dead and biofilm thickness data obtained by confocal laser scanning microscopy. The SPSS program for Windows (version 15.0; SPSS Inc.) was used for statistical analyses ($\alpha=0.05$).

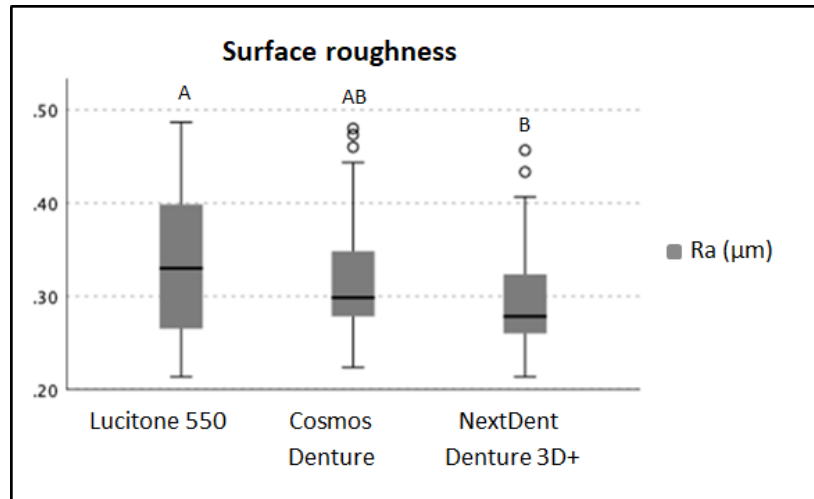
Results

Surface roughness and free energy

The mean ($\pm$ SD) Ra for the 3D printed resins was relatively low (NE: 0.295 ± 0.056 µm; CO resin: 0.315 ± 0.058 µm) compared to the control (LU: 0.329 ± 0.07 µm). Differences were significant (Kruskal-Wallis, $p=0.022$), with pairwise comparisons

(Bonferroni test) showing that the LU resin was significantly rougher than NE ($p=0.024$), whereas both LU and NE presented similar roughness to the CO ($p=1.000$ and $p=0.129$, respectively) (Fig 1).

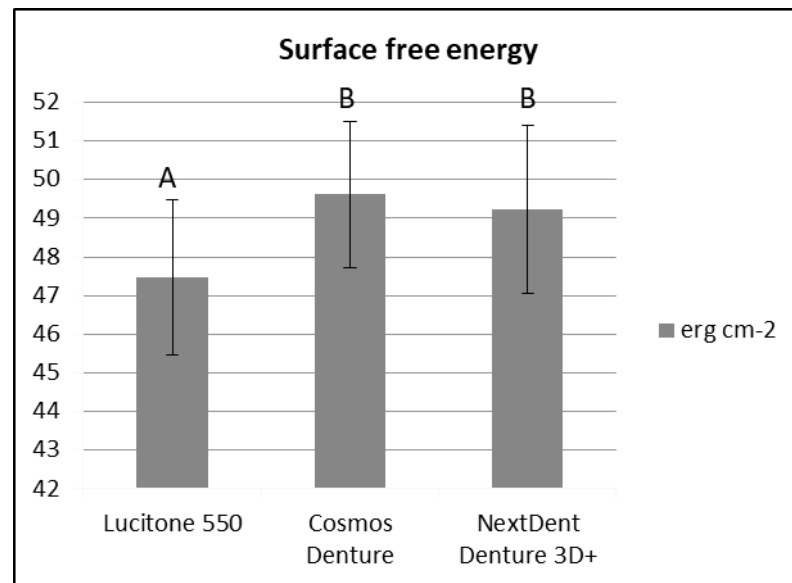
Fig 1. Surface roughness (Ra μm) for the evaluated resins (Kruskal-Wallis and Bonferroni test, $p<.05$).



Similar capital letters indicate statistically significant similarity between groups.

Both 3D printed resins presented higher surface free energy (CO: 49.61 ± 1.88 erg cm^{-2} , NE: 49.23 ± 2.16 erg cm^{-2}) than LU (47.47 ± 2.01 erg cm^{-2}) (one-way ANOVA, $p<0.001$, significant). By the Tukey HSD test, differences between LU and both 3D printed resins were significant ($p<0.001$), but not between CO and NE ($p=0.541$) (Fig 2).

Fig 2. Surface free energy (erg cm⁻²) for the evaluated resins (One-way ANOVA and Tukey HSD, $p < .05$).



Similar capital letters indicate statistically significant similarity between groups.

Colony counting

The two-way ANOVA test showed that both the type of resin ($p=0.016$) and the incubation period ($p<0.001$) influenced the quantification of CFU/mL. However, the interaction between the two factors ($p=0.451$) was not significant (Table 1).

Table 1. Two-way ANOVA of CFU/mL log₁₀ counting, according to resin and incubation periods.

Source of variation	SS	Df	MS	F	P
Resin	0.538	2	0.269	4.965	.016*
Incubation period	2.545	1	2.545	46.982	<.001*
Resin × Incubation period	0.045	2	0.045	0.824	.451 ^{ns}
Error	0.054	24	0.054		

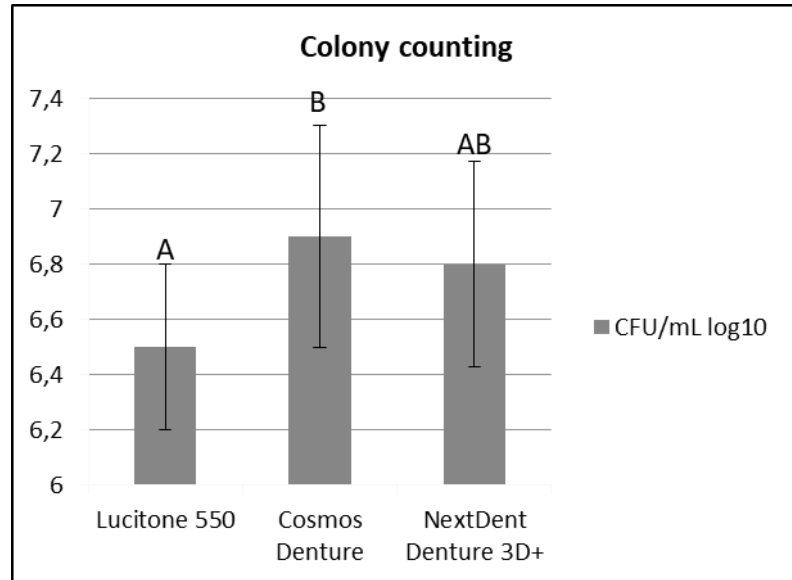
*Significant difference ($\alpha=.05$)

No significant difference = ns

The LU acrylic resin of the control group (6.5 ± 0.3) presented lower values in the colony count in relation to the CO resin (6.9 ± 0.4) ($p=0.015$), analyzed by the Tukey HSD post-test. However, the LU and CO resins had similar results to the NE resin (6.8 ± 0.37), ($p=0.147$ and $p=0.956$, respectively) (Fig 3). The adhesion period of 90

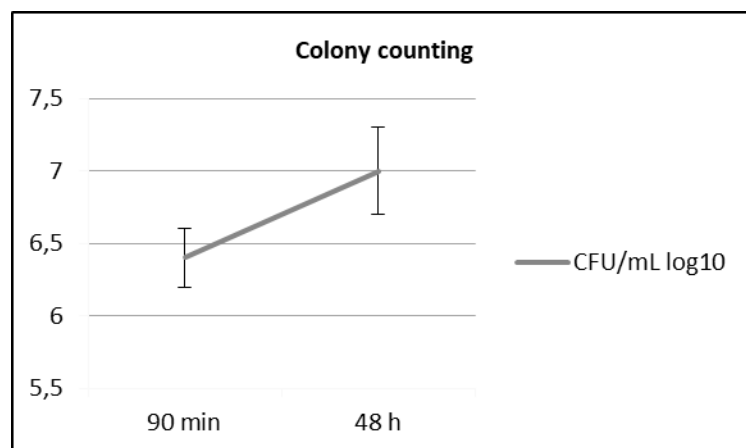
minutes (6.4 ± 0.2) showed a lower number of colonies of *C. albicans*, in relation to the biofilm of 48 hours (7.0 ± 0.3), irrespective of the resin (Fig 4).

Fig 3. Colony counting (CFU/mL) $\log_{10}$ for the evaluated resins (Two-way ANOVA and Tukey HSD, $p < .05$).



Similar capital letters indicate statistically significant similarity between groups.

Fig 4. Colony counting (CFU/mL) $\log_{10}$ for all the resins, according to the incubation period (Two-way ANOVA, $p < .05$).



XTT assay

The two-way ANOVA test only showed the influence of resin type ($p < 0.001$) on cellular metabolism of *C. albicans*. However, the incubation period ($p = 0.222$) and two-factor interaction ($p = 0.941$) were not significant (Table 2).

Table 2. Two-way ANOVA of XTT, according to resin and incubation periods.

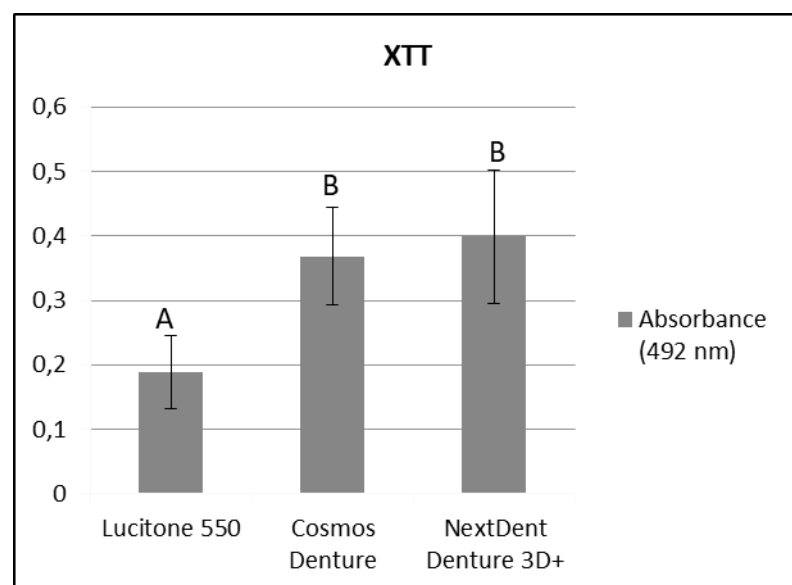
Source of variation	SS	Df	MS	F	P
Resin	0.257	2	0.128	18.590	<.001*
Incubation period	0.011	1	0.011	1.574	.222 ^{ns}
Resin × Incubation period	0.001	2	0.000	0.061	.941 ^{ns}
Error	0.166	24	0.007		

*Significant difference ($\alpha = 0.05$)

No significant difference = ns

The 3D printed resins (CO: 0.369 ± 0.076 nm, NE: 0.399 ± 0.104 nm) showed higher cellular metabolism of *C. albicans* than LU (0.189 ± 0.056 nm) (Bonferroni post-test, $p < 0.001$ for both). Both CO and NE had similar results ($p = 1.000$) (Fig 5).

Fig 5. Cell metabolism of *C. albicans* (XTT) for the evaluated resins (two-way ANOVA and Bonferroni test, $p < 0.05$).



Similar capital letters indicate statistically significant similarity between groups.

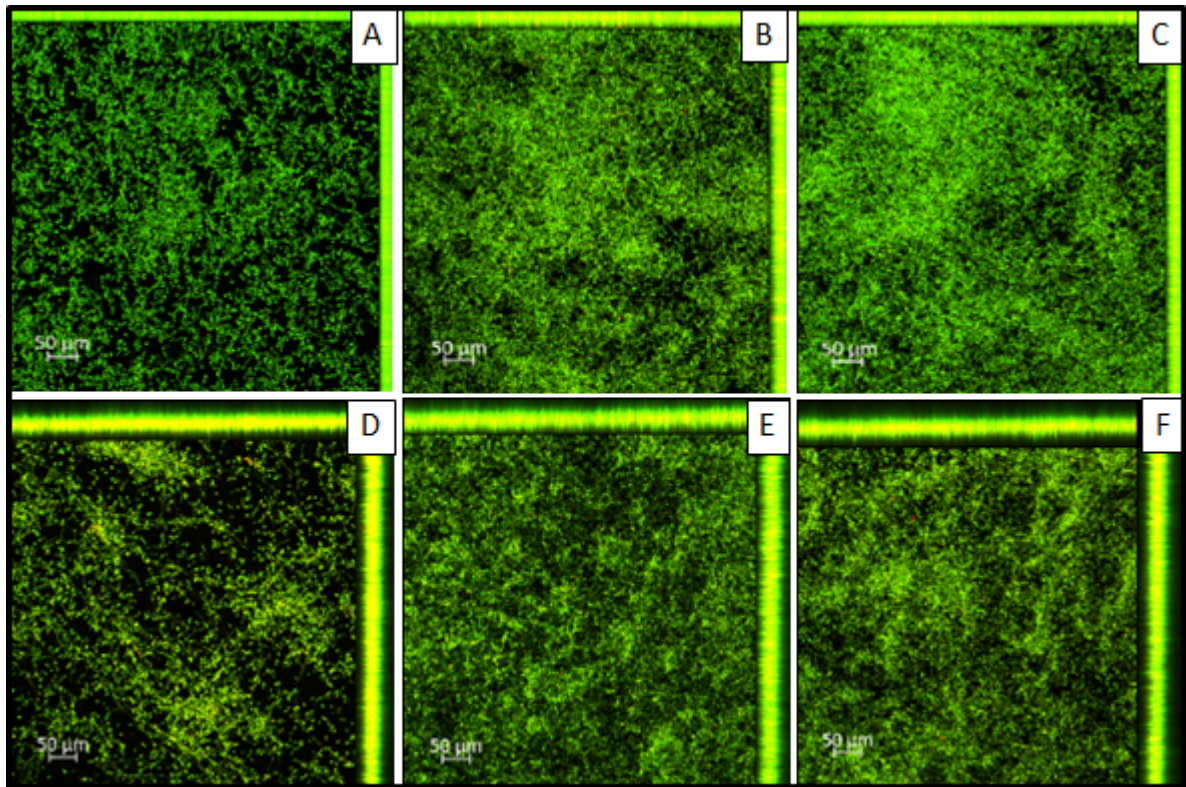
Confocal laser scanning microscopy

The fluorescence quantification data were recorded from the capture of a standard area ($411494.395 \mu\text{m}^2$) of the images obtained by group in a 10x objective. Six image captures representing the fluorescence (live/dead) and thickness results for adhesion and 48-hour biofilm periods were selected for the three groups (Table 3) (Fig 6). It was possible to observe a greater biofilm thickness and the predominance of live cells in CO resin, followed by NE and finally, the conventional acrylic resin LU (control group), in both periods of 90 minutes of adhesion and biofilm of 48 hours. Images capture for fluorescence counting of live/dead microorganisms assumes a 2D view. At 48 h the biofilm thickness was greater for all resins tested, the values practically doubles, corresponding to almost twice the values of live/dead microorganisms when projecting the values presents in Table 3 in a 3D perspective (considering thickness/depth). Thus, most of the cells remained alive in relation to the adhesion period.

Table 3. Means, standard deviations and 95% confidence interval of fluorescence (live/dead) and thickness for 90-min and 48-hour biofilm for LU, CO and NE.

Resins		Adhesion			Biofilm 48h		
		Mean / SD	95CI, lower	95CI, upper	Mean / SD	95CI, lower	95CI, upper
Lucitone 550	Live	58.1 $\pm$ 22.7	46.3	70.0	49.3 $\pm$ 19.9	38.0	60.6
	Dead	24.4 $\pm$ 12.2	18.0	30.8	26.4 $\pm$ 10.3	20.6	32.3
	Thickness	20.3 $\pm$ 2.5	19.0	21.7	48.3 $\pm$ 4.0	46.1	50.6
Cosmos Denture	Live	109.9 $\pm$ 33.4	92.4	127.4	79.4 $\pm$ 32.1	59.5	99.3
	Dead	46.8 $\pm$ 13.4	39.8	53.9	39.9 $\pm$ 20.1	27.5	52.4
	Thickness	29.8 $\pm$ 4.2	27.5	32.0	56.1 $\pm$ 5.0	53.0	59.2
NextDent Denture 3D+	Live	105.7 $\pm$ 14.3	97.9	113.4	71.7 $\pm$ 33.9	52.5	90.9
	Dead	46.2 $\pm$ 7.4	42.2	50.2	35.6 $\pm$ 18.3	25.2	46.0
	Thickness	26.3 $\pm$ 2.8	24.8	27.9	50.3 $\pm$ 5.3	47.3	53.3

Fig 6. Image captures representing the fluorescence (live/dead) and thickness for 90-min and 48-hour biofilm for LU, CO and NE.



A: Lucitone 550 – Adhesion 90min (Z-stack: 11 slices - 20µm); B: Cosmos Denture – Adhesion 90 min (Z-stack: 14 slices - 26µm); C: NextDent Denture 3D+ – Adhesion 90min (Z-stack: 14 slices - 26µm); D: Lucitone 550 – Biofilm 48h (Z-stack: 35 slices - 68µm); E: Cosmos Denture – Biofilm 48h (Z-stack: 31 slices - 60µm); F: NextDent Denture 3D+ – Biofilm 48h (Z-stack: 43 slices - 84µm).

Images information:

Live/Dead™ BacLight™ Bacterial Viability Kit

Laser wavelength – 488nm: 3%

Pinhole – 1,88AU / 60µm

Detection wavelength – Live 400-540nm/ Dead 600-700nm

Discussion

This study investigated key surface properties of 3D printed denture base resins and how those resins would interact with *C. albicans*. Results led to the rejection of the null hypothesis of no influence of tested materials on the study outcome measures. The type of resin influenced both colony count and metabolism of *C. albicans*, and the incubation period influenced the microbial counting, but did not affect cell metabolism.

Moreover, there was a difference in surface roughness and surface free energy among the different resins tested.

Both tested 3D printed resins had lower roughness than the control material, a traditional PMMA denture base resin. The same 3D printed resins, however, were linked to higher *C. albicans* counts and cell metabolism than the control. From these results, it can be suggested that the surface roughness is not the only or the most important factor to determine colonization by *C. albicans*. Other study endorses that a higher surface roughness obtained in printing denture resins was not decisive in the amount of *C. albicans* adhered, when comparing as specimens printed at different angles (45 and 90 degrees) [25].

The lack of association between the lower roughness of 3D printed resins and lower colonization by *C. albicans* was unexpected. Explanation includes the capability of their capability to absorb different substances. Those materials may absorb salivary and biofilm proteins in different manner when compared to PMMA, as demonstrated for mucin (higher absorption with 3D printed resins) [19]. Lower roughness, however, can be relevant to prevent the harboring of debris and microorganisms by denture bases [2,26]. It can be said that the between-material differences found are irrelevant for polished materials. This is reinforced by other studies that show no influence of the surface topography/roughness of denture base resins on the adhesion [19], biofilm formation [27] and cell types (hyphae or blastopore) of *C. albicans* [28].

Surface free energy of denture base resins was linked to *C. albicans* adhesion and biofilm formation in our study. This study endorses that surface free energy can influence microbial adhesion of microorganisms on denture base materials [12]. The 3D-printed resins CO and NE presented the highest surface free energy values in comparison to the control group LU. Surfaces presenting increased free energy contribute to microbial adhesion of *C. albicans*, a hydrophobic strain [25,29]. Therefore, in this study, the surface free energy of the resins was the main factor to clarify the microbiological findings, showing that the higher surface free energy surfaces, higher the adhesion and metabolism of *C. albicans*, irrespective of the incubation period. Meirowitz et al. demonstrated that the hydrophobicity of denture base resins from different fabrication techniques was moderately associated with microbial cell counts [19].

The images obtained from the confocal laser scanning microscopy corroborate with the colony counts and metabolism results obtained in this study, in which a greater

amount of live microorganisms and a greater thickness of biofilms was found in the 3D-printed resins, in both incubation periods. Another study presented similar results, since the fabrication of resin samples for denture base using 3D printing increased the amount of colonies in the 4-hour adhesion period of *C. albicans* in relation to the conventional technique of heat-cured [19]. On the other hand, Di Fiore et al. verified greater adhesion of *C. albicans* in 90 minutes on the heat-cured PMMA resin in comparison to the 3D-printed SLA technique and milled denture base resins, but all resins had similar microbial adhesion after 16 hours of incubation [30].

The need for greater knowledge about the composition of resins used in digital additive manufacturing is a limitation of the present study. Restricted patents by manufacturing companies do not allow for a more accurate exploration of the results found. However, it was possible to verify that the resins used in 3D have higher surface free energy compared to conventional acrylic resins, making them more avid to colonize microorganisms and greater cellular metabolism of *C. albicans*. Furthermore, we cannot state whether the formation of the salivary film influenced the surface free energy of the resin samples, which could also represent a limitation of the study. Future studies should be carried out to evaluate the morphology of *C. albicans* adhered on the surfaces of 3D-printed resins since it could influence the virulence and adherence of this microorganism, representing a primordial factor in the development of oral pathologies [14,28,31,32].

This *in vitro* study presents relevant findings about the microbiological behavior of 3D-printed denture base resins concerning the adherence and metabolism of *C. albicans*, the main etiological factor to the development of denture stomatitis, the most prevalent oral pathology among denture wearers. Therefore, these results could be useful to support future *in vivo* approaches, and finally the safe indication of these resins to fabricate denture bases ensuring the health of their users.

Conclusions

Both 3D printed resins (Cosmos Denture and NextDent Denture 3D+) are slightly more prone to colonization by *C. albicans* than a traditional heat-cured denture base resin. Whereas the surface free energy of the resins was an important factor behind those findings, differences in their surface roughness were not associated with microbial colonization.

Acknowledgments

The authors thank Natercia Soriani and the company Done3D for making the 3D printed specimens of this study. We also thank Paula Aboud Barbugli and Bruna Natália Alves da Silva Pimentel for your support in confocal and fluorescence reading. Study supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

References

1. Abaci O, Haliki-Uztan A, Ozturk B, Toksavul S, Ulusoy M, Boyacioglu H. Determining *Candida spp.* incidence in denture wearers. *Mycopathologia*. 2010;169: 365–372. doi:10.1007/s11046-010-9275-8
2. Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont*. 2011;20: 251–260. doi:10.1111/j.1532-849X.2011.00698.x
3. Mothibe J V, Patel M. Pathogenic characteristics of *Candida albicans* isolated from oral cavities of denture wearers and cancer patients wearing oral prostheses. *Microb Pathog*. 2017;110: 128–134. doi:10.1016/j.micpath.2017.06.036
4. Senpuku H, Sogame A, Inoshita E, Tsuha Y, Miyazaki H, Hanada N. Systemic diseases in association with microbial species in oral biofilm from elderly requiring care. *Gerontology*. 2003;49: 301–309. doi:10.1159/000071711
5. Iinuma T, Arai Y, Abe Y, Takayama M, Fukumoto M, Fukui Y, et al. Denture wearing during sleep doubles the risk of pneumonia in the very elderly. *J Dent Res*. 2015;94: 28S-36S. doi:10.1177/0022034514552493
6. Orlandini RK, Bepu DAN, Saraiva M da CP, Bollela VR, Motta ACF, Lourenço AG. Are *Candida albicans* isolates from the oral cavity of HIV-infected patients more virulent than from non-HIV-infected patients? Systematic review and meta-analysis. *Microb Pathog*. 2020;149: 104477. doi:10.1016/j.micpath.2020.104477
7. Motta-Silva AC, Aleva NA, Chavasco JK, Armond MC, França JP, Pereira LJ. Erythematous oral candidiasis in patients with controlled type II diabetes mellitus and complete dentures. *Mycopathologia*. 2010;169: 215–223. doi:10.1007/s11046-009-9240-6

8. Ramla S, Sharma V, Patel M. Influence of cancer treatment on the *Candida albicans* isolated from the oral cavities of cancer patients. Support Care Cancer. 2016;24: 2429–2436. doi:10.1007/s00520-015-3035-8
9. Latib YO, Owen CP, Patel M. Viability of *Candida albicans* in denture base resin after disinfection: A preliminary study. Int J Prosthodont. 2018;31: 436–439. doi:10.11607/ijp.5653
10. Valentini-Mioso F, Maske TT, Cenci MS, Boscato N, Pereira-Cenci T. Chemical hygiene protocols for complete dentures: A crossover randomized clinical trial. J Prosthet Dent. 2019;121: 83–89. doi:10.1016/j.prosdent.2017.12.022
11. de Souza RF, Silva-Lovato CH, de Arruda CN, Regis RR, Zanini AP, Longo DL, et al. Efficacy of a propolis solution for cleaning complete dentures. Am J Dent. 2019; 306–310.
12. Koch C, Bürgers R, Hahnel S. *Candida albicans* adherence and proliferation on the surface of denture base materials. Gerodontology. 2013;30: 309–313. doi:10.1111/ger.12056
13. Kang S-H, Lee H-J, Hong S-H, Kim K-H, Kwon T-Y. Influence of surface characteristics on the adhesion of *Candida albicans* to various denture lining materials. Acta Odontol Scand. 2013;71: 241–248. doi:10.3109/00016357.2012.671360
14. Mayahara M, Kataoka R, Arimoto T, Tamaki Y, Yamaguchi N, Watanabe Y, et al. Effects of surface roughness and dimorphism on the adhesion of *Candida albicans* to the surface of resins: scanning electron microscope analyses of mode and number of adhesions. J Investig Clin Dent. 2014;5: 307–312. doi:10.1111/jicd.12055
15. Alghazzawi TF. Advancements in CAD/CAM technology: Options for practical implementation. J Prosthodont Res. 2016;60: 72–84. doi:10.1016/j.jpor.2016.01.003
16. Alharbi N, Wismeijer D, Osman RB. Additive Manufacturing Techniques in Prosthodontics: Where Do We Currently Stand? A Critical Review. Int J Prosthodont. 2017;30: 474–484. doi:10.11607/ijp.5079
17. Aati S, Akram Z, Shrestha B, Patel J, Shih B, Shearston K, et al. Effect of post-curing light exposure time on the physico-mechanical properties and cytotoxicity of 3D-printed denture base material. Dent Mater. 2022;38: 57–67. doi:10.1016/j.dental.2021.10.011

18. Li P, Fernandez PK, Spintzyk S, Schmidt F, Beuer F, Unkovskiy A. Effect of additive manufacturing method and build angle on surface characteristics and *Candida albicans* adhesion to 3D printed denture base polymers. J Dent. 2022;116: 103889. doi:10.1016/j.jdent.2021.103889
19. 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. doi:10.3390/ma14010221
20. International Organization for Standardization. ISO 1567: denture base polymers. 2nd ed. Geneva: The Organization; 1998.
21. Hada T, Kanazawa M, Iwaki M, Arakida T, Minakuchi S. Effect of printing direction on stress distortion of three-dimensional printed dentures using stereolithography technology. J Mech Behav Biomed Mater. 2020;110: 103949. doi:10.1016/j.jmbbm.2020.103949
22. Janssen D, de Parma R, Verlaak S, Heremans P, Dehaen W. Static solvent contact angle measurements, surface free energy and wettability determination of various self-assembled monolayers on silicon dioxide. Thin Solid Films. 2006;515: 1433–8.
23. de Oliveira Junior NM, Mendoza Marin DO, Leite ARP, Pero AC, Klein MI, Compagnoni MA. Influence of the use of complete denture adhesives on microbial adhesion and biofilm formation by single- and mixed-species. PloS one. 2018;13: e0203951. doi:10.1371/journal.pone.0203951
24. Nunes TSBS, Rosa LM, Vega-Chacón Y, Mima EG de O. Fungistatic action of N-Acetylcysteine on *Candida albicans* biofilms and its interaction with antifungal agents. Microorganisms. 2020;8. doi:10.3390/microorganisms8070980
25. Shim JS, Kim J-E, 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: 468–475. doi:10.1016/j.prosdent.2019.05.034
26. Murat S, Alp G, Alatalı C, Uzun M. In vitro evaluation of adhesion of *Candida albicans* on CAD/CAM PMMA-Based Polymers. J Prosthodont. 2019;28: e873–e879. doi:10.1111/jopr.12942

27. de Foggi CC, Machado AL, Zamperini CA, Fernandes D, Wady AF, Vergani CE. Effect of surface roughness on the hydrophobicity of a denture-base acrylic resin and *Candida albicans* colonization. J Investig Clin Dent. 2016;7: 141–148. doi:10.1111/jicd.12125
28. 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: 988–993. doi:10.1016/j.prosdent.2014.02.003
29. Katsikogianni M, Missirlis YF. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. Eur Cell Mater. 2004;8: 37–57. doi:10.22203/ecm.v008a05
30. Di Fiore A, Meneghello R, Brun P, Rosso S, Gattazzo A, Stellini E, et al. Comparison of the flexural and surface properties of milled, 3D-printed, and heat polymerized PMMA resins for denture bases: an in vitro study. J Prosthodont Res. 2021. doi:10.2186/jpr.JPR_D_21_00116
31. Aguayo S, Marshall H, Pratten J, Bradshaw D, Brown JS, Porter SR, et al. Early adhesion of *Candida albicans* onto dental acrylic surfaces. J Dent Res. 2017;96: 917–923. doi:10.1177/0022034517706354
32. Fang J, Wang C, Li Y, Zhao Z, Mei L. Comparison of bacterial adhesion to dental materials of polyethylene terephthalate (PET) and polymethyl methacrylate (PMMA) using atomic force microscopy and scanning electron microscopy. Scanning. 2016;38: 665–670. doi:10.1002/sca.21314

3.2 Artigo 2*

Brushing-induced abrasion of 3D-printed denture base and artificial teeth resins: an in vitro study

ABSTRACT

Purpose: This study evaluated the abrasion resistance and surface roughness of DLP-printed resins after simulated brushing, representing up to 5 years of denture wearing.

Methods: Three base resins [NextDent Denture 3D+ (ND), Cosmos Denture (CD), Lucitone 550 (LU/control)] and two teeth resins [Cosmos TEMP (CT) and Duralay 62 (DU/control)] underwent in vitro brushing for periods representing 6 months, 1, 3 and 5 years. Outcomes included weight loss (g) and surface roughness (Ra and Rz, in μm), and were compared by generalized estimation equations and the Bonferroni test ($\alpha = 0.05$).

Results: ND, CD and CT showed lower weight loss than LU and DU, regardless of the period, although all resins lost weight over time. Ra for CD and ND significantly increased only after 3 years of brushing, whereas CT only increased after 5 years. Rz remained similar to CD and CT even after 5 years of brushing, but increased to ND after 3 years. LU showed higher Ra and Rz for all periods in relation to ND and CD. For DU and CT, Ra and Rz showed a difference only after 3 years of brushing.

Conclusions: DLP-printed denture base and artificial teeth resins present greater abrasion resistance to brushing than conventional materials.

1. Introduction

Daily denture hygiene is essential to prevent plaque/biofilm accumulation, calculus, malodor and poor esthetics[1]. Brushing with toothpaste remains the method of choice for denture hygiene[2,3], with good results in terms of biofilm removal[4]. As an adverse effect, continuous brushing can abrade denture bases and acrylic resin teeth considerably over the years[5–7]. The linear features (scratches) created by brushing on acrylic resin can harbor bacteria and yeasts[8], which contribute to the development of denture stomatitis[9]. The surface topography of denture polymers is

* Artigo segue as normas do periódico *Journal of Prosthodontic Research* (ISSN: 1883-1958), ao qual foi submetido.

crucial for the initial adherence of *Candida albicans* cells, besides their physicochemical properties. This is true for conventional poly(methylmethacrylate) (PMMA) materials, and also for the novel polymers used in computer-aided design and manufacturing (CAD/CAM) procedures[10].

With the increasing use of CAD/CAM in dentistry, new resins and techniques have been formulated to replace PMMA-based materials. Additive manufacturing is certainly one of the most remarkable of those novel techniques, with digital light processing (DLP) and stereolithography (SLA) being used for denture fabrication. The DLP technology, which uses a high power LED source to polymerizing layer upon layer of liquid resin, has been widely discussed in the literature for making precision dentures[11]. Using DLP to produce complete dentures can reduce clinical and laboratory steps, increase patient comfort, allowing adjustments to the digital image and mitigate material waste[11]. DLP tends to be faster than SLA due to the ability to simultaneously cure all parts of a given slice, whereas the latter employs a laser to trace each layer point by point[12].

A recent in vitro study observed similar roughness (Ra) for two SLA-printed denture base resins a conventional PMMA resin after thermocycling, simulated brushing and immersion in artificial saliva, coffee, cola or lemon juice, all corresponding to two years of oral conditions[13]. Nam et al.[14] observed that two 3D-printed resins for artificial teeth (NextDent C&B printed in DLP and FormLabs printed in SLA) presented mechanical and optical properties comparable to milled denture base materials and were stable after 20,000 brushing cycles and hydrothermal aging.

Despite their favorable properties of denture base and artificial teeth made by additive manufacturing, few studies have evaluated the impact of brushing on their surface roughness[13,14]. Furthermore, no found published studies evaluated their abrasion resistance by weight loss after and before brushing. The aim of this study was to evaluate the abrasion resistance and surface roughness of light-cured resins used for DLP after simulated brushing corresponding to 6 months, 1 year, 3 years and 5 years. The null hypothesis was that there would be no difference in the surface roughness and weight of the specimens induced by the period of simulated artificial brushing and the type of resin (DLP 3D-printed and conventional).

2. Materials and methods

This in vitro study evaluated the weight loss and surface roughness of three denture base materials subjected to simulated brushing: NextDent Denture 3D+ (NextDent B.V., Soesterberg, Netherlands) (ND), Cosmos Denture (Yllar Digital, Pelotas, RS, Brazil) (ND), and Lucitone 550 (Dentsply Ind. e Com. Ltda, Petrópolis, RJ, Brazil) (LU, control group).

Two resins for artificial tooth fabrication underwent the same evaluation: Cosmos TEMP (Yllar Digital, Pelotas, RS, Brazil) (CT), and the Duralay 62 (Reliance Dental Manufacturing, Alsip, IL, USA) autopolymerizing resin (DU, control). DU was chosen as a control material due to its common use for the fabrication of provisional restorations.

Ten rectangular bar-shaped specimens (dimensions: 40×10×2mm)[15] were prepared using each of the five resins. Specimens from the 3D-printed groups (CD, ND and CT) were designed virtually by the software Adobe Meshmixer v. 3.5 (Autodesk Inc, San Rafael, CA, USA) in the .stl format, and manufactured by a DLP 3D printer (Flashforge Hunter, Zhejiang Flashforge3D technology Co., Jinhua City, ZheJiang, China) (LED λ = 405nm; layer thickness of 50 μ m). After printing, the specimens were washed in 99% isopropyl alcohol for 10 minutes and irradiated by UV light in the Form Cure equipment (Formlabs, Inc., Somerville, MA, USA) for 10 minutes (5 minutes per wide sides)[16].

The pack-and-press technique was used for the LU (denture base, control). Manipulation and condensation of this material was performed as per manufacturer's recommendations. The resin was inserted into a metal matrix with the dimensions of the specimens, which was sandwiched between glass sheets and placed inside a dental flask with type III dental stone. After 30 minutes of pressing the resin with 1.25 ton-force, water-bath polymerization was performed for 1 ½ hour at 73°C + ½ hour at 100°C in an automatic polymerization tank (Solab Equipamentos para laboratórios Ltda, Piracicaba, SP). After polymerization, the flask was bench cooled overnight and then the specimens were deflasked. For the fabrication of DU specimens (artificial teeth, control), the self-cured resin was manipulated according to the manufacturer's recommendation (3:1 volume ratio powder/liquid) and inserted inside the metallic matrix between two glass sheets. The glass sheets matrix set was placed under hydraulic pressing for the final polymerization (5 minutes).

For all groups, specimens were finished with carbide burs and polished with 220-, 400- and 600-grit sandpaper. A digital caliper was used to control the final dimensions of the specimens.[15] After polishing, all specimens were sonicated in deionized water with 1% detergent (1 minute), dried with absorbent paper, and stored in distilled water at 37°C for 50±2 hours[15].

Specimens underwent simulated brushing in a machine equipped with soft-bristle toothbrushes (Oral-B Indicator 35, Oral-B, Procter & Gamble, Cincinnati, Ohio, USA)[5,17–19]. The specimens were firmly adapted in the compartments of the brushing machine and immersed in a 1:1 distilled water/toothpaste solution (Colgate Total 12, Colgate-Palmolive, São Bernardo do Campo, Brazil). In turn, the machine performed a reciprocating movement of the toothbrush heads over the wide side of the specimens, under a load of 200g[17–19] at 60 rpm. Specimens were evaluated after 8,900, 17,800, 53,400 and 89,000 brushing cycles, corresponding to 6 months (T1), 1-year (T2), 3-year (T3) and 5-year (T4) denture wear, respectively[18]. Each brush and toothpaste solution were replaced every 17,800 cycles (i.e., corresponding to 1 year)[18].

After performing each brushing cycling interval (T1-T4), the specimens were removed from the compartments in the brushing machine, sonicated in deionized water with 1% detergent (1 minute) and dried with absorbent paper. Subsequently, they were weighed on a precision electronic scale (XS105 DualRange, Mettler Toledo, Columbus, Ohio, USA) with five decimal places (0.00000g) to calculate the weight loss (g). For all periods, the weight loss was calculated in relation to weight of the specimen before brushing (T0, baseline).

The surface roughness of the specimens was measured in the amplitude parameters of arithmetic average height (Ra) (µm) and ten-point height (Rz) (µm)[20] from three measurements perpendicular to the longest dimension, at baseline (T0) and after each brushing cycle (T1, T2, T3 and T4), using a profilometer model SJ-400 (Mitutoyo Corporation, Japan) with an accuracy of 0.01 µm and active tip at 0.5 mm/s. Figure 1 displays a flow diagram of research course.

For each dependent variable (i.e., weight loss, and differences in Ra and Rz from baseline), the 3 denture base groups were compared by generalized estimation equations (GEEs). Cycling intervals (T1 to T4) were entered as a paired second factor. Multiple comparisons were performed by the Bonferroni post hoc test to identify differences within each group, interval, or interaction levels. The same tests were

repeated for the 2 artificial tooth resins. Statistical analysis was performed using SPSS for Windows (version 15.0; SPSS Inc.), with $\alpha = 0.05$. The descriptive data of mean and standard deviation present the difference according to the measurements of weight (g) and roughness Ra and Rz (μm) between periods T1-T0, T2-T0, T3-T0 and T4-T0.

3. Results

3.1 Denture base resins

The GEEs showed that the interaction between denture base resins and brushing cycles was significant for the three variables, i.e., weight loss ($p=0.001$), Ra ($p=0.017$) and Rz ($p=0.014$). Tables 1, 2 and 3 present the differences found in the post hoc test for the 3 dependent variables.

The weight loss of all denture base resins was proportional to time, although it was milder for CD and ND than for LU (Table 1). The same trend was observed for Ra and Rz, with the time-dependent changes for CD and ND being much milder than for LU. CD and ND had significantly lower Ra than LU in all periods, and were similar in most periods (Table 1). For Rz, LU and ND had increased after three years of brushing, but CD remained with similar 6-month Rz values brushing even after 5 years of brushing. CD and ND showed the lowest Rz in all brushing periods compared to LU (Table 1).

3.2 Artificial tooth resins

For the artificial tooth resins, the interaction (GEE) between groups and brushing cycles was also significant for weight loss ($p<0.001$), surface roughness Ra ($p=0.003$) and Rz ($p=0.002$). Tables 4, 5 and 6 present the differences found in the post hoc test for these variables.

The weight of both artificial tooth resins reduced between the different periods, however, in the same period, the CT resin presented lower weight loss than DU (Table 2). The Ra of CT remained similar between the periods of 1 and 5 years of brushing, whereas DU increased after 3-year brushing, achieving a large increase after 5 years of brushing. DU showed higher Ra at 3 and 5 years of brushing compared to CT (Table 2). The Rz of DU was high after 3-year brushing, achieving a large increase after 5 years of brushing and CT samples maintained similar Rz after all brushing cycles. DU showed higher Rz at 3 and 5 years of brushing compared to CT (Table 2).

4. Discussion

In this study, the null hypothesis of similarity between the tested resins and brushing periods was rejected, regardless of the dependent variable (i.e., weight loss, Ra and Rz). The results of this study showed that the 3D-printed resins for denture base (Cosmos Denture, CD and NextDent Denture 3D+, ND) and artificial teeth (Cosmos TEMP, CT) were more resistant to abrasion than the tested conventional resins. Although all materials have lost weight continuously with cycling, the loss was significantly lower for 3D-printed resins than for conventional materials. In addition, the roughness Ra and Rz were higher for the heat-polymerized denture base resin (LU) than the 3D-printed resins ND and CD in all the periods of brushing tested.

The 5-year period of mechanical toothbrushing was simulated in this study considering the average period usually recommended for replacement of removable dentures. Beyond that, dentures become unacceptable by the progression of residual alveolar ridge resorption[21] and deterioration of their acrylic resin parts[22]. The weight loss was calculated in this study as a value measurement for the abrasion resistance of acrylic resin materials for denture base and artificial tooth fabrication, according to previous studies[17–19].

Our results showed that the Ra roughness for the 3D-printed denture base resins CD and ND significantly increased after 3 years of toothbrushing. For the 3D-printed resin CT, used for artificial tooth fabrication, the Ra significantly increased only after 5 years of toothbrushing. However, the Rz roughness remained similar to CD and CT even after 5 years of mechanical brushing, but significantly increased for ND after 3 years. Alfouzan et al.[13] detected no difference in Ra after simulating two years of aging by thermal cycling, mechanical brushing (17,800 cycles) and immersion in beverages comparing two denture base 3D-printed resins in SLA, including NextDent Denture 3D+ (ND), and one conventional heat-cured denture base resin. Nam et al.[14] showed that Ra and Rz values for FormLabs printed in SLA and NextDent C&B printed in DLP was higher before artificial brushing but only the FormLabs printed in SLA did not increase Ra and Rz after 20,000 brushing cycles compared to PMMA CAD/CAM blocks. Therefore, similar to our results, Nam et al.[14] also observed that the 3D-printed resin NextDent showed an increase in the Rz parameter after brushing. In addition, our results demonstrated a significant difference between the 3D-printed denture base resins ND and CD for the Rz results. Rz was significantly increased just after 3 years of mechanical brushing for ND, whereas the same occurred only after 5

years for CD. This difference between the 3D-printed resins might be attributed to their different and little-known compositions, despite both containing methacrylic oligomers, methacrylate monomers, initiators, stabilizers and pigments, but in different proportions.

The parameter Rz is more sensitive to occasional high peaks or deep valleys than Ra[20]. This parameter is the difference in height between the average of the five highest peaks and the five lowest valleys along the assessment length of the surface profile[20]. In this study, the profilometer did not detect high peaks or deep valleys even after 5 years of mechanical brushing in CD and CT samples. It could be considered favorable results, indicating that these 3D-printed resins for denture base (CD) and artificial teeth (CT) were stable even after 5-year artificial toothbrushing, which could represent polished surfaces over 5 years, preventing microbial adhesion.

It is noteworthy that, in this study, the control group for the denture base resin (LU) and artificial tooth (DU) showed significantly higher weight loss than the 3D-printed resins ND, CD and CT, irrespective of the period of toothbrushing. Lucitone 550 also resulted in higher surface roughness (Ra and Rz) for all the periods in comparison to ND and CD 3D-printed resins. On the other hand, for the artificial tooth resins, a significant difference on the parameters Ra and Rz were notable only after 3 years of brushing. A reasonable explanation for these results could be related to the different compositions and polymerization processes of these resins. Chang et al.[7] suggests a high number of residual monomers in PMMA conventional resins makes the internal structure more brittle compared to other materials such as 3D-printed resins[7]. In addition, the 3D printing process is more controlled by the printed layers, thickness, printing directions, extent and degree of polymerization, shrinkage between printed layers, and the strength and magnitude of the radiating laser source affect material properties of the printing material[13].

The use a single toothbrush/toothpaste combination could be seen as a limitation of this study. However, different types of soft and medium toothbrushes/denture brushes have similar effect on weight loss and surface roughness of acrylic resins[5]. The size and type of abrasives of the different toothpastes may have a greater influence[6]. The toothpaste used was chosen due to its wide use, low abrasiveness to acrylic resin[6] and composite, causing minimal reduction in gloss and less change in surface roughness of the latter[23].

The main limitation of this in vitro study is the absence of the simulated oral environment. The oral cavity is a dynamic and complex environment, being that the temperature, presence of saliva, serum and proteins may influence on the adhesion of the microorganisms to the materials surfaces, further complicating the adherence process[10]. Nevertheless, this in vitro study presents promising results regarding the abrasion-resistance of 3D-printed resins after 5-year simulated brushing with toothpaste that was shown to be lower than that observed with conventional resins, as measured by surface roughness and weight change. These preliminary results endorse the use of these materials for denture fabrication, with a more predictable and satisfactory prognosis over the years.

5. Conclusion

Despite the limitations of this in vitro study, it can be concluded that the DLP 3D-printed resins for denture base and artificial teeth have greater abrasion resistance and maintenance of finishing and polishing of surface roughness than conventional PMMA resins after different periods of brushing. The 3D-printed materials evaluated in this study showed more stable surface properties than the conventional resins even after 5 years of simulated brushing.

Acknowledgments

The authors thank Prof. Patricia Maria de Paula for making the precision electronic scale available for reading. Study supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Declaration of interest statement

None.

References

- [1] Shigli K. Aftercare of the complete denture patient. J Prosthodont 2009;18:688–93. doi:10.1111/j.1532-849X.2009.00500.x.
- [2] Cinquanta L, Varoni EM, Barbieri C, Sardella A. Patient attitude and habits regarding removable denture home hygiene and correlation with prosthesis cleanliness: A cross-sectional study of elderly Italians. J Prosthet Dent 2021;125:772.e1-772.e7. doi:10.1016/j.prosdent.2021.01.024.

- [3] Peracini A, Andrade IM de, Paranhos H de FO, Silva CHL da, de Souza RF. Behaviors and hygiene habits of complete denture wearers. *Braz Dent J* 2010;21:247–52. doi:10.1590/s0103-64402010000300013.
- [4] Paranhos HFO, Silva-Lovato CH, Souza RF, Cruz PC, Freitas KM, Peracini A. Effects of mechanical and chemical methods on denture biofilm accumulation. *J Oral Rehabil* 2007;34:606–12. doi:10.1111/j.1365-2842.2007.01753.x.
- [5] de Freitas Pontes KM, de Holanda JC, Fonteles CSR, Pontes C de B, Lovato da Silva CH, Paranhos H de FO. Effect of toothbrushes and denture brushes on heat-polymerized acrylic resins. *Gen Dent* 2016;64:49–53.
- [6] Gautam N, Sharma A, Bashir U, Rapolu S, Mamatha N, Sravani S. Effect of different dentifrices on the surface roughness of acrylic resins: An in vitro study. *J Contemp Dent Pract* 2017;18:679–82. doi:10.5005/jp-journals-10024-2106.
- [7] Chang Y-H, Lee C-Y, Hsu M-S, DU J-K, Chen K-K, Wu J-H. Effect of toothbrush/dentifrice abrasion on weight variation, surface roughness, surface morphology and hardness of conventional and CAD/CAM denture base materials. *Dent Mater J* 2021;40:220–7. doi:10.4012/dmj.2019-226.
- [8] Verran J, Jackson S, Coulthwaite L, Scallan A, Loewy Z, Whitehead K. The effect of dentifrice abrasion on denture topography and the subsequent retention of microorganisms on abraded surfaces. *J Prosthet Dent* 2014;112:1513–22. doi:10.1016/j.prosdent.2014.05.009.
- [9] Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont* 2011;20:251–60. doi:10.1111/j.1532-849X.2011.00698.x.
- [10] Murat S, Alp G, Alatalı C, Uzun M. In vitro evaluation of adhesion of *Candida albicans* on CAD/CAM PMMA-based polymers. *J Prosthodont* 2019;28:e873–9. doi:10.1111/jopr.12942.
- [11] Alghazzawi TF. Advancements in CAD/CAM technology: Options for practical implementation. *J Prosthodont Res* 2016;60:72–84. doi:10.1016/j.jpor.2016.01.003.
- [12] Stansbury JW, Idacavage MJ. 3D printing with polymers: Challenges among expanding options and opportunities. *Dent Mater* 2016;32:54–64. doi:10.1016/j.dental.2015.09.018.

- [13] Alfouzan AF, Alotiabi HM, Labban N, Al-Otaibi HN, Al Taweel SM, AlShehri HA. Effect of aging and mechanical brushing on surface roughness of 3D printed denture resins: A profilometer and scanning electron microscopy analysis. *Technol Health Care* 2022;30:161–73. doi:10.3233/THC-212974.
- [14] Nam N-E, Shin S-H, Lim J-H, Shim J-S, Kim J-E. Effects of artificial tooth brushing and hydrothermal aging on the mechanical properties and color stability of dental 3D printed and CAD/CAM materials. *Materials (Basel)* 2021;14. doi:10.3390/ma14206207.
- [15] International Organization for Standardization. ISO 1567: denture base polymers. 2nd ed. Geneva: The Organization; 1998.
- [16] Hada T, Kanazawa M, Iwaki M, Arakida T, Minakuchi S. Effect of printing direction on stress distortion of three-dimensional printed dentures using stereolithography technology. *J Mech Behav Biomed Mater* 2020;110:103949. doi:10.1016/j.jmbbm.2020.103949.
- [17] Policastro VB, Giro G, Leite ARP, Mendoza-Marin DO, Paleari AG, Compagnoni MA, et al. In vitro assessment of the abrasion resistance of two types of artificial teeth submitted to brushing. *J Prosthodont* 2016;25:485–8. doi:10.1111/jopr.12455.
- [18] Pisani MX, Bruhn JP, Paranhos HFO, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Panzeri H. Evaluation of the abrasiveness of dentifrices for complete dentures. *J Prosthodont* 2010;19:369–73. doi:10.1111/j.1532-849X.2010.00592.x.
- [19] Panzeri H, Lara EHG, Paranhos H de FO, Lovato da Silva CH, de Souza RF, de Souza Gugelmin MCM, et al. In vitro and clinical evaluation of specific dentifrices for complete denture hygiene. *Gerodontology* 2009;26:26–33. doi:10.1111/j.1741-2358.2008.00235.x.
- [20] Gadelmawla ES, Koura MM, Maksoud TMA, Elewa IM, Soliman HH. Roughness parameters. *J Mater Process Technol* 2002;123:133–45. doi:https://doi.org/10.1016/S0924-0136(02)00060-2.
- [21] Kovacic I, Celebić A, Zlatarić DK, Petricević N, Buković D, Bitanga P, et al. Decreasing of residual alveolar ridge height in complete denture wearers. A five year follow up study. *Coll Antropol* 2010;34:1051–6.
- [22] Polychronakis N, Yannikakis S, Zissis A. A clinical 5-year longitudinal study on the dimensional changes of complete maxillary dentures. *Int J Prosthodont* 2003;16:78–81.

- [23] da Costa J, Adams-Belusko A, Riley K, Ferracane JL. The effect of various dentifrices on surface roughness and gloss of resin composites. *J Dent* 2010;38 Suppl 2:e123-8. doi:10.1016/j.jdent.2010.02.005.

TABLES

Table 1. Mean values and 95% confidence intervals for weight loss (g) and surface roughness (Ra and Rz, both in μm) of denture base resin samples after brushing cycles (Bonferroni, $P < .05$).

Variable	Resin	Brushing cycles			
		6-month	1-year	3-year	5-year
Weight loss	CD	-.0028($\pm$.0001)	-.0052($\pm$.0001)	-.0071($\pm$.0002)	-.0101($\pm$.0003)
		Ba	Bb	Bc	Bd
	ND	-.0059($\pm$.0029)	-.0085($\pm$.0030)	-.0097($\pm$.0029)	-.0116($\pm$.0030)
		Ba	Bb	Bc	Bd
	LU	-.0082($\pm$.0004)	-.0172($\pm$.0007)	-.0404($\pm$.0014)	-.0657($\pm$.0024)
		Aa	Ab	Ac	Ad
Ra	CD	-.0790($\pm$.0109)	-.0830($\pm$.0089)	+.0023($\pm$.0181)	+.0710($\pm$.0264)
		Ba	Ca	Bb	Bb
	ND	-.0280($\pm$.0206)	-.0157($\pm$.0165)	+.0810($\pm$.0390)	+.1997($\pm$.0456)
		Ba	Bab	Bb	Bc
	LU	+1.8773($\pm$.4044)	+3.3607($\pm$ 1.0623)	+11.6367($\pm$ 2.2948)	+14.4827($\pm$ 1.9076)
		Aa	Aa	Ab	Ab
Rz	CD	-.6067($\pm$.1016)	-.7600($\pm$.0446)	-.5333($\pm$.0749)	-.3333($\pm$.1001)
		Bab	Ba	Bab	Bb
	ND	-.3833($\pm$.0932)	-.4000($\pm$.0581)	+.0533($\pm$.1825)	+.3867($\pm$.1859)
		Ba	Ca	Bab	Cb
	LU	+9.1067($\pm$ 1.9740)	+14.0233($\pm$ 4.0564)	+45.6867($\pm$ 8.5415)	+59.4467($\pm$ 6.9384)
		Aa	Aa	Ab	Ab

For each dependent variable, same capital letters indicate no significant differences within each column (no difference between materials); similar lowercase letters indicate no significant difference within the same row (no difference between cycling periods).

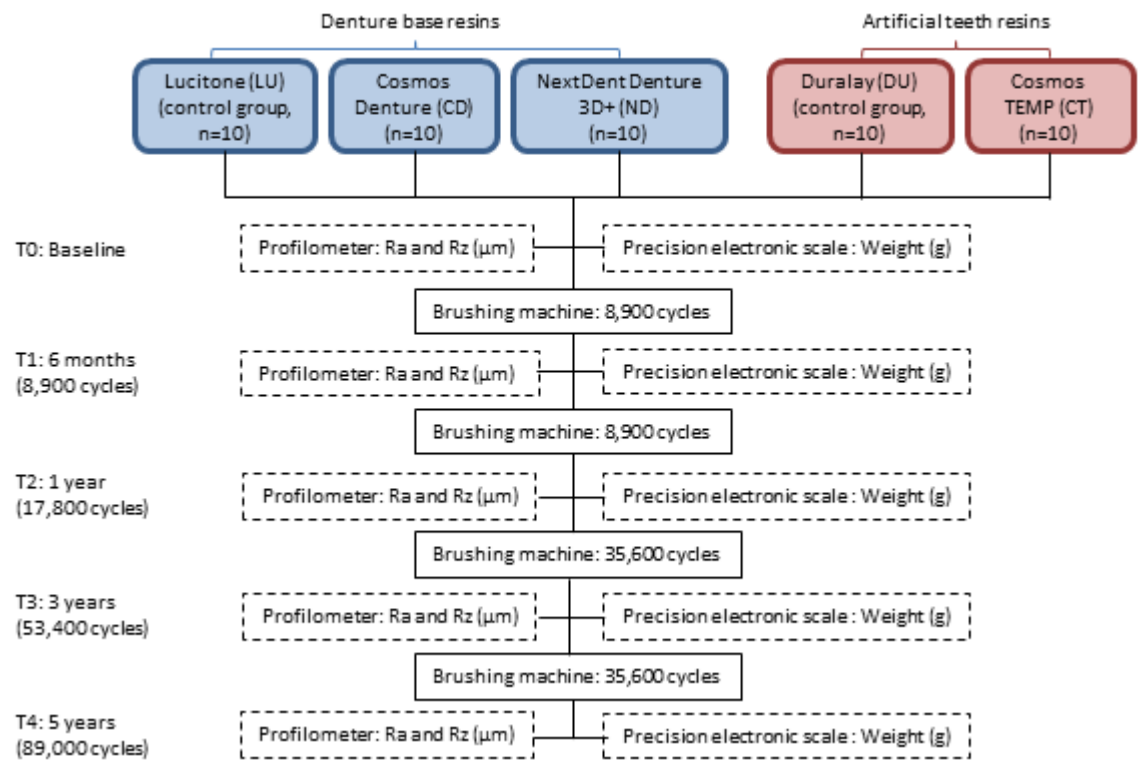
Table 2. Mean values and 95% confidence intervals for weight loss (g) and surface roughness (Ra and Rz, both in μm) of artificial tooth resin samples after brushing cycles (Bonferroni, $P < .05$).

Variable	Resin	Brushing cycles			
		6-month	1-year	3-year	5-year
Weight loss	CT	-0.0037(± 0.0002)	-0.0066(± 0.0001)	-0.0087(± 0.0004)	-0.0127(± 0.0005)
		Ba	Bb	Bc	Bd
	DU	-0.0116(± 0.0007)	-0.0214(± 0.0011)	-0.0501(± 0.0018)	-0.0834(± 0.0023)
		Aa	Ab	Ac	Ad
Ra	CT	-0.0807(± 0.0181)	-0.0370(± 0.0174)	-0.0203(± 0.0193)	+0.0470(± 0.0282)
		Aa	Aab	Bab	Bb
	DU	+2.1837(± 0.8278)	+3.5363(± 1.3471)	+8.2897(± 1.7720)	+13.6087(± 1.7923)
		Aa	Aab	Ab	Ac
Rz	CT	-0.8467(± 0.1229)	-0.7333(± 0.0865)	-0.7767(± 0.0592)	-0.5700(± 0.1212)
		Aa	Aa	Ba	Ba
	DU	+9.8000(± 3.8241)	+14.1167(± 5.0783)	+33.3200(± 6.6574)	+55.7800(± 7.1699)
		Aa	Aab	Ab	Ac

For each dependent variable, same capital letters indicate no significant differences within each column (no difference between materials); similar lowercase letters indicate no significant difference within the same row (no difference between cycling periods).

FIGURES PAGE

Figure 1. Flow diagram of research course.



4 DISCUSSÃO

A hipótese nula dos estudos foi rejeitada: (a) O tipo de resina e o período de incubação influenciaram na adesão e formação de biofilme de *C. albicans*. Além disso, houve diferença na rugosidade de superfície e energia livre de superfície entre as diferentes resinas testadas; (b) Todos os materiais perderam peso continuamente com a escovação, a perda foi significativamente menor para resinas impressas 3D do que para materiais convencionais. Além disso, as rugosidades Ra e Rz foram maiores para a resina Lucitone 550 do que as resinas NextDent Denture 3D+ e Cosmos Denture impressas 3D em todos os períodos de escovação testados.

As resinas impressas em tecnologia DLP apresentaram uma qualidade superior em alguns aspectos em relação a resinas impressas no método SLA, como maior resistência a flexão e módulo de elasticidade²⁹, menor solubilidade³⁶, porém parece não influenciar na rugosidade de superfície e adesão de *C. albicans*³⁹. Este método tornou-se mais interessante para a prática clínica odontológica devido à rapidez da impressão, em relação à tecnologia SLA^{14,27}.

Devido a recente introdução na odontologia, muito precisa ser aprimorado na composição das resinas e técnica de impressão para uma maior adesão profissional e aplicabilidade clínica. Nos presentes estudos, as propriedades de adesão e formação de biofilme de *C. albicans* e energia livre de superfície parecem necessitar de maior atenção dos fabricantes, uma vez que uma maior contagem de unidades de formação de colônias (UFC/mL), metabolismo celular (nm) e uma maior energia livre de superfície (erg cm^{-2}) foram encontrados em resinas impressas em tecnologia DLP comparada as resinas termopolimerizadas convencionais (dados do Artigo 1).

Por outro lado, os satisfatórios resultados quanto à influência da escovação sobre a superfície das resinas impressas no Artigo 2, elucidam vantagens que demonstram achados in vitro promissores em longo prazo dessas resinas. Outra grande vantagem relatada na literatura foi uma menor concentração de metilmetacrilato eliminada (monômero residual) em comparação com próteses fresadas³³, diminuindo o risco de toxicidade provada a mucosa por essas próteses.

Além disso, tentativas de mudanças de parâmetros para melhores desempenhos das propriedades das próteses dentárias 3D são buscadas através da mudança do tempo de pós-polimerização²⁸, orientação de impressão^{29,39} e tratamento de superfície³⁰. Deve-se levar em consideração que esta tecnologia foi recém-

implantada na odontologia e ainda precisa ser aprimorada, porém trata-se de um material promissor.

5 CONCLUSÃO

Apesar das limitações dos estudos *in vitro* realizados, pode-se concluir que:

- a) As resinas utilizadas em impressão 3D (Cosmos Denture e NextDent Denture 3D+) são ligeiramente mais propensas à colonização por *C. albicans* do que uma resina convencional de base protética polimerizada por calor. Considerando que a energia livre de superfície das resinas foi um fator importante por trás desses achados, diferenças na rugosidade de sua superfície não foram associadas à colonização microbiana.
- b) As resinas utilizadas em impressão 3D DLP para base de prótese e dentes artificiais apresentam maior resistência à abrasão e manutenção da rugosidade da superfície do que as resinas PMMA convencionais após diferentes períodos de escovação. Os materiais utilizados em impressão 3D avaliados neste estudo mostraram propriedades de superfície mais estáveis do que as resinas convencionais, mesmo após 5 anos de escovação simulada.

REFERÊNCIAS*

1. Rueggeberg FA. From vulcanite to vinyl, a history of resins in restorative dentistry. *J Prosthet Dent*. 2002; 87(4): 364–79.
2. Alhareb AO, Akil HM, Ahmad ZA. PMMA denture base composites reinforced by nitrile rubber and ceramic fillers. *Polym Polym Compos*. 2016; 24(1): 71–80.
3. 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.
4. 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*. 2008; 17(2): 125–9.
5. Bettencourt AF, Neves CB, de Almeida MS, Pinheiro LM, Oliveira SA, Lopes LP et al. Biodegradation of acrylic based resins: a review. *Dent Mater*. 2010; 26(5): e171-80.
6. 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.
7. 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*. 2014; 23(3): 182–91.
8. Cunha TR, Della Vecchia MP, Regis RR, Ribeiro AB, Muglia VA, Mestriner WJ 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.
9. Alghazzawi TF. Advancements in CAD/CAM technology: options for practical implementation. *J Prosthodont Res*. 2016; 60(2): 72–84.
10. Bidra AS, Taylor TD, Agar JR. Computer-aided technology for fabricating complete dentures: systematic review of historical background, current status, and future perspectives. *J Prosthet Dent*. 2013; 109(6): 361–6.
11. Chen J, Ahmad R, Suenaga H, Li W, Sasaki K, Swain M et al. Shape optimization for additive manufacturing of removable partial dentures: a new paradigm for prosthetic CAD/CAM. *PloS one*. 2015; 10(7): e0132552.
12. Zaharia C, Gabor A, Gavrilovici A-M, Stan A, Idorasi L, Sinescu C et al. Digital dentistry: 3D printing applications. *J Interdiscip Med*. 2017; 2(1): 50-3.
13. Lin L, Fang Y, Liao Y, Chen G, Gao C, Zhu P. 3D printing and digital processing techniques in dentistry: a review of literature. *Adv Eng Mater*. 2019; 21(6): 1801013.

* 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>

14. Tian Y, Chen C, Xu X, Wang J, Hou X, Li K et al. A review of 3D printing in dentistry: technologies, affecting factors, and applications. *Scanning*. 2021; 2021: 9950131. [acesso 2022 dez 10] Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2021/9950131>.
15. Prpić V, Schauperl Z, Ćatić A, Dulčić N, Čimić S. Comparison of mechanical properties of 3D-printed, CAD/CAM, and conventional denture base materials. *J Prosthodont*. 2020; 29(6): 524–8.
16. Fouda SM, Gad MM, Abualsaud R, Ellakany P, AlRumaih HS, Khan SQ et al. Flexural properties and hardness of CAD-CAM denture base materials. *J Prosthodont*. 2022 May 14. doi: 10.1111/jopr.13535.
17. Di Fiore A, Meneghello R, Brun P, Rosso S, Gattazzo A, Stellini E et al. Comparison of the flexural and surface properties of milled, 3D-printed, and heat polymerized PMMA resins for denture bases: an in vitro study. *J Prosthodont Res*. 2021; 66(3): 502-8.
18. Cha H-S, Park J-M, Kim T-H, Lee J-H. Wear resistance of 3D-printed denture tooth resin opposing zirconia and metal antagonists. *J Prosthet Dent*. 2020; 124(3): 387–94.
19. Pham DM, Gonzalez MD, Ontiveros JC, Kasper FK, Frey GN, Belles DM. Wear resistance of 3D printed and prefabricated denture teeth opposing zirconia. *J Prosthodont*. 2021; 30(9): 804–10.
20. Bayarsaikhan E, Lim J-H, Shin S-H, Park K-H, Park Y-B, Lee J-H et al. Effects of postcuring temperature on the mechanical properties and biocompatibility of three-dimensional printed dental resin material. *Polymers*. 2021; 13(8): 1180.
21. Choi JJE, Uy CE, Plaksina P, Ramani RS, Ganjigatti R, Waddell JN. Bond strength of denture teeth to heat-cured, CAD/CAM and 3D printed denture acrylics. *J Prosthodont*. 2020; 29(5): 415-21.
22. Awad AN, Cho S-H, Kesterke MJ, Chen J-H. Comparison of tensile bond strength of denture relined materials on denture bases fabricated with CAD-CAM technology. *J Prosthet Dent*. 2021; S0022-3913(21): 00365-6.
23. Gad MM, Fouda SM, Abualsaud R, Alshahrani FA, Al-Thobity AM, Khan SQ et al. Strength and surface properties of a 3D-printed denture base polymer. *J Prosthodont*. 2022; 31(5): 412–8.
24. Alfouzan AF, Alotiabi HM, Labban N, Al-Otaibi HN, Al Taweel SM, AlShehri HA. Effect of aging and mechanical brushing on surface roughness of 3D printed denture resins: a profilometer and scanning electron microscopy analysis. *Technol Health Care*. 2022; 30(1): 161–73.
25. Dimitrova M, Chuchulska B, Zlatev S, Kazakova R. Colour stability of 3D-printed and prefabricated denture teeth after immersion in different colouring agents: an in vitro study. *Polymers*. 2022; 14(15): 3125.
26. Shim JS, Kim J-E, 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.

27. Stansbury JW, Idacavage MJ. 3D printing with polymers: challenges among expanding options and opportunities. *Dent Mater*. 2016; 32(1): 54–64.
28. Perea-Lowery L, Gibreel M, Vallittu PK, Lassila L V. 3D-printed vs. heat-polymerizing and autopolymerizing denture base acrylic resins. *Materials (Basel)*. 2021; 14(19): 5781.
29. Srinivasan M, Kalberer N, Kamnoedboon P, Mekki M, Durual S, Özcan M et al. CAD-CAM complete denture resins: an evaluation of biocompatibility, mechanical properties, and surface characteristics. *J Dent*. 2021 Nov; 114: 103785.
30. Yao Q, Morton D, Eckert GJ, Lin W-S. The effect of surface treatments on the color stability of CAD-CAM interim fixed dental prostheses. *J Prosthet Dent*. 2021; 126(2): 248–53.
31. Li P, Krämer-Fernandez P, Klink A, Xu Y, Spintzyk S. Repairability of a 3D printed denture base polymer: effects of surface treatment and artificial aging on the shear bond strength. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2021 Feb; 114: 104227.
32. 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): 221.
33. Srinivasan M, Chien EC, Kalberer N, Alambiaga Caravaca AM, Castelleno AL, Kamnoedboon P et al. Analysis of the residual monomer content in milled and 3D-printed removable CAD-CAM complete dentures: an in vitro study. *J Dent*. 2022 May; 120: 104094.
34. Choi JJE, Ramani RS, Ganjigatti R, Uy CE, Plaksina P, Waddell JN. Adhesion of denture characterizing composites to heat-cured, CAD/CAM and 3D printed denture base resins. *J Prosthodont*. 2021; 30(1): 83–90.
35. Kraemer Fernandez P, Unkovskiy A, Benkendorff V, Klink A, Spintzyk S. Surface characteristics of milled and 3D printed denture base materials following polishing and coating: an in-vitro study. *Materials (Basel)*. 2020; 13(15): 3305.
36. Gad MM, Alshehri SZ, Alhamid SA, Albarrak A, Khan SQ, Alshahrani FA et al. Water sorption, solubility, and translucency of 3D-printed denture base resins. *Dent J*. 2022; 10(3): 42.
37. Tieh MT, Waddell JN, Choi JJE. Optical and mechanical properties of conventional, milled and 3D-printed denture teeth. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2022 Feb; 126: 105061.
38. Cleto MP, Silva MDD, Nunes TSBS, Viotto HEC, Coelho SRG, Pero AC. Evaluation of shear bond strength between denture teeth and 3D-printed denture base resin. *J Prosthodont*. 2022 May 24. doi: 10.1111/jopr.13527
39. Li P, Fernandez PK, Spintzyk S, Schmidt F, Beuer F, Unkovskiy A. Effect of additive manufacturing method and build angle on surface characteristics and *Candida albicans* adhesion to 3D printed denture base polymers. *J Dent*. 2022 Jan; 116: 103889.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (T.C.L.E) PARA COLETA DE AMOSTRAS DE SALIVA

Nome do projeto: Propriedades microbiológicas de materiais para base protética utilizados na técnica de impressão 3D

Nome do Pesquisador Responsável: Prof^{fa} Dra. Ana Carolina Pero

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (T.C.L.E) descreve um estudo científico, o que você pode esperar se você decidir ser participante deste estudo e informações importantes para ajudá-lo a tomar sua decisão. Por favor leia este documento atentamente.

A equipe do estudo explicará o estudo para você. Por favor, pergunte sobre qualquer coisa que não está clara antes de você decidir participar. Você poderá levar este documento para casa para discutir com seus familiares e amigos.

- Participar deste estudo é voluntário: é sua opção.
- Se você participar deste estudo, você pode mudar de ideia e deixar de participar a qualquer momento.

Introdução

Você está sendo abordado para participar neste estudo porque você é um adulto saudável. Este estudo está sendo conduzido pela Pesquisadora Dra. Ana Carolina Pero, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

Objetivo do Estudo

O objetivo deste estudo é analisar a presença e as características de microrganismos presentes em dentaduras confeccionadas em impressora 3D.

Descrição dos Procedimentos para o Estudo

Se você decidir participar neste estudo, você será convidado a doar amostras de 5 a 15 ml (em torno de 2 a 3 colheres de chá) de saliva cuspidando em um copo. Você também poderá mascar um pedaço pequeno de filme de parafina para estimular a produção de saliva. Apenas um encontro será necessário para esta doação. No dia da coleta, você deverá comparecer com pelo menos 2 (duas) horas em jejum e não ter feito uso de cremes dentais ou bochechos com substâncias antissépticas. Sua amostra de saliva será coletada em tubo de plástico e após a coleta, o pesquisador irá centrifugar, filtrar e armazenar a saliva em alíquotas em um freezer para utilização restrita no projeto. Ao finalizar o estudo, o pesquisador irá autoclavar as alíquotas de saliva e descartar em saco branco hospitalar.

Duração do Procedimento

O procedimento para coleta de saliva dura em média 20 minutos.

Riscos de Participação

Existe o risco de você engolir o pedaço de filme de parafina. Se isso acontecer, o filme se dissolverá no estômago do mesmo modo como uma goma de mascar se dissolve. Além disso, é possível que haja constrangimento durante a coleta de saliva; dessa forma, será providenciado local reservado para a coleta de saliva a fim de evitar tal desconforto.

Benefícios de Participação

Através deste estudo o possível benefício para o participante e para os indivíduos usuários de próteses removíveis, será o conhecimento das propriedades microbiológicas e performance de materiais comercialmente utilizados para a confecção de dentaduras manufaturadas através de uma tecnologia digital, clinicamente mais ágil e sustentável. Sendo mais apropriado na prevenção de doenças oportunistas da mucosa bucal como a Candidose, por exemplo.

Financiamento da Pesquisa

Financiamento próprio.

Custos ou Pagamentos

Não existem custos para você participar neste estudo. Você não será pago para participar neste estudo.

Sigilo e Confidencialidade das Informações

A instituição e seus pesquisadores fazem todos os esforços para manter as suas informações registradas confidenciais. Para tanto, armazenaremos as informações em local seguro, com acesso restrito. Ocasionalmente, porém, pesquisadores precisam compartilhar informações com outros membros da equipe de pesquisa na instituição que possam lhe identificar. Se isto acontecer, tomaremos todas as precauções para proteger as informações que você forneceu. Os resultados do estudo poderão ser apresentados em conferências ou publicações científicas, mas seu nome não será usado.

Pessoas para Contato

Para maiores informações sobre este estudo, por favor entre em contato com:

Dra. Ana Carolina Pero no (16) 3301-6401 (durante o dia, de segunda-feira a sexta-feira).

Ou entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa:

Rua Humaitá, 1680 - Centro

CEP. 14801-903 - ARARAQUARA - SP

Fax: (16) 3301-6459

Participação voluntária

Participação neste estudo é voluntária. Você é livre para não participar ou cancelar sua participação a qualquer momento, por qualquer razão. Não importa a decisão que você tomar, não existem penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. No caso em que você decida cancelar sua participação no estudo, as informações que você já tenha fornecido serão mantidas de modo sigiloso e confidencial.

Caso seja funcionário ou estudante dessa instituição, participar deste estudo não faz parte de suas funções na instituição, e recusar ser participante não afetará seu trabalho ou estudos. Você não receberá nenhuma consideração especial relacionada ao trabalho ou estudo se você participar do presente estudo.

Caso ocorra algum dano comprovadamente decorrente da sua participação nesta pesquisa, você poderá ser indenizado conforme determina a Resolução CNS 466/12.

Consentimento do Participante

Declaro que tomei ciência e que fui esclarecido de maneira a não restarem quaisquer dúvidas sobre a minha participação no estudo. Eu li (ou alguém leu para mim) o conteúdo deste documento (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) e eu fui encorajado a fazer perguntas. Eu recebi respostas para minhas perguntas. Eu aceito participar neste estudo. Eu recebi uma via deste documento para meu registro e referência futura.

Nome Completo do Participante:

R.G. do Participante:

Endereço do Participante:

Número do Prontuário na Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP do Participante:

Assinatura do Participante

Data

Pesquisador

Eu li este documento para o participante e/ou o participante leu este documento. Eu forneci para o participante uma via datada e assinada deste documento. Uma explicação da pesquisa foi dada e as perguntas feitas pelo participante foram respondidas de modo que o participante tenha entendido. No meu entendimento, o participante demonstrou entender as informações. Eu dei oportunidade adequada para o participante ler o documento antes de assiná-lo.

Nome do Pesquisador: Prof^a Dra. Ana Carolina Pero

Assinatura do Pesquisador

Data

APÊNDICE B – DESCRIÇÃO DETALHADA DA METODOLOGIA

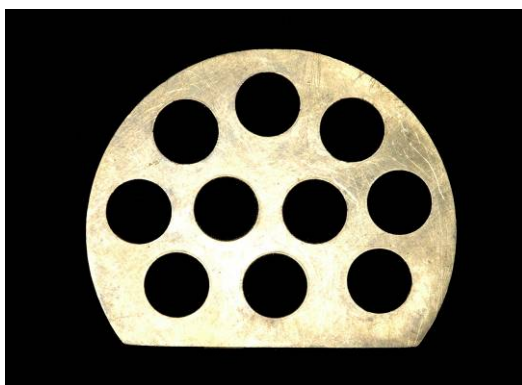
ARTIGO 1

Para a avaliação das propriedades físicas: rugosidade Ra (μm) e energia livre de superfície (erg cm^{-2}); e microbiológicas: formação de biofilme de *Candida albicans* (UFC/mL $\log_{10}$), avaliação por XTT (nm) e análise por Confocal; descritos no Artigo 1, foram obtidos corpos-de-prova circulares apresentando 15 mm de diâmetro e 3 mm de espessura, confeccionados de acordo com o protocolo a seguir.

Corpos-de-Prova Lucitone 550 – Grupo Controle

Para a obtenção dos corpos-de-prova das resinas Lucitone 550 (Dentsply Ind. e Com. Ltda, Petrópolis, RJ, Brasil), um conjunto de matriz metálica/lâmina de vidro (Figura B1) foi incluído em mufla metálica com gesso pedra tipo III. Após presa do gesso, uma nova lâmina de vidro foi posicionada sobre o conjunto matriz metálica/lâmina de vidro e a contra-mufla foi disposta vazada com gesso tipo III, completando-se assim a fase de inclusão.

Figura B1 - Matriz metálica



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Após abertura da mufla e isolamento do gesso com Cel-Lac, a prensagem da resina acrílica Lucitone 550 para base protética foi realizada. A proporção (21g/ 10 mL) e manipulação pó/líquido da resina foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante, sendo que o pó foi pesado em uma balança de precisão eletrônica e o líquido mensurado com o auxílio de uma pipeta.

A prensagem foi realizada sob prensa hidráulica em duas etapas, uma prensagem inicial e uma final. Para a prensagem inicial, uma carga de 0,5 tonelada-

força foi exercida e, logo após, a mufla foi aberta e os excessos de resina foram eliminados com auxílio de um buril de Le Cron. Durante a prensagem final, cargas de 0,5, 0,75 e 1,25 toneladas-força foram exercidas sobre a mufla metálica.

Para uma correta acomodação da resina no interior da matriz metálica e uma agregação adequada do monômero ao polímero da resina, um período de 30 minutos foi aguardado sob a prensa. Posteriormente, as muflas foram fechadas com auxílio de parafusos próprios 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 (Solab Equipamentos para laboratórios Ltda, Piracicaba, SP, Brasil). Após a polimerização, a mufla foi resfriada sobre bancada por uma noite e, então, os corpos-de-prova foram desincluídos.

Corpos-de-Prova NextDent Denture 3D+ e Cosmos Denture

Os corpos-de-prova dos grupos experimentais de base de prótese NextDent Denture 3D+ (NextDent B.V., Soesterberg, Holanda) e Cosmos Denture (Yller Digital, Pelotas, RS, Brasil) foram obtidos por meio da técnica de impressão aditiva. Para isso, foi utilizada a impressora Flashforge Hunter DLP Resin 3D Printer (Zhejiang Flashforge3D technology Co., Jinhua City, ZheJiang, China, Figura B2). O desenho virtual dos corpos-de-prova, nas respectivas dimensões descritas foi realizado através do software Adobe Meshmixer v. 3.5 (Autodesk Inc, San Rafael, CA, EUA), inicialmente em formato próprio do software (.mix). Um arquivo .stl foi preparado para cada tipo de espécime. Os espécimes virtuais foram carregados no software próprio (FlashDLPrint v. 3.28.0), para desenho dos suportes, fatiamento da trama e carregamento na impressora.

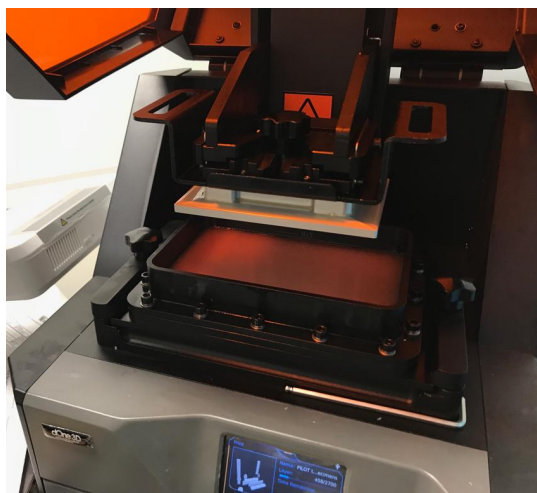
A partir do desenho e fatiamento dos corpos-de-prova, as resinas para base protética NextDent Denture 3D+ ou a resina Cosmos Denture foram depositadas no tanque próprio da impressora, previamente à impressão propriamente dita (Figura B3). Ao acionar comando próprio, iniciou-se o processo de impressão dos corpos-de-prova sob a plataforma do equipamento, sendo que a polimerização foi ativada por luz ultravioleta (painel LED, $\lambda = 405\text{nm}$). O processo de impressão dos corpos-de-prova foi realizado conforme as recomendações dos fabricantes (ex.: tempo de polimerização por camada, intervalo e % de energia), usando-se uma espessura de camada de 50 μm .

Figura B2 - Impressora Flashforge – Hunter DLP Resin 3D Printer



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Figura B3 - Resina para base protética depositada no tanque próprio da impressora previamente à impressão

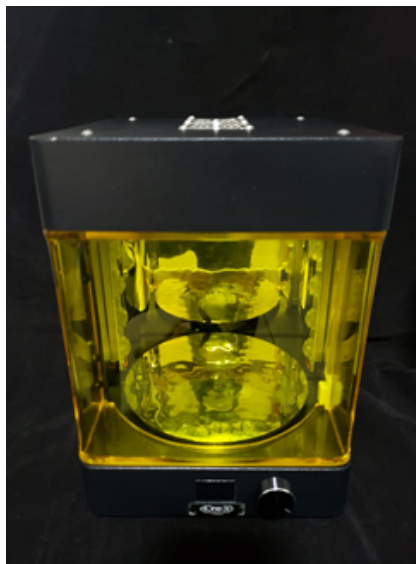


Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Após a impressão, a plataforma da impressora sob a qual estavam posicionados os corpos-de-prova, foi imediatamente removida do equipamento e os corpos-de-prova foram destacados da mesma. Em seguida, foram lavados em álcool isopropílico 99% por 5 minutos e foi realizada uma polimerização adicional em luz UV

no equipamento Form Cure (Formlabs, Inc., Somerville, MA, EUA) (Figura B4) por 5 minutos em cada face do corpo-de-prova.

Figura B4 - Equipamento Curing Box para polimerização adicional em luz UV



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Acabamento e Polimento dos Corpos-de-Prova

O acabamento e polimento dos corpos-de-prova foram realizados na máquina politriz Aropol 2V. Foram utilizadas lixas d'água para polimento com granulação de 220, 400 e 600. Um paquímetro digital foi utilizado para controlar o desgaste dos corpos-de-prova, de acordo com as dimensões recomendadas pela norma ISO/FDIS 1567¹. Previamente à realização dos testes de rugosidade e energia livre de superfície, os corpos-de-prova de todas as resinas foram armazenados em água destilada a 37°C por 50±2 horas¹.

Avaliação da Rugosidade

A rugosidade de superfície foi analisada através de um rugosímetro digital portátil modelo SJ-400 (Mitutoyo Corporation, Japão) com precisão de 0,01 μm . A velocidade da ponta ativa foi 0,5 mm/s. Para cada corpo-de-prova foram realizadas três mensurações de rugosidade em regiões distintas, e então um valor de rugosidade média foi obtido em R_a (μm), para cada condição experimental. Todas as medidas foram realizadas por um único operador.

Avaliação da Energia Livre de Superfície

Um goniômetro (modelo 200, Ramé-hart instrument co., Netcong, New Jersey, EUA) foi utilizado acoplado a uma micro-seringa para gotejamento do líquido e uma câmera CCD que registra a imagem da gota sobre a superfície do espécime. A este equipamento, também foi acoplado um sistema computadorizado que possui um software (DROPimage Standard, ramé-hart instrument co., Netcong, New Jersey, EUA).

Cada corpo-de-prova foi posicionado sobre uma plataforma do equipamento entre a câmera e a lente. Foram utilizados como agentes molhantes a água destilada (componente polar) e o diiodometano (componente apolar). Foi estabelecido um mesmo volume para cada gota a ser dispensada sobre o corpo-de-prova, assim como um intervalo de 10 segundos foi aguardado como tempo de acomodamento, para estabilização e interação do líquido com a superfície, antes de se realizar as mensurações. Foram avaliados os ângulos de contato direito e esquerdo formados entre a superfície de cada corpo-de-prova e a gota correspondente a cada líquido, e então, o ângulo de contato final foi calculado utilizando a equação de Laplace-Young². Esses valores foram utilizados para o cálculo da energia livre de superfície com auxílio do software, utilizando o conceito de componentes polares e dispersão com o método de OWRK (Owens–Wendt–Rabel–Kaelble)².

Duas medidas para cada corpo-de-prova foram realizadas, em partes distintas do mesmo, sendo então obtida uma média aritmética para cada condição experimental. Todas as medidas foram realizadas por um único operador.

Avaliação Microbiológica

As propriedades microbiológicas foram avaliadas por meio de testes específicos para avaliação da capacidade de adesão e formação de biofilmes simples de *C. albicans*. Para essa análise, foram utilizados os testes de contagem de Unidades Formadoras de Colônias/ mL (UFC/ mL) convertido em $\log_{10}$ e avaliação do metabolismo celular (ensaio de XTT). Além disso, com a finalidade de avaliar a arquitetura dos biofilmes formados sobre as resinas para base protética foram obtidas imagens através de microscopia confocal.

Obtenção dos Inóculos

A cepa microbiana utilizada (*C. albicans* SC5314) foi mantida congelada a -80°C e reativadas no momento do uso em placas contendo ágar SDA + Cloranfenicol, pelo método do esgotamento, sendo em seguida incubadas a 37°C por 48 horas. Após este período, um número estabelecido de colônias de cada cepa foi transferido separadamente para meio de cultura caldo TYE (Tryptone and Yeast Extract) suplementado com 1% de glicose, e foram então incubados por 16 horas, em estufa formando desta maneira o pré-inóculo. Após o período de incubação, para a obtenção do inóculo, foram realizadas diluições das concentrações dos micro-organismos em meio TYE+ 1% de glicose 1:10. O crescimento dos micro-organismos na fase exponencial (mid-log) foi determinado através da mensuração da densidade ótica (DO) em espectrofotômetro, garantindo assim a concentração microbiana de aproximadamente 1×10^7 UFC/ mL³.

Foram utilizadas placas estéreis de 12 poços. Os discos de resina foram previamente desinfetados por exposição a luz UV, em um período de 20 minutos cada lado³, e posteriormente distribuídos aleatoriamente nos poços. Em seguida, em cada poço da placa, foi acrescentado 2 mL da saliva filtrada e incubada em estufa a 37°C durante 90 minutos para formação da película salivar. Após este período, os corpos-de-prova foram transferidos para uma nova placa.

A saliva foi previamente coletada a partir de oito voluntários escolhidos segundo os critérios de inclusão. Essa coleta foi realizada com a devida apreciação e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (CAAE: 26410519.0.0000.5416) (Anexo A). Foram selecionados independentemente do sexo/gênero e idade, com base nos seguintes critérios de inclusão: ausência de doença sistêmica debilitante, jejum e não ter utilizado dentifrício ou enxaguatório bucal por, pelo menos, duas horas antes da coleta; foram excluídos se tivessem tomado antibióticos nos últimos três meses. A saliva coletada foi colocada em tubos Falcon, centrifugada (4°C, 4000RPM, por 10 minutos), e o sobrenadante foi filtrado utilizando-se membrana de 0,22µm. As alíquotas de saliva foram mantidas a -80°C até sua utilização.

Formação do Biofilme

Formação de biofilme isolado de *C. albicans*: 1 mL da suspensão 1×10^7 UFC/mL foi adicionada em placas estéreis de 12 poços, completando-se com meio TYE + 1% glicose, para um volume final por poço de 2 mL.

O biofilme simples de *C. albicans* foi submetido à fase de adesão que consiste em incubação por 90 minutos sob agitação orbital de 75 rpm a 37°C³. Após a fase de adesão, todos os discos foram removidos da placa, imersos cuidadosamente em 2 mL de PBS para remoção das células não aderidas. Em seguida os discos que foram aleatoriamente separados para análise da fase de adesão e foram colocados em placas estéreis para realizar raspagem durante 1 minuto com uma ponta de pipeta estéril. Os discos contendo os discos com os microorganismos que foram analisados os biofilmes de 48h, foram imersos em poços contendo 2 mL de TYE + 1% sacarose fresco após os 90min de adesão. As placas foram colocadas em agitador orbital a 37°C, 75RPM por 24 horas e uma nova troca de meio TYE + 1% sacarose foi realizada. As placas foram mantidas em agitador orbital até completar as 48hr para a obtenção dos biofilmes maduros.

Para a avaliação da fase de adesão e da formação de biofilme em 48 horas, os discos foram lavados em placas estéreis contendo 2 mL de PBS e imersos em nova placa de 12 poços estéril, a raspagem com ajuda de uma ponta de pipeta estéril durante 1 minuto foi realizada em meio PBS. Os biofilmes obtidos foram transferidos para tubos eppendorf para a realização de uma diluição seriada. As diluições foram semeadas em placas com meios de cultura ágar SDA+Cloranfenicol, e foram incubadas por 48 horas a 37°, sendo em seguida o número de UFC quantificado para as duas etapas. Os corpos-de-prova com biofilmes maduro 48hrs foram processados do mesmo modo descrito para os ensaios de adesão.

Os espécimes foram distribuídos aleatoriamente para os ensaios microbiológicos, ou seja, contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL), avaliação do metabolismo celular (ensaio XTT) e para os períodos de inoculação. Esses dois ensaios foram realizados em triplicata, em cinco experimentos em ocasiões distintas. A análise por microscopia confocal de varredura a laser foi realizada em duplicata apenas na quinta ocasião.

Contagem de Colônias

Após 48 horas de incubação a 37°C, as placas de SDA+Cloranfenicol foram submetidas à contagem de colônias. O número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) foi calculado. Para esse cálculo, foi utilizada a fórmula a seguir:

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

Nessa fórmula, n equivale ao valor absoluto da diluição (1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7), e q equivale à quantidade, em mL, pipetada para cada diluição quando nas sementeiras das placas. Os valores de UFC/mL foram obtidos em notação científica e foi calculada então a média aritmética dos valores das triplicatas de cada amostra. Em seguida, os dados obtidos para as contagens foram transformados de acordo com a fórmula $\log (UFC+1)/mL$.

Avaliação do Metabolismo Celular (Ensaio de XTT)

Para a análise do metabolismo celular, o XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl) - 5 - [(phenylamino) carbonyl] - 2H - tetrazolium hydroxide), foi preparado a uma concentração de 0,5g/L, utilizando-se PBS. Esta solução foi mantida -20°C até o momento do experimento. A solução de menadiona 10mM foi preparada com acetona. A solução do XTT foi preparada com 1 µL de menadiona adicionada a 10 mL de XTT, em uma concentração final de 1 µM, imediatamente antes de cada experimento.

Após a fase de adesão e formação de biofilme de 48 horas, os discos destinados ao ensaio de XTT de cada condição experimental foram transferidos para placas de cultura estéreis com 24 poços contendo 500 µL da solução XTT. As placas foram incubadas no escuro a 37°C, 75 RPM por 3 horas. Em uma nova placa de 96 poços, foi adicionada em duplicata 100 µl do produto de degradação XTT (sobrenadante) e foi posicionada no leitor de Elisa para leitura da absorbância utilizando-se o filtro 492 nm.

Análise por Microscopia de Varredura Confocal a Laser

A análise de viabilidade celular de *C. albicans* foi realizada usando microscopia confocal de varredura a laser (Lsm 800 com Airyscan com detector GaAsp, Carls Zeiss, Alemanha). Após as fases de adesão e biofilme de 48 horas, as amostras aleatoriamente designadas para este ensaio foram lavadas uma vez em

PBS e coradas com o Live/Dead™ BacLight™ Bacterial Viability Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) contendo SYTO-9 e iodeto de propídio (excitação/emissão a 488/400–540 nm e 488/600–700 nm, respectivamente). Para todas as capturas de imagem, 3% de potência e 60 µm de abertura de orifício foram usados. Os discos de resina foram imersos em 1,5 mL da solução corante em placas estéreis de 12 poços e incubados no escuro por 45 minutos, conforme instruções do fabricante. Após o período de incubação, os espécimes foram lavados uma vez em PBS para serem observados em microscopia confocal de varredura a laser. A medição da fluorescência foi realizada capturando cinco imagens em campos aleatórios por disco, totalizando dez imagens por grupo. A espessura do biofilme foi determinada com leituras z-stack a 1 µm⁴.

Análise Estatística

Todos os dados coletados foram verificados quanto aos pressupostos de normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Levene). A análise dos dados de rugosidade de superfície (Ra) foi realizada por meio do teste de Kruskal-Wallis seguido do teste post-hoc de Bonferroni, enquanto a energia livre de superfície (erg cm⁻²) foi analisada por meio de ANOVA one-way e Tukey HSD. Para o ensaio microbiológico, os valores de UFC/mL foram convertidos em log₁₀ para análise estatística. Os dados de UFC/mL log₁₀ e XTT foram analisados por ANOVA two-way (fatores de variação: tipo de resina e período de incubação). O pós-teste Tukey HSD foi usado para UFC/mL log₁₀ e os dados de Bonferroni para o ensaio XTT. Uma análise descritiva, com intervalos de confiança, foi realizada para fluorescência live/dead e os dados de espessura de biofilme obtidos por microscopia confocal de varredura a laser. O programa SPSS for Windows (versão 15.0; SPSS Inc.) foi utilizado para análise estatística (α=0,05).

ARTIGO 2

Este estudo *in vitro* avaliou a perda de peso e a rugosidade de superfície de três materiais de base de próteses submetidos à escovação simulada: NextDent Denture 3D+ (NextDent B.V., Soesterberg, Holanda) , Cosmos Denture (Yller Digital, Pelotas, RS, Brasil) e Lucitone 550 (Dentsply Ind. e Com. Ltda, Petrópolis, RJ, Brasil) (grupo controle). Duas resinas de dentes artificiais passaram pela mesma avaliação: Cosmos TEMP (Yller Digital, Pelotas, RS, Brasil) e a resina autopolimerizável Duralay

62 (Reliance Dental Manufacturing, Alsip, IL, EUA) (controle). O Duralay 62 foi escolhido como material do grupo controle para dente artificial devido ao seu uso comum para a fabricação de restaurações provisórias.

Corpos-de-Prova Lucitone 550 – Grupo Controle de Base Protética

Os corpos-de-prova foram confeccionados através da mesma metodologia utilizada no Artigo 1. No entanto, foi utilizado uma matriz metálica de 40 mm de comprimento, 10 mm de largura e 2 mm de profundidade, a qual foi estabelecido como o tamanho padrão dos corpos-de-prova (Figura B5). Esta medida é adequada aos compartimentos retangulares encontrados na máquina de escovação.

Figura B5 - Matriz metálica utilizada para o posicionamento dos corpos-de-prova a máquina de escovação



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Corpos-de-Prova Duralay 62 – Grupo Controle de Dente Artificial

A mesma matriz metálica utilizada anteriormente foi posicionada centralmente sobre uma placa de vidro grossa, retangular. A proporção e manipulação pó/líquido da resina acrílica Duralay 62 foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante, sendo que o pó foi pesado em uma balança de precisão eletrônica e o líquido mensurado com o auxílio de uma pipeta. Em seguida, o material foi inserido no interior da matriz metálica com mínimo excesso, e outra placa de vidro grossa foi posicionada sobre a matriz metálica. O conjunto placas de vidro/ matriz foi

imediatamente levado à prensa hidráulica, onde foi aguardado o período de polimerização do material, de acordo do fabricante.

Após completa polimerização, os corpos-de-prova foram removidos do interior da matriz metálica e submetidos ao acabamento e polimento.

Resinas para impressão 3D de base protética Cosmos Denture, NextDent Denture 3D+ e de dente artificial Cosmos TEMP

Os corpos-de-prova dos grupos experimentais Cosmos Denture, NextDent Denture 3D+ e Cosmos TEMP foram obtidos por meio de técnica similar ao Artigo 1, inclusive pelo mesmo modelo de impressora e softwares. A única diferença foi a adição da avaliação da resina utilizada para confecção de dentes artificiais e coroas provisórias.

Para todos os grupos, os espécimes foram acabados com brocas de carboneto e polidos com lixas de gramatura de 220, 400 e 600. Um paquímetro digital foi usado para controlar as dimensões finais dos espécimes¹. Após o polimento, todos os espécimes foram sonicados em água deionizada com 1% de detergente (1 minuto), secos com papel absorvente e armazenados em água destilada a 37°C por 50±2 horas¹.

Avaliação da Resistência ao Desgaste

Para a avaliação da resistência ao desgaste, foi utilizada a máquina de ensaio de escovação⁵.

A máquina de escovação possui duas bases horizontais metálicas removíveis com três compartimentos de formato retangular onde os corpos-de-prova foram posicionados durante os ensaios de escovação. Na parte central da máquina, encontra-se o motor unido a dois braços metálicos que acoplam 6 dispositivos metálicos, os quais permitem o encaixe das partes ativas das escovas dentais.

Neste estudo, para cada ensaio, foram realizados 8.900, 17.800, 53.400 e 89.000 ciclos de escovação, simulando períodos de 6 meses (T1), 1 ano (T2), 3 anos (T3) e 5 anos (T4), respectivamente⁶. Os espécimes foram pesados em balança eletrônica de precisão com cinco casas antes da vírgula para cálculo da perda de massa (g) e mensurados quanto a rugosidade de superfície dos espécimes nos parâmetros de amplitude média aritmética (Ra) (µm) e altura de dez pontos (Rz) (µm)⁷ em um rugosímetro digital portátil modelo (SJ-400, Mitutoyo Corporation, Japão) com

precisão de 0,01 μm e velocidade de ponta ativa de 0,5mm/s. As leituras foram realizadas antes da escovação (T0) e após cada período de simulação de escovação T1, T2, T3 e T4.

Para a realização dos ciclos de escovação, as bases horizontais removíveis da máquina foram preenchidas com água destilada/dentífrico (Colgate Total 12, Colgate-Palmolive, São Bernardo do Campo, Brasil) na proporção de 1:1 em massa, em quantidade suficiente para imergir completamente os espécimes (200g).

Para todos os ensaios, foi estabelecida uma mesma carga de escovação (200g)^{6,8,9} e 60 rpm como frequência. Foram utilizadas escovas Oral-B Indicator 35 (Oral-B, Procter & Gamble, Cincinnati, Ohio, USA), com cerdas macias^{6,8,9}, as quais foram devidamente adaptadas à máquina de escovação. Foi estabelecido que cada escova, bem como a solução de escovação, seria substituída a cada 17.800 ciclos, o que corresponde a um ano de utilização⁶.

Após a realização dos testes de escovação, os espécimes foram removidos da solução correspondente, limpos por um minuto em ultrassom contendo água deionizada com 1% de detergente, e secos com papel absorvente para as leituras de perda de massa (g) e rugosidade de superfície $R_a(\mu\text{m})$ e $R_z(\mu\text{m})$.

Análise Estatística

Para cada variável dependente (ou seja, perda de peso e rugosidade de superfície R_a e R_z), os 3 grupos de bases de prótese (Lucitone 550, Cosmos Denture e NextDent Denture 3D+) foram comparados pelo teste de Estimação de Equações Generalizadas. Os períodos de simulação da escovação (T1 a T4) foram inseridos como um segundo fator pareado. Comparações múltiplas foram realizadas usando o pós-teste de Bonferroni para identificar diferenças dentro de cada grupo, ciclo de escovação ou níveis de interação. Os mesmos testes foram repetidos para as 2 resinas de dente artificial (Duralay 62 e Cosmos TEMP). A análise estatística foi realizada usando SPSS para Windows (versão 15.0; SPSS Inc.), com $\alpha=0,05$. Os dados descritivos de média e desvio padrão mostram a diferença de acordo com as medidas de peso (g) e rugosidade R_a e R_z (μm) entre os períodos T1-T0, T2-T0, T3-T0 e T4-T0.

Referências

1. International Organization for Standardization. ISO 1567: denture base polymers. 2nd ed. Geneva: The Organization; 1998.
2. Janssen D, de Parma R, Verlaak S, Heremans P, Dehaen W. Static solvent contact angle measurements, surface free energy and wettability determination of various self-assembled monolayers on silicon dioxide. *Thin Solid Films*. 2006; 515: 1433–8.
3. de Oliveira Junior NM, Mendoza Marin DO, Leite ARP, Pero AC, Klein MI, Compagnoni MA. Influence of the use of complete denture adhesives on microbial adhesion and biofilm formation by single- and mixed-species. *PloS one*. 2018; 13(10): e0203951.
4. Nunes TSBS, Rosa LM, Vega-Chacón Y, Mima EG de O. Fungistatic action of n-acetylcysteine on *Candida albicans* biofilms and its interaction with antifungal agents. *Microorganisms*. 2020; 8(7): 980.
5. Machado AL, Giampaolo ET, Vergani CE, Pavarina AC, Salles D da SL, Jorge JH. Weight loss and changes in surface roughness of denture base and relined materials after simulated toothbrushing in vitro. *Gerodontology*. 2012; 29(2): e121-7.
6. Pisani MX, Bruhn JP, Paranhos HFO, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Panzeri H. Evaluation of the abrasiveness of dentifrices for complete dentures. *J Prosthodont*. 2010; 19(5): 369–73.
7. Gadelmawla ES, Koura MM, Maksoud TMA, Elewa IM, Soliman HH. Roughness parameters. *J Mater Process Technol*. 2002; 123(1):133–45.
8. Policastro VB, Giro G, Leite ARP, Mendoza-Marin DO, Paleari AG, Compagnoni MA et al. In vitro assessment of the abrasion resistance of two types of artificial teeth submitted to brushing. *J Prosthodont*. 2016; 25(6): 485–8.
9. Panzeri H, Lara EHG, Paranhos H de FO, Lovato da Silva CH, de Souza RF, de Souza Gugelmin MCM et al. In vitro and clinical evaluation of specific dentifrices for complete denture hygiene. *Gerodontology*. 2009; 26(1): 26–33.

ANEXO A – COMPROVANTE DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FOAR-UNESP

Portal do Governo Brasileiro

Plataforma Brasil

[principal](#) [sair](#)

[Público](#) [Pesquisador](#) [CEP](#) [Alterar Meus Dados](#)

Cadastros

Ana Carolina Pero - Pesquisador | V3.2.51

Sua sessão expira em: 30min 24

DETALHAR NOTIFICAÇÃO

DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Propriedades microbiológicas de materiais para base protética utilizados na técnica de impressão 3D
 Pesquisador Responsável: Ana Carolina Pero
 Área Temática:
 Versão: 3
 CAAE: 26410519.0.0000.5416
 Submetido em: 23/04/2020
 Instituição Proponente: UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO
 Situação da Versão do Projeto: Aprovado
 Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável
 Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Comprovante de Recepção:  PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_1476709

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Final
 Detalhe:
 Justificativa:
 Data do Envio: 19/04/2021
 Situação da Notificação: Aprovado

DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA





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

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 14 de fevereiro de 2023

Marcela Dantas Dias da Silva