



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



Thaís de Sousa Santana

Efeito da incorporação de nanocristais de celulose em uma resina acrílica para base protética sobre propriedades superficiais e formação de biofilmes simples e misto de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* sensível a metilina (MSSA)

Araraquara

2021



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



Thaís de Sousa Santana

Efeito da incorporação de nanocristais de celulose em uma resina acrílica para base protética sobre propriedades superficiais e formação de biofilmes simples e misto de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina (MSSA)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Araraquara - Unesp, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof^a Dr^a Ana Carolina Pero

Araraquara

2021

S232e	<p>Santana, Thais de Sousa</p> <p>Efeito da incorporação de nanocristais de celulose em uma resina acrílica para base protética sobre propriedades superficiais e formação de biofilmes simples e misto de <i>Candida albicans</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> sensível a metilina (MSSA) / Thais de Sousa Santana. -- Araraquara, 2021</p> <p>73 p. : il., tabs.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara</p> <p>Orientadora: Ana Carolina Pero</p> <p>1. Resina acrílica. 2. Nanopartículas. 3. Biofilme. I. Título.</p>
-------	---

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Thaís de Sousa Santana

Efeito da incorporação de nanocristais de celulose em uma resina acrílica para base protética sobre propriedades superficiais e formação de biofilmes simples e misto de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina (MSSA)

Comissão julgadora

Presidente e orientador: Prof^a Dr^a Ana Carolina Pero

2º Examinador Prof^a Dr^a Carina Toda

3º Examinador Prof^a Dr^a Janaína Habib Jorge

Araraquara, 27 de Maio de 2021.

Thaís de Sousa Santana

DADOS CURRICULARES

Nascimento: 27/07/1993 – São Gotardo - MG

Filiação: Paulo Roberto Santana e Selma Sueli Sousa Santana

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2014 – 2018: Curso de Graduação – Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOAr - UNESP)

2019 – 2021: Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral – Curso de Mestrado – FOAr – UNESP

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à **Deus**. Minha base, aquele que me sustenta em todos os momentos. Agradeço à Ele por direcionar a minha vida e por ter permitido a realização de tantos objetivos. Ele é tudo em minha vida e minha força para superar todas as dificuldades vem Dele.

Aos meus pais, **Selma e Paulo**. Sou eternamente grata por todo amor, dedicação e paciência comigo. Vocês são minha fonte de sabedoria, força, bons conselhos e, principalmente, meus melhores amigos. Sem vocês nada do que aconteceu seria possível. Vocês são minha inspiração e tudo o que sou devo à vocês! Sou grata pelo apoio e por tudo o que fizeram e fazem por mim.

À minha irmã, **Pollyana**, minha amiga, companheira em todos os momentos, meu exemplo de persistência. Sou grata por todo o apoio e incentivo que tem me dado. Tenho uma imensa gratidão por estar sempre ao meu lado!

Ao meu noivo **Matheus**, gratidão por toda a compreensão, apoio e amor que tem me dado. Você foi e é minha calma em meio ao caos. Meu presente de Deus!

À minha querida Orientadora, **Profª Drª Ana Carolina**. Sou grata por tudo o que fez por mim! Por ter me orientado desde o início da Graduação, foram 7 anos de muito aprendizado e não somente profissional, pois o modo de exercer seu dom de ensinar revela também a pessoa maravilhosa que ela é. Sua dedicação e boa vontade em transmitir conhecimento são inspiradoras, Carol!

À **Profª Drª Maria Isabel**, minha gratidão por toda a sua ajuda e disponibilidade em me ensinar! Agradeço por tanta boa vontade e paciência em me guiar no universo da microbiologia. E por ter aceitado me ajudar, mesmo sabendo que eu era totalmente inexperiente. Muito obrigada por tudo, você é uma pessoa sensacional!

A todos os alunos e professores que trabalharam comigo no **Laboratório de Microbiologia**, agradeço a ajuda e companheirismo. Especialmente a **Bruna Pimentel**, que, por muitas vezes, me ensinou com total paciência e boa vontade.

Ao **Grupo de Pesquisa** da Prótese Total, especialmente à **Profª Drª Andressa**, agradeço por toda a ajuda e paciência comigo!

Aos meus queridos amigos **Marlon, Mariana e Su**. A amizade de vocês foi fundamental para que o fardo do Mestrado fosse mais leve de carregar. Minha gratidão por compartilharem tantos momentos juntos. Vocês são presentes que a FOAr me deu e que eu vou levar para a vida toda.

Agradeço também a **todos os funcionários** dessa Faculdade, cada um de vocês foi muito importante para meu crescimento intelectual e pessoal durante esses anos. Gratidão aos nossos Diretores Prof. Dr. **Edinho** e Prof^a Dr^a **Patrícia** por cuidarem de nossa Faculdade com tanto amor e dedicação. Aos Professores, agradeço por desempenharem com dedicação as aulas ministradas, sendo elas fundamentais para minha formação. Aos Técnicos, Secretárias, Bibliotecárias, Funcionários da segurança, da limpeza, e aos demais funcionários, meus sinceros agradecimentos.

À CAPES:

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

À

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2019/07491-6) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

Santana TS. Efeito da incorporação de nanocristais de celulose em uma resina acrílica para base protética sobre propriedades superficiais e formação de biofilmes simples e misto de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* sensível a metilicina (MSSA) [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

RESUMO

A utilização de biopolímeros de fontes renováveis como agentes de reforço nanométricos pode representar uma importante inovação em materiais odontológicos. O objetivo desse estudo foi avaliar a adesão e formação de biofilmes simples e mistos de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* sensível à metilicina (MSSA) e a viabilidade dos micro-organismos na superfície de uma resina acrílica para base de prótese, após a incorporação de nanocristais de celulose (NC). Nanocristais de celulose (NC) isolados a partir de polpa de madeira (*Eucalyptus Urograndis*) foram incorporados em uma resina acrílica para base de prótese (Onda-Cryl® - OC, ativada por energia de micro-ondas). Discos de resina acrílica (15 x 3 mm) foram obtidos (N=240) em cada condição experimental (grupos 0%NC - controle e 0,75%NC). Previamente aos testes de adesão e formação de biofilmes, foi mensurada a rugosidade média da superfície dos discos (n=120) em rugosímetro digital (Ra, μm) e a energia livre de superfície (ELS) a partir de medidas de ângulo de contato (n=120), obtidas por meio de um goniômetro conectado a um sistema computadorizado. Foi realizada a formação de biofilmes a partir dos inóculos de *C. albicans* e *S. aureus* sobre os discos de resina, os quais foram incubados a 37°C por 90 minutos e 48h. Após ambos os períodos, foram feitas as análises de: metabolismo celular pelo ensaio do XTT (n=9); avaliação da atividade antimicrobiana através da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/ml) (n=9) e análise por microscopia confocal a laser (n=2). Todas as análises foram realizadas em triplicata em 3 ocasiões distintas. Os dados foram tabulados e submetidos aos testes T de Student e teste não paramétrico U de Mann-Whitney, de acordo com a aderência à normalidade, e foi empregado um nível de significância de 5%. A incorporação de NC (0,75%) não exerceu influência sobre os resultados de rugosidade e ELS para a resina OC ($P>0,05$). Também foi observado, (método XTT e log UFC/mL), que não houve diferença significativa entre os grupos para a adesão e formação de biofilme dos diferentes micro-organismos analisados. A microscopia confocal mostrou marcações que evidenciam a viabilidade dos micro-organismos e estas foram semelhantes para ambos os grupos (Controle e NC 0,75%). Dessa forma, conclui-se que a incorporação de 0,75% de NC não exerceu influência sobre as propriedades físicas (rugosidade e energia livre de superfície) e microbiológicas (adesão e formação de biofilme/microscopia confocal) da resina acrílica para base protética.

Palavras-chave: Resina acrílica. Nanopartículas. Biofilme.

Santana TS. Effect of incorporation of cellulose nanocrystals in a denture base resin on superficial properties and simple and mixed *Candida albicans* and Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) biofilms [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

ABSTRACT

The use of biopolymers from renewable sources as nanometric reinforcing agents can represent an important innovation in dental materials. The aim of this study was evaluate the simple and mixed biofilm formation of *Candida albicans* and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) and microorganisms' viability on the surface of acrylic resin for denture base, after the incorporation of cellulose nanocrystals (CN). Cellulose nanocrystals (NC) isolated from wood pulp (*Eucalyptus Urograndis*) were incorporated into acrylic resin for denture base (Onda-Cryl® - OC, activated by microwave energy). Disc-shaped specimens (15 x 3 mm) were obtained (N=240) for each condition (groups 0%CN - control, and 0.75%CN) Prior to the adhesion and biofilm formation tests, the surface roughness was measured (n=120) in a digital rugosimeter (Ra, μm) and the surface free energy (SFE) was measured from contact angle measurements (n=120), obtained by means of a goniometer connected to a computerized system. The formation of biofilms was performed from the inoculation of *C. albicans* and *S. aureus* on the acrylic resin discs, which were incubated at 37°C for 90 minutes and 48h. After both periods, the analysis of cell metabolism test (XTT) was performed (n=9); evaluation of antimicrobial activity by counting colony-forming units (CFU/ml) (n=9) and analysis by confocal laser microscopy (n=2). All analyses were performed in triplicate on 3 distinct occasions. Data were tabulated and submitted to Student t test and non-parametric Mann-Whitney U test, according to adherence to normality, at 5% of significance level. The incorporation of NCs (0.75%) did not influence the results of the surface roughness and surface free energy (SFE) tests for OC acrylic resin ($P>0.05$). It was also observed, (XTT method and CFU/mL log), that there was no significant difference between the groups for the adhesion and formation of biofilm of the different microorganisms analyzed. The confocal laser microscopy exhibited images that show the viability of the microorganisms and these were similar for both groups (control and NC 0.75%). Thus, it could be concluded that the incorporation of 0.75% of NC did not influence the physical (roughness and free surface energy) and microbiological (adhesion and biofilm formation/confocal microscopy) properties of the acrylic resin for denture base.

Keywords: Acrylic resin. Nanoparticles. Biofilm.

LISTA DE ABREVIações

- NC: Nanocristais de celulose
- OC: Onda-Cryl
- ELS: Energia Livre de superfície
- UFC: Unidades formadoras de colônias
- GPa: Gigapascal
- PMMA: Polimetilmetacrilato
- MMA: Metilmetacrilato
- Fapesp: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- EP: estomatite protética
- PPR: Próteses parciais removíveis
- CHX: Clorexidina
- CIM: concentração inibitória mínima
- CBMs: concentrações bactericidas mínimas
- CFM: concentração fungicida mínima
- FICI: Índice de concentração inibitória fracionada
- MET: microscópio eletrônico de transmissão
- MEV: microscópio eletrônico de varredura
- FTIR: espectroscopia de infravermelho por transformador de Fourier
- FV: fibra de vidro
- RAA: resina acrílica autopolimerizável
- RAC: resina acrílica de polimerização térmica convencional
- RAR: resina acrílica de polimerização térmica de alta resistência
- RF-LP: resistência à flexão no limite proporcional
- FVC: fibra de vidro unidirecional contínua
- Nps: Nanopartículas
- AgNPs: nanopartículas de prata
- nano-ZrO₂: nanopartículas de óxido de zircônio
- NFC: nanofibra de celulose
- CMC: celulose microcristalina
- CIVMR: cimentos de ionômero de vidro modificados por resina
- NCB: nanocristais de celulose bacteriana
- SDA: Sabouraud Dextrose

- BHI: Brain heart infusion
- TYE: Tryptone and Yeast Extract
- DO: densidade ótica
- UV: Ultravioleta
- PBS: Phosphate Buffered saline
- PI: Iodeto de propídeo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1 Considerações Sobre o Uso de Próteses – Material de Confeção e Implicações Clínicas.....	14
2.2 Incorporação de Agentes de Reforço em Resinas PMMA.....	20
3 PROPOSIÇÃO	31
3.1 Objetivo Geral.....	31
3.2 Objetivos Específicos.....	31
4 MATERIAL E MÉTODO	32
4.1 Material	32
4.2 Método	32
4.2.1 Obtenção dos nanocristais de celulose (NC).....	33
4.2.2 Trocas de solventes.....	33
4.2.3 Grupos experimentais.....	33
4.2.4 Confeção dos corpos de prova.....	34
4.2.5 Avaliação da rugosidade.....	36
4.2.6 Avaliação da energia livre de superfície.....	36
4.2.7 Avaliação da adesão e formação de biofilmes na resina acrílica após a incorporação dos NC.....	37
5 RESULTADOS.....	43
5.1 Rugosidade.....	43
5.2 Energia Livre de Superfície (ELS).....	44
5.3 Adesão do Biofilme Multiespécies.....	44
5.4 Formação do Biofilme Multiespécies.....	46
5.5 Análise por Microscopia Confocal.....	47
6 DISCUSSÃO.....	49
7 CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS	54
APÊNDICE.....	64
ANEXO.....	68

1 INTRODUÇÃO

O grande interesse em materiais sustentáveis e ambientalmente corretos tem incentivado às pesquisas acadêmicas e industriais a desenvolver biopolímeros para aplicações alternativas às quais polímeros oriundos de fontes fósseis são tradicionalmente empregados¹. Para este fim, muitos biopolímeros têm sido modificados visando uma adequação em termos de propriedades desejadas.

Os nanocristais de celulose (NC) são materiais com características únicas derivados da celulose, a qual é o biopolímero mais abundante na Terra, biodegradável oriundo de fontes renováveis vegetais e animais². Esses materiais têm recebido significativo interesse devido às suas propriedades mecânicas, óticas, químicas e reológicas, tais como elevada área superficial, elevado módulo de elasticidade (aproximadamente 150 GPa), habilidade de atuar como reforço significativo empregando baixos níveis de carga, baixa densidade, natureza não abrasiva, além de biocompatibilidade¹⁻¹¹ e propriedades antimicrobianas^{12,13}.

Os NC são partículas de celulose em formato de agulha, com dimensão equivalente ou inferior a 100 nm, de natureza altamente cristalina⁸. Os NC são obtidos a partir da hidrólise ácida das fibras de celulose que são biodegradáveis e de natureza renovável, com caráter hidrofílico. Há registros¹⁴ na literatura consultada sobre a incorporação de NC em matriz de Polimetilmetacrilato (PMMA), com o objetivo de reforçar essa matriz para aplicação em dispositivos óticos, devido às excelentes propriedades de transparência e baixa densidade deste polímero. No estudo de Liu et al.¹⁴ (2010), a incorporação de NC ao PMMA produziu compósitos com boa transparência e com melhores propriedades mecânicas em relação à matriz de PMMA puro.

Estudos para avaliação do desempenho da incorporação de NC em matrizes poliméricas, especificamente resinas acrílicas para uso odontológico, podem representar uma importante inovação para os materiais odontológicos. Estudos têm demonstrado melhora nas propriedades de resinas compostas e cimentos de ionômero de vidro após incorporação de NC¹⁵⁻¹⁸. Entretanto, a avaliação do efeito da incorporação de NC em resinas acrílicas à base de PMMA ainda é limitada. Até o momento, poucos estudos demonstraram¹⁹ que o uso de NC para reforço de uma

resina para base protética (PMMA) para impressão 3D tem potencial para futuras aplicações clínicas.

A base protética de resina acrílica é considerada um ambiente propício para proliferação e sobrevivência de micro-organismos bucais e formação de biofilme microbiano²¹, devido à facilidade de células microbianas se aderirem às rugosidades e poros superficiais presentes nessa base protética. O crescimento microbiano na superfície protética ocorre a partir da adesão de espécies de micro-organismos, às superfícies, como prótese e mucosa oral, induzindo a uma resposta inflamatória crônica na mucosa bucal, denominada estomatite protética²²⁻²⁵.

A estomatite protética, caracterizada pela presença de área eritematosa na mucosa que mantém contato com a prótese, é considerada a lesão bucal mais comumente observada e afeta de 24-60% dos usuários de próteses removíveis, totais ou parciais²³⁻²⁴. Estudos prévios concluíram que os micro-organismos *Candida albicans*, *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus* são os mais prevalentes tanto na mucosa como na parte interna das próteses de pacientes²⁶⁻²⁸.

Esses micro-organismos têm a capacidade de se aglutinar em estruturas complexas, formando biofilmes mistos, caracterizados por diversas formas celulares microbianas aderidas em um substrato, e envoltas por uma matriz de polímeros extracelulares²⁹⁻³¹.

A *C.albicans*, um fungo comensal, é a espécie mais prevalente nas candidoses bucais³². Um dos fatores que pode ser atribuído à sua virulência é a capacidade de interagir com outros micro-organismos no meio bucal³³. O micro-organismo *S.aureus*, uma bactéria gram-positiva também bastante prevalente nas candidoses bucais, tem especial relevância devido à sua elevada virulência e capacidade de desenvolver resistência às terapias medicamentosas³⁴. De acordo com estudos prévios, a interação de *C.albicans* e *S.aureus* em infecções polimicrobianas aumenta a severidade das doenças³⁵, como a estomatite protética³⁶, além de aumentar o risco de desenvolvimento de infecções sistêmicas, de difícil tratamento³⁷.

Embora não sejam totalmente conhecidos, os mecanismos de adesão de micro-organismos à superfície da prótese estão relacionados com as propriedades dessa superfície, como rugosidade e interações eletrostáticas representadas por forças hidrofóbicas^{28,38-40}. Estudos prévios observaram que a retenção de micro-organismos ocorre mais rapidamente em superfícies rugosas por apresentarem maior área de contato e também por dificultarem a ação mecânica de limpeza^{21,41}. Em

relação à hidrofobicidade, alguns estudos demonstraram que quanto mais hidrofóbica a superfície, maior a adesão de *Candida* spp. por unidade de área^{40,42}, enquanto em outro estudo²⁸ foi demonstrado que a diminuição do ângulo de contato implicou no aumento de adesão de *C.albicans* e, por outro lado, reduziu a adesão de *Candida tropicalis*.

O estudo da incorporação de NC em resinas acrílicas para base protética e para reembasamento têm sido realizados com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) em vigência (Auxílio à Pesquisa Regular 2017/26512-9) por nosso grupo de pesquisa coordenado pela Prof^a. Dra. Ana Carolina Pero. Os resultados até o momento obtidos demonstraram que a incorporação de NC nas concentrações de 0,75% e 1% na resina acrílica Onda-Cryl®, ativada por meio de micro-ondas, produziu um significativo aumento na dureza superficial desta resina, reduziu a resistência à flexão, porém dentro do limite aceito (65 MPa) e não foi capaz de alterar a cor em níveis considerados clinicamente inaceitáveis. Para complementação desses estudos, considerou-se oportuno avaliar o efeito da incorporação de NC nesta resina sobre outras propriedades de superfície e a formação de biofilmes.

A hipótese do nosso projeto é que a incorporação de NC em uma resina acrílica de uso odontológico modificaria suas propriedades superficiais tais como a sua energia livre de superfície e rugosidade, possivelmente influenciando na adesão e formação de biofilme sobre esse material.

A hipótese nula testada no presente estudo foi que a adesão e formação de biofilme e a viabilidade dos micro-organismos sobre a superfície da resina acrílica não seriam afetadas pela incorporação de NC. Caso esta hipótese seja rejeitada, o presente estudo tem potencial para apresentar como alternativa o desenvolvimento de resinas acrílicas para base protética reforçadas a partir de biomassa residual vegetal, com propriedades de superfície capazes de reduzir a formação de biofilme em próteses odontológicas e, conseqüentemente, prevenir o desenvolvimento de patologias bucais em usuários de próteses. Assim, o projeto apresenta característica tecnológica, econômica e ambiental, além de poder gerar benefícios diretamente aos usuários de próteses totais ou parciais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Considerações Sobre o Uso de Próteses – Material de Confeção e Implicações Clínicas

O uso de próteses totais continua sendo um tratamento eficaz para pacientes edêntulos⁴³. O material mais comumente utilizado para a fabricação de bases protéticas desde a década de 1930 e ainda em uso é PMMA⁴⁴. Meng et al.⁴⁵ (2005) ressaltaram em seu estudo que um material ideal para base de prótese deve ter propriedades mecânicas e físicas adequadas, além de biocompatibilidade e estética.

O PMMA apresenta várias vantagens, incluindo baixo custo, biocompatibilidade, facilidade de processamento, estabilidade no ambiente oral e estética aceitável. No entanto, Alla et al.⁴⁶, mostraram, em 2015, que não é considerado um material ideal devido às suas propriedades físicas e mecânicas inferiores.

A resina acrílica (PMMA) possui características que favorecem o acúmulo, crescimento e colonização de biofilme em profundidade, como, por exemplo, suas irregularidades e sua porosidade. Chau et al.⁴⁷ (1995) demonstraram que as bactérias penetraram três tipos de resina acrílica após um curto período de tempo. Amostras de resina acrílica foram contaminadas com 4 tipos de bactérias (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, e *alfa:hemolytic Streptococcus pneumonia*) e foram colocadas em três soluções desinfetantes diferentes (Biocide®, Alcide LD®, Hipoclorito de sódio 0,525%), conforme orientação dos fabricantes. Após a diluição específica e o tempo de imersão, foram feitas culturas nas amostras de resina. O único desinfetante eficaz foi a solução de hipoclorito de sódio a 0,525% em uma imersão de 10 minutos. Ele desinfetou não somente as superfícies, mas também atingiu as bactérias que penetraram nas superfícies a uma profundidade de 3 mm.

Papadiochou, Polyzois⁴⁸ (2018) revisaram sistematicamente as evidências científicas recentes sobre as práticas de higiene das próteses removíveis quanto à eficácia, cor e estabilidade dimensional. Além disso, identificaram as atitudes e hábitos dos pacientes em relação à higiene das próteses. Para isso, três bases de dados eletrônicas (MEDLINE/PubMed, Scopus e Cochrane Library) foram triadas, na língua inglesa, entre janeiro de 1995 e dezembro de 2016. Uma busca manual complementar na lista de referências dos artigos identificados também foi realizada. Ensaio clínico

controlados (ECCs) envolvendo pacientes sem sinais clínicos de estomatite protética juntamente com objetivo abrangente de avaliar a eficácia das intervenções de higiene e seu impacto na cor da prótese e na estabilidade dimensional foram elegíveis para inclusão. Como resultado, foi possível observar que, após uma triagem completa de títulos/resumos/textos completos e consideração dos critérios de inclusão definidos, 21 ECCs examinaram a eficácia das abordagens de higiene, 3 avaliaram a estabilidade de cor de próteses totais submetidas a práticas de higiene, 2 examinaram a estabilidade dimensional de próteses totais após a desinfecção por micro-ondas e 30 estudos registraram as atitudes e hábitos dos pacientes em relação à higiene das próteses totais. Os autores concluíram que a aplicação combinada de diferentes intervenções de higiene, incluindo escovação ou ultrassom em conjunto com agentes químicos, leva a resultados mais eficazes (redução na porcentagem de biofilme da prótese e/ou número de unidades formadoras de colônias de micro-organismos). A estabilidade dimensional parece não ter sido alterada, mas o número de ensaios clínicos foi limitado. Concentrações críticas de soluções de limpeza junto com a duração de sua implementação influenciam a facilidade de manutenção das próteses em relação à estabilidade da cor. Os autores observaram que a escovação representa a prática de higiene mais comumente aplicada, enquanto as atitudes dos usuários de próteses não estão de acordo com as orientações recomendadas, considerando a frequência relatada das práticas de higiene e o desgaste contínuo das próteses. Isso ocorre, sobretudo, quando realizada por indivíduos idosos, que frequentemente apresentam comprometimento da destreza manual e acuidade visual fundamentais para uma limpeza adequada.

A principal implicação da limpeza e desinfecção deficiente das próteses removíveis e mucosa bucal é o desenvolvimento da estomatite protética (EP) nos usuários destes tipos de prótese. Ramage et al.⁴⁹, em 2004, consideraram a *Candida albicans* o principal agente etiológico na patogênese da estomatite protética (EP), patologia comumente encontrada em usuários de próteses removíveis, parciais ou totais. A EP também conhecida como candidíase eritematosa crônica, é um tipo de doença que afeta principalmente a mucosa palatina. Clinicamente a mucosa é apresentada com eritema local ou difuso e raramente, hiperplasia nodular/papilar⁵⁰. No ambiente bucal, os micro-organismos se organizam em forma de biofilmes, que podem ser definidos como comunidades microbianas de células aderidas à uma superfície e envoltas em uma matriz autoproduzida de substância polimérica

extracelular⁵¹. De acordo com Ramage et al.⁴⁹ (2004), essa matriz de biofilme é capaz de criar uma barreira física e atuar como reservatório de proteção para micro-organismos orais como *C. albicans*.

Emami et al.⁵² (2012) analisaram as evidências sobre a ocorrência de EP e potenciais fatores de risco em pacientes usuários de próteses parciais removíveis (PPR). Para isso, MEDLINE, EMBASE, o Cochrane Central Register of Controlled Trials e o Cochrane Database of Systematic Reviews foram pesquisados e complementados por pesquisa manual. As medidas de desfecho foram a presença de EP em pacientes com PPRs e avaliação dos fatores de risco associados. Foram incluídos todos os tipos de estudos experimentais e observacionais que investigam uma associação entre EP e o uso de PPRs. Os autores encontraram oito estudos que atenderam aos critérios de inclusão. A prevalência de EP em usuários de PPR variou de 1,1% a 36,7%. Os dados sobre os potenciais fatores de risco não foram consistentes. Além disso, eles mostram que apesar da heterogeneidade e da qualidade metodológica dos estudos incluídos, foi encontrada associação entre EP e o uso de PPRs. Foi concluído que há algumas evidências de que a presença de EP está associada ao uso de PPR, porém, devido a limitações metodológicas e desenhos transversais de estudos de pesquisa, nenhuma relação causa-efeito poderia ser inferida. Por isso, pesquisas futuras devem fornecer níveis mais elevados de evidência para confirmar a etiologia do EP em usuários de PPR.

Salerno et al.⁵³ (2011) mostraram em seu estudo que a *Candida albicans* é uma levedura dimórfica fortemente gram-positiva capaz de viver como micro-organismo comensal na cavidade oral de pessoas saudáveis. É a levedura isolada com maior frequência na cavidade oral. Dependendo dos fatores locais e sistêmicos relacionados às condições do hospedeiro, pode tornar-se virulenta levando à candidíase oral. Tem sido demonstrado que o uso de próteses removíveis é um fator predisponente ao aparecimento de patologias relacionadas à *C. albicans*. Foi possível observar que *C. albicans* não é apenas capaz de aderir às mucosas, mas também, às resinas acrílicas das próteses. Tanto a placa acumulada na prótese, quanto a higiene oral deficiente, contribuem para a virulência da *Candida spp*, levando à EP. Mesmo que assintomática, a EP deve ser tratada, pois pode atuar como reservatório para infecções mais extensas, incluindo o trato respiratório, desencadeando infecções generalizadas. Tanto na terapia, quanto na prevenção, o tratamento mais eficaz é a erradicação e controle da placa microbiana.

Chandra et al.⁵⁴ (2001) descreveram, de forma detalhada, a formação do biofilme de *C. albicans* em tiras de PMMA, material mais utilizado na confecção de bases protéticas. Os autores mostraram que a formação do biofilme ocorre em três fases distintas: 1) Precoce (0 a 11 horas); 2) Intermediária (12 a 30 horas) e 3) Maturação (38 a 72 horas). Inicialmente (0 a 2 horas), a maioria das células de *C. albicans* (leveduriformes) aderiram-se à superfície das tiras, posteriormente (3 a 4 horas), formando as micro-colônias. No final da fase 1 (11^a hora), as comunidades de *C. albicans* apresentavam-se como faixas grossas de crescimento fúngico, devido ao crescimento e agregação das colônias ao longo de áreas de irregularidades superficiais. O desenvolvimento da fase 2 foi caracterizado pelo surgimento de substância predominantemente não celular, assemelhando-se a uma “névoa” cobrindo as micro-colônias do fungo. Durante a fase 3, de maturação, houve um aumento na quantidade de substância polimérica extracelular deixando as comunidades de *C. albicans* completamente cobertas por essa substância. As comunidades fúngicas e o material extracelular no qual estão inseridos constituem o biofilme. Os autores concluíram que a formação de biofilme fúngico é um fenômeno complexo distinto da adesão. Além disso, puderam observar que o estudo de tais sistemas revelará a verdadeira natureza dos biofilmes fúngicos e sua biologia. Assim, a demonstração de características comuns do biofilme (fases distintas de desenvolvimento, arquitetura heterogênea e fenótipos de resistência a drogas) em diferentes táxons estende a implicação deste estudo além dos fungos para outras comunidades celulares organizadas. O impacto dessas informações é de suma importância para o desenvolvimento de antimicrobianos específicos.

De acordo com Monroy et al.⁵⁵, a bactéria *S. aureus* geralmente é isolada junto com *Candida albicans* em próteses dentárias de indivíduos com estomatite protética (EP). Em 2005, os autores determinaram a prevalência de *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans* na mucosa e na base de prótese de pacientes com e sem EP atrófica. Além disso, estudaram qual sua relação com outros potenciais fatores clínicos coexistentes. Para isso, uma coleta de saliva foi realizada, para medir seu pH, em 105 pacientes usuários de prótese total. Amostras de biofilme da mucosa e da prótese foram retiradas para o estudo microbiológico. Como resultado, os autores observaram que os pacientes tinham alta ingestão de carboidratos e que as doenças sistêmicas mais frequentes foram diabetes e hipertensão. Estomatite protética atrófica foi relatada em 50 pacientes e o pH médio

na saliva foi de 5,2. A presença de *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans* na mucosa e na prótese foi de 51,4%, 52,4% e 67,6%, respectivamente. *C. albicans* foi isolada em 66,7% da prótese, enquanto *S. aureus* e *S. mutans* foram isolados em 49,5% dessas mesmas próteses. *C. albicans* foi isolada em 86% dos pacientes com estomatite protética atrófica e *S. aureus* foram isolados em um percentual de 84% dos pacientes. O isolamento de *S. mutans* foi menos frequente, e foi observado em 16% das amostras orais desses pacientes. Os autores concluíram que *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans* frequentemente colonizam a mucosa oral de pacientes com próteses dentárias.

Pereira et al.⁵⁶ (2013), objetivaram em seu estudo, isolar, quantificar, identificar e comparar micro-organismos oportunistas (gêneros *Candida* e *Staphylococcus* e famílias *Enterobacteriaceae/ Pseudomonadaceae*) de superfícies protéticas, palato duro e bochechas de indivíduos usuários de próteses totais superiores com (50) e sem (50) Estomatite protética (EP). As cepas foram coletadas e identificadas por meio de testes fenotípicos, bioquímicos e moleculares. Os autores puderam observar que as contagens de micro-organismos foram significativamente maiores no grupo de indivíduos com EP ($p < 0,05$). *C. albicans* foi a espécie de levedura mais frequentemente isolada em ambos os grupos, seguida por *C. tropicalis* e *C. glabrata*. *S. aureus* e *S. epidermidis* foram as espécies de *Staphylococcus* mais frequentes em ambos os grupos. A associação entre *Candida spp.* e as bactérias isoladas neste estudo sugerem que esses micro-organismos podem desempenhar papéis importantes no estabelecimento e persistência da EP.

Em 2017, Kean et al.⁵⁷ investigaram os patógenos *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* no que diz respeito à intervenção antimicrobiana. Os autores caracterizaram a interação usando ensaios de biofilme e avaliaram o efeito do tratamento com miconazol usando ensaios *in vitro* e *in vivo*. Avaliaram também o impacto da matriz extracelular do biofilme nessas interações. A partir dos resultados desse estudo, foi possível observar que os micofilmes da *Candida albicans* apoiaram a adesão e colonização por *S. aureus* através de interações próximas com elementos de hifas, aumentando significativamente a formação de biofilme de *S. aureus* ao longo da maturação do biofilme. Ou seja, *Staphylococcus aureus* pode utilizar a arquitetura de biofilme de *Candida albicans* em sua vantagem. Além disso, foi demonstrado que a resistência ao miconazol em biofilmes de duas espécies é suportada por eDNA.

Todd, Peters⁵⁸ (2019) descreveram interações empregadas por comunidades polimicrobianas, enfatizando a relação entre o fungo *Candida albicans* e a bactéria *Staphylococcus aureus* na compreensão dos mecanismos que conduzem a resultados exacerbados durante a co-infecção. Os autores discutiram os mecanismos empregados por esses dois patógenos humanos durante o crescimento polimicrobiano, incluindo como eles estabelecem e persistem em biofilmes inter-reinos, toleram a terapia antimicrobiana, co-invadem o tecido do hospedeiro, exacerbam detecção de quorum e produção de toxina estafilocócica e eliciam sinergismo infeccioso. Os autores ressaltam que este estudo, juntamente dos outros sobre o mesmo tema, permitiram ao campo da microbiologia perscrutar além do paradigma monomicrobiano que Koch propôs um século antes e ajudaram a inaugurar uma nova fronteira, concluem que ainda há muito a aprender sobre esse par microbiano.

Estudos focados em aumentar as propriedades antimicrobianas de resinas acrílicas, com materiais incorporados, contra *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* têm sido realizados. Como exemplo, Zainal et al.⁵⁹, que em 2021 determinaram a eficácia terapêutica da alicina contra *Candida albicans* (*C. albicans*) e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), os agentes etiológicos comuns para estomatite protética (EP). Para a realização do estudo, a concentração inibitória mínima (CIM), as concentrações bactericidas mínimas (CBMs) e a concentração fungicida mínima (CFM) de alicina foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo seguido pelo método de microdiluição em xadrez para uma interação sinérgica entre alicina + nistatina e alicina + Clorexidina (CHX). O potencial da alicina para erradicar *C. albicans* e *S. aureus* nos biofilmes foram avaliados tratando o biofilme formado em resina acrílica autopolimerizada com alicina em uma concentração sub-CIM por 5 min. Um limpador de próteses totais comercial foi usado como um controle positivo. Os autores observaram que a alicina exibiu atividade antimicrobiana contra *C. albicans* (CIM: 8 µg / ml e CFM: 16 µg / ml) e *S. aureus* (CIM: 8 µg / ml e CBM: 8 µg / ml). Foi observada uma interação sinérgica entre alicina + nistatina e alicina + CHX (Índice de concentração inibitória fracionada - FICI ≤ 0,5). A alicina exibiu erradicação significativa de biofilme contra os biofilmes da *C. albicans* e *S. aureus*, com percentuais de 50,0% e 52,6%, respectivamente. Os resultados deste estudo sugerem uma possível aplicação da alicina no tratamento da infecção por *C. albicans* e *S. aureus* na EP.

2.2 Incorporação de Agentes de Reforço em Resinas PMMA

São diversos os estudos realizados com o objetivo de potencializar as propriedades do PMMA, utilizando diferentes métodos de polimerização e/ou incorporando agentes de reforço em sua composição⁶⁰. A adição de cargas e fibras ao PMMA é um método comumente utilizado para melhorar suas propriedades físicas e mecânicas⁶¹.

O reforço de uma resina para base protética, através da incorporação de fibra vegetal curta de rami foi avaliado por Xu et al.⁶², em 2013. Essas fibras foram selecionadas para investigar o efeito do comprimento da fibra e da fração de volume, nas propriedades de flexão da base protética reforçada com fibra de rami. As propriedades interfaciais entre a base da prótese (PMMA) e as fibras de rami foram avaliadas pelo teste de pull-out de fibra única. Em seguida, as fibras de rami picadas foram pré-agitadas com pó de PMMA por um misturador mecânico e, em seguida, misturadas com o líquido MMA para fabricar os compósitos. Dois fatores de influência crucial, fração de volume da fibra e comprimento da fibra, foram estudados para esclarecer seus efeitos nas propriedades de flexão dos compósitos. Os autores mostraram que a resina reforçada com fibra de rami curta apresentou módulo de flexão mais alto do que a resina pura, enquanto a resistência foi reduzida devido à fraca adesão interfacial. Os autores concluíram que o potencial das fibras vegetais como agentes de reforço para base de prótese deve ser investigado mais detalhadamente, fortalecendo a interface entre a celulose e a resina para base protética.

Yu et al.⁶³ (2014) avaliaram o reforço da resina para base protética (PMMA) com nanotubos de ZrO₂. As nanopartículas de ZrO₂ e nanotubos silanizados de ZrO₂ também foram investigados para fins comparativos. A morfologia dos nanotubos de ZrO₂ e as superfícies de fratura do polímero foram observadas por microscópio eletrônico de varredura (MEV) e por microscópio eletrônico de transmissão (MET). A estrutura cristalina deles foi caracterizada por difração de raios X e o efeito do tratamento de superfície foi investigado por espectroscopia de infravermelho por transformador de Fourier (FTIR). A resistência a flexão foi testada em uma máquina de ensaios universal. Os resultados dos testes mostraram que os nanotubos de ZrO₂ não tratados conferiram o melhor efeito de reforço. Os autores observaram que

nanotubos de ZrO_2 , com superfície tratada por um reagente de acoplamento de silano, diminuiriam esse efeito de reforço e explicaram que pode ter acontecido devido à combinação entre os nanotubos de ZrO_2 e o polímero gerado a partir do tratamento de superfície evitando que a cadeia do polímero deslize sobre a superfície dos nanotubos. Esse comportamento diferiu significativamente daquele das nanopartículas de ZrO_2 . Além disso, a concentração de aditivo também exerceu uma influência significativa nas propriedades do compósito: a concentração de 2,0 % em peso de nanotubos de ZrO_2 conferiu a resistência máxima à flexão nos compósitos de ZrO_2 /PMMA testados.

Em 2015, Wang et al.⁶⁴ revisaram o progresso da pesquisa nas aplicações de nanometais, nanocerâmicas, nanoresina e outros nanomateriais em próteses dentárias. Os autores observaram que muitas propriedades como módulo de elasticidade, dureza superficial e grau de polimerização de materiais usados em prótese dentária podem ser significativamente melhorados depois que suas escalas foram reduzidas de micro para nanotecnologia e que o desempenho dos compósitos também pode ser melhorado pela adição de nanomateriais apropriados.

No ano de 2015, Murthy et al.⁶⁵ compararam a resistência ao impacto da resina para base protética com e sem reforço e avaliaram a resistência ao impacto da resina para base protética quando reforçada com tela de aço inoxidável, fibra de vidro e fibras de polietileno. Os espécimes foram feitos no formato de base de prótese superior utilizando a resina PMMA convencional, polimerizada por calor. Foram divididos em quatro grupos (n=10). Os espécimes do grupo I ou grupo controle não foram reforçados. Os espécimes do Grupo II foram reforçados com malha de aço inoxidável e os espécimes do Grupo III e do Grupo IV foram reforçados com 3% em peso de fibras de vidro e fibras de polietileno em forma de trama, respectivamente. Todas as amostras foram imersas em água por 1 semana antes do teste. Os autores concluíram que o reforço das próteses totais superiores apresentou um aumento significativo na resistência ao impacto quando comparado às próteses não reforçadas. As fibras de polietileno apresentaram melhor resistência ao impacto, seguidas por fibras de vidro e malha de aço inoxidável. Além disso, concluíram que utilizando fibras de vidro e fibras de polietileno, a resistência ao impacto das bases protéticas pode ser aumentada de forma eficaz.

Yoshida et al.⁶⁶, em 2015, avaliaram o efeito do reforço por fibra de vidro na resistência a flexão no limite proporcional de uma resina para base protética. O estudo

testou resinas reforçadas com metal, com fibra de vidro (FV) e sem reforço. Os testes realizados nos grupos foram: resistência máxima à flexão, resistência à flexão no limite proporcional (RF-LP) e módulo de elasticidade. Os autores observaram que as resinas com reforço (metálico e FV) apresentaram resistência à flexão final significativamente maior do que a resina sem reforço e não foram significativamente diferentes entre si. A RF-LP foi semelhante para ambas as resinas reforçadas e esta foi maior do que a RF-LP da resina sem reforço. O módulo de elasticidade da resina com reforço de FV foi significativamente menor do que com o reforço de metal e foi maior do que a sem reforço. Os autores concluíram que o reforço com FV teve efeito positivo na RF-LP de uma resina para base protética.

Yoshida et al.⁶⁷, (2016) avaliaram a resistência à flexão de resinas reforçadas para base protética que foram submetidas à imersão em água por um longo período. Para isso, resina acrílica para base protética reforçada com fio metálico ou com fibra de vidro, e sem reforço foram testadas. Metade dos espécimes foi armazenada em água destilada a 37°C por 50 horas, a outra metade foi armazenada em água destilada a 37°C por 180 dias, antes do teste. A resistência à flexão final e a resistência à flexão no limite proporcional da resina foram testadas. Os autores observaram que a resistência à flexão de uma resina para base protética reforçada não mudou após imersão em água por longo prazo.

Gad et al.⁶⁸ (2016), avaliaram o efeito da incorporação de fibra de vidro, zircônia e nano-zircônia na resistência transversal de resina para base protética reparada. Oitenta espécimes de resina acrílica polimerizada termicamente foram preparados e divididos aleatoriamente em oito grupos (n=10): um grupo intacto (controle) e sete grupos reparados. Um grupo foi reparado com resina autopolimerizável, enquanto os outros seis grupos foram reparados usando resina autopolimerizável reforçada com 2% em peso ou 5% em peso de fibra de vidro, zircônia ou partículas de nano-zircônia. Um teste de flexão de três pontos foi usado para medir a resistência transversal. Através da análise dos resultados, os autores concluíram que o reforço do material de reparo com nano-zircônia pode melhorar significativamente a resistência transversal de alguns polímeros de base de dentadura fraturada. Além disso, foi possível observar que não houve diferença significativa entre os grupos reparados com resina de reparo sem reforço, 2% em peso de zircônia e resina reforçada com fibra de vidro.

Em 2017, Dhole et al.⁶⁹ avaliaram o efeito da incorporação de óxido de alumínio na resistência à flexão de diferentes resinas acrílicas. Para realização do estudo, um total de 180 espécimes de acrílico foram confeccionados, os quais foram divididos em três grupos de resina acrílica autopolimerizável (RAA), resina acrílica de polimerização térmica convencional (RAC) e resina acrílica de polimerização térmica de alta resistência (RAR). Cada grupo foi dividido em quatro subgrupos, isto é, grupo controle e os espécimes dos três grupos restantes foram reforçados com óxido de alumínio (Al_2O_3) em pó a 5%, 10% e 15% em peso. Os espécimes foram armazenados em água destilada por uma semana e a resistência à flexão foi testada por máquina de ensaios universal. A resistência à flexão de RAA aumentou em 9%, 13% e 19%, a resistência à flexão de RAC aumentou em 8%, 15% e 19% e a de RAR aumentou em 21%, 26% e 29% em comparação com o grupo de controle adição de 5%, 10% e 15% da incorporação com alumina ($p < 0,001$). A adição de 15% de pó de alumina ao RAA mostrou alta resistência à flexão em comparação ao grupo controle de RAC ($p < 0,001$). A adição de 10% e 15% de pó de alumina ao RAC apresentou alta resistência à flexão em comparação ao grupo controle de RAR ($p < 0,001$). Os autores concluíram que a adição de alumina à resina acrílica autopolimerizável, resina acrílica de polimerização térmica convencional e resina acrílica de polimerização térmica de alta resistência aumentou a resistência à flexão.

Gad et al.⁷⁰, em 2017, analisaram o aprimoramento da resina acrílica para base protética durante as últimas décadas, em relação ao efeito causado pela adição de fibras, agentes de reforço e nanoreforço nas propriedades do PMMA. A revisão é baseada em revisões científicas, artigos e resumos, bem como estudos sobre o efeito de aditivos, fibras, enchimentos e materiais de reforço no PMMA, publicados entre 1974 e 2016. Muitos estudos relataram melhora do material de base de dentadura de PMMA com a adição de agentes de reforço. No entanto, a maioria dos estudos limitou-se a investigações *in vitro* sem bioatividade e implicações clínicas. Considerando os resultados da revisão, não existe um material ideal para base de prótese, mas as propriedades do PMMA podem ser melhoradas com algumas modificações.

Sasaki et al.⁷¹, em 2017, avaliaram o efeito do reforço nas propriedades flexurais de resinas termoplásticas moldadas por injeção para bases protéticas. Três resinas termoplásticas moldadas por injeção para base de prótese dentária (poliamida, poliéster, policarbonato) foram selecionadas para este estudo, e uma resina para base de prótese dentária polimerizada por calor convencional (PMMA) foi

usada como controle. Compósito reforçado com fibra de vidro unidirecional contínua (FVC) e fio de metal foram usados para o reforço. Amostras em forma de barra reforçada (65 mm de comprimento, 10 mm de largura, 3,3 mm de altura) foram confeccionadas (n=10). A resistência à flexão no limite proporcional (RF-LP) e o módulo de elasticidade foram medidos por meio de um teste de flexão de três pontos. Os autores observaram que todos os espécimes do material de base protética reforçados com FVC possuíam um RF-LP significativamente maior em comparação com aqueles sem reforço. Concluíram que o reforço contínuo unidirecional de compósito reforçado com fibra de vidro (FVC) teve um efeito de reforço satisfatório para as resinas termoplásticas moldadas por injeção para base de próteses.

A literatura relata várias nanopartículas experimentadas, como Naji et al.⁷² que, em 2018, revisaram as diferentes tentativas de aprimorar as propriedades mecânicas dos materiais para base de prótese. Além disso, mostraram avanços recentes e potenciais desenvolvimentos futuros para reforço das resinas acrílicas PMMA. Nesse estudo, foi observado que borrachas, diferentes macrofibras, enchimentos metálicos e cerâmicos têm sido usados por décadas como agentes de reforço para a confecção de base de próteses (PMMA). Também se concluiu que o conceito de nanotecnologia apresenta uma nova era para o reforço de materiais por causa da grande área de superfície para a proporção de volume e as propriedades biológicas, físicas e químicas dos nanomateriais. Nanopartículas (Nps) - que incluem Nps de prata, Nps de TiO₂, Nps de ZrO₂, Nps de alumina e Nps de cerâmicos - foram empregadas para melhorar as propriedades mecânicas das resinas para base de prótese. Recentemente, nanofibras e nanotubos foram introduzidos para reforçar os materiais dentários. Nanofibras/tubos com maior área de superfície por porcentagem de volume que Nps, fornecem melhores propriedades mecânicas nos compósitos reforçados em comparação com Nps. Diferentes mecanismos foram apresentados para o efeito de reforço de nanofibras/tubos. Uma maior área de superfície pode fornecer uma área maior para transferir carga e facilitar mecanismos de endurecimento, tais como ponte de fibra/tubo e retirada de fibra/tubo. Graus superiores de reticulação, devido à incorporação de monômeros em partes ocas de nanotubos, têm sido sugeridos para reforçar os nanotubos. Dispersão uniforme e umedecimento completo das nanofibras/tubos são 2 fatores importantes que afetam o efeito de reforço de nanofibras/tubos. Os autores concluem que mais estudos devem ser realizados sobre o uso nanofibras/tubos em resinas para base protética (PMMA)

a fim de avaliar o mecanismo de reforço desses aditivos. O uso de nanofibras/tubos pode oferecer uma nova abordagem para reforço de resinas PMMA e, possivelmente, ser considerado agentes de reforço promissores para materiais utilizados para base protética no futuro.

Fortunati et al.¹³ (2014), prepararam e caracterizaram filmes de nano-biocompósitos ternários baseados em poli (ácido lático) (PLA) com nanocristais de celulose modificados (s-CNC) e nanopartículas de prata sintetizadas (Ag). Foi possível observar que a funcionalização da superfície do CNC com um éster de fosfato ácido de nonilfenol etoxilado favoreceu sua dispersão na matriz de PLA. Além disso, os efeitos positivos da adição de celulose e prata nas propriedades de barreira do PLA foram confirmados por reduções na permeabilidade à água e na taxa de transmissão de oxigênio dos filmes testados. Os autores concluem que os nano-biocompósitos de PLA mostraram uma atividade antibacteriana significativa influenciada pelo teor de Ag. Destacam que, em resumo, a combinação das propriedades antibacterianas de nanopartículas de prata com nanocristais de celulose no PLA mostra alto potencial para melhorar as propriedades ativas funcionais com implicações importantes no desenvolvimento de novos materiais biodegradáveis para aplicações em embalagens de alimentos frescos.

Em 2016, de Castro et al.¹², tiveram como objetivo de seu estudo a esterificação da superfície de nanocristais de celulose (NCs) utilizando ácidos resínicos atóxicos. As modificações estruturais e morfológicas dos NCs foram caracterizadas (CNMR/espectroscopia de infravermelho com transformação de Fourier, microscopia de força atômica e análises de difração de raios-X). Além disso as propriedades desses NCs funcionalizados foram avaliadas por análise termogravimétrica e medidas do ângulo de contato. Os autores observaram que a esterificação procedeu da superfície do NC. Já as atividades antimicrobianas do NC puro e modificado foram investigadas e o NC enxertado com resina exibiu uma forte atividade antibacteriana contra bactérias Gram-negativas e uma atividade antibacteriana modesta contra bactérias Gram-positivas.

O estudo de Chen et al.⁷³ (2018) teve como objetivo desenvolver um novo tipo de resina composta de PMMA, com propriedades mecânicas aprimoradas, alta atividade antibacteriana e biocompatível. Para isso, uma série de resinas compostas reforçadas para impressão em 3D foram preparadas pela mistura de PMMA com nanocristais de celulose modificados (NCs), que foram revestidos com polidopamina

e nanopartículas de prata (AgNPs). A avaliação mecânica e a análise de microscopia eletrônica de varredura sugeriram que o composto NCs-AgNPs melhora efetivamente as propriedades mecânicas da resina PMMA. O ensaio de citotoxicidade e os testes microbiológicos indicaram excelente biocompatibilidade e alta atividade antibacteriana. Além disso, PMMA com NCs-AgNPs de 0,1% em peso (PMMA-NCs-AgNPs-0,1) possuíam as propriedades mecânicas mais desejáveis devido à distribuição homogênea de AgNPs ao longo da matriz de resina. Esta resina composta específica pode ser usada como material de restauração dentária com potencial para outras aplicações médicas.

Tyagi et al.¹⁰⁶, em 2019, desenvolveram um papel de seda antimicrobiano funcionalizado com um revestimento por spray hidrofóbico de compósito de quitosana (Ch) e nanocristais de celulose (NCs). Os autores hipotetizaram que a natureza hidrofóbica da quitosana poderia ser contrabalançada pela adição de NC para manter a formação de fibras e a absorção de água. Então, folhas de papel de tecido leve foram preparadas, revestidas por spray com Ch, NC e seu revestimento composto (ChNC) e testadas para atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* e uma amostra microbiana de uma mão humana após usar o banheiro. As propriedades de absorção e resistência de água também foram analisadas. Para ativar a superfície do papel higiênico cationizado, os autores realizaram um tratamento de plasma atmosférico com gás oxigênio/hélio nos papéis de tecido antimicrobianos de melhor desempenho. Foi observado que a maior atividade bactericida foi a com papel de seda revestido com ChCNC, inibindo até 98% do crescimento microbiano. O tratamento com plasma melhorou ainda mais a atividade antimicrobiana dos revestimentos. As propriedades de absorção de água foram reduzidas com Ch, mas aumentadas com CNC. Os autores destacam que este tecido bactericida "auto-desinfetante" tem potencial para ser um dos produtos mais inovadores para a indústria de higiene, pois pode secar, limpar e resistir à infecção de superfícies simultaneamente, proporcionando benefícios sociais significativos.

Em 2019, Wang et al.⁷⁴ exploraram o efeito de reforço e antibacteriano da incorporação de nanocristais de celulose/nanohíbridos de óxido de zinco (NC/ZnO) em compósitos de resina odontológica. A preparação dos nano-híbridos NC/ZnO foi através da precipitação de Zn^{2+} na superfície do NC e, então, introduzidos nas resinas. As propriedades mecânicas dessas resinas, incluindo resistência à compressão, módulo de flexão, resistência à flexão e microdureza Vickers foram

avaliadas. A atividade antibacteriana para *Streptococcus mutans* foi determinada e a morfologia de *Streptococcus mutans* na superfície das resinas odontológicas após a incubação foi observada. A morfologia da superfície fraturada após o teste de flexão e o conteúdo de Zn nos compósitos foram analisados. Os autores concluíram que pequenas quantidades de nano-híbridos NC/ZnO têm uma influência positiva nas propriedades mecânicas e antibacterianas do material analisado.

Gad et al.⁷⁵ (2019) avaliaram os efeitos de reforço híbrido de nanopartículas de óxido de zircônio (nano-ZrO₂) e fibras de vidro (FVs) em diferentes concentrações na resistência à flexão e ao impacto de uma base de prótese dentária de polimetilmetacrilato (PMMA). Um total de 160 espécimes foram fabricados a partir de resinas acrílicas polimerizadas por calor usando a técnica de banho de água. Para o grupo controle, os espécimes não receberam incorporações; para o grupo de teste, foram adicionadas diferentes concentrações de nano-ZrO₂/FVs a 5% do polímero PMMA. A resistência à flexão foi medida usando o teste de flexão de três pontos. A resistência ao impacto foi medida usando o teste de impacto Charpy. As resistências à flexão e ao impacto dos compósitos PMMA-nano-ZrO₂ + FV foram significativamente melhoradas quando comparadas com as do PMMA puro ($p < 0,05$). A resistência à flexão máxima ($94,05 \pm 6,95$ MPa) e a resistência ao impacto ($3,89 \pm 0,46$ kJ/m²) foram obtidas com misturas de PMMA (2,5%) /nano-ZrO₂ + 2,5% FV e podem ser utilizadas para a fabricação de próteses removíveis.

Karci et al.⁷⁶ (2019) avaliaram o efeito da incorporação de diferentes nanopartículas (Al₂O₃, SiO₂ e TiO₂) em concentrações de 1,3 e 5% em peso, e seu efeito na resistência à flexão de resinas para base protética. A resistência à flexão foi medida por meio de testes de flexão de três pontos. Os autores observaram um aumento significativo na resistência à flexão do PMMA após adição de nanopartículas a 1% nas resinas acrílicas polimerizadas por calor e autopolimerizáveis ($p < 0,05$). Os valores de resistência à flexão dos grupos aos quais foram adicionadas nanopartículas de Al₂O₃ e TiO₂ superaram os do grupo com adição de SiO₂ ($p < 0,05$). As imagens de microscopia eletrônica revelaram que as nanopartículas estavam mais homoganeamente dispersas nos grupos que apresentaram maior resistência à flexão. Os autores concluíram que as propriedades mecânicas do PMMA podem ser melhoradas pela adição de nanopartículas ao PMMA na concentração de 1%; entretanto, os valores de resistência à flexão do PMMA diminuem com a adição de nanopartículas em porcentagens mais altas (3-5%).

Em uma revisão de literatura, Wang et al.⁷⁷ (2019), discutiram a preparação da nanocelulose, incluindo os métodos comumente usados de hidrólise, oxidação, líquidos iônicos físicos e ecológicos. As vantagens e desvantagens de diferentes métodos também foram comparadas. Além disso, introduziu a aplicação de celulose nanofibrizada e cristais de nanocelulose nas áreas de termofixos e termoplásticos, como ácido polilático, polipropileno e resina epóxi. Os autores concluíram que, nos últimos anos, a pesquisa com nanocelulose manteve um rápido crescimento. A seleção, extração, preparação e processamento de compósitos de celulose foram aprimorados, o desempenho da nanocelulose foi ainda mais promovido. Cada condição na preparação da nanocelulose, como a fonte da matéria-prima, a remoção de impurezas, os parâmetros de processamento dos tratamentos determinaram seu tamanho e distribuição de partículas, levando a diferentes capacidades de aprimoramento da nanocelulose, e afetando as propriedades finais do produto. Atualmente, os compósitos de nanocelulose também se tornaram mais diversificados. A adição de nanocelulose como agente de reforço ao sistema polimérico pode melhorar as propriedades mecânicas, termodinâmicas e de adsorção do composto sem alterar substancialmente a transparência, biodegradabilidade e condutividade elétrica do próprio material.

Em 2020, Al-Thobity⁷⁸ avaliou a influência das técnicas de polimerização em autoclave com reforço de fibra de vidro na resistência à flexão e no módulo de elasticidade de resinas para base protéticas (PMMA). Noventa espécimes foram confeccionados a partir de resina acrílica polimerizada por calor e distribuídos aleatoriamente em três grupos (n=30), de acordo com a técnica de polimerização: banho de água, autoclave de ciclo curto e autoclave de ciclo longo. Cada grupo foi dividido em três subgrupos (n=10) com base na concentração de fibra de vidro de 0, 2,5 e 5% em peso. Os autores observaram que os valores de resistência à flexão e módulo de elasticidade foram significativamente maiores no grupo da autoclave de ciclo longo reforçada com 5% em peso de fibra de vidro em comparação com os outros grupos ($p < 0,05$).

Kawaguchi et al.⁷⁹, em 2020, investigaram o efeito da incorporação de nanofibra de celulose (NFC) em resina para base protética (PMMA) em suas propriedades de flexão. Os corpos de prova foram fabricados a partir de um modelo de resina termoplástica para base protética usando a técnica de moldagem por injeção. Os grânulos de resina foram misturados com NFC (para obter diferentes

porcentagens em peso 5, 10, 15 e 23% em peso). PMMA sem NFC serviu como controle (0% em peso). Antes do teste, os corpos de prova (n =12/grupo) foram imersos em água a 37°C por 50h. A resistência à flexão e o módulo de elasticidade das amostras foram determinados usando testes de flexão de três pontos. Os autores observaram que as propriedades do PMMA reforçado com NFC foram significativamente maiores do que aqueles do PMMA puro ($p < 0,05$). Portanto, a incorporação de NFC pode melhorar significativamente as propriedades de flexão de um material para base protética (PMMA).

Em 2020, Rahaman Ali et al.⁸⁰ avaliaram o impacto da ciclagem térmica nas propriedades flexurais de resina acrílica para base protética reforçada com celulose microcristalina (CMC) derivada de cacho vazio de dendê. Para isso a resistência à flexão e o módulo de flexão, após a ciclagem térmica (5000 ciclos de 5-55°C) de 3 amostras de PMMA reforçado com CMC foram comparadas com o PMMA de alto impacto convencional e disponível comercialmente. Os 3 grupos de teste foram representados pela adição de várias combinações de peso de CMC e pós acrílicos. Os autores observaram que os 3 grupos com a adição de CMC demonstraram resistência à flexão e módulo de flexão melhorados em comparação com a resina convencional, sem e após a ciclagem térmica. A maior resistência à flexão média correspondeu às amostras reforçadas com 5% de CMC seguido por 2% de CMC. Dessa forma, concluiu-se que a adição de CMC derivado de cacho vazio de dendê ao PMMA pode ser uma alternativa viável para o reforço de resinas para base protética de PMMA. O potencial de aplicação de preenchimentos naturais na fabricação de uma resina para base protética reforçada precisa de mais estudos.

Em 2020, Moradian et al.⁸¹ estudaram os efeitos nas propriedades mecânicas de cimentos de ionômero de vidro modificados por resina (CIVMR) ao incorporar nanocristais de celulose bacteriana (NCB) no material. As propriedades mecânicas analisadas foram resistência à compressão, resistência à tração diametral e módulo de elasticidade. Esses testes foram feitos em uma máquina de ensaios universal. A adição dos NCBs foi realizada em diferentes concentrações (0,3%, 0,5% e 1% em peso). Os autores observaram que a incorporação de NCBs levou a um aumento em todas as propriedades mecânicas testadas, em comparação com o grupo controle, com um aumento significativo para a concentração de 1% em peso de NCB.

Em sua revisão sistemática e meta-análise, Bangera et al.⁸² (2020), buscaram avaliar a mudança na resistência à flexão de resina para base protética reforçadas

com nanopartículas de dióxido de titânio em diferentes concentrações (1%, 3%, e 5% em peso). Ensaios de controle randomizados, *in vitro*, foram selecionados. A revisão foi formulada com base nas diretrizes de itens de relatório preferidos para revisões sistemáticas e meta-análises-protocolo (PRISMA-P). A avaliação da qualidade foi realizada de acordo com as diretrizes do Consolidated Standards Of Reporting Trials (CONSORT) e da ferramenta Cochrane de risco de viés. Seis artigos atenderam a todos os critérios e foram submetidos a meta-análise. Uma meta-análise foi realizada usando efeitos aleatórios em um intervalo de confiança de 95%. Dentro das limitações do estudo, pode-se supor que não há conformidade precisa sobre a concentração ideal de nanopartículas de dióxido de titânio necessária para melhorar a resistência à flexão do polímero. Mais estudos utilizando as diretrizes padrão ISO podem ajudar na obtenção de resultados consistentes.

Em 2021, Silvério et al.¹⁰⁷ tiveram como objetivo caracterizar os nanocristais de celulose (NC) utilizados na preparação de nanocompósitos e avaliar a influência da incorporação dos NC na resistência à flexão de um reembasador rígido (poli etil metacrilato) para próteses dentárias. Os NC foram isolados da polpa de madeira por hidrólise ácida e o ácido maleico anidrido foi usado para modificar superficialmente os NC. Os nanocristais modificados (NCmod) e não modificados (NC) foram caracterizados e incorporados no reembasador nas concentrações 0% (grupo controle), 0,25%, 0,5%, 0,75% e 1%. A resistência foi medida por meio de teste de flexão de 3 pontos com máquina EMIC DL 2000. As imagens de microscopia de força atômica mostraram que as amostras NC e NCmod apresentam nanopartículas com formato acicular dimensões típicos. Além disso, foi possível observar uma melhora significativa da resistência à flexão, mesmo em baixos níveis de carga, principalmente nos grupos de nanocristais com superfície modificada quimicamente (NCmod). Os autores concluíram que a incorporação de NC, principalmente com modificação de superfície, representa uma alternativa que pode maximizar as propriedades mecânicas das resinas acrílicas e suas respectivas aplicações odontológicas.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi analisar propriedades de superfície e a formação de biofilmes em uma resina acrílica para base protética após a incorporação de nanocristais de celulose (NC).

3.2 Objetivos Específicos

- Investigar a influência da incorporação de NC em uma resina para base protética sobre a rugosidade e energia livre de superfície;
- Avaliar o efeito da incorporação de NC em uma resina para base protética sobre a adesão e formação de biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. aureus* sensível à meticilina (MSSA);
- Analisar a viabilidade dos micro-organismos através de microscopia confocal a laser, após a incorporação de NC.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Material

Neste estudo, foi utilizada a resina acrílica para base protética Onda-Cryl®, termo-ativada por energia de micro-ondas. O Quadro 1 descreve o nome comercial desse material, fabricante, sigla, proporção, composição e ciclo de polimerização.

A resina Onda-Cryl® foi selecionada neste estudo devido aos resultados obtidos em estudo paralelo, com apoio da FAPESP em vigência (Auxílio à Pesquisa Regular 2017/26512-9), que demonstraram que a incorporação de NC nas concentrações de 0,75% e 1 % resultou em aumento significativo na dureza superficial e não gerou alteração de cor clinicamente inaceitável. Além disso, na concentração de 0,75%, para a resina Onda-Cryl®, a resistência flexural dos corpos de prova foi semelhante ao grupo controle. Tais resultados encontram-se em anexo (ANEXO A).

Quadro 1 - Descrição da resina acrílica utilizada no estudo

NOME COMERCIAL	SIGLA	FABRICANTE	PROPORÇÃO PÓ/LÍQUIDO	COMPOSIÇÃO	CICLO DE POLIMERIZAÇÃO
Onda-Cryl®	OC	Clássico Artigos Odontológicos Ltda, São Paulo, SP, Brasil	21g/ 7 mL	Pó: PMMA Líquido: MMA	3 min a 320W + 4 min 0W + 3 min a 720W

PMMA, Poli (metil metacrilato); MMA, metil metacrilato.

Fonte: Elaboração própria.

4.2 Método

Os protocolos descritos abaixo (itens 4.2.1 e 4.2.2), foram realizados no Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, sob a supervisão do Prof. Dr. Daniel Pasquini, pesquisador colaborador do projeto. Estes protocolos estão de acordo com metodologias descritas em estudos anteriores.^{1,6-11}

4.2.1 Obtenção dos nanocristais de celulose (NC)

Polpa celulósica de madeira *Eucalyptus urograndis* (híbrido de *Eucalyptus urophila* and *Eucalyptus grandis*) branqueada pelo processo Kraft foi adquirida da empresa Suzano (Limeira, São Paulo, Brasil). A polpa de madeira, inicialmente na forma de folhas, foi triturada com auxílio de um liquidificador até o material resultante apresentar aspecto semelhante a um algodão. A hidrólise foi realizada a 45°C durante 55 min sob agitação vigorosa e constante. Para cada 1,0 grama da polpa de madeira triturada foram utilizados 20 mL de ácido sulfúrico 9,17 M. Imediatamente após o tempo estabelecido, a suspensão foi diluída dez vezes pela adição de água destilada fria ($\pm 5^\circ\text{C}$) para interromper a reação de hidrólise. Em seguida, a suspensão foi centrifugada duas vezes por 10 minutos a 10.000 rpm utilizando uma centrífuga com refrigeração (Eppendorf Centrifuge 580 R) a 10°C para remover o excesso de ácido. A fase concentrada resultante da centrifugação foi então dialisada contra água destilada até pH neutro para remoção dos grupos sulfatos que não reagiram, sais e açúcares solúveis. Logo após o processo de diálise, o material foi tratado com um ultrassom de sonda (Hielscher modelo UP100HP) durante 15 min, utilizando pulso de 7 seg on e 2 seg off. A suspensão resultante foi armazenada sob refrigeração a 4°C.

4.2.2 Trocas de solventes

Para que os NC fossem incorporados na resina, foi necessário realizar uma troca de solventes dos NC que inicialmente se encontravam em água para o líquido Metilmetacrilato (MMA) empregado nas polimerizações da resina de acordo com o fabricante. As trocas de solventes foram realizadas com auxílio de uma centrífuga (Eppendorf Centrifuge 580 R). Inicialmente, os NC obtidos estavam em solução aquosa, em seguida as trocas de solvente foram realizadas a 7000 rpm a 10°C por 10 minutos por duas vezes com cada um dos solventes na seguinte ordem: água, etanol, acetona e MMA (ordem decrescente de polaridade). Após a última centrifugação com MMA, os NC foram dispersos utilizando um ultrassom de sonda (Hielscher modelo UP100H) durante 5 minutos (pulso utilizado: 7 segs. on e 2 segs. off).

4.2.3 Grupos experimentais

O grupo controle foi constituído de corpos de prova de resina acrílica intacta (OC), sem incorporação de NC, e, o grupo experimental foi composto de corpos de

prova de resina acrílica após a incorporação de NC 0,75%. Esta concentração de 0,75% de NC na resina Onda-Cryl® foi selecionada para este estudo por ter sido a concentração mínima que produziu benefício nas propriedades dureza superficial e estabilidade de cor, e não alterou a resistência flexural em relação ao grupo controle (ANEXO A).

4.2.4 Confeção dos corpos de prova

Foram obtidos corpos de prova circulares apresentando 15 mm de diâmetro e 3 mm de espessura. Para cada ocasião foram confeccionados 120 corpos de prova de cada grupo (n=120), de acordo com o protocolo a seguir. Para melhor entendimento da distribuição dos corpos de prova utilizados para cada teste, esta foi descrita em um fluxograma (ANEXO C). Para padronizar as dimensões dos corpos de prova, uma matriz metálica contendo 10 orifícios de 15 mm de diâmetro e 3 mm de espessura foi posicionada sobre uma lâmina de vidro previamente jateada com óxido de alumínio, e incluída em mufla plástica com gesso pedra tipo III (Figura 1). Esta lâmina de vidro jateada foi utilizada para padronizar a rugosidade da superfície das amostras em aproximadamente 3,0 μm , para simular a rugosidade da superfície interna da base protética clinicamente⁸³. Após presa do gesso, uma nova lâmina de vidro previamente jateada com óxido de alumínio foi posicionada sobre o conjunto matriz metálica/lâmina de vidro, a contra-mufla foi posicionada e então, o gesso tipo III foi vazado completando-se assim a fase de inclusão. Após abertura da mufla e isolamento do gesso com Cel-Lac, a prensagem da resina acrílica foi realizada.

Figura 1 - Conjunto matriz metálica/lâmina de vidro incluído em mufla plástica



Fonte: Elaboração própria

A proporção e manipulação pó/líquido da resina acrílica foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante (Quadro 1), sendo que o pó foi pesado em uma balança de precisão eletrônica e o líquido mensurado com o auxílio de uma pipeta graduada. Os nanocristais de celulose (NC) na concentração de 0,75% foram adicionados à mistura pó/ líquido da resina acrílica, respeitando-se a proporção do fabricante da resina Onda-Cryl®. A concentração de 0,75% de NC foi calculada a partir de solução de NC com concentração conhecida em massa/ volume, que foi determinada durante a síntese dos NC, produzidos na Universidade Federal de Uberlândia, sob a supervisão do Prof. Dr. Daniel Pasquini.

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 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 1,00 toneladas foram exercidas sobre a mufla plástica, gradualmente. 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 pelo fabricante (Quadro 1) em micro-ondas (Continental AW-30, Bosh Eletrodomésticos, Manaus, AM).

Após a polimerização, a mufla foi resfriada sobre bancada por uma noite e, então, os corpos de prova foram desincluídos. Os excessos laterais existentes nos corpos de prova foram removidos com uma ponta do tipo Maxicut (Lesfils de August Malleifer SA, Ballaigues, Suíça). Previamente à realização dos testes, todos os corpos de prova foram limpos por 1 minuto em ultrassom contendo água deionizada com 1% de detergente e secos com papel absorvente. Em seguida, foram armazenados em água destilada a 37°C por 50±2 horas⁸⁴.

Após armazenamento em água destilada, os corpos de prova foram secos com papel absorvente e submetidos a ultrassom por 20 minutos, seguido da desinfecção por meio de luz UV no interior da câmara de fluxo laminar vertical.⁸⁷ A desinfecção foi realizada em ambas as superfícies dos corpos de prova por 20 minutos cada, sendo posteriormente armazenados por no máximo 24 horas em placas de Petri descartáveis estéreis, e que foram mantidas seladas até o momento do uso.

4.2.5 Avaliação da rugosidade

A rugosidade superficial foi analisada através de um rugosímetro digital portátil modelo SJ-400 (Mitutoyo Corporation, Japão) com precisão de $0,01 \mu\text{m}$ (Figura 2). O percurso de medição do rugosímetro foi de 2,4 mm, a velocidade da ponta ativa de 0,5 mm/s, e o raio da ponta ativa de $5 \mu\text{m}$. Foram avaliados 40 corpos de prova por grupo, para cada ocasião ($n=40$). Para cada corpo de prova foram realizadas duas mensurações de rugosidade, em ambos os lados e 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.

Figura 2 - Rugosímetro digital



Fonte: Elaboração própria

4.2.6 Avaliação da energia livre de superfície

Foi utilizado um goniômetro (modelo 200, Ramé-hart instrument co., Netcong, New Jersey, USA), que possui acoplado uma micro-seringa para gotejamento do líquido e uma câmera Dispositivo de Carga Acoplada (CCD) que registra a imagem da gota sobre a superfície do espécime (Figura 3). A este equipamento, também está acoplado um sistema computadorizado que possui um software (DROPIimage Standard, ramé-hart instrument co., Netcong, New Jersey, USA).

Foram avaliados 40 corpos de prova por grupo, para cada ocasião ($n=40$). 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 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-Young⁸⁵. 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)⁸⁵.

Foram realizadas duas medidas para cada corpo de prova, em partes distintas do mesmo, sendo então obtida uma média aritmética para cada condição experimental⁸⁶. Todas as medidas foram realizadas por um único operador.

Figura 3 - Goniômetro modelo 200, acoplado ao computador



Fonte: Elaboração própria

4.2.7 Avaliação da adesão e formação de biofilmes na resina acrílica após a incorporação dos NC

O efeito da incorporação dos NC na resina acrílica foi avaliado na capacidade de adesão e formação de biofilmes simples e mistos de *C. albicans* e *S. aureus*. Foi realizado o ensaio de XTT, para avaliação do metabolismo celular e a contagem de unidades formadoras de colônias para quantificar a atividade antimicrobiana.

Obtenção dos inóculos

As cepas microbianas utilizadas (*C. albicans* SC5314 e *S. aureus* ATCC 25923) foram mantidas congeladas a -80°C e reativadas no momento do uso em placas contendo ágar Sabouraud Dextrose (SDA) + Cloranfenicol para *C. albicans*, e, ágar Brain heart infusion (BHI) + Anfotericina B para *S. aureus*, 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 *Tryptone and Yeast Extract* (TYE) suplementado com 1% de glicose, e foram então incubados por 16 e 18 horas (*C. albicans* e *S. aureus*, respectivamente), em estufa, obtendo-se 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 para *C.albicans* e 1:20 para *S.aureus*. 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 1×10^7 UFC/mL).

Foram utilizadas placas estéreis de 12 poços. Os discos de resina acrílica previamente desinfetados⁸⁷ foram distribuídos aleatoriamente nos poços da placa de 12 poços. Para cada grupo e tipo de biofilme foram destinados três corpos de prova (n=3) para cada teste (UFC e XTT), nos dois tempos (90 minutos e 48 horas). Em seguida, em cada poço da placa, foi acrescentado 2 mL da saliva filtrada e a placa foi 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.

Coleta de saliva

A saliva foi previamente coletada a partir de oito voluntários escolhidos segundo os critérios de exclusão (Quadro 2). 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: 12932919.7.0000.5416 – ANEXO B). Foram considerados critérios de exclusão para os voluntários para coleta de saliva: doenças sistêmicas, uso de antibióticos nos últimos 3 meses, presença de cárie ativa e/ou doença periodontal. A coleta da saliva foi estimulada através da mastigação. Para isso, foram utilizados pedaços de Parafilm® para que os voluntários pudessem mastigar. Então, a saliva coletada foi colocada em tubos Falcon, centrifugada (3800

g, 4°C, 10 minutos), e o sobrenadante foi filtrado utilizando-se membrana de 0,22µm. As alíquotas de saliva foram mantidas a -20°C até sua utilização.

Quadro 2 - Voluntários da doação de saliva

ID	Idade	Gênero
1	26	Feminino
2	27	Feminino
3	26	Masculino
4	23	Feminino
5	39	Feminino
6	28	Feminino
7	41	Feminino
8	32	Masculino

Fonte: Elaboração própria

Formação de biofilme

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

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

Formação de biofilme misto de *C.albicans* + *S.aureus*: 1mL da suspensão 1×10^7 UFC/mL de *C.albicans* foi misturada com 1mL da suspensão 1×10^7 UFC/mL de *S.aureus* e adicionada sobre as amostras. Totalizando um volume final de 2mL por poço.

Os biofilmes simples e mistos de *C.albicans* e *S.aureus* foram submetidos à fase de adesão que consiste em incubação por 90 minutos sob agitação orbital de 75 rpm a 37°C⁸⁸. Após a fase de adesão, todos os discos foram removidos da placa, lavados cuidadosamente com Phosphate Buffered saline (PBS) 1X para remoção das células não aderidas. Em seguida os discos que foram aleatoriamente separados para análise da fase de adesão, foram colocados em novas placas estéreis para realizar a remoção das células aderidas por meio de raspagem. Sobre os demais poços, foram adicionados 2mL de TYE + 1% sacarose fresco em cada poço contendo os discos com os micro-organismos que ficaram aderidos. As placas foram colocadas em agitador orbital a 37°C por 48 horas para a obtenção dos biofilmes maduros.

Para a avaliação da fase de adesão e do biofilme de 48 horas de formação, os discos foram colocados em placas estéreis e foram adicionados 2 mL de PBS 1X para a realização da raspagem dos mesmos. A raspagem do disco foi realizada com uma ponteira (Ponteira Azul de 100-1000uL) não acoplada à micropipeta, com o auxílio de uma pinça estéril para a imobilização do disco. 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 (*C. albicans* em SDA+Cloranfenicol e *S. aureus* em BHI+Anfotericina B) e foram incubadas por 48 horas a 37°C sendo em seguida o número de UFC quantificado para as duas etapas.

Para cada micro-organismo isoladamente e para o biofilme misto o ensaio microbiológico foi realizado em triplicata, em três ocasiões distintas.

Contagem de colônias

Após 48 horas de incubação a 37°C, as placas de SDA + Cloranfenicol e de BHI + Anfotericina B 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:

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

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 semeaduras 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 $\log(\text{UFC}+1)/\text{mL}$.

Avaliação do metabolismo celular (ensaio de XTT)

Para a análise do metabolismo celular, a solução de XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl) - 5 - [(phenylamino) carbonyl] - 2H - tetrazolium hydroxide), e a solução de menadiona foram previamente preparadas e mantidas a -20°C até o momento do experimento. Para a realização do teste foi preparada a solução de XTT.

Para cada 10ml da solução de XTT foi adicionado 1µl da solução de Menadiona. Após misturadas, foram mantidas longe da luz até a aplicação sobre os discos.

Após a fase de adesão e formação de biofilme de 48 horas, os discos de cada condição experimental foram lavados para remoção das células não aderidas e então, transferidos para placas de cultura estéreis com 24 poços. Então, 500µl da solução XTT foram colocados sobre cada disco, sendo incubados, no escuro a 37°C, por 3 horas. Após esse período, alíquotas de 100µl, em duplicata, foram colocados na placa de 96 poços. Essa placa foi posicionada no leitor de Elisa para leitura da absorbância utilizando-se o filtro 492 nm. A solução de XTT preparada para o experimento foi utilizada como "Blank".

Análise por microscopia confocal

Após a fase de adesão e formação de biofilme de 48 horas, os discos de cada condição experimental foram lavados 1X com PBS, transferidos para placas de cultura estéreis com 12 poços contendo 1mL de PBS com os marcadores SYTO 9® e Iodeto de propídeo (PI) (LIFE/DEAD™ BacLight™ Bacterial viability kit) na concentração de 1:1000. As amostras foram incubadas em estufa a 37°C, protegido da luz por um período de 30 minutos e lavadas para a remoção do excesso de marcador. A obtenção das imagens foi realizada por meio do Microscópio de Fluorescência Confocal Carl Zeiss LSM 800 com Airyscan, com auxílio do Software ZenBlue versão 2.3.

A marcação positiva para SYTO® 9 dos micro-organismos vivos foi obtida pela excitação das amostras com laser em 488 nm, na faixa espectral de 488 nm até 530 nm (verde); para a visualização dos micro-organismos mortos marcados com PI, foi utilizado o laser em 488 na faixa espectral de 575 nm até 630 nm (vermelho).

Planejamento experimental

Neste estudo, foram avaliadas as variáveis rugosidade (Ra) e energia livre de superfície (erg cm^{-2}) e estabelecido um fator de variação (incorporação de NC), avaliado em dois níveis (controle e 0,75%) para a resina OC.

Também foram avaliadas as variáveis metabolismo celular (ensaio XTT) e contagem de colônias (UFC/mL) em biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. aureus* e estabelecido um fator de variação (incorporação de NC), avaliado em dois níveis (controle e 0,75%). Os dados de contagens de colônias foram transformados de acordo com a fórmula $\log(\text{UFC}+1)/\text{mL}$.

Os dados obtidos neste estudo estão apresentados nos APÊNDICES. Após o agrupamento dos dados, estes foram analisados estatisticamente utilizando o software SPSS for Windows (versão 15.0; SPSS Inc.). Todas as análises foram realizadas utilizando-se $\alpha = 0,05$. A aderência dos dados à distribuição normal e a homogeneidade de variância foram testadas pelo teste de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente, onde foi constatada distribuição normal ($p > 0,05$) e homogeneidade de variâncias ($p > 0,05$) para as variáveis avaliadas, portanto os dados cumprem os pressupostos para aplicar um teste paramétrico para amostras independentes. Dessa forma, os valores correspondentes às médias dos espécimes dos grupos foram submetidos ao Teste t de Student. A variável ELS não apresentou normalidade, assim, para esta variável o teste não paramétrico U de Mann-Whitney foi aplicado.

Os ensaios microbiológicos foram realizados em triplicata, em três ocasiões distintas, totalizando $n=9$ para cada condição experimental. Ainda, uma ocasião distinta foi realizada para que os corpos de prova de cada condição experimental ($n=2$) fossem submetidos à análise por microscopia confocal.

5 RESULTADOS

5.1 Rugosidade

Inicialmente, foram mensuradas a rugosidade de 120 amostras da resina OC (controle) e outras 120 amostras da resina OC incorporada com 0,75% de NC. A análise descritiva está apresentada na Tabela 1.

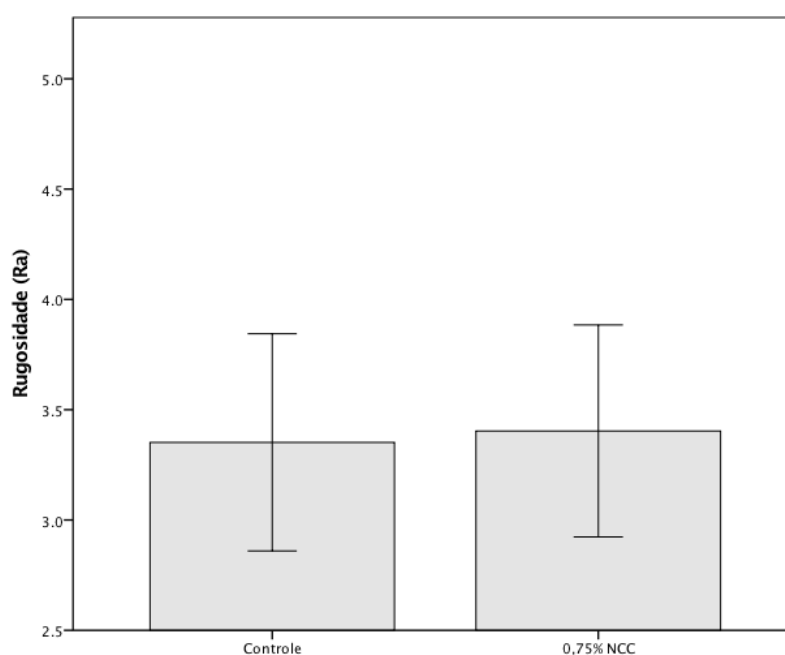
Tabela 1 - Estatística descritiva da rugosidade (RA)

Grupos	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
				Limite inferior	Limite superior		
Controle	3,35	0,49	0,04	3,26	3,44	1,98	4,45
0,75% NC	3,40	0,48	0,04	3,31	3,49	2,41	4,72

Fonte: Elaboração própria

Na Figura 4 observa-se que a adição de 0,75% de NC não exerceu influência sobre os resultados do ensaio de rugosidade para a resina OC ($P>0,05$).

Figura 4 - Valores médios e desvios-padrão da rugosidade (Ra) para os grupos avaliados da resina OC (Teste T de Student, $p=0,412$).



Fonte: Elaboração própria

5.2 Energia Livre de Superfície (ELS)

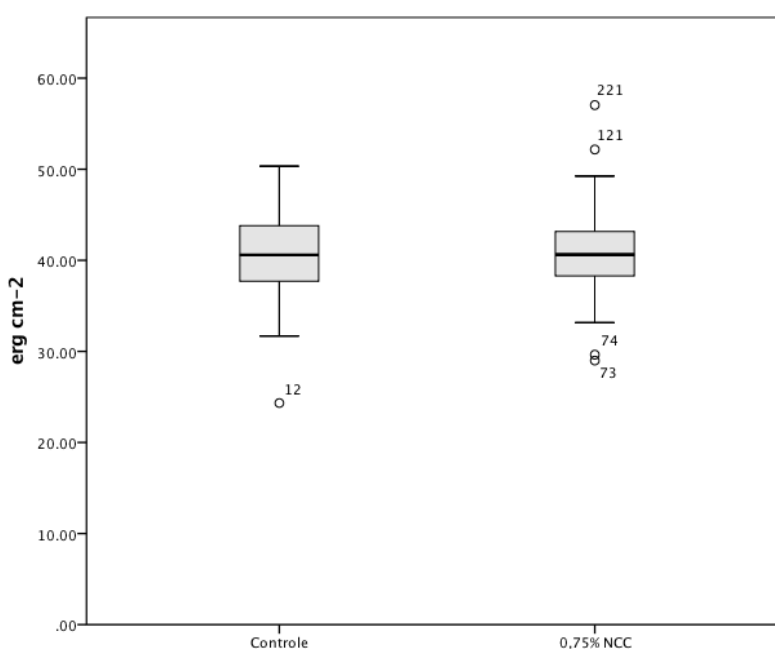
A energia livre de superfície foi obtida pela conversão não linear dos valores encontrados na mensuração dos ângulos de contato e, assim, foi possível observar por meio da Figura 5 que a incorporação de 0,75% de NC a resina OC não apresentou influência sobre a variável ELS. A análise descritiva está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 - Estatística descritiva da ELS (erg cm^{-2}) para resina OC.

Grupos	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
				Limite inferior	Limite superior		
Controle	40,69	4,24	0,38	39,92	41,45	24,33	50,35
0,75% NC	40,81	4,07	0,37	40,07	41,55	28,99	57,04

Fonte: Elaboração própria

Figura 5 - Valores médios e desvios padrão da energia livre de superfície (erg cm^{-2}) para os grupos avaliados da resina OC (Teste U de Mann-Whitney, $p=0,920$).



Fonte: Elaboração própria

5.3 Adesão do Biofilme Multiespécies

Na Tabela 3 estão apresentados as médias e desvios padrão referentes às absorvâncias determinadas pelo método XTT no estudo da adesão dos biofilmes simples e misto (*C. albicans* e *S. aureus*). O Teste T de Student foi empregado para

avaliar a aderência de micro-organismos pela absorbância ao nível de significância de 5%. Nota-se que não houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo com adição de 0,75% de NC para os diferentes micro-organismos.

Tabela 3 – Médias (desvios-padrão) de absorbâncias pelo método XTT, para o teste de adesão do biofilme multiespécies, de acordo com os grupos avaliados (controle ou 0,75% NC)

		Média	Desvio Padrão	P
<i>C. albicans</i>	Controle	0,44	0,12	.813
	0,75% NC	0,45	0,15	
<i>S. aureus</i>	Controle	0,98	0,09	.362
	0,75% NC	0,96	0,05	
<i>C. albicans + S. aureus</i>	Controle	0,97	0,07	.698
	0,75% NC	0,98	0,08	

Fonte: Elaboração própria

As médias e desvios padrão de logaritmos de UFC/mL para os micro-organismos avaliados estão apresentados na Tabela 4. É possível observar que os resultados foram semelhantes ao observado no ensaio XTT, onde, a incorporação do NC não alterou a adesão dos micro-organismos.

Tabela 4 - Médias (desvios-padrão) de logaritmos de UFC/mL, para o teste de adesão do biofilme simples e misto de *C. albicans*, *S. aureus*, de acordo com os grupos avaliados (controle ou 0,75% NC)

		Média	Desvio Padrão	P
<i>C. albicans</i>	Controle	6,5	0,1	0,696
	0,75% NC	6,5	0,1	
<i>S. aureus</i>	Controle	7,6	0,2	0,447
	0,75% NC	7,4	0,6	
<i>C. albicans + S. aureus (SDA)</i>	Controle	6,3	0,2	0,376
	0,75% NC	6,2	0,2	
<i>C. albicans + S. aureus (BHI)</i>	Controle	7,7	0,3	0,910
	0,75% NC	7,7	0,3	

Fonte: Elaboração própria

5.4 Formação do Biofilme Multiespécies

As médias e desvios-padrão de absorvâncias determinadas pelo método XTT no estudo da formação de biofilme simples e misto (*C. albicans* e *S. aureus*) podem ser observados na Tabela 5. Nota-se que, para os diferentes micro-organismos, não foram encontradas diferenças significativas entre as médias dos grupos experimentais.

Tabela 5 – Médias (desvios-padrão) de absorvâncias pelo método XTT, para o teste de formação do biofilme simples e misto de *C. albicans* e *S. aureus*, de acordo com os grupos avaliados (controle ou 0,75% NC)

		Média	Desvio Padrão	P
<i>C. albicans</i>	Controle	0,85	0,18	0,809
	0,75% NC	0,86	0,11	
<i>S. aureus</i>	Controle	0,97	0,17	0,100
	0,75% NC	0,86	0,23	
<i>C. albicans</i> + <i>S. aureus</i>	Controle	0,88	0,06	0,593
	0,75% NC	0,89	0,13	

Fonte: Elaboração própria

Na Tabela 6 estão apresentadas as médias e desvios-padrão de logaritmos de UFC/mL para os biofilmes simples e mistos em meios de cultura SDA e BHI. Ao nível de significância de 5%, as quatro análises (teste T de Student) revelaram que a incorporação de 0,75% de NC a resina OC não alteraram a formação do biofilme de 48h para os micro-organismos avaliados.

Tabela 6 - Médias (desvios-padrão) de logaritmos de UFC/mL (Log 10), para o teste de formação do biofilme (*C. albicans*, *S. aureus* e *C. albicans* + *S. aureus*), de acordo com os grupos avaliados (controle ou 0,75%NC)

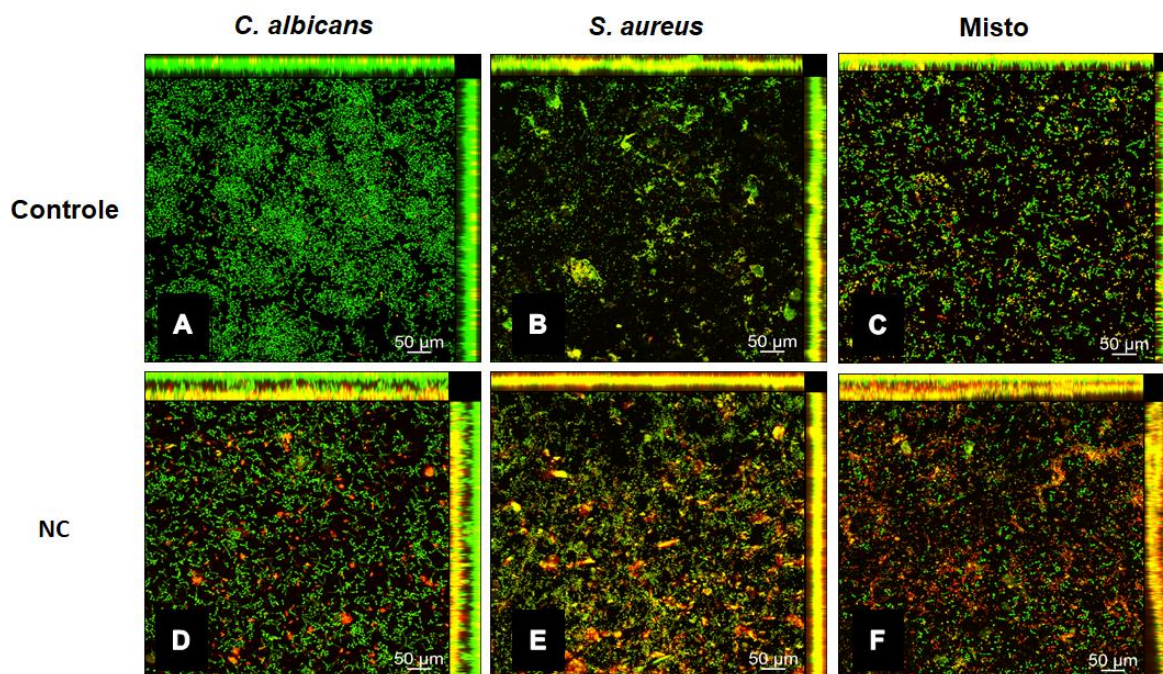
		Média	Desvio Padrão	P
<i>C. albicans</i>	Controle	6,9	0,3	.941
	0,75% NC	6,9	0,3	
<i>S. aureus</i>	Controle	7,7	0,2	.209
	0,75% NC	7,9	0,3	
<i>C. albicans</i> + <i>S. aureus</i> (SDA)	Controle	6,4	0,2	.293
	0,75% NC	6,5	0,2	
<i>C. albicans</i> + <i>S. aureus</i> (BHI)	Controle	8,0	0,2	.917
	0,75% NC	8,0	0,2	

Fonte: Elaboração própria

5.5 Análise por Microscopia Confocal

A morfologia celular e a integridade da parede dos biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. aureus* (*MSSA*) formados na superfície de corpos de prova de resina acrílica para base de prótese com e sem incorporação de NC 0,75% foram analisadas por microscopia confocal após a fase de adesão (Figura 6), e após 48 h de formação dos biofilmes (Figura 7). Observou-se que as células viáveis apresentaram marcação positiva para SYTO® 9 (verde), demonstrando que a superfície da resina acrílica do grupo NC 0,75% não interfere na adesão nem na formação dos biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. aureus* (*MSSA*) de 48 h. As células com parede celular danificada ou permeável apresentaram marcação positiva para PI (vermelho), e foi evidente para o tempo de adesão dos biofilmes de *C. albicans* (Figura 6D), *S. aureus* (*MSSA*) (Figura 6E) e misto (Figura 6F) formados sobre os corpos de prova de resina acrílica tratada com o NC 0,75%.

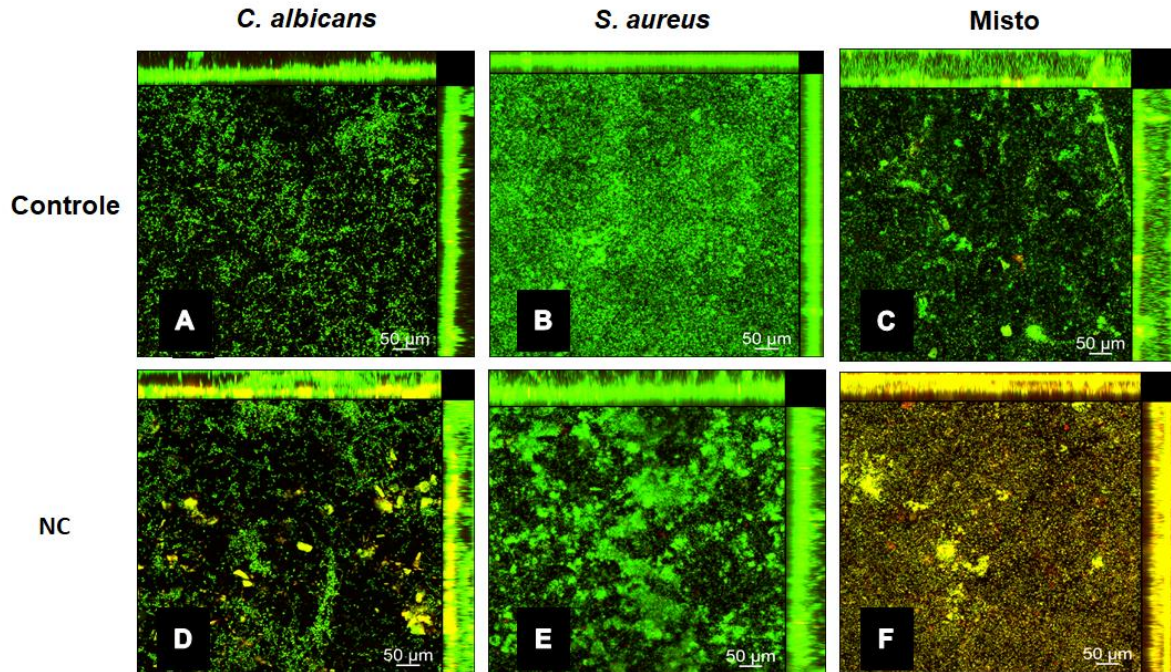
Figura 6 - Imagens adquiridas por microscopia confocal de biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. aureus*, formados na superfície dos corpos de prova de resina acrílica para base de prótese com e sem incorporação de nanocristais de celulose 0,75%. Fase de adesão.



Biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. aureus* (*MSSA*) formados na superfície de corpos de prova de resina acrílica para base de prótese sem incorporação de NC 0,75% (A, B, C) e com incorporação de NC 0,75% (D, E, F) avaliados após 90 minutos de incubação (fase de adesão). A integridade da parede celular foi avaliada pela marcação com *LIFE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit*. Micro-organismos vivos apresentaram marcação positiva para SYTO® 9 (verde). Micro-organismos mortos apresentaram marcação positiva para PI (vermelho). A marcação amarela resulta da sobreposição de ambos os fluoróforos. Escala: 50 µm.

Fonte: Elaboração própria

Figura 7 - Imagens adquiridas por microscopia confocal de biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. aureus*, formados na superfície de corpos de prova de resina acrílica para base de prótese com e sem incorporação de nanocristais de celulose 0,75%. Fase de biofilme.



Biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. aureus* (MSSA) formados na superfície de corpos- de-prova de resina acrílica para base de prótese sem incorporação de NC 0,75% (A, B, C) e com incorporação de NC 0,75% (D, E, F) avaliados após 48 horas de incubação (fase de biofilme). A integridade da parede celular foi avaliada pela marcação com *LIFE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit*. Micro-organismos vivos apresentaram marcação positiva para SYTO® 9 (verde). Micro-organismos mortos apresentaram marcação positiva para PI (vermelho). A marcação amarela resulta da sobreposição de ambos os fluoróforos. Escala: 50 µm.

Fonte: Elaboração própria

6 DISCUSSÃO

A hipótese nula do presente estudo foi aceita, uma vez que as propriedades físicas (Rugosidade e Energia Livre de Superfície) e a adesão e formação dos micro-organismos (UFC e XTT) sobre a superfície da resina acrílica não foram influenciadas pela incorporação de NC nesta resina.

Esse estudo teve como objetivo avaliar as propriedades físicas e a adesão e formação de biofilme com a incorporação de NC em uma resina acrílica para base protética polimerizada por micro-ondas. De acordo com estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa, esse material, nessa concentração (0,75%), foi o mais promissor em relação a um aumento significativo da dureza desta resina.

O aumento na dureza foi provavelmente devido a estrutura do NC ser altamente cristalina e à presença de NC na resina de base da prótese⁸⁹. A dureza é uma propriedade física que está relacionada à resistência à deformação plástica de um material. Esta propriedade representa a longevidade da prótese, pois quanto maior a dureza, menor o risco de fratura do material de base da prótese e maior a resistência à abrasão, fundamental para a estética e redução do acúmulo de biofilme⁹⁰. Além disso, a dureza é considerada um parâmetro para avaliar o teor de monômero residual, ou seja, para avaliar o grau de conversão do monômero em polímero durante a polimerização⁹⁰.

Os resultados mostraram que a incorporação dos NC não exerceu influência sobre a rugosidade do grupo experimental testado. O fato de não ter alteração da rugosidade no grupo experimental é um resultado positivo, uma vez que essa propriedade superficial do grupo controle foi mantida mesmo após a incorporação dos NC. O grupo experimental não apresentou um aumento nessa propriedade, o que é positivo, pois, segundo Bollen et al.⁹¹, superfícies de resina acrílica com valores de rugosidade maiores que 0,2 μm potencializam a adesão de micro-organismos, sendo este o valor crítico para a resina acrílica. Além disso, superfícies de base de próteses com menor rugosidade são menos suscetíveis ao acúmulo de micro-organismos, portanto, favoráveis na prevenção de patologias orais, além de serem mais resistentes à manchas⁹¹. Características físicas do substrato, como a energia livre superficial e aspereza da base da prótese, podem interferir na colonização e maturação do biofilme⁹². Entretanto, alguns estudos têm mostrado que a rugosidade da resina acrílica não foi um fator determinante na adesão de *C. albicans*^{93,94}.

A interação entre as forças de coesão e adesão e a capacidade de molhamento de um sólido é determinada pela ELS⁹⁵. No presente estudo, a adição de NC na resina para base protética não alterou o ELS quando comparada ao grupo controle. Tanto os polímeros celulósicos quanto os acrílicos possuem estruturas com grupos polares e não polares, que refletem em sua energia superficial. A celulose tem uma energia superficial de cerca de 45-50 mN/m e este valor é a soma das contribuições polares ~30-35 mN/m e contribuições dispersivas (ou não polares) ~15-20mN/m. PMMA tem uma energia de superfície em torno de 40-45 mN/m e este valor é a soma das contribuições polares ~5-10 mN/m e contribuições dispersivas (ou não polares) ~35-40 mN/m. Uma das condições para uma boa adesão entre os materiais é que eles tenham valores de energia de superfície semelhantes, o que é o caso desses dois compostos. Porém, ainda apresentam diferenças entre as contribuições polares e dispersivas que podem contribuir negativamente para essa adesão. Apesar disso, devido ao caráter químico dos dois componentes, ainda se espera uma adesão razoável entre eles e isso explicaria a melhora da dureza da resina polimerizada por micro-ondas após a incorporação de NC a 0,75%.

A significância clínica da ELS está relacionada à capacidade de molhamento de uma superfície, onde uma alta ELS é desejada se houver necessidade de adesão, mas, indesejável caso exista o objetivo de resistência à adesão⁹⁶. Embora a relação entre a ELS e a adesão de *Candida spp.* tenha sido investigada extensivamente, os dados ainda são controversos^{97,98}. Alguns estudos observaram que substratos com alta ELS podem induzir maior adesão e proliferação de *Candida albicans*⁹⁹. No entanto, outros autores não encontraram correlação entre ELS e adesão^{100,101} e formação de biofilme¹⁰².

Os resultados do presente estudo *in vitro* mostraram que a incorporação de NC (0,75%), não exerceu influência sobre as propriedades microbiológicas (adesão e formação de biofilme) da resina para base protética Onda-Cryl®. Os estudos encontrados na literatura que avaliaram a atividade antimicrobiana do NC foram realizados utilizando os NC associados a outros componentes ou com modificações de superfície^{12,13,106}. Eles mostram que quando há atividade antimicrobiana, essa é resultante das modificações ou adições de compósitos aos NC. Dessa forma, entende-se que os NC quando utilizados de maneira isolada não tem potencial antimicrobiano, porém pode ser um material base para adição de outros componentes, sendo assim mais promissor^{12,13,106}. Sabe-se que o aumento da rugosidade pode

potencializar a adesão de micro-organismos⁹¹. Nossos resultados mostraram que a rugosidade do grupo experimental foi semelhante à do grupo controle. Dessa forma, era esperado que, conseqüentemente, a adesão e formação de micro-organismos sobre os corpos de prova de ambos os grupos, não apresentassem diferença entre os grupos.

A partir da análise das imagens adquiridas através da microscopia confocal a laser foi possível constatar que a incorporação de NC 0,75% não influenciou na viabilidade dos biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. aureus* (MSSA). Isso ocorreu para ambos os tempos avaliados, adesão (90 minutos) e formação de biofilme maduro (48h), corroborando com os resultados das outras análises microbiológicas. Apesar da marcação vermelha evidente na fase de adesão (Figuras 6D, 6E, 6F), a morte celular observada, não foi suficiente para inibir a adesão dos micro-organismos sobre as superfícies de resina acrílica para base de prótese com incorporação de NC 0,75%, permitindo a formação de biofilmes maduros simples e misto de *C. albicans* e *S. aureus* (MSSA), após 48 horas (Figuras 7D, 7E, 7F).

Com os avanços da nanotecnologia, agentes de reforço como NC, óxido de metal, diamante, carbono e nanopartículas de fibra de vidro foram incorporados às resinas para base protética^{19,103}. Particularmente, o uso de NC como agentes de reforço nanométricos pode representar uma importante inovação em materiais odontológicos, uma vez que esses materiais são biopolímeros de fontes renováveis.

Os estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa revelaram melhoria da dureza dessa mesma resina, após a incorporação de NC na concentração de 0,75%. Além disso, essa incorporação não resultou em alteração de cor em níveis clinicamente significantes nem reduziu a resistência à flexão abaixo do limite estabelecido pela norma ISO (65 MPa). E, apesar de não ter sido observado melhora nas propriedades aqui avaliadas, também observamos que a incorporação dos NC na resina não foi prejudicial a este material, uma vez que não houve alteração de suas propriedades superficiais e, conseqüentemente, o mesmo ocorreu em relação à adesão e formação de biofilme. Na prática, com a melhora da dureza, pode-se esperar que a incorporação de 0,75% NC nesta resina pode melhorar a sua resistência à abrasão, o que é desejável a longo prazo, uma vez que a base da prótese é constantemente submetida à escovação. Além disso, a polimerização de bases de próteses por micro-ondas é considerada um método rápido, econômico e limpo na prática laboratorial¹⁰⁴.

Estudos futuros devem ser realizados para aprofundar a avaliação do efeito da incorporação de NC em resinas acrílicas para base de prótese. Os resultados apresentados na literatura ainda são limitados. De maneira geral, os estudos indicam que a modificação dos NC em sua superfície para otimizar sua interação com o PMMA resulta em melhor desempenho mecânico dos compósitos obtidos^{73,74,77,107}. Assim, estudos adicionais são recomendados para que esses achados possam ser aplicados em pesquisas clínicas¹⁰⁵.

Com os resultados preliminares obtidos até o momento, considera-se que a aplicação da celulose como material de reforço em resinas para base protética deve ser investigada mais extensivamente, pois tem potencial para gerar benefícios tecnológicos, econômicos e ambientais, uma vez que podem promover o aumento da vida útil da prótese através do uso de um material abundante e renovável.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a incorporação de 0,75% de NC na resina acrílica para base protética polimerizada por micro-ondas (Onda-Cryl®) não exerceu influência sobre suas propriedades físicas (rugosidade e energia livre de superfície) e microbiológicas (adesão e formação de biofilme).

REFERÊNCIAS*

- 1- Silvério HA, Flauzino Neto WP, Pasquini D. Effect of incorporating cellulose nanocrystals from corncob on the tensile, thermal and barrier properties of Poly (Vinyl Alcohol) nanocomposites. *J Nanomater.* 2013; 2013: 1-9.
- 2- Alternativas de uma fibra vegetal. *Rev Pesq Fapesp.* 2017 [acesso 2019 mar 2]; 253: 70-3. Disponível em: <https://revistapesquisa.fapesp.br/2017/03/17/alternativas-de-uma-fibra-vegetal/>.
- 3- Peng BL, Dhar N, Liu HL, Tam KC. Chemistry and applications of nanocrystalline cellulose and its derivatives: a nanotechnology perspective. *Can J Chem Eng.* 2011; 89: 1191-206.
- 4- Habibi Y, Dufresne A. Highly filled bionanocomposites from functionalized polysaccharide nanocrystals. *Biomacromolecules.* 2008; 9: 1974-80.
- 5- Jean B, Dubreuil F, Heux L, Cousin F. Structural details of cellulose nanocrystals/Polyelectrolytes multilayers probed by neutron reflectivity and AFM. *Langmuir.* 2008; 24: 3452-8.
- 6- Flauzino Neto WP, Silvério HA, Vieira JG, Alves HCS, Pasquini D, Assunção RMN, et al. Preparation and characterization of nanocomposites of carboxymethyl cellulose reinforced with cellulose nanocrystals. *Macromol. Symp.* 2012; 319: 93–8.
- 7- Silvério HA, Flauzino Neto WP, Dantas NO, Pasquini D. Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from corncob for application as reinforcing agent in nanocomposites. *Ind Crops Prod.* 2013; 44: 427-36.
- 8- Flauzino Neto WP, Silvério HA, Dantas NO, Pasquini D. Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from agro-industrial residue Soy hulls. *Ind Crops Prod.* 2013; 42: 480-8.
- 9- Silvério HA, Flauzino Neto WP, da Silva ISV, Rosa JR, Pasquini D, Assunção RMN, et al. Mechanical, thermal, and barrier properties of methylcellulose/cellulose nanocrystals nanocomposites. *Polímeros.* 2014; 24: 683-8.

*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>

- 10- Flauzino Neto WP, Mariano M, da Silva ISV, Silvério HA, Putaux J, Otaguro H, et al. Mechanical properties of natural rubber nanocomposites reinforced with high aspect ratio cellulose nanocrystals isolated from soy hulls. *Carbohydr Polym.* 2016; 153: 143-52.
- 11- Flauzino Neto WP, Putaux J, Mariano M, Ogawa Y, Otaguro H, Pasquini D, et al. Comprehensive morphological and structural investigation of cellulose I and II nanocrystals prepared by sulphuric acid hydrolysis. *RSC Adv.* 2016; 79: 76017-27.
- 12- de Castro DO, Bras J, Gandini A, Belgacem N. Surface grafting of cellulose nanocrystals with natural antimicrobial rosin mixture using a green process. *Carbohydr Polym.* 2016; 137: 1-8.
- 13- Fortunati E, Rinaldi S, Peltzer M, Bloise N, Visai L, Armentano I, et al. Nanobiocomposite films with modified cellulose nanocrystals and synthesized silver nanoparticles. *Carbohydr Polym.* 2014; 101: 1122–33.
- 14- Liu H, Liu D, Yao F, Wu Q. Fabrication and properties of transparent polymethylmethacrylate/cellulose nanocrystals composites. *Bioresour Technol.* 2010; 101: 5685-92.
- 15- Wang Y, Hua H, Li W, Wang R, Jiang X, Zhu M. Strong antibacterial dental resin composites containing cellulose nanocrystal/zinc oxide nanohybrids *J Dent.* 2019; 80: 23-9.
- 16- Moradian M, Nosrat Abadi M, Jafarpour D, Saadat M. Effects of bacterial cellulose nanocrystals on the mechanical properties of resin-modified glass ionomer cements. *Eur J Dent.* 2021; 15(02): 197-201.
- 17- Peres BU, Manso AP, Carvalho LD, Ko F, Troczynski T, Vidotti HA, Carvalho RM. Experimental composites of polyacrylonitrile-electrospun nanofibers containing nanocrystal cellulose. *Dent Mater.* 2019; 35: e286-e97.
- 18- Menezes-Silva R, de Oliveira BMB, Fernandes PHM, Shimohara LY, Pereira FV, Borges AFS, Buzalaf MAR, Pascotto RC, Sidhu SK, de Lima Navarro MF. Effects of the reinforced cellulose nanocrystals on glass-ionomer cements. *Dent Mater.* 2019; 35: 564-573.
- 19- Chen S, Yang J, Jia YG, Lu B, Ren L. A study of 3D-Printable reinforced composite resin: PMMA modified with silver nanoparticles loaded cellulose nanocrystal. *Materials (Basel).* 2018; 11: 2444.

- 20- Jaiswal P, Pande N, Banerjee R, Radke U. Effect of repeated microwave disinfection on the surface hardness of a heat-cured denture base resin: an in vitro study. *Contemp Clin Dent*. 2018; 9: 446-51.
- 21- Radford DR, Sweet SP, Challacombe SJ, Walter JD. Adherence of *Candida albicans* to denture-base materials with different surface finishes. *J Dent*. 1998; 26: 577-83.
- 22- Radford DR, Challacombe SJ, Walter JD. Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to denture-base materials in vivo and in vitro. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999; 10: 99-116.
- 23- Arendorf TM, Walker DM. Denture stomatitis: a review. *J Oral Rehabil*. 1987; 14: 217-27.
- 24- Moskona D, Kaplan I. Oral lesions in elderly denture wearers. *Clin Prev Dent*. 1992; 14: 11-4.
- 25- Nair RG, Samaranayake LP. The effect of oral commensal bacteria on candidal adhesion to denture acrylic surfaces. An in vitro study. *APMIS*. 1996; 104: 339–49.
- 26- Baena-Monroy T, Moreno-Maldonado V, Franco-Martínez F, Aldape-Barrios B, Quindós G, Sánchez-Vargas LO. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2005; 10: 27-39.
- 27- Ribeiro DG, Pavarina AC, Dovigo LN, Spolidorio DMP, Giampaolo ET, Vergani CE. Denture disinfection by microwave irradiation: a randomized clinical study. *J Dent*. 2009; 37: 666-72.
- 28- O'Donnell LE, Robertson D, Nile CJ, Cross LJ, Riggio M, Sherriff A, et al. The oral microbiome of denture wearers is influenced by levels of natural dentition. *PLoS One*. 2015; 10: e0137717.
- 29- Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res*. 2001; 80: 903-8.
- 30- Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol*. 2003; 11: 30-6.
- 31- Finkel JS, Mitchell AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat Rev Microbiol*. 2011; 9: 109-18.
- 32- Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J*. 2002; 78: 455-9.

- 33- Sánchez-Vargas LO, Estrada-Barraza D, Pozos-Guillen AJ, Rivas-Caceres R. Biofilm formation by oral clinical isolates of *Candida* species. *Arch Oral Biol*. 2013; 58: 1318-26.
- 34- Chadwick PR. Revised UK guidelines for the control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals. *Int J Antimicrob Agents*. 1999; 11: 89-91.
- 35- Morales DK, Hogan DA. *Candida albicans* interactions with bacteria in the context of human health and disease. *PLoS Pathog*. 2010; 6: e1000886.
- 36- Nair N, Biswas R, Götz F, Biswas L. Impact of *Staphylococcus aureus* on pathogenesis in polymicrobial infections. *Infect Immun*. 2014; 82: 2162-9.
- 37- Li H, Zhang C, Liu P, Liu W, Gao Y, Sun S. In vitro interactions between fluconazole and minocycline against mixed cultures of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol Immunol Infect*. 2015; 48: 655-61.
- 38- Minagi S, Miyake Y, Inagaki K, Tsuru H, Suginaka H. Hydrophobic interaction in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* adherence to various denture base resin materials. *Infect Immun*. 1985; 47: 11-4.
- 39- Horbett TA, Waldburger JJ, Ratner BD, et al. Cell adhesion to a series of hydrophilic-hydrophobic copolymers studied with a spinning disc apparatus. *J Biomed Mater Res*. 1988; 22: 383-404.
- 40- 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: 141-8.
- 41- Klotz SA, Drutz DJ, Zajic JE. Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces. *Infect Immun*. 1985; 50: 97-101.
- 42- Verran J, Maryan CJ: Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surface topography. *J Prosthet Dent*. 1997; 77: 535-9.
- 43- Zarb GA, Hobkirk J, Eckert S, Jacob R. Tratamento protético para pacientes edêntulos. 13.ed. St. Louis: Mosby/Elsevier; 2012. p. 1-27.
- 44- Peyton FA. History of resins in dentistry. *Dent Clin North Am*. 1975; 19(2): 211-22.
- 45- Meng TR, Latta MA. Physical properties of four acrylic denture base resins. *J Contemp Dent Pract*. 2005; 6: 93–100.
- 46- Alla R, Raghavendra KN, Vyas R, Konakanchi A. Conventional and contemporary polymers for the fabrication of denture prosthesis: part I – overview, composition and properties. *Int J Appl Dent Sci*. 2015; 1: 82–9.

- 47- Chau VB, Saunders TR, Pimsler M, Elfring DR. In-depth disinfection of acrylic resins. *J Prosthet Dent.* 1995; 74: 309-13.
- 48- Papadiochou S, Polyzois G. Hygiene practices in removable prosthodontics: A systematic review. *Int J Dent Hyg.* 2018; 16: 179-201.
- 49- Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, López-Ribot JL, Redding SW. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 98: 53-9.
- 50- Aoun G, Berberi A. Prevalence of chronic erythematous candidiasis in lebanese denture wearers: a clinico-microbiological study. *Mater Sociomed.* 2017; 29: 26-9.
- 51- Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15: 167-93.
- 52- Emami E, Taraf H, de Grandmont P, Gauthier G, de Koninck L, Lamarche C, et al. The association of denture stomatitis and partial removable dental prostheses: a systematic review. *Int J Prosthodont.* 2012; 25: 113-9.
- 53- Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L, et al. *Candida*-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011; 16: e139-43.
- 54- Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol.* 2001; 183: 5385-94.
- 55- Baena-Monroy T, Moreno-Maldonado V, Franco-Martínez F, Aldape-Barrios B, Quindós G, Sánchez-Vargas LO. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2005; 10: E27-39.
- 56- Pereira CA, Toledo BC, Santos CT, Pereira Costa AC, Back-Brito GN, Kaminagakura E, et al. Opportunistic microorganisms in individuals with lesions of denture stomatitis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013; 76: 419-24.
- 57- Kean R, Rajendran R, Haggarty J, Townsend EM, Short B, Burgess KE, et al. *Candida albicans* mycofilms support *Staphylococcus aureus* colonization and enhances miconazole resistance in dual-species interactions. *Front Microbiol.* 2017; 8: 258.

- 58-** Todd OA, Peters BM. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* pathogenicity and polymicrobial interactions: lessons beyond Koch's postulates. *J Fungi (Basel)*. 2019; 5: 81.
- 59-** Zainal M, Mohamad Zain N, Mohd Amin I, Ahmad VN. The antimicrobial and antibiofilm properties of allicin against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* - A therapeutic potential for denture stomatitis. *Saudi Dent J*. 2021; 33: 105-11.
- 60-** Meng TR, Latta MA. Physical properties of four acrylic denture base resins. *J Contemp Dent Pract*. 2005; 6: 93–100.
- 61-** Alla R, Raghavendra KN, Vyas R, Konakanchi A. Conventional and contemporary polymers for the fabrication of denture prosthesis: part I – overview, composition and properties. *Int J Appl Dent Sci*. 2015; 1: 82–9.
- 62-** Xu J, Li Y, Yu T, Cong L. Reinforcement of denture base resin with short vegetable fiber. *Dent Mater*. 2013; 29: 1273-9.
- 63-** Yu W, Wang X, Tang Q, Guo M, Zhao J. Reinforcement of denture base PMMA with ZrO(2) nanotubes. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2014; 32: 192-7.
- 64-** Wang W, Liao S, Zhu Y, Liu M, Zhao Q, Fu Y. Recent applications of nanomaterials in prosthodontics. *J Nanomater*. 2015; 2015: 1-11.
- 65-** Murthy HB, Shaik S, Sachdeva H, Khare S, Haralur SB, Roopa KT. Effect of reinforcement using stainless steel mesh, glass fibers, and polyethylene on the impact strength of heat cure denture base resin - an in vitro study. *J Int Oral Health*. 2015; 7: 71-9.
- 66-** Yoshida K, Takahashi Y, Hamanaka I, Kawaguchi T, Sasaki H, Shimizu H. Reinforcing effect of glass fiber-reinforced composite reinforcement on flexural strength at proportional limit of a repaired denture base resin. *Acta Biomater Odontol Scand*. 2015; 1: 81-5.
- 67-** Yoshida K, Takahashi Y, Sasaki H, Hamanaka I, Kawaguchi T. Flexural strengths of reinforced denture base resins subjected to long-term water immersion. *Acta Biomater Odontol Scand*. 2016; 2: 20-4.
- 68-** Gad M, ArRejaie AS, Abdel-Halim MS, Rahoma A. The reinforcement effect of nano-zirconia on the transverse strength of repaired acrylic denture base. *Int J Dent*. 2016; 2016: 7094056.

- 69-** Dhole RI, Srivatsa G, Shetty R, Huddar D, Sankeshwari B, Chopade S. Reinforcement of aluminum oxide filler on the flexural strength of different types of denture base resins: an in vitro study. *J Clin Diagn Res.* 2017; 11: ZC101-4.
- 70-** Gad MM, Fouda SM, Al-Harbi FA, Nöpänkangas R, Raustia A. PMMA denture base material enhancement: a review of fiber, filler, and nanofiller addition. *Int J Nanomedicine.* 2017; 12: 3801-12.
- 71-** Sasaki H, Hamanaka I, Takahashi Y, Kawaguchi T. Effect of reinforcement on the flexural properties of injection-molded thermoplastic denture base resins. *J Prosthodont.* 2017; 26: 302-8.
- 72-** Naji SA, Kashi TSJ, Behroozibakhsh M, Hajizamani H, Habibzadeh S. Recent advances and future perspectives for reinforcement of poly(methyl methacrylate) denture base materials: a literature review. *J Dent Biomater.* 2018; 5: 490–502.
- 73-** Chen S, Yang J, Jia YG, Lu B, Ren L. A study of 3D-Printable reinforced composite resin: PMMA modified with silver nanoparticles loaded cellulose nanocrystal. *Materials (Basel).* 2018; 11: 2444.
- 74-** Wang Y, Hua H, Li W, Wang R, Jiang X, Zhu M. Strong antibacterial dental resin composites containing cellulose nanocrystal/zinc oxide nanohybrids. *J Dent.* 2019; 80: 23-9.
- 75-** Gad MM, Al-Thobity AM, Rahoma A, Abualsaud R, Al-Harbi FA, Akhtar S. Reinforcement of PMMA denture base material with a mixture of ZrO₂ nanoparticles and glass fibers. *Int J Dent.* 2019; 2019: 2489393.
- 76-** Karci M, Demir N, Yazman S. Evaluation of flexural strength of different denture base materials reinforced with different nanoparticles. *J Prosthodont.* 2019; 28: 572-9.
- 77-** Wang J, Liu X, Jin T, He H, Liu L. Preparation of nanocellulose and its potential in reinforced composites: a review. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2019; 30: 919-46.
- 78-** Al-Thobity AM. The impact of polymerization technique and glass-fiber reinforcement on the flexural properties of denture base resin material. *Eur J Dent.* 2020; 14: 92-9.
- 79-** Kawaguchi T, Lassila LVJ, Baba H, Tashiro S, Hamanaka I, Takahashi Y, et al. Effect of cellulose nanofiber content on flexural properties of a model, thermoplastic, injection-molded, polymethyl methacrylate denture base material. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2020; 102: 103513.

- 80-** Rahaman Ali AAA, John J, Mani SA, El-Seedi HR. Effect of thermal cycling on flexural properties of microcrystalline cellulose-reinforced denture base acrylic resins. *J Prosthodont.* 2020; 29: 611-6.
- 81-** Moradian M, Nosrat Abadi M, Jafarpour D, Saadat M. Effects of bacterial cellulose nanocrystals on the mechanical properties of resin-modified glass ionomer cements. *Eur J Dent.* 2021; 15(2): 197-201.
- 82-** Bangera MK, Kotian R, N R. Effect of titanium dioxide nanoparticle reinforcement on flexural strength of denture base resin: a systematic review and meta-analysis. *Jpn Dent Sci Rev.* 2020; 56: 68-76.
- 83-** Zissis AJ, Polyzois GL, Yannikakis SA, Harrison A. Roughness of denture materials: a comparative study. *Int J Prosthodont.* 2000; 13: 136-40.
- 84-** International Organization for Standardization. ISO 1567: denture base polymers. 2nd ed. Geneva: ISO; 1998.
- 85-** Janssen D, De Palma 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.
- 86-** Compagnoni MA, Pero AC, Ramos SM, Marra J, Paleari AG, Rodriguez LS. Antimicrobial activity and surface properties of an acrylic resin containing a biocide polymer. *Gerodontology.* 2014; 31: 220-6.
- 87-** Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Effect of microwave postpolymerization treatment and of time of storage in water on the cytotoxicity of denture base and reline acrylic resins. *Quintessence Int.* 2009; 40: 93-100.
- 88-** Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. In vitro growth and analysis of *Candida* biofilms. *Nat Protoc.* 2008; 3: 1909-24.
- 89-** Flauzino Neto WP, Silvério HA, Dantas NO, Pasquini D. Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from agro-industrial residue-soy hulls *Ind Crops Prod.* 2013; 42: 480-8.
- 90-** Emmanouil JK, Kavouras P, Kehagias T. The effect of photo-activated glazes on the microhardness of acrylic baseplate resins. *J Dent.* 2002; 30: 7-10.
- 91-** Bollen CM, Lambrechts P, Quirynen M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. *Dent Mater.* 1997; 13: 258-69.

- 92-** da Silva WJ, Leal CM, Viu FC, Gonçalves LM, Barbosa CM, Del Bel Cury AA. Influence of surface free energy of denture base and liner materials on *Candida albicans* biofilms. *J Investig Clin Dent*. 2015; 6: 141-6.
- 93-** Zamperini CA, Machado AL, Vergani CE, Pavarina AC, Giampaolo ET, da Cruz NC. Adherence in vitro of *Candida albicans* to plasma treated acrylic resin. Effect of plasma parameters, surface roughness and salivary pellicle. *Arch Oral Biol*. 2010; 55: 763-70.
- 94-** Nikawa H, Jin C, Makihira S, Egusa H, Hamada T, Kumagai H. Biofilm formation of *Candida albicans* on the surfaces of deteriorated soft denture lining materials caused by denture cleansers in vitro. *J Oral Rehabil*. 2003; 30: 243-50.
- 95-** Sipahi C, Anil N, Bayramli E. The effect of acquired salivary pellicle on the surface free energy and wettability of different denture base materials. *J Dent*. 2001; 29: 197-204.
- 96-** Combe EC, Owen BA, Hodges JS. A protocol for determining the surface free energy of dental materials. *Dent Mater*. 2004; 20: 262-8.
- 97-** Minagi S, Miyake Y, Inagaki K, Tsuru H, Suginata H. Hydrophobic interaction in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* adherence to various denture base resin materials. *Infect Immun*. 1985; 47: 11-4.
- 98-** Radford DR, Challacombe SJ, Walter JD. Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to denture-base materials in vivo and in vitro. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999; 10: 99-116.
- 99-** Koch C, Bürgers R, Hahnel S. *Candida albicans* adherence and proliferation on the surface of denture base materials. *Gerodontology*. 2013; 30: 309-13.
- 100-** Pereira-Cenci T, Cury AA, Cenci MS, Rodrigues-Garcia RC. In vitro *Candida* colonization on acrylic resins and denture liners: influence of surface free energy, roughness, saliva, and adhering bacteria. *Int J Prosthodont*. 2007; 20: 308-10.
- 101-** Serrano-Granger C, Cerero-Lapiedra R, Campo-Trapero J, Del Río-Highsmith J. In vitro study of the adherence of *Candida albicans* to acrylic resins: relationship to surface energy. *Int J Prosthodont*. 2005; 18: 392-8.

- 102-** da Silva WJ, Seneviratne J, Samaranayake LP, Del Bel Cury AA. Bioactivity and architecture of *Candida albicans* biofilms developed on poly(methyl methacrylate) resin surface. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010; 94: 149-56.
- 103-** Al-Harbi FA, Abdel-Halim MS, Gad MM, Fouda SM, Baba NZ, AlRumaih HS, et al. Effect of nanodiamond addition on flexural strength, impact strength, and surface roughness of pmma denture base. *J Prosthodont*. 2019; 28: e417-25.
- 104-** Botega DM, de Souza Machado T, de Mello JA, Garcia RC, Del Bel Cury AA. Polymerization time for a microwave-cured acrylic resin with multiple flasks. *Braz Oral Res*. 2004; 18: 23-8.
- 105-** Paleari AG, Marra J, Pero AC, Rodriguez LS, Ruvolo-Filho A, Compagnoni MA. Effect of incorporation of 2-tert-butylaminoethyl methacrylate on flexural strength of a denture base acrylic resin. *J Appl Oral Sci*. 2011; 19: 195-9.
- 106-** Tyagi P, Mathew R, Opperman C, Jameel H, Gonzalez R, Lucia L, et al. High-strength antibacterial chitosan-cellulose nanocrystal composite tissue paper. *Langmuir*. 2019; 35: 104112.
- 107-** Silvério HA, Leite ARP, da Silva MDD, de Assunção RMN, Pero AC, Pasquini D. Poly (ethyl methacrylate) composites reinforced with modified and unmodified cellulose nanocrystals and its application as a denture resin. *Polymer Bull*. 2021. doi: 10.10071/s00289-021-03621-0

APÊNDICES

Tabela A1 – Dados referentes a variável rugosidade (Ra - μm)

ID	1ªocasião		2ªocasião		3ªocasião	
	Controle	NC	Controle	NC	Controle	NC
1	3,31	2,50	3,24	2,65	3,38	4,72
2	3,30	3,34	4,12	2,94	3,57	3,82
3	3,18	3,18	4,01	3,43	3,72	3,87
4	3,25	4,38	3,47	3,16	3,21	3,45
5	3,65	3,83	4,45	4,36	2,94	4,06
6	2,93	2,94	3,86	3,52	4,23	3,48
7	3,48	3,72	3,75	4,22	3,25	3,19
8	3,53	3,13	2,90	3,21	3,61	3,17
9	3,12	3,70	3,27	3,29	2,79	3,02
10	3,69	3,30	4,24	2,76	3,27	3,91
11	3,28	3,64	3,78	3,39	3,36	3,38
12	3,55	2,46	2,38	2,41	3,67	2,46
13	3,41	3,21	3,74	2,93	3,93	3,80
14	3,12	3,88	3,65	3,42	3,24	3,41
15	3,11	3,82	3,31	3,33	2,44	2,97
16	3,62	2,70	2,74	3,46	2,67	4,62
17	3,54	3,38	4,44	4,02	3,00	3,46
18	3,44	2,77	4,06	2,79	3,14	3,44
19	2,98	2,94	4,17	3,71	2,70	3,80
20	2,83	3,41	3,30	4,32	3,54	3,72
21	3,39	3,32	2,81	2,77	2,98	3,59
22	2,91	3,73	4,39	2,68	3,30	3,44
23	3,49	3,33	4,04	3,63	2,78	3,43
24	3,78	3,61	4,00	3,48	4,14	3,37
25	2,87	3,56	3,73	3,48	3,49	3,54
26	3,21	3,48	2,76	3,00	2,74	2,63
27	3,30	3,67	4,08	3,46	2,50	3,76
28	3,57	4,10	3,41	2,82	3,63	4,38
29	2,87	4,05	2,89	3,33	3,62	3,68
30	3,25	3,14	3,94	2,44	3,35	3,57
31	3,53	2,77	3,25	2,48	3,08	3,83
32	3,03	3,20	3,48	3,09	1,98	3,80
33	3,02	2,80	3,26	3,30	2,58	3,77
34	3,25	3,16	2,62	3,57	3,10	3,22
35	3,87	2,78	2,02	3,68	3,14	3,79
36	3,21	2,93	2,98	2,78	3,62	3,53
37	3,60	3,14	3,28	4,06	3,56	3,79
38	3,30	3,21	2,88	3,54	2,79	3,39
39	2,80	3,22	3,63	3,31	3,35	3,89
40	3,57	4,01	4,34	3,17	4,32	3,75

Fonte: Elaboração própria

Tabela A2 – Dados referentes a variável ELS (erg cm⁻²)

ID	1ªocasião		2ªocasião		3ªocasião	
	Controle	NC	Controle	NC	Controle	NC
1	46,52	45,53	36,38	52,17	42,89	39,27
2	37,63	42,37	42,02	40,58	41,63	38,25
3	42,05	42,19	40,63	38,75	38,17	43,15
4	44,95	49,25	37,52	42,33	41,71	39,40
5	44,75	36,85	36,26	40,99	39,42	37,74
6	42,45	45,10	41,42	45,79	42,30	35,39
7	39,67	33,62	39,92	46,46	47,48	47,20
8	40,54	40,34	40,26	42,56	48,09	36,78
9	37,01	41,30	35,36	39,78	44,28	43,35
10	31,83	39,02	37,71	45,23	44,11	41,95
11	33,81	37,92	40,26	36,81	40,48	39,66
12	24,33	39,42	42,29	38,85	38,14	39,98
13	36,74	47,88	35,42	42,34	38,58	40,79
14	38,74	41,19	38,06	42,06	48,58	43,48
15	43,23	42,07	41,32	43,27	45,83	40,94
16	43,21	36,47	37,21	38,14	42,40	38,62
17	36,71	47,08	39,10	46,35	41,45	40,92
18	41,59	42,10	37,79	43,94	41,12	36,62
19	32,31	33,55	35,62	41,57	38,08	43,71
20	36,00	43,77	38,89	40,67	37,44	39,55
21	35,55	39,69	36,86	44,29	38,73	57,04
22	45,72	37,51	40,43	42,57	50,35	40,81
23	37,70	33,17	43,16	42,59	48,68	36,90
24	37,16	38,02	44,42	46,75	43,29	37,59
25	36,68	36,58	44,52	44,81	46,78	39,97
26	39,88	34,74	37,70	47,16	44,55	38,67
27	48,37	43,73	39,06	39,57	35,75	39,53
28	35,68	39,19	42,51	47,54	37,92	40,25
29	36,78	42,86	39,31	38,62	44,84	39,81
30	42,79	43,13	41,84	37,64	45,78	44,33
31	37,78	35,83	44,02	40,86	38,92	36,96
32	37,32	36,09	39,09	41,34	44,92	38,57
33	45,44	28,99	45,89	46,78	42,22	39,79
34	35,70	29,64	48,87	39,64	45,66	38,66
35	42,41	38,57	43,19	44,90	43,65	38,04
36	43,90	37,86	38,88	44,64	43,25	40,28
37	38,43	42,21	35,49	40,93	43,61	38,96
38	37,96	41,75	35,80	38,14	45,17	41,08
39	43,70	37,33	45,58	43,65	41,00	38,34
40	31,67	34,52	44,68	42,61	46,13	43,16

Fonte: Elaboração própria

Tabela A3 - Dados referentes às absorvâncias determinadas pelo método XTT no estudo da adesão dos micro-organismos em biofilme simples e misto (*C. albicans* e *S. aureus*)

CP	ADESÃO (90 min)					
	<i>C. albicans</i>		<i>S. aureus</i>		<i>C. albicans</i> + <i>S. aureus</i>	
	Controle	NC	Controle	NC	Controle	NC
1	0,337	0,325	0,960	0,915	0,989	1,057
1	0,342	0,329	1,040	0,939	0,945	1,009
2	0,421	0,415	0,979	0,847	0,929	1,026
2	0,436	0,458	0,951	0,91	0,972	1,027
3	0,396	0,458	0,809	1,003	1,016	1,015
3	0,429	0,628	0,875	0,971	1,069	1,064
4	0,476	0,537	0,802	0,958	0,930	0,920
4	0,491	0,563	0,898	1,01	0,950	0,980
5	0,664	0,645	0,949	1,005	1,031	0,860
5	0,671	0,627	0,989	1,031	0,890	0,944
6	0,555	0,675	1,089	0,946	0,990	0,889
6	0,545	0,664	1,093	0,942	1,047	0,899
7	0,273	0,399	0,995	0,887	0,825	0,86
7	0,293	0,386	1,061	0,918	0,859	0,924
8	0,519	0,291	1,006	1,01	1,043	0,968
8	0,470	0,294	0,996	1	1,074	0,989
9	0,322	0,222	1,084	0,99	0,936	1,188
9	0,313	0,234	1,092	0,98	0,943	0,999

Fonte: Elaboração própria

Tabela A4 - Dados referentes às UFC/mL (Log10) no estudo da adesão dos micro-organismos em biofilme simples e misto (*C. albicans* e *S. aureus*), de acordo com os grupos avaliados (controle ou 0,75%NC)

CP	ADESÃO (90 min)							
	<i>C. albicans</i>		<i>S. aureus</i>		<i>C. albicans</i> + <i>S. aureus</i> (SDA)		<i>C. albicans</i> + <i>S. aureus</i> (BHI)	
	Controle	NC	Controle	NC	Controle	NC	Controle	NC
1	6,5	6,5	7,7	7,2	6,5	6,5	7,5	7,9
2	6,5	6,7	7,7	7,7	6,3	6,4	7,8	8,0
4	6,4	6,4	7,7	6,7	6,4	6,2	8,1	7,3
5	6,5	6,4	7,5	7,7	6,3	6,3	7,5	7,7
6	6,5	6,3	7,5	7,8	6,6	6,0	7,9	7,2
7	6,4	6,5	7,5	6,7	6,2	6,4	7,3	7,7
8	6,6	6,5	7,4	8,1	6,2	5,9	8,0	7,5
9	6,5	6,6	7,4	7,9	6,1	6,0	7,6	7,8

Fonte: Elaboração própria

Tabela A5 - Dados referentes às absorvâncias determinadas pelo método XTT no estudo da formação de biofilme simples e misto (*C. albicans* e *S. aureus*)

XTT BIOFILME (48 horas)					
<i>C. albicans</i>		<i>S. aureus</i>		Misto	
Controle	NC	Controle	NC	Controle	NC
0,92	0,653	1,131	0,968	0,859	0,977
0,88	0,736	1,22	0,947	0,934	0,989
0,886	0,988	1,052	0,614	0,891	0,804
0,973	1,046	1,137	0,609	0,913	0,777
1,184	0,774	1,093	0,933	0,786	0,807
1,276	0,874	1,242	0,996	0,835	0,886
0,601	0,935	0,722	0,47	0,814	0,802
0,647	0,894	0,75	0,492	0,861	1,156
0,838	0,788	1,095	0,625	0,91	0,689
0,857	0,721	1,14	0,641	0,9	0,706
0,926	0,88	0,84	0,887	0,843	0,778
0,94	0,91	0,844	0,889	0,816	0,8
0,717	0,779	0,74	0,874	0,858	0,994
0,757	0,81	0,949	1,009	0,913	0,91
0,575	0,79	0,896	1,056	0,972	1,04
0,816	0,901	0,953	1,064	0,992	0,94
0,766	0,998	0,881	1,12	0,845	0,98
0,697	0,999	0,811	1,258	0,809	1,04

Fonte: Elaboração própria

Tabela A6 - Dados referentes às UFC/mL (Log10) no estudo da formação de biofilme (*C. albicans* e *S. aureus*), de acordo com os grupos avaliados (controle e 0,75%NC)

CP	Biofilme (48 horas)							
	<i>C. albicans</i>		<i>S. aureus</i>		<i>C. albicans</i> + <i>S. aureus</i> (SDA)		<i>C. albicans</i> + <i>S. aureus</i> (BHI)	
	Controle	NC	Controle	NC	Controle	NC	Controle	NC
1	6,2	6,9	7,9	8,2	6,3	6,6	8,0	7,8
2	7,2	7,3	7,7	8,3	6,3	6,5	7,9	8,0
4	7,0	7,2	7,9	8,2	6,4	6,5	8,1	7,9
5	7,4	6,9	7,7	7,2	6,7	6,6	8,3	8,1
6	6,9	6,9	7,4	7,8	6,5	6,6	8,2	8,3
7	6,7	6,9	7,7	7,6	6,5	6,5	8,1	8,1
8	7,0	6,4	7,8	7,8	6,2	6,6	7,7	8,2
9	6,9	6,7	7,9	8,1	6,2	6,3	7,8	8,0

Fonte: Elaboração própria

ANEXO A
RESULTADOS PARCIAIS AUXÍLIO REGULAR 2017/26512-9

1- DUREZA SUPERFICIAL VICKERS

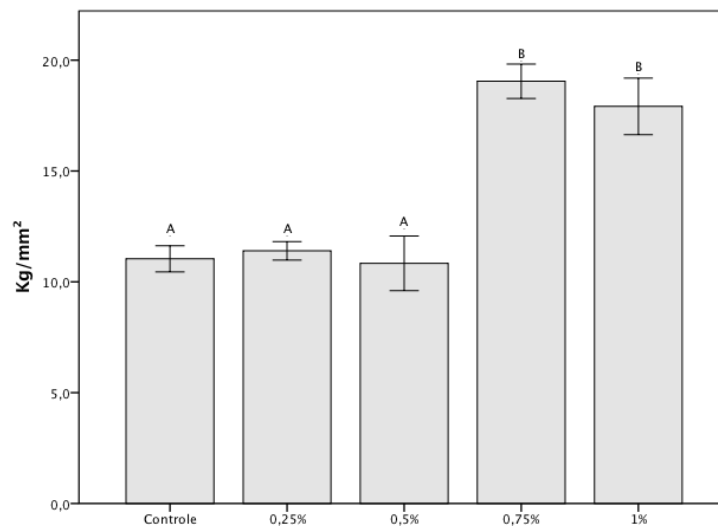
Tabela A1 - Sumário da análise de variância para avaliação das diferentes concentrações de NC, e suas interações sobre a dureza (Kg/mm²) da resina Onda-Cryl®.

Efeito	SQ	gl	QM	P
Grupos	663,765	4	165,941	0,000*
Resíduo	38,513	45	0,856	
Total	702,277	49		

* Significante (P < 0,05).

Fonte: Grupo de pesquisa da Prótese Total (Prof^a Dr^a Ana Carolina Pero)

Figura A1 - Valores médios e desvios-padrão da dureza superficial (Kg/mm²) para os grupos avaliados da resina Onda-Cryl®. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (Teste de Anova One-Way, Games Howell, p< 0,05)



Fonte: Grupo de pesquisa da Prótese Total (Prof^a Dr^a Ana Carolina Pero)

2- ESTABILIDADE DE COR

Tabela A2 - Sumário da análise de variância para avaliação das diferentes concentrações de NC, e suas interações sobre a estabilidade de cor (ΔE) da resina Onda-Cryl®

Efeito	SQ	gl	QM	P
Grupos	21,492	3	7,164	0,267*
Resíduo	188,101	36	5,225	
Total	209,593	39		

* Significante ($P < 0,05$).

Fonte: Grupo de pesquisa da Prótese Total (Prof^a Dr^a Ana Carolina Pero)

Os parâmetros médios de avaliação de cor ($L^*a^*b^*$), médias e desvios padrão de variações de cor ΔE e valores transformados em unidades NBS para a resina Onda-Cryl® podem ser observados na Tabela 3.

Tabela A3– Parâmetros médios de avaliação de cor ($L^*a^*b^*$), médias e desvios padrão de variações de cor ΔE e valores transformados em unidades NBS, de acordo com o grupo para a resina Onda-Cryl®

Grupo	L*	a*	b*	ΔE	NBS
0 (controle)	43,496	11,2875	4,966	---	---
0,25% NC	41,661	11,8215	5,9225	3,62 ($\pm 3,16$) A	3,33
0,5% NC	41,849	12,0765	6,332	2,18 ($\pm 2,33$) A	2,01
0,75% NC	40,9205	11,085	5,4805	2,21 ($\pm 1,54$) A	2,04
1% NC	40,9375	10,981	5,7815	1,65 ($\pm 1,77$) A	1,51

* Letras maiúsculas iguais representam semelhança estatística entre os grupos (Anova One-way, $\alpha > 0,05$).

Fonte: Grupo de pesquisa da Prótese Total (Prof^a Dr^a Ana Carolina Pero)

3- RESISTÊNCIA À FLEXÃO

Na Tabela 4 pode-se observar a estatística descritiva para a resina OC. Quanto à análise de variância da Tabela 5 observa-se que os fatores de variação estudados (diferentes concentrações de NC) exerceram influência sobre os resultados do ensaio para a resina OC ($P=0,022$). Na Figura 2 é possível observar que a concentração 1% de NC diminuiu

significamente a resistência a flexão e os demais grupos apresentaram-se semelhantes ao controle.

Tabela A4– Estatística descritiva da resistência a flexão (MPa) para resina Onda-Cryl®

Grupos	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
				Limite inferior	Limite superior		
Controle	85,5302	11,26966	6,50654	57,5348	113,5256	72,98	94,78
0,25%	66,4015	6,30759	3,64169	50,7325	82,0704	60,24	72,84
0,50%	62,1493	8,98184	5,18567	39,8372	84,4614	53,32	71,27
0,75%	65,1286	3,60637	2,08214	55,1699	73,0873	60,53	67,74
1%	57,6369	10,43995	6,02751	31,7026	83,5712	50,82	69,66
Total	67,1693	12,32883	3,18329	60,3418	73,9968	50,82	94,78

Fonte: Grupo de pesquisa da Prótese Total (Prof^a Dr^a Ana Carolina Pero)

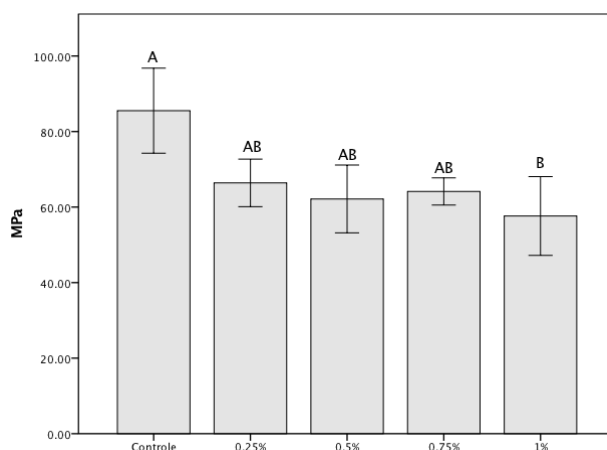
Tabela A5 - Sumário da análise de variância para avaliação das diferentes concentrações de NC, e suas interações sobre a resistência a flexão (MPa) da resina Onda-Cryl®

Efeito	SQ	GI	QM	P
Grupos				
	1389,076	4	347,269	0,022*
Resíduo				
	738,926	10	73,893	
Total				
	2128,002	14		

* Significante ($P < 0,05$).

Fonte: Grupo de pesquisa da Prótese Total (Prof^a Dr^a Ana Carolina Pero)

Figura A2. Valores médios e desvios-padrão da resistência a flexão (MPa) para os grupos avaliados da resina Onda-Cryl®. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (Teste de Anova One-Way, pós-teste de Bonferroni, $p < 0,022$).



Fonte: Grupo de pesquisa da Prótese Total (Prof^a Dr^a Ana Carolina Pero)

CONCLUSÃO

- 1- Houve aumento significativo da dureza Vickers da resina acrílica polimerizada por micro-ondas Onda-Cryl® após a incorporação de NC nas concentrações de 0,75% e 1%.
- 2- A estabilidade de cor para a resina Onda-Cryl® encontrou-se dentro dos parâmetros aceitáveis clinicamente ($\Delta E < 3,3$) nas concentrações de NC de 0,5%, 0,75% e 1%.
- 3- A resistência flexural foi estatisticamente semelhante ao grupo controle até a concentração de 0,75%.

ANEXO B – COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO CEP

The screenshot displays the 'Plataforma Brasil' interface. At the top, there is a header with the 'Saúde' logo and 'Ministério da Saúde'. Below this, the 'Plataforma Brasil' logo is visible, along with navigation buttons for 'Público', 'Pesquisador', and 'Alterar Meus Dados'. The user is identified as 'Ana Carolina Pero - Pesquisador | V3.2' and the session expires in 35 minutes and 40 seconds.

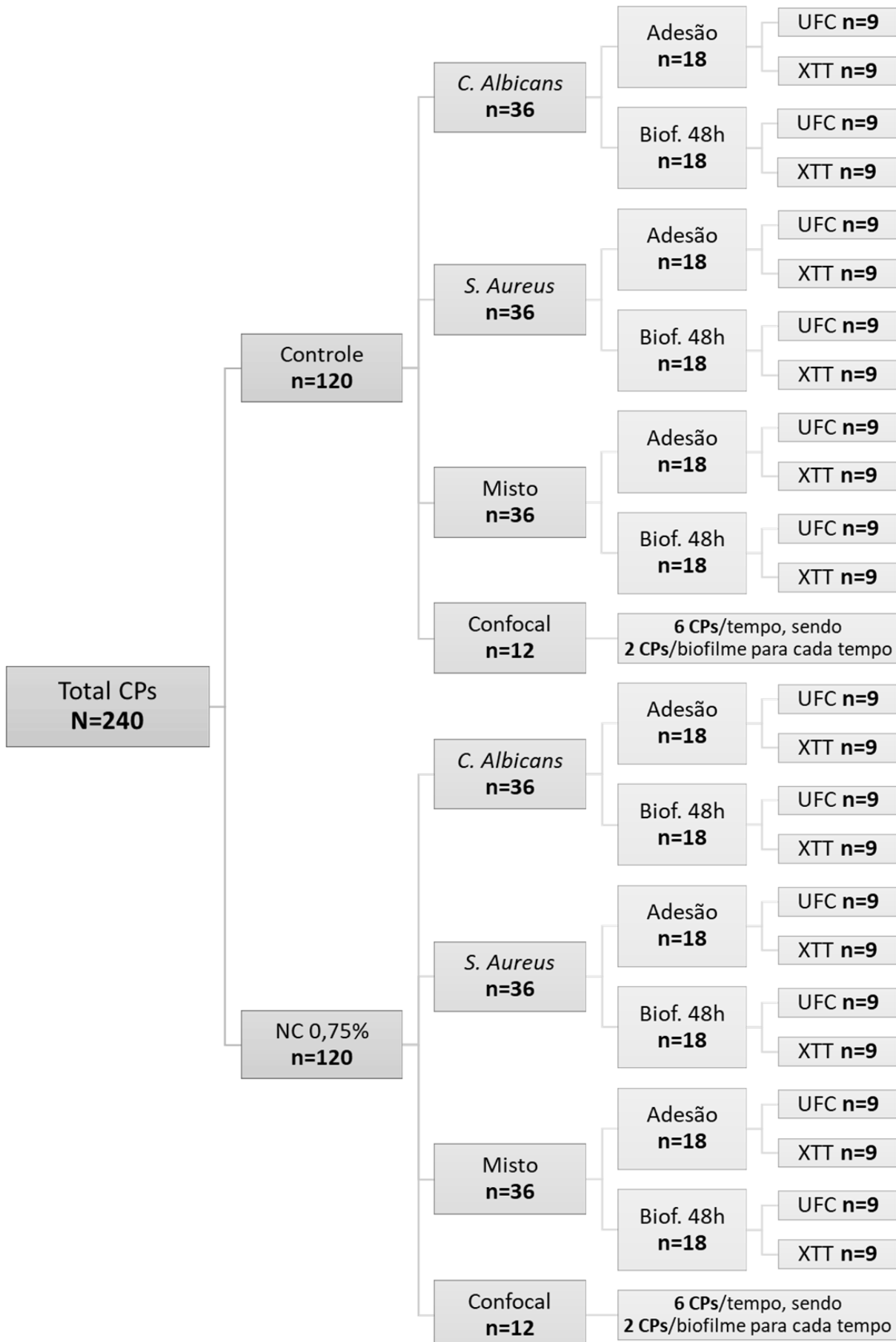
The main content area is titled 'DETALHAR PROJETO DE PESQUISA' and contains a section for 'DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA'. The details listed are:

- Título da Pesquisa:** Efeito da incorporação de nanocristais de celulose superficialmente modificados sobre a adesão e formação de biofilmes simples e misto de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* sensível a medicina (MMSA) em uma resina acrílica para base protética
- Pesquisador Responsável:** Ana Carolina Pero
- Área Temática:** Versão: 4
- CAAE:** 12932919.7.0000.5416
- Submetido em:** 26/08/2019
- Instituição Proponente:** Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP
- Situação da Versão do Projeto:** Aprovado
- Localização atual da Versão do Projeto:** Pesquisador Responsável
- Patrocínador Principal:** Financiamento Próprio

A circular stamp with the text 'COORDENADOR' and 'PLATAFORMA BRASIL' is overlaid on the right side of the details. At the bottom right, there is a link for 'Comprovante de Recepção' with a PDF icon and the filename 'PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_1305476'.

CAAE: 12932919.7.0000.5416

ANEXO C – FLUXOGRAMA DE DISTRIBUIÇÃO DOS CORPOS DE PROVA



Não autorizo a publicação deste trabalho até 27 de Maio de 2023.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 27 de Maio de 2021.

Thaís de Sousa Santana