

Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Centro de Ciências da Saúde

Faculdade de Odontologia

PROPRIEDADES DE SUPERFÍCIE E COLONIZAÇÃO
MICROBIOLÓGICA DE FOTOPOLÍMERO APLICADO À
MANUFATURA ADITIVA POR ESTEREOLITOGRAFIA A LASER

Ericles Otávio Santos

CD

Dissertação submetida ao corpo docente da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos, para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia (Ortodontia).

Rio de Janeiro

2021

**PROPRIEDADES DE SUPERFÍCIE E COLONIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA
DE FOTOPOLÍMERO APLICADO À MANUFATURA ADITIVA POR
ESTEREOLITOGRAFIA A LASER**

ERICLES OTÁVIO SANTOS, CD

Orientadora: Prof^a. Dr^a. AMANDA CUNHA REGAL DE CASTRO

**Dissertação submetida ao corpo docente da
Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do
Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos, para
obtenção do Título de Mestre em Odontologia
(Ortodontia).**

Comissão Examinadora:

**Prof. Dr. Antônio Carlos de Oliveira Ruellas
CD, MO, DO**

**Prof. Dr. Eduardo Franzotti Sant'Anna
CD, MO, DO**

**Prof^a. Dr^a. Aline Raybolt dos Santos
CD, MO, DO**

Rio de Janeiro

2021

Ficha catalográfica

SANTOS, Ericles Otávio.
Propriedades de superfície e colonização microbiológica de fotopolímero aplicado à manufatura aditiva por estereolitografia a laser. Rio de Janeiro: UFRJ/Faculdade de Odontologia, 2021.

xix, 39 f.

Dissertação: Mestrado em Odontologia (Ortodontia) – Universidade do Brasil – UFRJ, Faculdade de Odontologia, 2021.

- | | |
|--------------------------------|-----------------------------------------|
| 1. Tecnologias digitais | 2. Biomateriais |
| 3. Manufatura aditiva | 4. Características de superfície |

I Título

II Dissertação (Mestrado – UFRJ/Faculdade de Odontologia)

Linha de Pesquisa do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da UFRJ (Área de Concentração em Ortodontia): Físico-química e estrutura dos materiais biocompatíveis.

Plataforma Sucupira

Projeto: Aspectos moduladores da morfologia craniofacial, fisiologia do movimento dentário, diagnóstico e tratamento ortodônticos.

Comitê de Ética Nº Permissão: não se aplica.

DEDICO

À minha mãe, **Maria Vilma Santos**. Você é a pessoa mais forte que eu conheço, e se hoje cheguei até aqui, foi graças a você. Você sempre sobrepôs minha felicidade em detrimento da sua. Essa conquista é mais sua que minha. Te amo muito!

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao **meu pai** que, embora não seja biológico, é o melhor pai do mundo, dando os melhores conselhos e me apoiando, desde sempre, a ser quem eu realmente sou; e ao **meu irmão**, com quem tenho uma forte conexão, a qual nada é capaz de abalar, ainda que com nossas diferenças. Amo vocês dois.

Aos meus amigos. E, em especial, à **Daniela Claudino, Iracema Figueiredo e Tamiris Gonçalves**. Vocês sempre me apoiaram e ouviram minhas angústias nos momentos mais delicados da minha vida. Obrigado! Eu sempre estarei aqui para vocês. Amo vocês!

À **Thaís Araújo, Rafael Mérola, Carlos Eduardo Jourdan, Hevelize Jourdan, Maria Luzimar Claudino, Luiz Claudio Claudino, Célia Carvalho e Flaviana Silva**. Obrigado por tudo! Sem vocês, a caminhada teria sido demasiadamente mais árdua.

Aos meus amados amigos de turma, **Letícia Landeyara Dantas de Andrade Sant'Anna, Mariana Braz Herzog, Marina Bruder Câmara, Rafael Bittencourt, Sarah Sayão de Paula**, por terem alegrado meus dias, vibrando nas vitórias e lamentado nas dificuldades. Espero levá-los comigo pra sempre. Amo vocês!

Às amigas da turma 54, **Annanda Pinheiro Martins, Daniela Gomes Rezende de Azevedo, Luíza Trindade Vilela, Luísa Schubach da Costa Barreto, Taiane dos Santos Lopes e Thais Prates Vieira**, obrigado por terem me recepcionado tão bem! O início do curso foi mais tranquilo, graças a vocês!

Aos amigos da turma 56, **Joberth Rainer Baliza de Paula, Liris Cristina Nepomuceno Pinto, Marcelly Dias Silva, Mariana Fernandes Meirelles Azevedo, Michelleda Silveira Guimarães e Thalita Teixeira Santana**, que viveram comigo as complicações e incertezas nesses últimos

dois anos, advindas do período pandêmico, e por quem hoje tenho muito orgulho.

Aos amigos do doutorado, **Karoline de Melo Magalhães, Guido Artemio Marañon Vasquez, Kelly Galisteu Luiz, Sylvia de Araújo Paes Souza, Pedro Lima Emmerich Oliveira, Alice Spitz, Fernanda Blaudt Carvalho Marques, Johnny de Gawn, Ana Paula Tenório de Sá, Luciana Duarte Caldas e Teresa Cristina Pereira de Oliveira.** Um agradecimento especial à **Bruna Caroline Tomé Barreto**, que sempre se mostrou disponível para responder minhas dúvidas, mesmo nos mais diversos horários; e à **Katherine J. de C. M. P. Silver**, que trabalhou incansavelmente ao meu lado quando iríamos, inicialmente, realizar duas pesquisas experimentais com animais. Kathe, espero podermos trabalhar e conceber um *paper* junto, em um futuro breve.

Carolina Starling e Lílian Lima, muito obrigado por tudo que fizeram por mim. Desde a graduação vocês me acompanharam, desejando o meu sucesso. Tenho grande admiração por vocês amigas!

Aos meus **pacientes**, vocês foram extraordinários e sou muito grato à honra de ter conhecido cada um de vocês. Nossas relações foram, na maior parte dos casos, mais que apenas de dentista-paciente. Criei amizades que levarei para sempre.

Aos colegas pesquisadores **Pedro Lima Emmerich Oliveira, Thaís Pereira de Mello, André Luis Souza dos Santos e Carlos Nelson Elias**, que contribuíram significativamente para que este estudo pudesse ser realizado. Obrigado por toda dedicação. Nosso trabalho ficou lindo.

À minha querida orientadora, **Amanda Cunha Regal de Castro**. Embora seja muito nova, você é extremamente capacitada. Sou muito feliz por ter passado esse período sob sua supervisão, e espero que, em caso de haver novos projetos, você aceite seguir puxando minha orelha. Obrigado por tudo mesmo! E mande um agradecimento especial ao seu digníssimo marido e meu amigo, **Rodrigo Alves Regal de Castro**, que sempre torceu pelo meu sucesso.

Aos demais e excepcionais professores do Departamento de Ortodontia da UFRJ que cruzaram o meu caminho, **Profa. Dra. Ana Maria Bolognese, Prof. Dr. Antônio Carlos de Oliveira Ruellas, Prof. Dr. Eduardo Franzotti**

Sant'Anna, Prof. Eduardo Otero Amaral Vargas, Prof. Flávio de Mendonça Copello, Prof. José Fernando Stangler Brazzalle, Prof. Dr. Lincoln Issamu Nojima, Profa. Dra. Luciana Rougemont Squeff, Prof. Luiz Felipe Cardoso de Araújo, Profa. Dra. Margareth Maria Gomes de Souza, Profa. Dra. Matilde Gonçalves da Cunha Nojima, Profa. Dra. Mônica Tirre de Souza Araújo, Prof. Dr. Sérgio Luiz Mota Júnior, Prof. Dr. Rodrigo Lopes de Lima.

Aos funcionários, **Diane Esteves de Souza Gomes, Laís Paiva Monteiro, Mônica Mello do Nascimento Gonçalves, Guilhermino Estanhe Saturnino e Edinaldo da Silva**, pela ajuda, conversa, carinho, amizade e disponibilidade.

Aos **alunos da Disciplina de Ortodontia da graduação da UFRJ** do ano de 2020, que foram de extrema importância na minha formação como mestre. Através de uma convivência plena e agradável, foi um prazer transmitir meus conhecimentos a vocês e colocar em prática a arte de lecionar.

À **Profa. Dra. Lucianne Cople Maia de Faria** e a doutoranda **Karla Lorene de França Leite** por terem se disponibilizado e ajudado com a confecção dos corpos de prova.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela bolsa de estudos concedida, auxiliando na minha formação acadêmica e profissional. “O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.”

Serei sempre grato. A cada um de vocês!

"I dreamed it all ever since I was young
They said I wouldn't be nothing

...

Now I can scream that I made it (we made it!)
Now everyone, everywhere I go, they say 'gratulations'

CONGRATULATIONS - Post Malone feat. Quavo, 2016.

RESUMO

SANTOS, Ericles Otávio. **Propriedades de superfície e colonização microbiológica de fotopolímero aplicado à manufatura aditiva por estereolitografia a laser.** Orientadora: Dr^a. Amanda Cunha Regal de Casto. Rio de Janeiro: UFRJ/Faculdade de Odontologia, 2021. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Ortodontia) 39 f.

O presente estudo teve como objetivo avaliar, *in vitro*, as propriedades de superfície, colonização microbiológica e atividade antifúngica e antimicrobiana de espécimes confeccionados a partir de fotopolímeros para manufatura aditiva e resina acrílica autopolimerizante. A amostra foi composta por um total de 315 corpos de prova, alocados em três grupos (n=105): grupo controle (GC), confeccionado em acrílico autopolimerizante; e grupos experimentais constituídos por fotopolímeros de impressão 3D nas resoluções de 50µm (GE – 50) e 100µm (GE – 100). As características e rugosidade de superfície foram avaliadas através de microscópio eletrônico de varredura (MEV) e rugosímetro óptico, respectivamente. A análise microbiológica foi realizada, em triplicata, a partir dos parâmetros de biomassa, matriz extracelular e atividade metabólica do biofilme formado pelos microrganismos *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. Em seguida, a atividade antifúngica e antimicrobiana do fotopolímero em seu estado líquido, não polimerizado, foi avaliada durante o período de 48 horas pós incubação. A análise estatística foi realizada no programa SPSS por meio da análise de variância (ANOVA)

seguida dos pós testes de Tukey e Dunnett ($\alpha=0,05$). A análise das ultramicrografias, obtidas em MEV, mostraram uma superfície mais irregular nos grupos experimentais (GE-50 e GE-100). Os resultados da análise de rugosidade superficial indicaram que o GC se apresentou menor rugosidade superficial em relação a ambos os grupos experimentais, porém quanto a R3z, houve diferença significativa apenas entre os grupos GC e GE-100 ($P<0,05$). O GC apresentou maior produção de biomassa e matriz extracelular tanto para *S. mutans* quanto para *C. albicans* ($P<0,05$). Observou-se, também, maior atividade metabólica no GC para *S. mutans* ($P<0,05$). Não houve diferença dos grupos experimentais entre si ($P>0,05$). A resina para manufatura aditiva utilizada neste estudo demonstrou potencial para inibir o crescimento microbiano em seu estado líquido não diluído, por um período de 48h. Embora resinas para manufatura aditiva impressas em resoluções de 50 e 100 μ m apresentem maior rugosidade superficial e alterações de superfície, apontam menor crescimento microbiológico quando comparadas à resina autopolimerizante, indicando potencial antimicrobiano das resinas para manufatura aditiva.

SUMMARY

SANTOS, Ericles Otávio. **Propriedades de superfície e colonização microbiológica de fotopolímero aplicado à manufatura aditiva por estereolitografia a laser.** Orientadora: Dr^a. Amanda Cunha Regal de Casto. Rio de Janeiro: UFRJ/Faculdade de Odontologia, 2021. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Ortodontia) 39 f.

This study aimed to evaluate, in vitro, the surface properties, microbiological colonization and antifungal and antimicrobial activity of specimens made from photopolymers for additive manufacturing and self-curing acrylic resin. The sample consisted of a total of 315 specimens, divided into three groups (n=105): control group (CG), made of self-curing acrylic; and experimental groups consisting of 3D printing photopolymers at resolutions of 50µm (GE – 50) and 100µm (GE – 100). Surface characteristics and roughness were evaluated using a scanning electron microscope (SEM) and optical rugosimeter, respectively. The microbiological analysis was performed, in triplicate, from the parameters of biomass, extracellular matrix and metabolic activity of the biofilm formed by the microorganisms *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. Then, the antifungal and antimicrobial activity of the photopolymer in its liquid, unpolymerized state was evaluated during a period of 48 hours after incubation. Statistical analysis was performed using the SPSS program using analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey and Dunnett post tests ($\alpha=0.05$). The analysis of ultramicrographs, obtained by

SEM, showed a more irregular surface in the experimental groups (GE-50 and GE-100). The results of the analysis of surface roughness indicated that the GC had lower surface roughness in relation to both experimental groups, but as for R3z, there was a significant difference only between the GC and GE-100 groups ($P < 0.05$). The GC showed higher biomass and extracellular matrix production for both *S. mutans* and *C. albicans* ($P < 0.05$). A higher metabolic activity was also observed in the GC for *S. mutans* ($P < 0.05$). There was no difference between the experimental groups ($P > 0.05$). The additive manufacturing resin used in this study demonstrated the potential to inhibit microbial growth in its undiluted liquid state for a period of 48 hours. Although resins for additive manufacturing printed at resolutions of 50 and 100 μm have greater surface roughness and surface alterations, they point to lower microbiological growth when compared to self-curing resin, indicating an antimicrobial potential of resins for additive manufacturing.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CG	Grupo controle.
GE - 50	Grupo experimental resina 3D com resolução de 50 μm .
GE - 100	Grupo experimental resina 3D com resolução de 100 μm .
μm	Micrômetro.
mm	Milímetro.
n	Tamanho amostral.
rpm	Rotações por minuto.
Ra	Rugosidade média.
rms	Desvio médio quadrático.
R3z	Rugosidade média do 3º pico e vale.
BHI	<i>Brain Heart Infusion.</i>
μL	Microlitro.
CFU	Unidades formadoras de colônias.
MEV	Microscópio eletrônico de varredura.
UV	Ultravioleta.

LISTA DE FIGURAS

DELINEAMENTO DA PESQUISA		Página
Figura 1	Design dos corpos de prova. A: GC , grupo resina autopolimerizante; B: GE50 , grupo resina 3D com resolução de 50µm; C: GE100 , grupo resina 3D com resolução de 100µm	7
Figura 2	Design dos corpos de prova desenhados em open-source CAD software (Meshmixer v. 3.5, Autodesk, Inc, CA, USA), com orientação de 90°.....	8
Figura 3	Ilustração da técnica de manufatura aditiva por processamento digital de luz.....	8
Figura 4	(A) Moldeira em silicone de adição para confecção dos corpos de prova do grupo controle. (B) Panela de pressão negativa.....	9
Figura 5	Fotografia da máquina politriz (APL4, Arotec, Cotia, SP, Brasil).....	10
DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA - ARTIGO		Página
Figure 1	Representative SEM images of specimens from each group. A and D , CG - auto-polymerizing acrylic resin. B and E , EG-50, VP resin printed with 50 µm resolution. C and F , EG-100, VP resin printed with 100 µm resolution. Magnification: A - C , 400 µm; D - F , 100 µm.....	28
Figure 2	Three-dimensional surface morphology images obtained with a scanning white light interferometer (scan area: 40 µm ²) A : CG, auto-polymerizing acrylic resin; B : EG-50, VP resin printed with 50 µm resolution; C : EG-100, VP resin printed with 100 µm resolution.....	29

- Figure 3** Biofilm formation by *C. albicans* and *S. mutans* for 24, 48, and 72 h at 37°C. **A**, *C. albicans*. **B**, *S. mutans*. At each time point evaluated, the systems were processed to detect biomass by incorporating a crystal violet solution at 590 nm. Results are expressed as the mean \pm standard deviation of three independent replicates. *P<0.05..... 30
- Figure 4** Biofilm formation by *C. albicans* and *S. mutans* for 24, 48, and 72 h at 37°C. **A**, *C. albicans*. **B**, *S. mutans*. At each time point evaluated, the systems were processed to detect metabolic activity by reducing XTT in menadione by viable cells at 492 nm. Results are expressed as the mean \pm standard deviation of three independent replicates. *P<0.05..... 30
- Figure 5** Extracellular matrix in biofilm formed by *C. albicans* and *S. mutans* for 24, 48, and 72 h at 37°C. **A**, *C. albicans*. **B**, *S. mutans*. At each time point evaluated, the systems were processed to detect extracellular matrix by staining with safranin at 530 nm. Results are expressed as the mean \pm standard deviation of three independent replicates. *P<0.05..... 31

LISTA DE TABELAS

DELINEAMENTO DA PESQUISA		Página
Quadro 1	Acrílico auto polimerizante e resina para manufatura aditiva utilizadas no estudo.....	7
DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA - ARTIGO		Página
Table 1	Auto-polymerizing acrylic and VP additive manufacturing resins used in the study.....	28
Table 2	Descriptive statistics (mean and standard deviation) of the surface roughness analysis. Ra, mean roughness; rms, root mean square; R3z, mean roughness of the 3rd peak and valley. CG, acrylic resin group; EG - 50, VP resin printed with 50 µm resolution; EG - 100, VP resin printed with 100 µm resolution.....	29

INDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	PROPOSIÇÃO.....	5
3	DELINEAMENTO DA PESQUISA.....	6
3.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	6
3.1.1	FOTOPOLÍMERO APLICADO À MANUFATURA ADITIVA (GRUPO EXPERIMENTAL).....	7
3.1.2	RESINA ACRÍLICA AUTOPOLIMERIZANTE (GRUPO CONTROLE).....	9
3.2	AVALIAÇÃO TRIDIMENSIONAL DAS CARACTERÍSTICAS DE SUPERFÍCIE.....	10
3.2.1	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	10
3.2.2	RUGOSIDADE SUPERFICIAL.....	11
3.3	ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS	11
3.4	MICROORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO.....	12
3.4.1	QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA DO BIOFILME.....	12

3.4.2	QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE METABÓLICA DO BIOFILME.....	13
3.4.3	QUANTIFICAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR DO BIOFILME.....	13
3.5	TESTE DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIMICROBIANA.....	14
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	14
4	DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA	15
4.1	ARTIGO: SANTOS, E.O.; OLIVEIRA, P.L.E.; MELLO, T.P.; SANTOS, A.L.S.; ELIAS, C.N.; CASTRO, A.C.R.: Surface Characteristics and Microbiological Analysis of a Vat Photopolymerization Additive Manufacturing Resin. Artigo a ser submetido ao periódico Materials.....	15
5	CONCLUSÃO.....	34
6	RECOMENDAÇÕES.....	35
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

1 INTRODUÇÃO

A cavidade bucal é composta por uma comunidade de aproximadamente 700 microrganismos, embora, até então, sejamos capazes de cultivar e nomear apenas 54% destes (ZHANG et al. 2018; ARWEILER AND NETUSCHIL 2016).

Eles diferem-se entre mutualistas, simbióticos e patogênicos de diferentes espécies bacterianas, virais e fúngicas, capazes de coabitar em harmonia (ZHANG et al. 2018; MOSADDAD et al. 2019). Contudo, ao ocorrer um distúrbio que favoreça o crescimento e desenvolvimento dos microrganismos com potencial patogênico, doenças podem ser instaladas (MARCOTTE AND LAVOIE 1998; LEDERBERG AND MCCRAY 2001).

A doença cárie é um ótimo exemplo de patologia microbiota dependente, a qual requer um ambiente propício para sua manifestação (MARCOTTE AND LAVOIE 1998). Ela é considerada a patologia oral mais comumente encontrada e principal causa de dores e perdas dentárias, tendo *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) e *Lactobacillus* como os dois patógenos específicos mais estudados associados à doença, afetando o esmalte e dentina dos elementos dentários (CONRADS AND ABOUT 2018; SELWITZ, ISMAIL, AND PITTS 2007).

Além disso, infecções fúngicas que afetam não só a cavidade bucal, mas também a orofaringe, podem ser encontradas com facilidade quando há

distúrbios na homeostase local. A candidíase oral apresenta alta prevalência, sendo os microrganismos do gênero *Candida spp* responsáveis por tais infecções, e, tendo majoritária presença de *Candida albicans* (PANKHURST 2013; GARCIA-CUESTA, SARRION-PÉREZ, AND BAGÁN 2014).

Em ambos os casos é necessário que haja um desequilíbrio no meio bucal que propicie a atuação desses microrganismos (MARCOTTE AND LAVOIE 1998; CHEVALIER, RANQUE, AND PRECHEUR 2018), iniciando-se pela formação do biofilme, que pode ter sua morfologia variada a depender dos patógenos responsáveis pela sua formação e às condições em que estão sendo formados (ZIJNGE et al. 2010; RABIN et al. 2015).

Com isso, a introdução de materiais odontológicos restauradores ou protéticos ao ambiente bucal pode propiciar tal desequilíbrio, maximizando a formação do biofilme (HAO et al. 2018). E, recentemente, produtos confeccionados por meio de impressões tridimensionais (3D) têm ganhado força no meio Odontológico, sendo cada vez mais utilizados graças à facilidade na aquisição, processamento e manipulação das imagens obtidas por meio do processo de escaneamento intraoral (KIM et al. 2018; CAMARGO et al. 2018).

Dentre as diversas técnicas de impressão 3D, podemos citar a manufatura aditiva por processamento digital de luz (digital light processing, DLP), que é, segundo a norma ISO/ASTM 52900/15 (E), um processo de *vat photopolymerization (VP)*, onde o líquido fotopolimerizável é curado de forma seletiva pela ativação de uma luz (ASTM 2015).

A técnica DLP se baseia na polimerização dos fotopolímeros através da projeção do objeto que se quer imprimir por meio de um pequeno projetor ou

espelhos que exibem uma única imagem por vez, de cada camada a ser fotoativada, de modo que a resolução do item a ser impresso está diretamente ligada ao número de projetores e espelhos utilizados. Dessa forma, camadas sólidas de pequenos blocos cúbicos, denominados voxels, originam-se da interação da luz com a resina de origem, a cada ativação, até que o objeto esteja completamente formado (VOET et al. 2018; REVILLA-LEÓN AND ÖZCAN 2019; DAWOOD et al. 2015; SALMORIA et al. 2009; BORRELLO et al. 2018). Uma vez que o objeto em questão é impresso, ele se encontra no “estado verde”, pois embora seu formato final tenha sido atingido, a reação de polimerização não foi completada (REVILLA-LEÓN AND ÖZCAN 2019). É necessário que ele seja submetido ao processamento de pós cura, que consiste em secar e deixar a superfície da peça mais rígida e resistente. Tal etapa pode variar de acordo com o tipo de técnica e intensidade de luz aplicada, embora muito comumente seja utilizada a luz ultravioleta (UV) (REVILLA-LEÓN AND ÖZCAN 2019; FERNANDES, AHRENS, AND PIRES 2000; KLAUSS AND SALMORIA 2006).

Coroas e próteses dentárias, guias e componentes cirúrgicos, alinhadores e aparelhos ortodônticos, além de material didático para pesquisa e ensino já representam uma realidade decorrente da Odontologia digital (REVILLA-LEÓN AND ÖZCAN 2019; BHARGAV et al. 2018; JAVAID AND HALEEM 2019). Contudo, certos parâmetros precisam ser observados a fim de se obter os melhores resultados das técnicas de impressão aplicadas em Odontologia, a exemplo da espessura de cada camada fotoativada, design da base, e meios de pós processamento e armazenamento, os quais influenciam a precisão dos modelos odontológicos 3D (ETEMAD-SHAHIDI et al. 2020). Quanto à

resolução de impressão, Shim em 2020 (SHIM et al. 2020) e Unkovskiy em 2021 (UNKOVSKIY et al. 2021) demonstraram, em estudos *in vitro*, que maior acurácia é obtida quando as peças são impressas na orientação de 90°, em ambas as técnicas, estereolitografia à laser (SLA) e DLP. Por outro lado, Hada em 2020 (HADA et al. 2020), relatou que a impressão na orientação de 45° apresentou acurácia superior em relação às orientações de 0° e 90°.

Já no que diz respeito à biocompatibilidade e ação antimicrobiana frente a patógenos em potencial, fotopolímeros têm sido estudados (PALZA 2015; GONZÁLEZ-HENRÍQUEZ, SARABIA-VALLEJOS, AND RODRÍGUEZ HERNANDEZ 2019; LIN et al. 2020) quanto à capacidade antibacteriana proveniente de polímeros naturais (SULTAN et al. 2017) e inclusão de agentes ou fármacos antimicrobianos na matriz de polímeros sintéticos (VAN HENGEL et al. 2020; YUE et al. 2015; GARCIA et al. 2018). Em estudo recente, Shin e colaboradores (SHIM et al. 2020) demonstraram que a orientação de impressão também influencia a capacidade de colonização microbiológica, uma vez que níveis significativamente menores de *C. albicans* foram detectados em objetos impressos em orientação de 90°, quando comparados aos de 45 e 0°. Embora haja um crescimento exponencial na aplicação de resinas para manufatura aditiva na Odontologia, seu conhecimento acerca da comparação às resinas autopolimerizantes, que são amplamente utilizadas na confecção de dispositivos odontológicos, ainda é limitado, fundamentando-se, portanto, a motivação do presente estudo.

2 PROPOSIÇÃO

Analisar, *in vitro*, as propriedades de superfície, bem como a colonização microbiológica de espécimes confeccionados a partir de fotopolímero aplicado à manufatura aditiva, em resoluções de 50 e 100 μm ; e confeccionados a partir de resina acrílica autopolimerizante, considerando-se:

2.1 as características e rugosidade de superfície dos espécimes em função de sua composição;

2.2 as características e rugosidade de superfície dos espécimes confeccionados a partir de fotopolímero aplicado à manufatura aditiva, em função das resoluções de impressão de 50 e 100 μm ;

2.3 a colonização microbiológica a partir dos parâmetros de biomassa, matriz extracelular, e atividade metabólica da cinética de formação do biofilme de *C. albicans* e *S. mutans*; e

2.4 a capacidade antifúngica e antimicrobiana de fotopolímero aplicado à manufatura aditiva, em seu estado líquido, antes da fotopolimerização.

3 DELINEAMENTO DA PESQUISA

Trata-se de um estudo do tipo experimental, laboratorial investigativo, quantitativo e qualitativo, em modelo *in vitro*. A pesquisa foi realizada no Departamento de Odontopediatria e Ortodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, em parceria com o Laboratório de Investigação de Peptidases do Departamento de Microbiologia Geral do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, e com o Laboratório de Biomateriais do Instituto Militar de Engenharia do Rio de Janeiro.

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra do presente estudo foi composta por 315 corpos de prova com dimensões de 4 mm de diâmetro x 1 mm de altura, alocados em três grupos (n=105): grupo controle (GC), confeccionado em acrílico autopolimerizante; e grupos experimentais constituídos por fotopolímeros de manufatura aditiva nas resoluções de 50 μm (GE - 50) e 100 μm (GE - 100) (Quadro 1) (Figura 1).

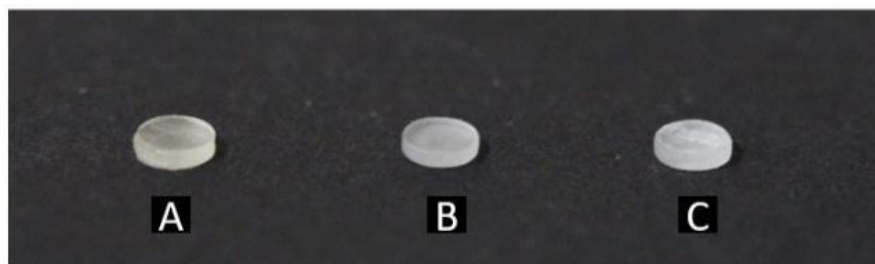


Figura 1. Design dos corpos de prova. **A:** GC, grupo resina autopolimerizante; **B:** GE50, grupo resina 3D com resolução de 50 μ m; **C:** GE100, grupo resina 3D com resolução de 100 μ m.

Produto	Componente	Fabricante
Acrílico autopolimerizante Ortho Class	Monômero Metil Metacrilato, DMT, Crosslink, Copolímero Metil Etil metacrilato	Clássico São Paulo, SP, Brasil
Resina para impressão 3D COSMOS Splint	Oligômeros, Monômeros, Fotoinciadores, Estabilizante, Pigmento	Yller Pelotas, RS, Brasil

Quadro 1. Acrílico auto polimerizante e resina para manufatura aditiva utilizadas no estudo.

3.1.1 FOTOPOLÍMERO APLICADO À MANUFATURA ADITIVA (GRUPO EXPERIMENTAL)

Os corpos de prova dos grupos experimentais foram desenhados em programa CAD open-source (Meshmixer v. 3.5, Autodesk, Inc, CA, EUA) (Figura 2), com orientação de impressão em 90 graus; e confeccionados em resina para manufatura aditiva (Cosmos Splint, Yller, Pelotas, RS, Brasil) em impressora 3D (PHOTON S, Anycubic 3D Printing, Shenzhen, Guangdong), pela tecnologia *digital light processing* (DLP/LCD) (Figura 3), com resoluções de impressão de 50 μ m (GE – 50) e 100 μ m (GE – 100). Os monômeros de superfície residuais nas amostras impressas em 3D foram removidos por meio de tecido embebido em álcool isopropílico. A etapa de pós-cura foi realizada de acordo com as

instruções do fabricante utilizando uma unidade de polimerização de luz UV. As estruturas de suporte dos espécimes foram removidas por meio de disco de carborundum acoplado em instrumento de baixa rotação de baixa rotação (Beltec, Araraquara, SP, Brasil).

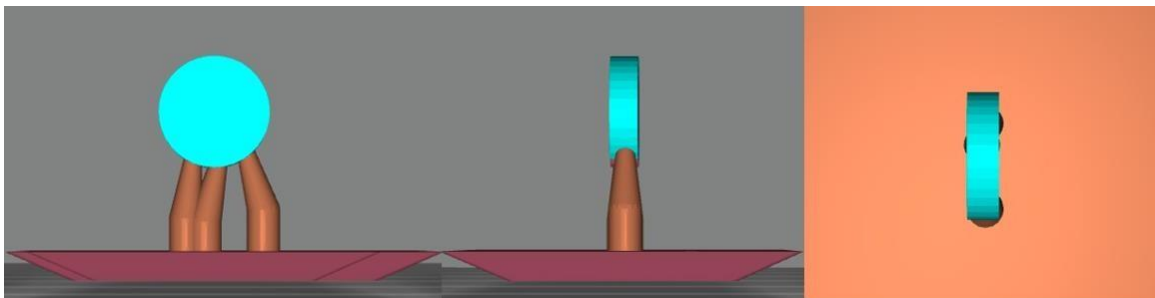


Figura 2. Design dos corpos de prova desenhados em open-source CAD software (Meshmixer v. 3.5, Autodesk, Inc, CA, USA), com orientação de 90°.

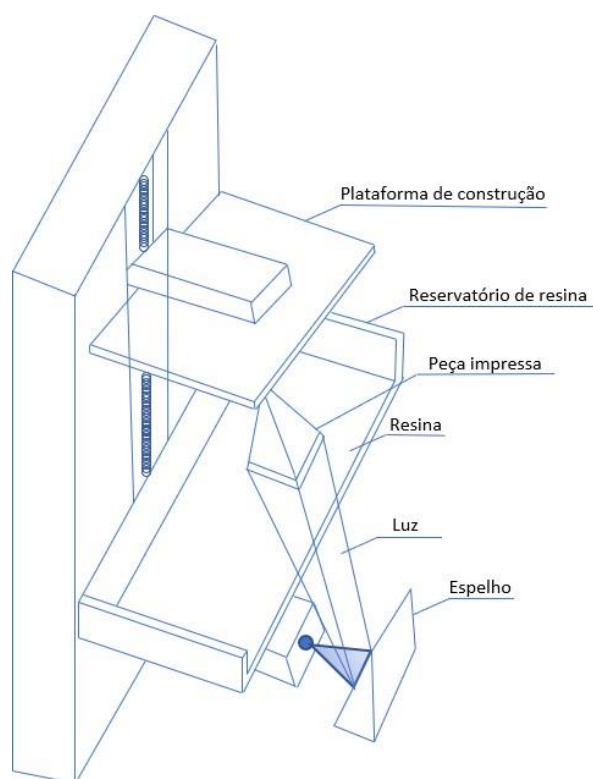


Figura 3. Ilustração da técnica de manufatura aditiva por processamento digital de luz.

3.1.2 RESINA ACRÍLICA AUTPOLIMERIZANTE (GRUPO CONTROLE)

Os espécimes do grupo controle (GC) (n=105) foram confeccionados em resina acrílica autopolimerizante incolor (OrtoClass, São Paulo-SP, Brasil) por um pesquisador calibrado (E.O.S.), respeitando as indicações do fabricante, com o auxílio de moldeira previamente confeccionada em silicone de adição (Figura 4A) (3M®, São Paulo-SP, Brasil).

Cada corpo de prova foi confeccionado individualmente, como proposto por Nealon em 1952 (NEALON 1952). Inicialmente, cada espécime apresentou as dimensões de 4 mm de diâmetro x 2 mm de altura no momento da acrilização, visto que ao fim do processo de acabamento eram obtidos corpos de prova com 4 mm de diâmetro x 1 mm de altura (PEDRINI, GAETTI-JARDIM JR., AND MORI 2001), nos quais, a altura foi verificada por meio de paquímetro digital (Starret Ind e Com. LTDA., Itú, São Paulo, Brasil). Os corpos de prova foram imersos em panela com pressão negativa (Protécni, Araraquara, SP, Brasil) (Figura 4B) durante o processo de acrilização para diminuir as chances do surgimento de eventuais bolhas.

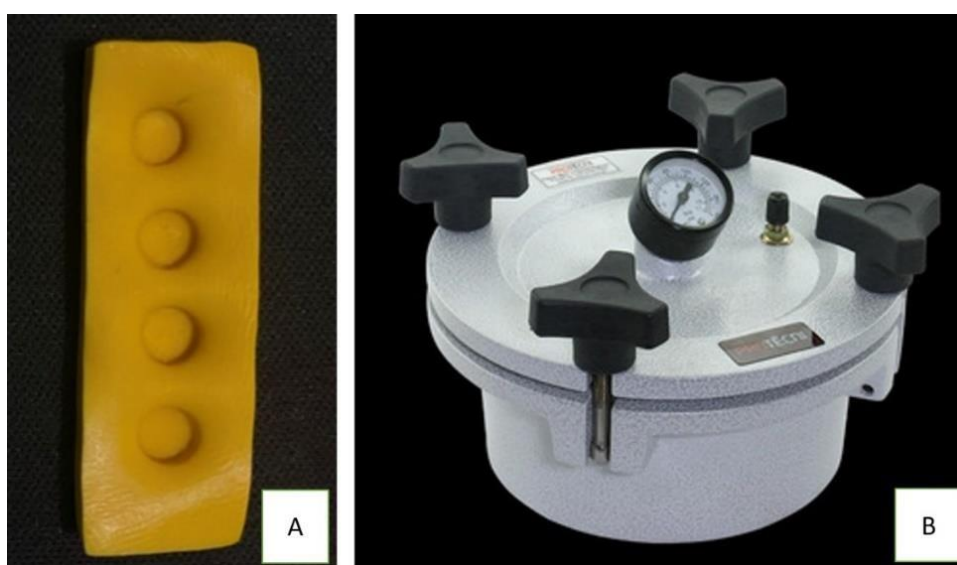


Figura 4. A, Moldeira em silicone de adição para confecção dos corpos de prova do grupo controle. **B,** Panela de pressão negativa.

Com objetivo de obter maior padronização dos corpos de prova ao final de suas confecções, tal refinamento foi realizado através da utilização, em ordem, de lixas de lixas d'água de granulação 400, 600 e 1200, em máquina Politriz metalográfica (APL4, Arotec, Cotia, SP, Brasil) (Figura 5) na velocidade de 300 rpm por 60 segundos a cada lixa, para cada corpo de prova (SANTOS et al. 2016).

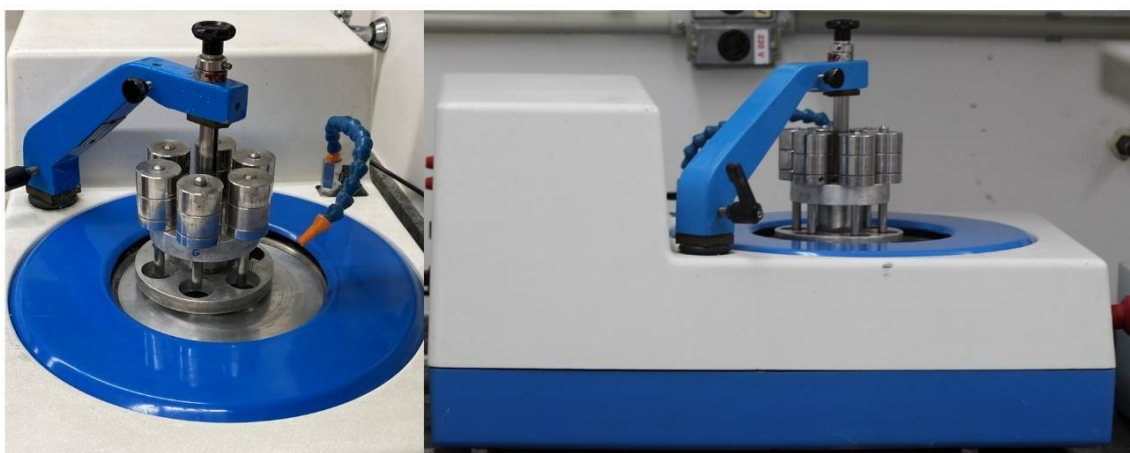


Figura 5. Fotografia da máquina Politriz utilizada na etapa de polimento (APL4, Arotec, Cotia, SP, Brasil).

3.2 AVALIAÇÃO TRIDIMENSIONAL DAS CARACTERÍSTICAS DE SUPERFÍCIE

3.2.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A análise da superfície de cada grupo foi realizada através de microscópio eletrônico de varredura (Quanta FEG 250, FEI, Eindhoven, Holanda), em magnificações de 100 e 400 μm . Para tal, os espécimes foram recobertos por partículas de ouro.

3.2.2 RUGOSIDADE SUPERFICIAL

A morfologia de superfície (3D) e rugosidade superficial foram avaliadas individualmente na região central de cada um dos espécimes dos grupos: GE - 50 μm (n=5), GE - 100 μm (n=5) e GC (n=5) através do rugosímetro óptico Zygo NewView 7100 (Zygo, Middlefield, CA, EUA), por meio da técnica de interferometria, utilizando lentes de aumento de 100 e 400x. Foram utilizados os parâmetros de rugosidade média (Ra), desvio médio quadrático (rms) e rugosidade média do 3º pico e vale (R3z).

A rugosidade média (Ra) é quantificada a partir da média aritmética dos valores absolutos das ordenadas de afastamento dos pontos do perfil de rugosidade em relação à linha média, dentro da área de medição; já o desvio médio quadrático (rms – *root mean square*) é definida como a raiz quadrada da média dos quadrados das ordenadas do perfil efetivo em relação à linha média dentro do percurso de medição, e por fim, a rugosidade média do 3º pico e vale (R3z) é obtida pela média aritmética dos valores de rugosidade parcial (3Zi) correspondentes a cada um dos cinco módulos.

3.3 ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

Previamente ao início dos experimentos microbiológicos, os espécimes foram submetidos à esterilização por luz ultravioleta (UV) por 30 minutos (YAGI et al. 2007) e, em seguida, armazenados em 5 microplacas de cultura celular com 96 poços cada (Kasvi®, São José dos Pinhais, Brasil). Dessa forma, cada espécime foi armazenado em um poço e as microplacas mantidas em estufa

(Quimis®, Diadema, Brasil) com temperatura controlada de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, mantendo-se dessa forma durante todo o período experimental.

3.4 MICROORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

A análise microbiológica foi realizada, em triplicata, em 100 amostras por grupo (Peeters, Nelis, and Coenye 2008). Os microrganismos utilizados no estudo foram *S. mutans* (ATCC 25175), *C. albicans* (ATCC 10231).

Para analisar a capacidade de formação de biofilme das espécies foram realizados ensaios em que 1×10^6 UFC (Unidades Formadoras de Colônias) de *S. mutans* e 1×10^6 leveduras de *C. albicans* foram disponibilizados para interação com os espécimes nos tempos de incubação de 24, 48 e 72 h a 37°C em meio BHI (*Brain Heart Infusion*). Os parâmetros de biomassa, atividade metabólica e matriz extracelular do biofilme foram avaliados conforme descrito abaixo.

3.4.1 QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA DO BIOFILME

As biomassas formadas pelos diferentes microrganismos foram avaliadas de acordo com o método descrito por Peeters em 2008 (PEETERS, NELIS, AND COENYE 2008). Os meios de cultura foram descartados e as biomassas foram fixadas com 100% de metanol (200 μL) por 15 min. Os sistemas foram secos à temperatura ambiente por 5 min e, posteriormente, foi adicionada uma solução contendo 0,4% de cristal violeta (200 μL) e as placas foram incubadas por 20 min. Em seguida, para retirar o excesso de corante, os sistemas foram novamente lavados com PBS. Posteriormente, as biomassas foram descoradas

com 30% de ácido acético (200 µL) por 5 min. A solução descorante (100 µL) foi transferida para outra placa de 96 poços e a absorbância foi mensurada a 590 nm em leitor de microplacas SpectraMax M3.

3.4.2 QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE METABÓLICA DO BIOFILME

A avaliação da atividade metabólica da biomassa microbiana formada após cada tempo de incubação foi avaliada através da redução do XTT. Aos poços foram adicionados uma solução de XTT na concentração final de 200 µg/mL e 0,04 mM de menadiona por 4h, na ausência de luz. Decorrido esse tempo, a mudança de coloração foi mensurada no leitor de microplacas SpectraMax M3 no comprimento de onda 492 nm (COSTA-ORLANDI et al. 2014).

3.4.3 QUANTIFICAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR DO BIOFILME

A quantificação da matriz extracelular foi realizada de acordo com o método descrito por CHOI em 2015 (CHOI, KANG, AND KIM 2015). Os meios de cultura foram descartados e, em seguida, foram adicionados aos poços uma solução contendo 0,1% de safranina (200 µL) à temperatura ambiente, por 5 min. Em seguida, para retirar o excesso de corante, os sistemas foram lavados com PBS. Posteriormente, a matriz extracelular foi descorada com 30% de ácido acético (200 µL) por 5 min. A solução descorante (100 µL) foi transferida para outra placa de 96 poços e a absorbância foi mensurada a 530 nm em leitor de microplacas SpectraMax M3.

3.5 TESTE DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIMICROBIANA

A atividade antifúngica e antimicrobiana do fotopolímero (Cosmos Splint, Yller, Pelotas, RS, Brasil), em seu estado líquido, não polimerizado foi avaliada nas concentrações de 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20 %, 10% e 0% diluídos em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) de acordo com as versões modificadas do CLSI M27-A3 para leveduras e CLSI M07-A9 (2012) para bactérias. A cada um dos poços (placa de 96 poços) foram adicionadas 1×10^3 leveduras de *Candida albicans* e 1×10^4 CFU (unidades formadoras de colônia) de *Streptococcus mutans*. Foram realizados os seguintes controles: (i) meio BHI puro, (ii) fotopolímero puro não polimerizado e (iii) meio BHI com microorganismos. A leitura visual das placas foi realizada após incubação a 37°C por 48h (INSTITUTE 2008; INSTITUTE 2012).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada no programa Statistical Package for the Social Science (SPSS versão 20.0, IBM, Chicago, Illinois, EUA). A aderência à curva normal foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Constatada a distribuição normal, a comparação dos dados da rugosidade superficial e análises microbiológicas, entre os grupos controle e experimental, foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) seguida dos pós-testes de Tukey e Dunnett. Em todas as análises, o nível de significância adotado foi de 5%.

4 DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA

4.1 ARTIGO

SANTOS, E.O.; OLIVEIRA, P.L.E.; MELLO, T.P.; SANTOS, A.L.S.; ELIAS, C.N.; CASTRO, A.C.R.: **Surface Characteristics and Microbiological Analysis of a Vat Photopolymerization Additive Manufacturing Resin**. Artigo a ser submetido ao periódico Materials.

Corresponding Author: Amanda Cunha Regal de Castro, Departamento de Odontopediatria e Ortodontia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Brazil. Avenida Professor Rodolpho Rocco, 325, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 21941-617. Phone Number: +55 21 3938-2014 / +55 21 3938-2015. Email: amandacunha@ortodontia.ufrj.br.

ABSTRACT

Surface characteristics and microbiological analysis of a vat photopolymerization (VP) resin, printed at resolutions of 50 μm (EG - 50) and 100 μm (EG - 100), was evaluated against an auto-polymerizing acrylic resin (CG). Surface characteristics were evaluated using a scanning electron microscope and a scanning white light interferometer. Biomass, extracellular matrix, and metabolic activity of biofilm formed by *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* were quantified in triplicates. Antifungal and antimicrobial activities of unpolymerized VP resin were evaluated. Intergroup comparisons were performed using the ANOVA followed by Tukey's and Dunnett's tests. EG - 50 and EG - 100 exhibited a more irregular and higher surface roughness ($P < 0.05$). CG presented a higher biomass and extracellular matrix production of *C. albicans* and *S. mutans* ($P < 0.05$). A higher metabolic activity of *S. mutans* was also observed in CG ($P < 0.05$). Unpolymerized VP resin, inhibited *C. albicans* and *S. mutans* growth over a 48h period. In spite of recording greater irregularity and higher surface roughness, VP resins demonstrated a clear resistance to *C. albicans* and *S. mutans* biofilm formation over CG and were not affected by the 3D-printing resolution. In addition, VP resin inhibited *C. albicans* and *S. mutans* growth in its pure, unpolymerized form.

1. INTRODUCTION

The oral cavity is constituted of more than 700 microorganisms, many of which are pathogenic and can benefit from changes in local homeostasis, such as *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*, responsible for caries and candidiasis, respectively [1, 2]. Thus, the introduction of restorative or prosthetic dental materials into the oral environment might provide such an imbalance, thereby maximizing biofilm formation [3]. Recently, products manufactured with three-dimensional (3D) printing have become popular in dentistry, being increasingly used due to the ease of acquisition, processing, and manipulation of images obtained through intraoral scanning [4, 5].

Among the various 3D printing techniques, additive manufacturing by digital light processing (DLP) is one of the first 3D printing processes, which is categorized according to ISO/ASTM 52900/15(E) as a vat photopolymerization (VP) process, wherein the photopolymerizable liquid is selectively cured by light activation [6]. The DLP technique is based on the polymerization of photopolymers by projecting the object to be printed through a small projector or mirrors that display a single image at one time. Each layer is photoactivated so that the resolution of the item to be printed is directly related to the number of projectors and mirrors used. That way, at each activation, solid layers of small cubic blocks, referred to as voxels, originate from the interaction of light with the resin of origin, until the object is completely formed [7-11].

Dental crowns and prostheses, surgical guides and components, orthodontic aligners and appliances, as well as courseware for research and teaching, represent a reality arising from digital dentistry [8, 12, 13]. However,

certain parameters need to be observed in order to obtain the best results from the printing techniques applied in dentistry, such as the thickness of each photoactivated layer, base design, post-processing, and storage media, which are influential factors of the accuracy of 3D dental models [14]. As for printing resolutions, Shim in 2020 [15] and Unkovskiy in 2021 [16] demonstrated, through in vitro studies, that greater accuracy is obtained when objects are printed in a 90° orientation in both stereolithography (SLA) and DLP techniques. Alternatively, Hada in 2020 [17] reported that the impression in a 45° orientation presented superior accuracy in relation to the 0° and 90° orientations.

With regard to biocompatibility and activity against potential pathogens, photopolymers have been studied [18-20] regarding the antibacterial capacity of natural polymers [21] and the addition of antimicrobial agents or drugs in the synthetic polymer matrix [22-24]. Shin et al. [15] recently demonstrated that print orientation also influences the microbiological colonization capacity, as significantly lower levels of *C. albicans* were detected on objects printed in a 90° orientation rather than 45° and 0°. Although there is an exponential growth in the application of additive manufacturing in dentistry, there is limited knowledge regarding the comparison of VP resins to auto-polymerizing acrylic resin systems, which are standardly applied to the manufacture of dental devices. Therefore, the present research focused on the investigation of a VP resin regarding surface characteristics, microbiological colonization, and antifungal/antimicrobial activities against an auto-polymerizing acrylic resin system, as the control. The null hypothesis of our study comprised: (1) the surface characteristics and biofilm formation by *C. albicans* and *S. mutans* of a VP resin for additive manufacturing will be similar to an auto-polymerizing acrylic resin, (2) 3D-printing resolution will

not affect the surface characteristics and microbiological colonization of VP resins, and (3) *C. albicans* and *S. mutans* growth will not be inhibited by VP resin.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

The sample of this study consisted of 300 specimens (4 mm in diameter × 1 mm in height), divided into three groups (n=100): control group (CG), constituted of auto-polymerizing acrylic resin, and experimental groups produced with VP additive manufacturing resin printed at resolutions of 50 µm (EG - 50) and 100 µm (EG - 100) (Table 1).

The CG was manufactured with an auto-polymerizing acrylic resin system (OrtoClass, São Paulo-SP, Brazil), by the same operator, with the aid of prefabricated molds of addition silicone (3M®, São Paulo, SP, Brazil), according to the manufacturer's recommendations. To reduce the chances of air bubbles occurrence, the specimens were fabricated by incremental build up technique and immersed in a pan with negative pressure (Protécni, Araraquara, SP, Brazil) during the polymerization phase. Then, the finishing of the specimens was performed sequentially using 400, 600, and 1200 gr sandpapers in a Politriz metallographic machine (APL4, Arotec, Cotia, SP, Brazil) at a speed of 300 rpm/60 s for each sandpaper per specimen [25].

Experimental groups, EG - 50 and EG - 100, specimens were designed using open-source CAD software (Meshmixer v. 3.5, Autodesk, Inc, CA, USA), with a 90° print orientation. 3D specimens were manufactured in resin for additive manufacturing (Cosmos Splint, Yller, Pelotas, RS, Brazil) in a 3D printer

(PHOTON S, Anycubic 3D Printing, Shenzhen, Guangdong), using digital light processing technology (DLP/LCD), with printing resolutions of 50 and 100 μm . The residual surface monomers on the 3D-printed specimens were cleaned using a wipe and isopropyl alcohol. Postpolymerization was performed in accordance with the manufacturer's instructions using a UV light polymerization unit (CureDen; DENTIS). The support structures were removed using low-speed rotary instruments (Beltec, Araraquara, SP, Brazil).

2.2. Analysis of surface characteristics

The surface analysis of each group was performed using a scanning electron microscope (Quanta FEG 250, FEI, Eindhoven, Netherlands) at magnifications of 100 and 400 μm . For this purpose, the specimens were coated with gold particles [15].

Morphology and surface roughness were evaluated in three samples per group, in duplicate, using a non-contact, three dimensional, scanning white light interferometer Zygo NewView 7100 (Zygo, Middlefield, CA, USA), using 20x magnification lenses. The mean roughness (Ra), root mean square (rms), and mean roughness of the 3rd peak and valley (R3z) were used, with an area of 40 μm^2 . The mean roughness (Ra) was quantified from the arithmetic mean of the absolute values and the ordinate distance of the points of the roughness profile in relation to the mean line within the measurement area. The root mean square (rms) deviation is defined as the square root of the mean of the ordinates' squares of the effective profile in relation to the mean line within the measurement path. Finally, the mean roughness of the 3rd peak and valley (R3z) is obtained by the

arithmetic mean of the partial roughness values ($3Z_i$) corresponding to each of the five modules.

2.3. Microbiological Analysis

Prior to the beginning microbiological analysis, the specimens were sterilized by ultraviolet (UV) light for 30 min [26] and then allocated to cell culture microplates with 96 wells each, (Kasvi®, São José dos Pinhais, Paraná, Brazil), wherein 1×10^6 *Candida albicans* yeasts and 1×10^6 colony-forming units (CFU) of *Streptococcus mutans* were added. The systems were kept in an oven (Quimis®, Diadema, Brazil) at a controlled temperature of $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ for 24, 48, and 72 h, in brain heart infusion (BHI). After each of the different timepoints, the resins were reallocated in new 96-well plates, and biomass, extracellular matrix, and metabolic activity were quantified in triplicates.

Biomass formed by different microorganisms was evaluated according to the method described by Peeters (2008) [27]. The culture media were discarded, and the biomass was fixed with 100% methanol (200 μL) for 15 min. The systems were dried at room temperature for 5 min, and then a solution containing 0.4% crystal violet (200 μL) was added, and the plates were incubated for 20 min. To remove excess dye, the systems were washed again with PBS. Subsequently, the biomass was decolorized with 30% acetic acid (200 μL) for 5 min. The bleach solution (100 μL) was transferred to another 96-well plate, and the absorbance was measured at 590 nm using a SpectraMax M3 microplate reader.

The extracellular matrix was quantified according to the method described by Choi in 2015 [28]. The culture medium was discarded, and a solution containing 0.1% safranin (200 μL) at room temperature was added to the wells

for 5 min. To remove excess dye, the system was washed with PBS. Subsequently, the extracellular matrix was decolorized with 30% acetic acid (200 μ L) for 5 min. The bleach solution (100 μ L) was transferred to another 96-well plate, and the absorbance was measured at 530 nm using a SpectraMax M3 microplate reader.

The metabolic activity of the microbial biomass formed after each incubation time was evaluated by reducing XTT. A solution of XTT at a final concentration of 200 μ g/ml and 0.04 mM of menadione was added to the wells for 4h, in the absence of light. After this time, the color change was measured using a SpectraMax M3 microplate reader at a wavelength of 492 nm [29].

2.4. Antifungal and antimicrobial activity testing

The antifungal and antimicrobial activities of unpolymerized VP resin were evaluated at concentrations of 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, and 0%, diluted in BHI medium according to modified versions of the CLSI M27-A3 and CLSI M07-A9 (2012) for yeasts and bacteria, respectively. To each of the wells (96-well plate), 1×10^3 yeasts of *C. albicans* and 1×10^4 CFU of *S. mutans* were added. The following controls were performed: (i) pure BHI medium, (ii) pure unpolymerized VP resin, and (iii) BHI medium with microorganisms. The plates were visually read after incubation at 37 °C for 48 h [30, 31].

2.5. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the Statistical Package for Social Science IBM SPSS software for Windows (version 20.0, SPSS Inc., Chicago,

Illinois, USA). Adherence to the normal curve was assessed with the Shapiro-Wilk test. After verifying the normal distribution, control and experimental groups comparisons of surface roughness and microbiological data was performed using the one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's and Dunnett's multiple comparisons tests, respectively. In all analyses, the significance level was set at 5%.

3. RESULTS

3.1. Surface characteristics

3.1.1 Scanning Electron Microscope (SEM)

SEM images of the auto-polymerizing acrylic and VP resin samples are illustrated in Figure 1. According to the analysis of the images, a flat but grooved surface was observed in the CG, with clear notches resulting from polishing sandpapers. A distinguishable corrugated and more irregular surface was noticed in the experimental groups (EG - 50 and EG - 100), which might be attributed to the photopolymers layers deposition process (Figure 1).

3.1.2 Surface Roughness

Surface roughness data are presented in Table 2. Intergroup comparisons indicated a statistically significant difference in all roughness parameters evaluated ($P < 0.05$). The experimental groups, EG - 50 ($R_a: 2.96 \pm 0.32 \mu\text{m}$; $rms: 4.05 \pm 0.43 \mu\text{m}$) and EG - 100 ($R_a: 3.76 \pm 0.58 \mu\text{m}$; $rms: 4.79 \pm 0.74 \mu\text{m}$), recorded the highest mean roughness and root mean square, compared to the control group ($R_a: 0.52 \pm 0.36 \mu\text{m}$; $rms: 0.84 \pm 0.54 \mu\text{m}$). As for R3z, a statistically

significant difference was observed only in EG – 100 compared to CG and (EG - 100: 58324.17 ± 4936.48 nm; CG: 31022.08 ± 16470.44 nm) (Table 2). Images of the three-dimensional morphology of the samples from each group are shown in Figure 2.

3.2. Quantification and kinetics of biofilm formation

The biomass, metabolic activity, and extracellular matrix data of the microorganisms *C. albicans* and *S. mutans* evaluated in the different study groups are presented in Figures 3, 4, and 5, respectively.

A significantly higher quantification of the biomass of *C. albicans* was observed in CG a in relation to EG - 100 at 72 h ($P < 0.05$). CG samples also presented statistically greater quantification of the biomass of *S. mutans* compared to experimental groups (EG - 50 and EG - 100) at 24h and 72h ($P < 0.05$), and to EG - 50 at 48h ($P < 0.05$) (Figure 3).

No significant differences were observed in the metabolic activity of *C. albicans* among the study groups. However, a statistically higher metabolic activity of *S. mutans* was observed in CG compared to EG - 50 and EG - 100 at 48h ($P < 0.05$), and in CG compared to EG - 50 at 72h ($P < 0.05$) (Figure 4).

CG presented a higher extracellular matrix production of biofilm formation by *C. albicans* in relation to EG - 50 and EG - 100 at 24 h ($P < 0.05$) and 48 h ($P < 0.01$). Also, biofilm formed by *S. mutans* recorded increased records of extracellular matrix production in CG compared to EG - 50 and EG - 100 at 24h ($P < 0.001$) and 72h ($P = < 0.001$) (Figure 5).

3.3. Antifungal and antimicrobial activity testing

Antifungal and antimicrobial activity testing indicated that, with the exception of pure unpolymerized VP resin (100%), all of the VP resin dilutions and control systems of BHI medium with microorganisms, presented *C. albicans* and *S. mutans* growth after a 48h incubation period at 37 °C.

4. DISCUSSION

The presence of *S. mutans* and *C. albicans* in the oral cavity does not indicate that the individual will develop caries and candidiasis, respectively, as other factors that trigger an imbalance in the environment need to be associated. However, high numbers of these microorganisms increase their pathogenicity [32, 33], starting with the formation of biofilm, which can vary depending on the microbes responsible for its formation and the conditions under which they are being formed [34, 35].

This in vitro study analyzed the surface characteristics of a VP resin for additive manufacturing, printed at resolutions of 50 and 100µm, in order to determine whether there would be a difference in surface characteristics and microbiological activity over an auto-polymerizing acrylic resin. This investigation directly implies in clinical practice, especially in the manufacture of intraoral devices, that usually remain for a long period in the oral cavity [36, 37].

The CG (auto-polymerizing acrylic resin) presented a surface with fewer irregularities and lower roughness than the experimental groups, EG - 50 and EG - 100. The literature shows that rougher surfaces have greater microbiological growth owing to the facilitation of the formation of acquired biofilm and development [38, 39]. From the analysis of the images obtained with a scanning

electron microscope (Figure 1) and by the scanning white light interferometer (Figure 2), it was possible to observe the surface grooves caused by the sequential finishing with the sandpaper strips and the printing streaks by the deposition of each layer in the additive manufacturing technique in the control and experimental groups, respectively. Conversely, despite the smoother surface, CG exhibited increased biofilm formation by *C. albicans* and *S. mutans* than EG - 50 and EG - 100.

Bacteria have cell membranes formed by phospholipids and teichoic acids with a negative net surface charge. Therefore, photopolymers with positively charged functional groups tend to interact better with the cell wall of these microorganisms than those with neutral or negatively charged functional groups [19]. We believe that this difference in our findings may be linked to the energy and surface charge of photopolymers for additive manufacturing, negatively influencing the process of colonization and growth of microorganisms [3, 40]. Another factor that may have influenced bacterial colonization is the orientation of the object at the time of photopolymer printing. In 2020, Shim [15] demonstrated that objects printed with a 90° orientation, as well as those printed in this study, had significantly lower levels of colonization by *C. albicans* than those printed at 0° and 45°. In addition, 90° printing was chosen because it allowed less contact with the supporting pillar of the specimen during the printing process, and therefore, caused less interference on the specimens surface.

Furthermore, the potential of microbiological growth inhibition by the photopolymers should be highlighted. Since Steiner and collaborators [41] presented their discoveries of peptides fighting both gram-positive and gram-negative bacteria, as well as fungi, in 1981, these proteins have been employed

in polymeric structures. A common feature is the combination of amino acids with polar and non-polar side chains, leading to amphiphilic structures in these peptides [19]. The photopolymer evaluated in the present study, inhibited the growth of *S. mutans* and *C. albicans* in its pure undiluted form, for a period of 48h. Thus, the antifungal and antimicrobial potential of photopolymers would be crucial in dentistry as regard the manufacturing of prostheses and orthodontic retainers, for example.

However, the photopolymer ability to inhibit microbiological growth was observed only in its pure form, without any dilution. Once diluted, even at the lowest concentration of BHI (90% photopolymer and 10% BHI), allowed the microorganisms growth, indicating that photopolymer component with antifungal and antimicrobial properties is soluble and loses potential of action when in contact with the BHI medium. Therefore, we suggest an investigation on the possible components responsible for inhibiting microorganisms growth in their undiluted form, and why it is lost when in contact with the BHI medium. It is also suggested that further studies be carried out for testing the antifungal and antimicrobial activity of photopolymers for a longer period.

5. CONCLUSIONS

Within the limitation of this in vitro study, in spite of recording greater irregularity and higher surface roughness, VP resins for additive manufacturing demonstrated a clear resistance to *C. albicans* and *S. mutans* biofilm formation over auto-polymerizing acrylic resin. Surface characteristics and microbiological colonization VP resins were not significantly affected by the 3D-printing resolution in layer thickness of 50 and 100 μm . In addition, VP resin inhibited *C. albicans*

and *S. mutans* growth in its pure, unpolymerized form, for an incubation period of 48 h.

TABLES

Table 1. Auto-polymerizing acrylic and VP additive manufacturing resins used in the study.

Product	Component	Manufacturer
Auto-polymerizing acrylic resin system Ortho Class	Methyl Methacrylate Monomer, DMT, Crosslink, Methyl Ethyl Methacrylate Copolymer	Clássico São Paulo, SP, Brazil
3D printing resin COSMOS Splint	Oligomers, Monomers, Photoinitiators, Stabilizer, Pigment	Yllor Pelotas, RS, Brazil

Table 2. Descriptive statistics (mean and standard deviation) of the surface roughness analysis.

Groups	Ra (μm)	P-value	rms (μm)	P-value	R3z (nm)	P-value
CG	0.52 ± 0.36 <i>a</i>		0.84 ± 0.54 <i>a</i>		31022.08 ± 16470.44 <i>a</i>	
EG-50	2.96 ± 0.32 <i>b</i>	<0.001	4.05 ± 0.43 <i>b</i>	<0.001	53966.22 ± 6866.32 <i>ab</i>	0.042
EG-100	3.76 ± 0.58 <i>b</i>		4.79 ± 0.74 <i>b</i>		58324.17 ± 4936.48 <i>b</i>	

FIGURES

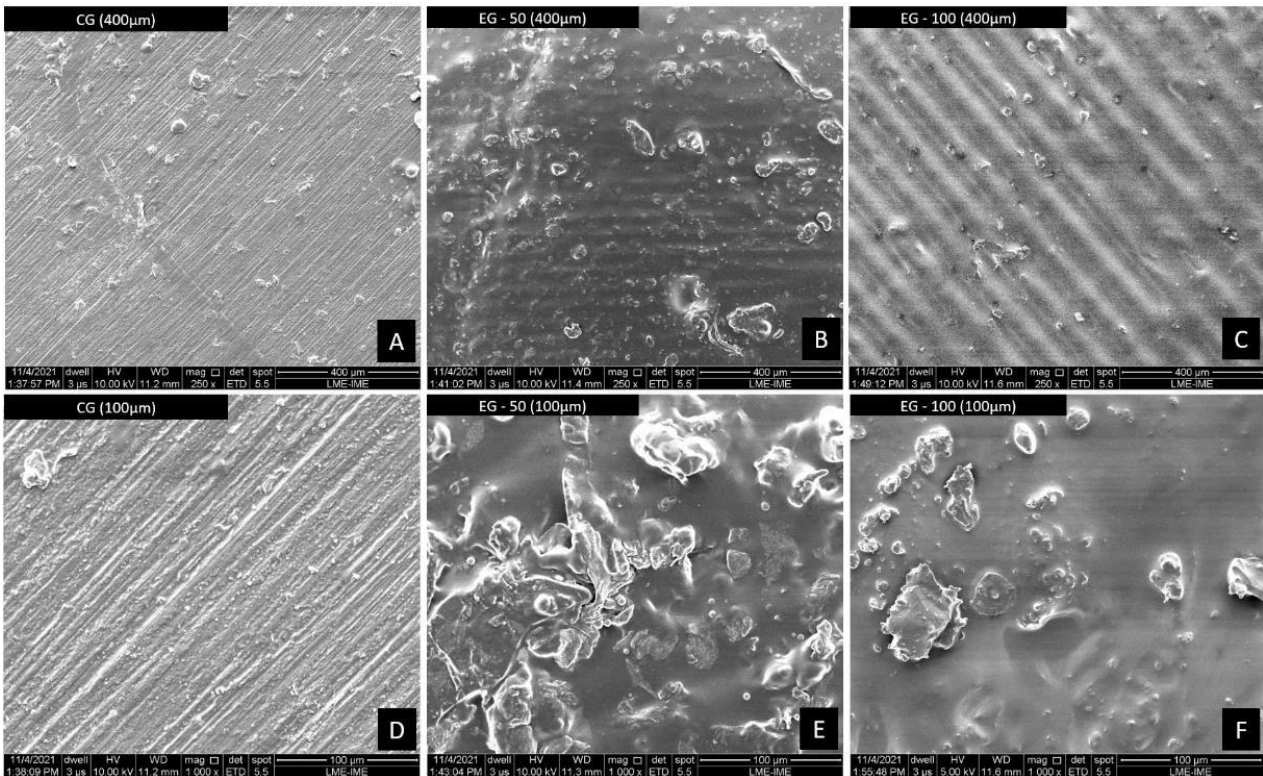


Figure 1. Representative SEM images of specimens from each group. **A and D**, CG - auto-polymerizing acrylic resin. **B and E**, EG-50, VP resin printed with 50 μm resolution. **C and F**, EG-100, VP resin printed with 100 μm resolution. Magnification: **A – C**, 400 μm ; **D – F**, 100 μm .

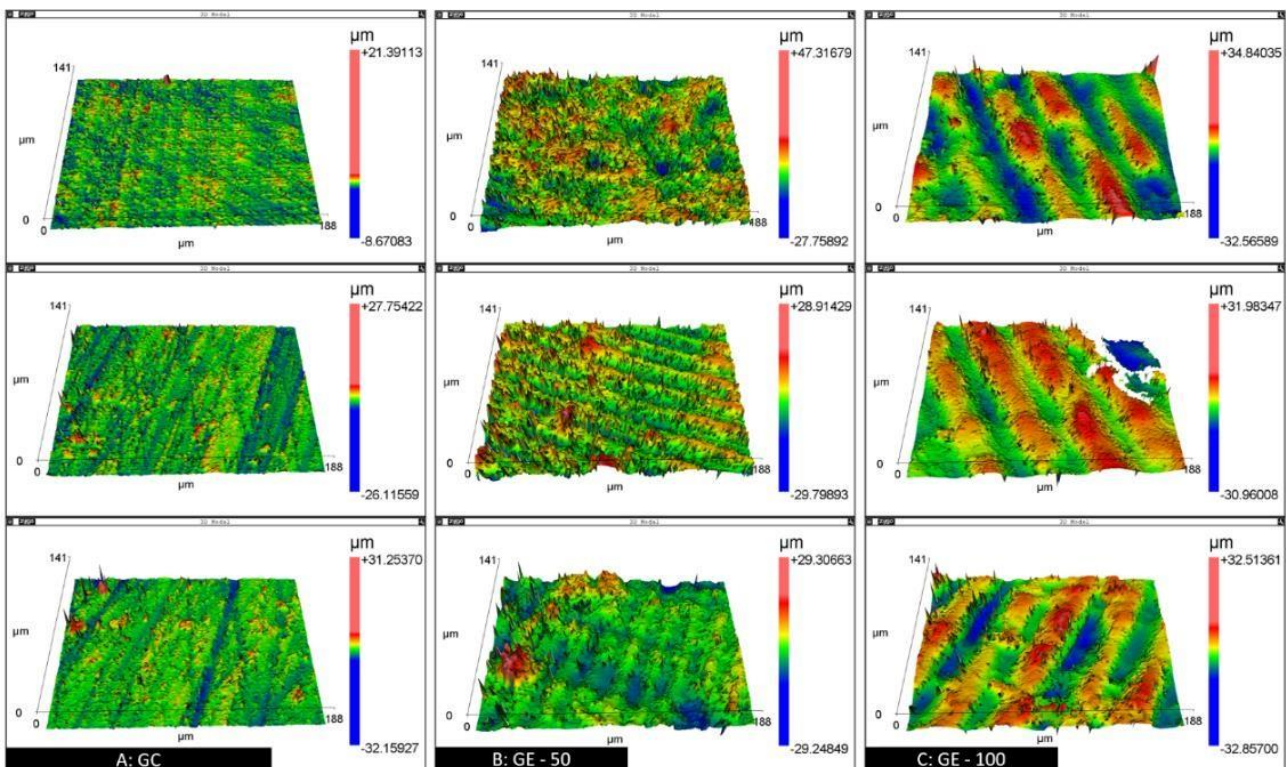


Figure 2. Three-dimensional surface morphology images obtained with a scanning white light interferometer (scan area: 40 μm^2) **A**: CG, auto-polymerizing acrylic resin; **B**: EG-50, VP resin printed with 50 μm resolution; **C**: EG-100, VP resin printed with 100 μm resolution.

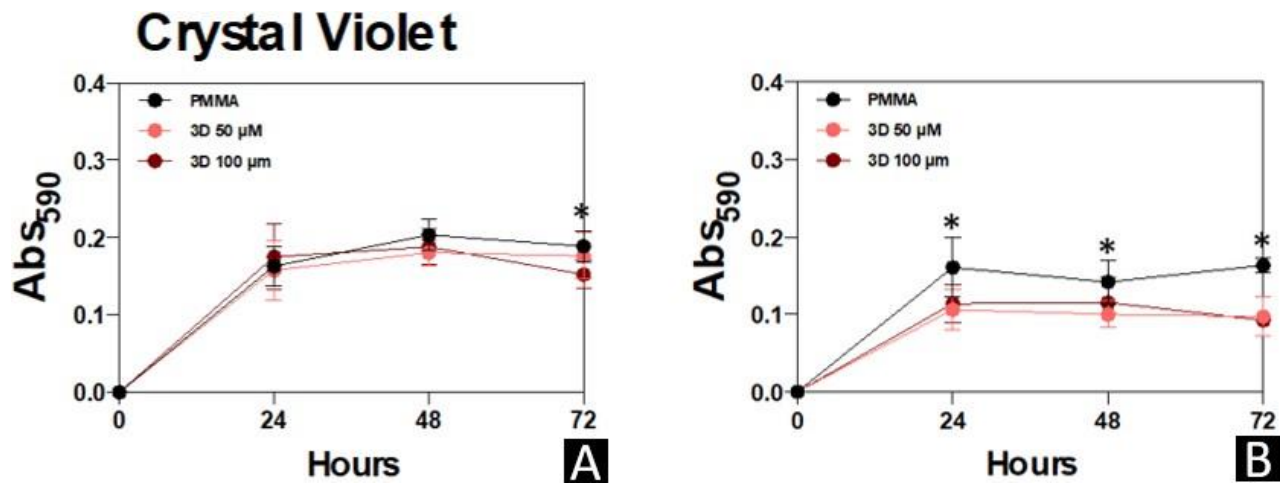


Figure 3. Biofilm formation by *C. albicans* and *S. mutans* for 24, 48, and 72 h at 37°C. **A**, *C. albicans*. **B**, *S. mutans*. At each time point evaluated, the systems were processed to detect biomass by incorporating a crystal violet solution at 590 nm. Results are expressed as the mean \pm standard deviation of three independent replicates. * $P < 0.05$.

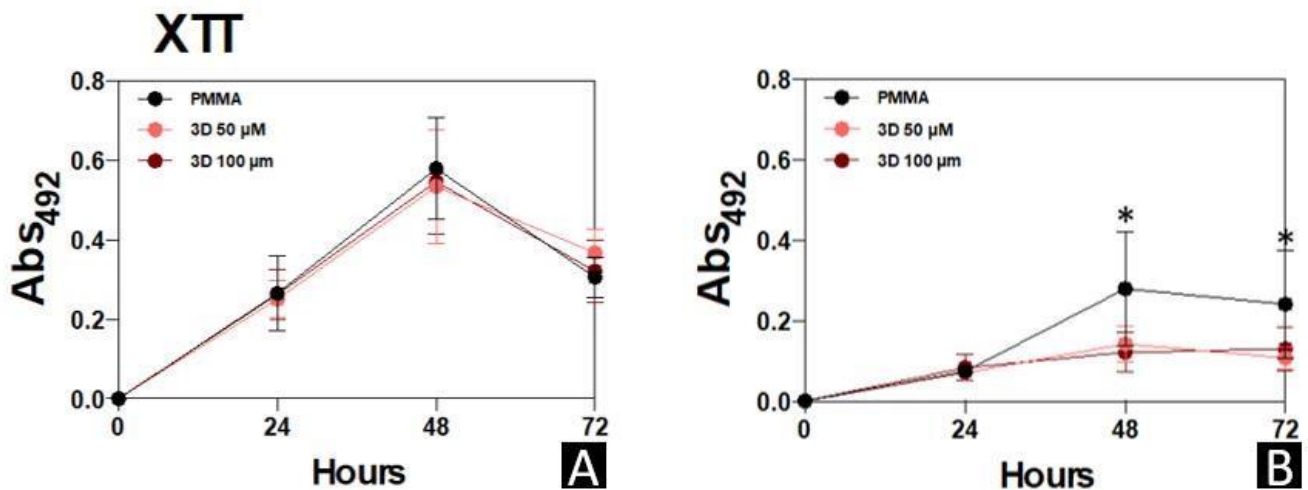


Figure 4. Biofilm formation by *C. albicans* and *S. mutans* for 24, 48, and 72 h at 37°C. **A**, *C. albicans*. **B**, *S. mutans*. At each time point evaluated, the systems were processed to detect metabolic activity by reducing XTT in menadione by viable cells at 492 nm. Results are expressed as the mean \pm standard deviation of three independent replicates. * $P < 0.05$.

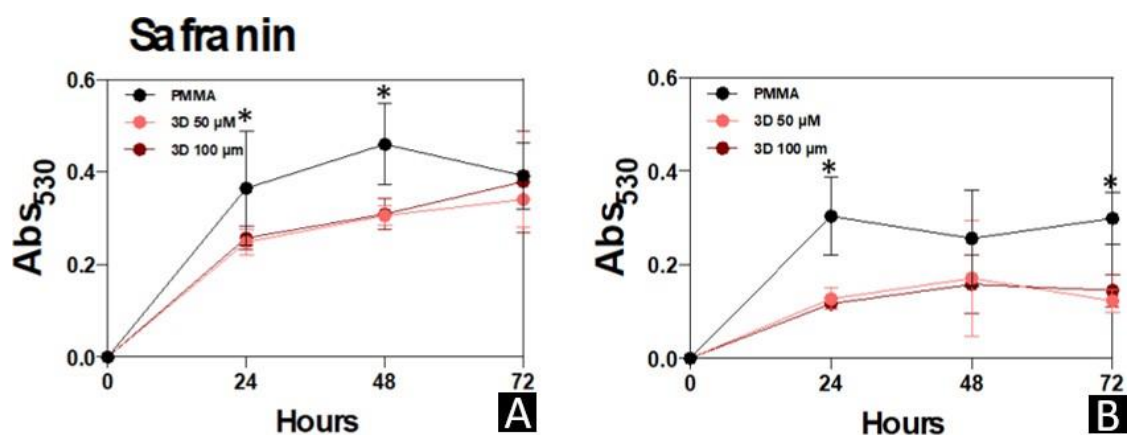


Figure 5. Extracellular matrix in biofilm formed by *C. albicans* and *S. mutans* for 24, 48, and 72 h at 37°C. **A**, *C. albicans*. **B**, *S. mutans*. At each time point evaluated, the systems were processed to detect extracellular matrix by staining with safranin at 530 nm. Results are expressed as the mean \pm standard deviation of three independent replicates. * $P < 0.05$.

6. REFERENCES

1. Arweiler, N.B. and L. Netuschil, The Oral Microbiota. *Adv Exp Med Biol*, 2016. 902: p. 45-60.
2. Zhang, Y., et al., Human oral microbiota and its modulation for oral health. *Biomed Pharmacother*, 2018. 99: p. 883-893.
3. Hao, Y., et al., Influence of Dental Prosthesis and Restorative Materials Interface on Oral Biofilms. *Int J Mol Sci*, 2018. 19(10).
4. Kim, S.Y., et al., Precision and trueness of dental models manufactured with different 3-dimensional printing techniques. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2018. 153(1): p. 144-153.
5. Camargo, I.F., et al., SISTEMAS CAD/CAM E SUAS APLICAÇÕES NA ODONTOLOGIA: REVISÃO DA LITERATURA. 2018(S3): p. 221-228%V 55.
6. ASTM, Standard Terminology for Additive Manufacturing—General Principles—Terminology. 2015, American Society for Testing and Materials: West Conshohocken, PA, USA.
7. Voet, V.S.D., et al., Biobased Acrylate Photocurable Resin Formulation for Stereolithography 3D Printing. *ACS Omega*, 2018. 3(2): p. 1403-1408.
8. Revilla-León, M. and M. Özcan, Additive Manufacturing Technologies Used for Processing Polymers: Current Status and Potential Application in Prosthetic Dentistry. *J Prosthodont*, 2019. 28(2): p. 146-158.
9. Dawood, A., et al., 3D printing in dentistry. *Br Dent J*, 2015. 219(11): p. 521-9.
10. Salmoria, G.V., et al., Evaluation of post-curing and laser manufacturing parameters on the properties of SOMOS 7110 photosensitive resin used in stereolithography. *Materials & Design*, 2009. 30(3): p. 758-763.
11. Borrello, J., et al., 3D Printing a Mechanically-Tunable Acrylate Resin on a Commercial DLP-SLA Printer. *Addit Manuf*, 2018. 23: p. 374-380.
12. Bhargav, A., et al., Applications of additive manufacturing in dentistry: A review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2018. 106(5): p. 2058-2064.

13. Javaid, M. and A. Haleem, Current status and applications of additive manufacturing in dentistry: A literature-based review. *J Oral Biol Craniofac Res*, 2019. 9(3): p. 179-185.
14. Etemad-Shahidi, Y., et al., Accuracy of 3-Dimensionally Printed Full-Arch Dental Models: A Systematic Review. *J Clin Med*, 2020. 9(10).
15. Shim, J.S., et al., Printing accuracy, mechanical properties, surface characteristics, and microbial adhesion of 3D-printed resins with various printing orientations. *J Prosthet Dent*, 2020. 124(4): p. 468-475.
16. Unkovskiy, A., et al., Stereolithography vs. Direct Light Processing for Rapid Manufacturing of Complete Denture Bases: An In Vitro Accuracy Analysis. *J Clin Med*, 2021. 10(5).
17. Hada, T., et al., Effect of Printing Direction on the Accuracy of 3D-Printed Dentures Using Stereolithography Technology. *Materials (Basel)*, 2020. 13(15).
18. Palza, H., Antimicrobial polymers with metal nanoparticles. *Int J Mol Sci*, 2015. 16(1): p. 2099-116.
19. González-Henríquez, C.M., M.A. Sarabia-Vallejos, and J. Rodríguez Hernandez, Antimicrobial Polymers for Additive Manufacturing. *Int J Mol Sci*, 2019. 20(5).
20. Lin, C.H., et al., Mechanical properties, accuracy, and cytotoxicity of UV-polymerized 3D printing resins composed of Bis-EMA, UDMA, and TEGDMA. *J Prosthet Dent*, 2020. 123(2): p. 349-354.
21. Sultan, S., et al., 3D printing of nano-cellulosic biomaterials for medical applications. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 2017. 2: p. 29-34.
22. van Hengel, I.A.J., et al., Self-defending additively manufactured bone implants bearing silver and copper nanoparticles. *J Mater Chem B*, 2020. 8(8): p. 1589-1602.
23. Yue, J., et al., 3D-Printable Antimicrobial Composite Resins. 2015. 25(43): p. 6756-6767.
24. Garcia, C., et al., Smart pH-Responsive Antimicrobial Hydrogel Scaffolds Prepared by Additive Manufacturing. *ACS Applied Bio Materials*, 2018. 1(5): p. 1337-1347.
25. Santos, D.M., et al., In vitro analysis of different properties of acrylic resins for ocular prosthesis submitted to accelerated aging with or without photopolymerized glaze. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2016. 69: p. 995-1003.
26. Yagi, N., et al., Sterilization using 365 nm UV-LED. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc*, 2007. 2007: p. 5842-5.
27. Peeters, E., H.J. Nelis, and T. Coenye, Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods*, 2008. 72(2): p. 157-65.
28. Choi, N.Y., S.Y. Kang, and K.J. Kim, *Artemisia princeps* Inhibits Biofilm Formation and Virulence-Factor Expression of Antibiotic-Resistant Bacteria. *Biomed Res Int*, 2015. 2015: p. 239519.
29. Costa-Orlandi, C.B., et al., In vitro characterization of *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* biofilms. *Biofouling*, 2014. 30(6): p. 719-27.
30. Institute, C.a.L.S., Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts M27-A3, in Approved Standard—Third Edition. 2008: CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.
31. Institute, C.a.L.S., Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically:M07-A9. 2012: CLSI, Wayne, PA, USA.

32. Marcotte, H. and M.C. Lavoie, Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998. 62(1): p. 71-109.
33. Chevalier, M., S. Ranque, and I. Precheur, Oral fungal-bacterial biofilm models in vitro: a review. *Med Mycol*, 2018. 56(6): p. 653-667.
34. Zijngge, V., et al., Oral biofilm architecture on natural teeth. *PLoS One*, 2010. 5(2): p. e9321.
35. Rabin, N., et al., Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Med Chem*, 2015. 7(4): p. 493-512.
36. Lyotard, N., et al., Short-term postorthodontic changes in the absence of retention. *The Angle orthodontist*, 2010. 80: p. 1045-50.
37. Littlewood, S., S. Kandasamy, and G. Huang, Retention and relapse in clinical practice. 2017. 62(S1): p. 51-57.
38. Teughels, W., et al., Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res*, 2006. 17 Suppl 2: p. 68-81.
39. Anselme, K., et al., The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometre scale. *Acta Biomater*, 2010. 6(10): p. 3824-46.
40. Engel, A.S., et al., Biofilm formation on different dental restorative materials in the oral cavity. *BMC Oral Health*, 2020. 20(1): p. 162.
41. Steiner, H., et al., Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*, 1981. 292(5820): p. 246-8.

5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados do presente estudo *in vitro*, pode-se concluir que:

5.1. espécimes confeccionados a partir de resina para manufatura aditiva apresentaram maior irregularidade e rugosidade de superfície quando comparados aos confeccionados a partir de resina acrílica autopolimerizante.

5.2. as resoluções de impressão de 50 e 100 μm não influenciaram significativamente as características e rugosidade de superfície dos espécimes confeccionados a partir de fotopolímero aplicado à manufatura aditiva;

5.3 espécimes confeccionados a partir de resina para manufatura aditiva evidenciaram parâmetros reduzidos de biomassa (48 e 72h), matriz extracelular (24, 48 e 72h), e atividade metabólica (24 e 48h) de biofilme formado por *C. albicans* quando comparados aos confeccionados em resina acrílica autopolimerizante. Em relação ao *S. mutans*, apenas o parâmetro de atividade metabólica do biofilme não se encontrou reduzido (24h);

5.4. o fotopolímero aplicado à manufatura aditiva utilizado neste estudo apresentou capacidade de inibição do crescimento fúngico e bacteriano, em seu estado líquido, não diluído, durante o período experimental de 48 horas.

6 RECOMENDAÇÕES

Para futuros estudos, sugere-se a investigação dos possíveis componentes presentes nos fotopolímeros para manufatura aditiva capazes de inibir o crescimento bacteriano e fúngico, em seu estado líquido, bem como o motivo dessa capacidade de inibição ser perdida diante de diluições, ainda que em baixas concentrações. Recomenda-se, ainda, que as análises microbiológicas sejam realizadas a partir de biofilme induzido por saliva humana, bem como, que os testes de atividade antimicrobiana e antifúngica sejam realizados por períodos maiores que 48 horas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANSELME, K., P. *et al.* 2010. 'The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometre scale', *Acta Biomater*, 6: 3824-46.
2. ARWEILER, N. B., AND L. NETUSCHIL. 2016. 'The Oral Microbiota', *Adv Exp Med Biol*, 902: 45-60.
3. ASTM. 2015. "Standard Terminology for Additive Manufacturing—General Principles—Terminology." In. West Conshohocken, PA, USA: American Society for Testing and Materials.
4. BHARGAV, A., V. *et al.* 2018. 'Applications of additive manufacturing in dentistry: A review', *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 106: 2058-64.
5. BORRELLO, J., *et al.* 2018. '3D Printing a Mechanically-Tunable Acrylate Resin on a Commercial DLP-SLA Printer', *Addit Manuf*, 23: 374-80.
6. CAMARGO, I .F, *et al.* 2018. 'SISTEMAS CAD/CAM E SUAS APLICAÇÕES NA ODONTOLOGIA: REVISÃO DA LITERATURA': 221-28%V 55.
7. CHEVALIER, M., S. RANQUE, AND I. PRECHEUR. 2018. 'Oral fungal-bacterial biofilmmodels in vitro: a review', *Med Mycol*, 56: 653-67.
8. CHOI, N. Y., S. Y. KANG, AND K. J. KIM. 2015. 'Artemisia princeps Inhibits Biofilm Formation and Virulence-Factor Expression of Antibiotic-Resistant Bacteria', *Biomed Res Int*, 2015: 239519.
9. CONRADS, G., AND I. ABOUT. 2018. 'Pathophysiology of Dental Caries', *Monogr Oral Sci*, 27: 1-10.
10. COSTA-ORLANDI, C. B., *et al.* 2014. 'In vitro characterization of Trichophyton rubrum and T. mentagrophytes biofilms', *Biofouling*, 30: 719-27.
11. DAWOOD, A., *et al.* 2015. '3D printing in dentistry', *Br Dent J*, 219: 521-9.
12. ENGEL, A. S., *et al.* 2020. 'Biofilm formation on different dental restorative materials in the oral cavity', *BMC Oral Health*, 20: 162.
13. ETEMAD-SHAHIDI, Y., *et al.* 2020. 'Accuracy of 3-Dimensionally Printed Full-Arch Dental Models: A Systematic Review', *J Clin Med*, 9.
14. FERNANDES, G. A., C. H. AHRENS, AND A. T. N. PIRES. 2000. 'Influência do processo de pós-cura em câmara de luz ultravioleta de peças obtidas com resina fotopoliméricas em máquinas de estereolitografia', *Congresso brasileiro de engenharia e ciência dos materiais*, 14.

15. GARCIA-CUESTA, C., M. G. SARRION-PÉREZ, AND J. V. BAGÁN. 2014. 'Current treatment of oral candidiasis: A literature review', *J Clin Exp Dent*, 6: e576-82.
16. GARCIA, C., *et al.* 2018. 'Smart pH-Responsive Antimicrobial Hydrogel Scaffolds Prepared by Additive Manufacturing', *ACS Applied Bio Materials*, 1: 1337-47.
17. GONZÁLEZ-HENRÍQUEZ, C. M., M. A. SARABIA-VALLEJOS, AND J. RODRÍGUEZ HERNANDEZ. 2019. 'Antimicrobial Polymers for Additive Manufacturing', *Int J Mol Sci*, 20.
18. HADA, T., *et al.* 2020. 'Effect of Printing Direction on the Accuracy of 3D-Printed Dentures Using Stereolithography Technology', *Materials (Basel)*, 13.
19. HAO, Y., *et al.* 2018. 'Influence of Dental Prosthesis and Restorative Materials Interface on Oral Biofilms', *Int J Mol Sci*, 19.
20. INSTITUTE, CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS. 2012. "Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically:M07- A9." In. CLSI, Wayne, PA, USA.
21. INSTITUTE, CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS. 2008. "Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts M27-A3." In *Approved Standard—Third Edition*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.
22. JAVAID, M., AND A. HALEEM. 2019. 'Current status and applications of additive manufacturing in dentistry: A literature-based review', *J Oral Biol Craniofac Res*, 9: 179-85.
23. KIM, S. Y., *et al.* 2018. 'Precision and trueness of dental models manufactured with different 3- dimensional printing techniques', *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 153: 144-53.
24. KLAUSS, P., e G. V. SALMORIA. 2006. 'Processos de cura e de decomposição térmica da resina Renshapetm SL 5260 utilizada em fabricação rápida por estereolitografia', Dissertação, Universidade Federal de Santa Catarina
25. LEDERBERG, JOSHUA, e ALEXA T. MCCRAY. 2001. "'Ome Sweet `Omics--A Genealogical Treasury of Words.'" In *The Scientist*, 8.
26. LIN, C. H., *et al.* 2020. 'Mechanical properties, accuracy, and cytotoxicity of UV-polymerized 3D printing resins composed of Bis-EMA, UDMA, and TEGDMA', *J Prosthet Dent*, 123: 349-54.
27. LITTLEWOOD, SJ, S KANDASAMY, AND G HUANG. 2017. 'Retention and relapse inclinical practice', 62: 51-57.
28. LYOTARD, N., *et al.* 2010. 'Short-term postorthodontic changes in the absence of retention', *The Angle orthodontist*, 80: 1045-50.
29. MARCOTTE, H., e M. C. LAVOIE. 1998. 'Oral microbial ecology and the role ofsalivary immunoglobulin A', *Microbiol Mol Biol Rev*, 62: 71-109.
30. MOSADDAD, S. A., *et al.* 2019. 'Oral microbial biofilms: an update', *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 38: 2005-19.

31. NEALON, F. H. 1952. 'Acrylic restorations by the operative nonpressure procedure', *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 2: 513-27.
32. PALZA, H. 2015. 'Antimicrobial polymers with metal nanoparticles', *Int J Mol Sci*, 16: 2099-116.
33. PANKHURST, C. L. 2013. 'Candidiasis (oropharyngeal)', *BMJ Clin Evid*, 2013: 1304.
34. PEDRINI, D., E. GAETTI-JARDIM JR., e G. G. MORI. 2001. 'Influência da aplicação de flúor sobre a rugosidade superficial do ionômero de vidro Vitremer e adesão microbiana a este material %J Pesquisa Odontológica Brasileira', 15:70-76.
35. PEETERS, E., H. J. NELIS, e T. COENYE. 2008. 'Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates', *J Microbiol Methods*, 72: 157-65.
36. RABIN, N., *et al.* 2015. 'Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents', *Future Med Chem*, 7: 493-512.
37. REVILLA-LEÓN, M., e M. ÖZCAN. 2019. 'Additive Manufacturing Technologies Used for Processing Polymers: Current Status and Potential Application in Prosthetic Dentistry', *J Prosthodont*, 28: 146-58.
38. SALMORIA, G. V., *et al.* 2009. 'Evaluation of post-curing and laser manufacturing parameters on the properties of SOMOS 7110 photosensitive resin used in stereolithography', *Materials & Design*, 30: 758-63.
39. SANTOS, D. M., *et al.* 2016. 'In vitro analysis of different properties of acrylic resins for ocular prosthesis submitted to accelerated aging with or without photopolymerized glaze', *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 69: 995-1003.
40. SELWITZ, R. H., A. I. ISMAIL, e N. B. PITTS. 2007. 'Dental caries', *Lancet*, 369:51-9.
41. SHIM, J. S., *et al.* 2020. 'Printing accuracy, mechanical properties, surface characteristics, and microbial adhesion of 3D-printed resins with various printing orientations', *J Prosthet Dent*, 124: 468-75.
42. STEINER, H., *et al.* 1981. 'Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity', *Nature*, 292: 246-8.
43. SULTAN, SAHAR., *et al.* 2017. '3D printing of nano-cellulosic biomaterials for medical applications', *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 2: 29-34.
44. TEUGHEL, W., *et al.* 2006. 'Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development', *Clin Oral Implants Res*, 17 Suppl 2: 68-81.
45. UNKOVSKIY, A., *et al.* 2021. 'Stereolithography vs. Direct Light Processing for Rapid Manufacturing of Complete Denture Bases: An In Vitro Accuracy Analysis', *J Clin Med*, 10.
46. VAN HENGEL, I. A. J., *et al.* 2020. 'Self-defending additively manufactured bone implants bearing silver and copper nanoparticles', *J Mater Chem B*, 8: 1589-602.

47. VOET, V. S. D., *et al.* 2018. 'Biobased Acrylate Photocurable Resin Formulation for Stereolithography 3D Printing', *ACS Omega*, 3: 1403-08.
48. YAGI, N., *et al.* 2007. 'Sterilization using 365 nm UV- LED', *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc*, 2007: 5842-5.
49. YUE, J., *et al.* 2015. '3D-Printable Antimicrobial Composite Resins', 25: 6756-67.
50. ZHANG, Y., *et al.* 2018. 'Human oral microbiota and its modulation for oral health', *Biomed Pharmacother*, 99: 883-93.
51. ZIJNGE, V., *et al.* 2010. 'Oral biofilm architecture on natural teeth', *PLoS One*, 5: e9321.