



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MESSINA**  
**DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE,**  
**ODONTOIATRICHE E DELLE IMMAGINI MORFOLOGICHE E**  
**FUNZIONALI**

**Corso di Dottorato in Bioingegneria Applicata alle Scienze Mediche**

---

**Upgrade nel trattamento con ortodonzia invisibile a tutela dei benefici  
terapeutici e della salute del paziente**

**ING-IND/14 (09/A3) / 06/F1 – MED/28**

Candidato

Dott.ssa Fabiana NICITA

Tutor

Chiar.mo Prof. Giacomo RISITANO

Co-tutor

Chiar.mo Prof. Marco CICCIO'

Dott. Ing. Vincenzo FILARDI

Tutor aziendale

Amministratore delegato Micerium S.p.A.

Ottaviano MICELI

---

**XXXV CICLO**

**2021/2022**

## INDICE

ABSTRACT.....	4
INTRODUZIONE .....	5
<b>1.1'EVOLUZIONE DELL'ORTODONZIA: GLI ALLINEATORI INVISIBILI</b>	<b>6</b>
1.1 Panoramica storica sugli allineatori invisibili.....	6
1.2 Produzione degli allineatori invisibili .....	7
1.3 Materiali impiegati nella realizzazione degli allineatori.....	9
1.3.1 Poliuretano.....	10
1.3.2 Polietilene tereftalato.....	11
1.3.3 Polietilene tereftalato glicole.....	11
1.3.4 Polipropilene.....	12
1.3.5 Policarbonato.....	12
1.4 Proprietà dei materiali termoplastici.....	12
1.4.1 Proprietà meccaniche e fisiche.....	13
1.4.2 Proprietà di resistenza chimica, capacità di assorbimento dell'acqua e l'influenza dell'ambiente orale.....	17
1.4.3 Proprietà ottiche e di trasparenza degli allineatori.....	22
1.4.4 Proprietà termiche.....	29
1.5 Influenza del processo di termoformatura.....	29
1.6 Elementi ausiliari nel trattamento con allineatori.....	35
1.7 Sterilizzazione dei dispositivi medici.....	36
1.7.1 Sterilizzazione a calore secco.....	37
1.7.2 Sterilizzazione a vapore.....	37
1.7.3 Sterilizzazione con ossido di etilene.....	38
1.7.4 Sterilizzazione con perossido di idrogeno.....	39
1.7.5 Sterilizzazione con irradiazione.....	40
1.7.6 Sterilizzazione con ozono.....	40
<b>2.CARATTERIZZAZIONE CHIMICO-FISICA DEGLI ALLINEATORI INVISIBILI LINEO CON SPETTROSCOPIA MICRO-RAMAN</b>	<b>42</b>
2.1 Materiali e Metodi.....	43
2.1.1 Preparazione dei campioni.....	43
2.1.2 Trattamento dei campioni con sostanze di uso comune.....	44
2.1.3 Spettroscopia micro-Raman.....	46
2.2 Risultati.....	47

2.3	Discussioni.....	57
<b>3.</b>	<b>EFFICACIA DI UN SISTEMA DI STERILIZZAZIONE A BASE DI OZONO GASSOSO NELL'AMBITO DEI PROCESSI DI PRODUZIONE AZIENDALI DEGLI ALLINEATORI INVISIBILI LINEO</b>	<b>59</b>
3.1.	Materiali e Metodi.....	60
3.1.1.	Suddivisione e contaminazione dei campioni.....	60
3.1.2.	Generatore di ozono.....	62
3.1.3.	Misurazione della densità ottica .....	63
3.1.4.	Trattamento di sterilizzazione a base di ozono gassoso.....	65
3.1.5.	Analisi statistica.....	68
3.2.	Risultati.....	68
3.3.	Discussioni.....	70
<b>4.</b>	<b>OTTIMIZZAZIONE DELLE FORME DEGLI ATTACHMENTS E DELL'INTERFACCIA SMALTO-COMPOSITO NEL TRATTAMENTO CON GLI ALLINEATORI INVISIBILI LINEO</b>	<b>74</b>
4.1.	Materiali e Metodi.....	75
4.1.1.	Preparazione e suddivisione dei modelli di arcate dentali.....	75
4.1.2.	Tecniche di posizionamento per attachments di tipo diretto e indiretto: procedure operative.....	79
4.1.3.	Analisi tridimensionale (3D).....	83
4.1.4.	Analisi al microscopio elettronico a scansione.....	86
4.1.5.	Analisi statistica.....	87
4.2.	Risultati.....	88
4.3.	Discussioni.....	94
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONI</b>	<b>97</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>98</b>

## **ABSTRACT**

The multidisciplinary research described in the following thesis was performed at the Department of Biomedical Sciences, Dental and Morphological and Functional Images, University of Messina, in collaboration with the production center Micerium Lab of the company Micerium S.p.A. The scientific activities described arise from the need to propose different treatment approaches and innovative solutions to obtain the best results in the orthodontic field with clear aligners. Initially, an overview of the evolution of orthodontics is provided with the development of clear aligners and the description of the main characteristics of thermoplastic materials with which these orthodontic devices are made. In particular, the properties of polymeric materials are highlighted, from mechanical to optical and transparency, to report the state of the art on the influence of the thermoforming process and the sterilization processes currently available for medical devices. Subsequently, a large part of the work was dedicated to the experimental contribution by evaluating various research areas which, although very different from each other, have a common purpose that is to optimize the therapeutic benefits and safeguard the patient's health during treatment with aligners. The first research area concerns the chemical-physical characterization of the PET-G-based thermoplastic material, in collaboration with the Institute for chemical-physical processes (IPCF) of the National Research Council (CNR) of Messina, which was carried out both after the polymer thermoforming process and after exposure to staining agents and substances commonly used substances for up to 15 days. The second phase involves a microbiological analysis, carried out at the "Molecular Genetics" laboratory of the University of Messina, through the measurement of the optical density of the microbial cultures inoculated on the surface of PET-G aligners pieces after direct exposure to the gaseous ozone at different times (24, 48 and 72 hours). Finally, the third scientific area concerns an *in vitro* evaluation of an innovative clinical technique to produce orthodontic attachments on the teeth using two experimental templates. In this regard, a deviation analysis was carried out for the superimposition of 3D scans and virtual planning models, by the Engineering Department of the University of Messina, and based on the excesses and defects of the composite resin compared to the standard protocol currently used in clinical practice.

## INTRODUZIONE

Il lavoro esposto nella tesi seguente è stato svolto presso il Dipartimento di Scienze Biomediche, Odontoiatriche e delle Immagini morfologiche e funzionali dell'Università degli Studi di Messina, in collaborazione con l'azienda satellite Micerium Lab appartenente alla società Micerium S.p.A., finanziatrice della borsa di dottorato. In accordo con l'azienda, è stata impostata una ricerca scientifica di tipo multidisciplinare per valutare diverse soluzioni innovative allo scopo di massimizzare i vantaggi del trattamento ortodontico con gli allineatori invisibili.

Nel primo capitolo viene esposta una panoramica generale sul trattamento con gli allineatori, dalla descrizione dei principali materiali termoplastici con cui vengono fabbricati gli allineatori e le loro caratteristiche in termini di proprietà meccaniche, fisiche, termiche, ottiche e di trasparenza. Viene anche discussa l'influenza dell'ambiente orale e del processo di termoformatura sui materiali polimerici. Infine, viene presentato un breve stato dell'arte sugli elementi ausiliari (attachment) che definiscono determinati movimenti dentali esercitati dall'allineatore e sulle moderne tecniche di sterilizzazione dei dispositivi medici. Di seguito, i capitoli successivi descrivono le attività sperimentali condotte riguardo diversi ambiti di ricerca, dall'analisi chimico-fisica, microbiologica, fino a una valutazione ingegneristica, che hanno come obiettivo comune l'ottimizzazione dei benefici di trattamento e la salvaguardia della salute del paziente ortodontico. Nel dettaglio, il secondo capitolo riporta il contributo scientifico ottenuto insieme alla collaborazione con l'Istituto per i processi chimico-fisici (IPCF) del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) di Messina riguardo la caratterizzazione chimico-fisica del materiale polimerico PET-G effettuata sia dopo il processo di termoformatura che dopo l'esposizione a sostanze pigmentate di uso quotidiano fino a 15 giorni. Il terzo capitolo descrive l'efficacia di una procedura di sterilizzazione basata sull'esposizione all'ozono gassoso in campioni di allineatori in PET-G mediante misurazione della densità ottica delle colture microbiche a 24, 48 e 72 ore, con la cooperazione del laboratorio di "Genetica Molecolare" dell'Università degli Studi di Messina. Infine, il quarto capitolo descrive la valutazione in vitro di una procedura clinica di posizionamento degli attachments sugli elementi dentali mediante due template sperimentali attraverso un'analisi di deviazione sulle sovrapposizioni di scansioni 3D e modelli di pianificazione virtuale, effettuata insieme ad alcuni docenti del Dipartimento di Ingegneria dell'Università degli Studi di Messina, sulla base della presenza di eccessi e difetti della resina composita rispetto al protocollo standard attualmente utilizzato.

# 1. L'EVOLUZIONE DELL'ORTODONZIA: GLI ALLINEATORI INVISIBILI

## 1.1 Panoramica storica sugli allineatori invisibili

Negli ultimi due decenni, gli allineatori invisibili rappresentano un'alternativa sempre più ricercata rispetto al trattamento con apparecchiatura fissa per molteplici tipi di malocclusioni [1,2].

I concetti basilari del trattamento con allineatori risalgono al 1945 con il “The Tooth Positioning Appliance” di Herald Dean Kesling [3]. Questo tipo di apparecchiatura in gomma flessibile, prodotto da una ceratura di laboratorio, veniva utilizzata durante le fasi di rifinitura determinando minimi movimenti dentali tra loro e, al tempo stesso, mantenendo l'allineamento dei denti in arcata. Inoltre, nonostante i limiti della tecnologia dell'epoca, Kesling ha osservato che “movimenti dentali maggiori si potevano realizzare grazie a una serie di posizionatori, modificando leggermente la posizione dei denti nel set-up durante gli steps terapeutici del trattamento” [3].

Il primo allineatore termoplastico, chiamato “Dental Contour Appliance”, è stato realizzato da Henry Isaac Nahoum nel 1959 [4]. Basandosi sull'idea precedente di Kesling, Nahoum ha realizzato una serie di modelli termoformati sottovuoto, grazie a una macchina termoformatrice industriale [5], ognuno dei quali corrispondeva a dei movimenti dentali progressivi ottenuti tramite la cera per baseplate su un modello modificato con le sezioni dei denti. Questo tipo di apparecchio, impiegato sia come contenzione sia per piccoli movimenti ortodontici, determinava una certa pressione fino a quando i denti non raggiungevano le loro posizioni predeterminate. La tecnica di Nahoum ha previsto anche l'utilizzo di elementi ausiliari, attualmente usati nel trattamento con allineatori, come dei bottoni in resina acrilica incorporati nell'apparecchio per la terapia con gli elastici inter-arcata.

Dieci anni dopo, Robert John Ponitz ha introdotto il dispositivo “Invisible Retainer” in plastica termoformata trasparente, principalmente impiegato nella rifinitura e nella contenzione [6]. La tecnica di Ponitz segue l'ipotesi di Kesling e consisteva nello spostamento dei denti sul modello utilizzando la cera così da realizzare un retainer termoformato sottovuoto, consentendo gli movimenti dentali durante il trattamento ortodontico. La metodica di Ponitz circa la produzione delle contenzioni invisibili è stata ripresa da James A. McNamara nel 1985 [7], modificando sia il tipo di materiale termoplastico (polimeri Biocryl<sup>TM</sup>) sia il metodo di termoformatura (a pressione positiva).

Negli anni '90, John J. Sheridan ha sviluppato una nuova tipologia di allineatore trasparente, chiamato "Essix Retainer", insieme al concetto di riduzione interprossimale degli elementi dentari (IPR) [8]. L'allineatore in questione era costituito da un foglio di copoliestere termoplastico di circa 0.030 pollici sottoposto a un processo di termoformatura a pressione. Il principio della metodica di Sheridan si basava sull'utilizzo di un unico allineatore che realizzasse gli spostamenti dentali durante il trattamento ortodontico mediante la modifica dell'allineatore stesso con una termoformatura per punti o la creazione di rilievi con materiale composito sulla superficie degli elementi dentari così da esercitare le forze ortodontiche richieste per effettuare il movimento dentale.

Ad oggi, la metodica manuale circa la pianificazione e fabbricazione degli allineatori invisibili è stata sostituita dalla progettazione e produzione assistita da computer (CAD/CAM) e dalle tecniche di prototipazione rapida [9–11]. Nel 1999, l'Align Technology ha lanciato sul mercato il sistema Invisalign™ [12], che utilizza per la prima volta la tecnologia CAD/CAM per realizzare una serie di allineatori invisibili che effettuassero movimenti dentali di tipo incrementale [13,14].

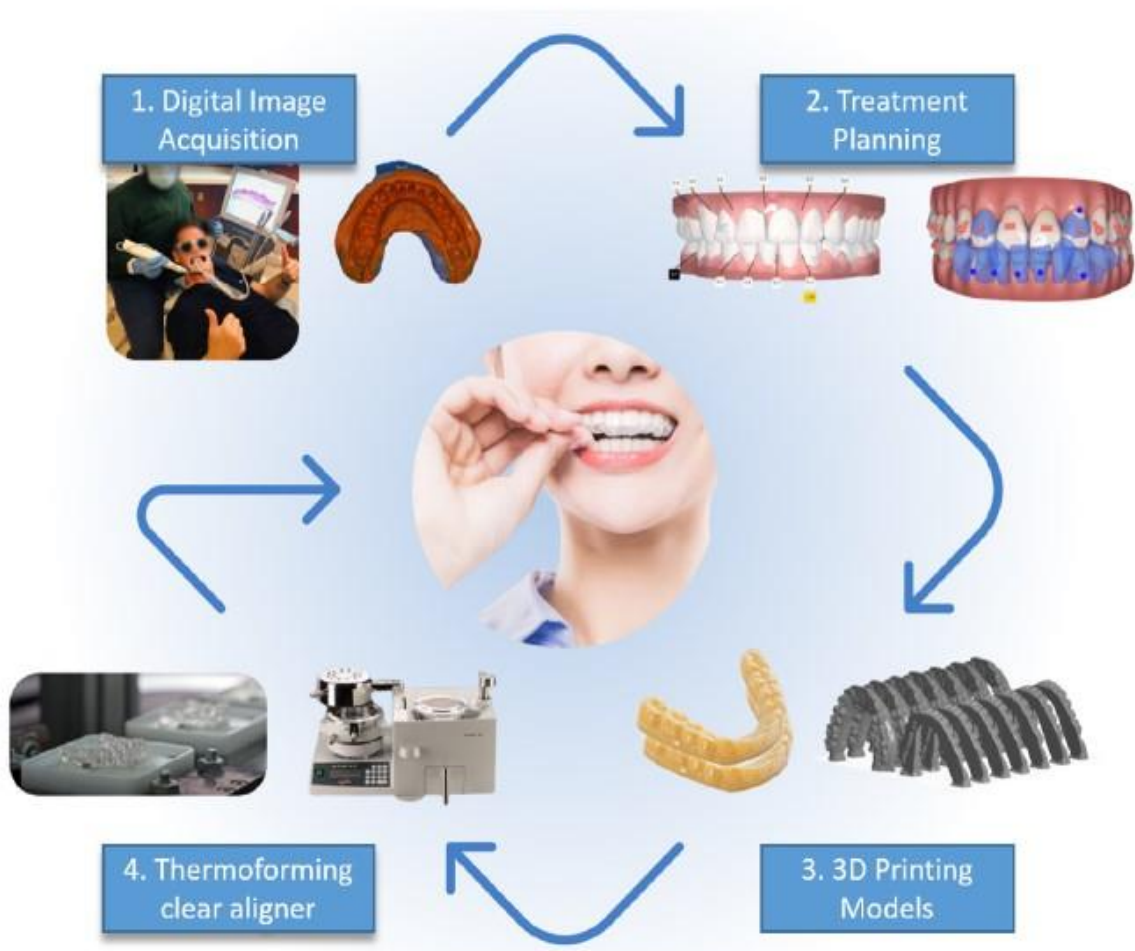
Il trattamento ortodontico con Invisalign ha subito notevoli cambiamenti nel corso del tempo. La prima generazione di questi allineatori funzionava esclusivamente grazie alla forma e al materiale termoformato dell'allineatore stesso e non era presente alcun elemento ausiliario [15]. I risultati circa l'efficacia del movimento dentale da parte di questi allineatori primari è stata dimostrata esclusivamente da Djeu e altri Autori [16]. Gli allineatori successivi (seconda generazione) venivano fabbricati con degli elementi ausiliari (attachments, bottoni in composito l'uso di elastici inter-mascellari) per cercare di ottimizzare il movimento dentale [15]. Gli allineatori di nuova generazione hanno introdotto ulteriori elementi ausiliari ottimizzati che migliorano efficacemente il controllo del movimento dentale [17].

## **1.2 Produzione degli allineatori invisibili**

I moderni allineatori invisibili ricalcano i principi dei suoi predecessori [3,4,6–8] e vengono realizzati tramite tecnologia CAD/CAM [11,18]. Questa tecnica consiste nella ricostruzione tridimensionale delle arcate dentarie del paziente tramite un approccio diretto (immagini da uno scanner intraorale) o un approccio indiretto (impronte in polivinilsilossano di alta qualità che vengono poi digitalizzate) [19]. La pianificazione del trattamento virtuale e le manipolazioni del movimento dentale vengono eseguite utilizzando software CAD. Gli algoritmi informatici segmentano le singole corone cliniche del modello 3D digitalizzato. Una volta completata la

fase della segmentazione, verrà sviluppata la pianificazione del piano di trattamento realizzando così piccoli movimenti dentali sequenziali dal software CAD che andranno a corrispondere a un determinato modello fisico 3D. La produzione dei modelli 3D, necessari per la realizzazione della serie di allineatori, viene realizzata mediante diversi processi di prototipazione rapida [10,20,21]. La tecnica più usata è nota come stereolitografia che consente di realizzare di prototipi mediante l'utilizzo di una resina liquida sottoposta a polimerizzazione strato dopo strato [21].

Pertanto, la fase finale di produzione degli allineatori prevede l'applicazione del materiale termoplastico trasparente, per ogni singolo modello fisico 3D, che viene sottoposto a un processo di termoformatura e, infine, il prodotto termoformato viene tagliato e rifinito per ottenere la configurazione finale [11]. Di seguito, viene riportato uno schema sequenziale sul processo di fabbricazione degli allineatori invisibili termoformati (Figura 1).



**Figura 1.** Flusso di lavoro del processo di fabbricazione degli allineatori ortodontici mediante la termoformatura [22].



Le proprietà meccaniche del materiale di fabbricazione degli allineatori invisibili sono fondamentali in quanto influiscono sulla qualità della forza applicata e quindi sul risultato finale del trattamento ortodontico. Tra queste sono inclusi: grande elasticità e resilienza, bassa rigidità, buona formabilità, biocompatibilità, stabilità ambientale, resistenza all'invecchiamento e trasparenza. Vengono utilizzati diversi tipi di materiali termoplastici (poliuretano, polietilene tereftalato, il polietilene tereftalato glicole) per la fabbricazione degli allineatori, i quali presentano molteplici peculiarità come ottime caratteristiche estetiche, la semplicità di utilizzo e la formabilità superiore [23].

### **1.3 Materiali impiegati nella realizzazione degli allineatori**

In linea generale, i materiali polimerici sono costituiti da lunghe catene molecolari che derivano dall'insieme di più monomeri. Le proprietà dei polimeri sono fortemente correlate alle variazioni di temperatura. Più precisamente, quando viene raggiunta una certa temperatura critica, definita temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ), i polimeri presentano una forma plastica e malleabile mentre, per temperature inferiori a  $T_g$ , si comportano come un solido vetroso con flessibilità limitata [24]. La temperatura di transizione vetrosa è condizionata dalla struttura chimica, dal grado di reticolazione chimica o fisica e dal peso molecolare del polimero e determina la classificazione di questi materiali in termoplastici o termoindurenti [25].

Il processo di fabbricazione degli allineatori (termoformatura sottovuoto su modelli o stampa diretta 3D) influenza notevolmente la composizione del materiale da utilizzare e, di conseguenza, anche le prestazioni cliniche dell'allineatore stesso [26]. Attualmente, i materiali termoplastici vengono impiegati nella realizzazione degli allineatori. La peculiarità di questi polimeri è che, raggiunta la temperatura di transizione vetrosa, diventano più plasmabili e malleabili e le strutture molecolari sono disposte irregolarmente con un grado di raggruppamento molecolare abbastanza basso [27]. In seguito al processo di raffreddamento, questi materiali presentano uno stato rigido vetroso o semi-cristallino, che comprende sia aree di catene uniformemente e strettamente raggruppate (domini cristallini) sia aree disposte irregolarmente (regioni amorfe), mantenendo la forma acquisita [27,28]. Questo comportamento termico è un processo reversibile e i cicli di riscaldamento e raffreddamento dovrebbero essere effettuati in numero limitato senza provocare conseguenze a livello strutturale o funzionale [29,30]. Superato il valore della temperatura di fusione, la struttura cristallina del polimero si modifica, la catena principale macromolecolare si disperde in modo casuale provocando l'alterazione di determinate proprietà fisico-chimiche. Inoltre, la presenza

di legami secondari deboli tra le catene principali formate da atomi di carbonio determina uno scorrimento tra di loro. Questa peculiare composizione chimica, insieme agli effetti dati dalla temperatura, condizionano le proprietà meccaniche del materiale [29]. Le caratteristiche principali dei polimeri termoplastici includono un'elevata tenacità e durezza, una migliore resistenza, trasparenza ottica, durata, comportamento termico ed elettrico e potenziale idrofobico [31,32]. I polimeri termoplastici più comunemente utilizzati per la produzione di allineatori ortodontici sono rappresentati dal policarbonato (PC), polipropilene (PP), poliuretano (PU o PUR), polietilentereftalato o polietilene tereftalato (PET) e polietilentereftalato modificato con glicole (PET-G) [17,23,33–35].

Per migliorare le proprietà di questi materiali, sono in corso diverse ricerche inerenti ai processi di produzione, alla miscelazione e alle proporzioni dei vari materiali termoplastici tra loro [22]. La letteratura scientifica ha osservato che le proprietà meccaniche e chimiche dei polimeri possono essere migliorate grazie a miscele di diversi polimeri come il poliestere, il poliuretano o il polipropilene [22]. È importante considerare che il rapporto impiegato per la miscelazione dei materiali influenza in modo significativo le caratteristiche della miscela polimerica. Per fare un esempio, la miscelazione di PET-G/PC/PU con un rapporto di 70/10/20 ha determinato proprietà meccaniche migliori rispetto ad altri rapporti di miscelazione, esercitando anche forze ortodontiche più sostenute rispetto ad altri prodotti commercializzati [26]. Allo stesso modo, la miscela di PET-G/PC2858 con un rapporto 70/30 comporta le migliori proprietà meccaniche in termini di resistenza alla trazione, resistenza all'urto e allungamento a rottura [36].

### **1.3.1 Poliuretano**

Il poliuretano (PU o PUR) è un particolare polimero ottenuto dalla reazione chimica di policondensazione tra un isocianato e un diolo [37] ed è adoperato in diversi settori grazie alla sua versatilità [38]. È un materiale che presenta un'elevata durezza e resilienza, una maggiore resistenza alla tensione e alla compressione ed è capace di cambiare forma se sovraccaricato e, una volta rimosso il carico, di ritornare allo stato originario [39]. Inoltre, è molto flessibile poiché è in grado di allungarsi e riprendersi ed è caratterizzato da un'elevata resistenza alla lacerazione [40]. Tuttavia, il poliuretano è un materiale termoplastico abbastanza opaco per cui il suo uso in ortodonzia invisibile sembra essere limitato [38]. La composizione chimica e le caratteristiche strutturali del poliuretano influenzano le proprietà di questo materiale [41], tra le quali si riscontrano la resistenza all'abrasione, resistenza chimica, elevata elasticità, resistenza meccanica, eccellenti caratteristiche di adesione e facilità di lavorazione [42–44]. Queste

diverse caratteristiche consentono al poliuretano di poter essere utilizzato nelle varie applicazioni mediche. Tuttavia, il poliuretano è influenzato dal calore, dall'umidità e dal contatto prolungato con gli enzimi salivari [45].

### **1.3.2 Polietilene tereftalato**

Il polietilene tereftalato (PET) appartiene alla classe dei poliesteri ed è sintetizzato a partire da una reazione di policondensazione tra il glicole etilenico con l'acido tereftalico. In base al processo di sintesi e alla temperatura con cui viene effettuato, il PET può presentare due forme diverse che influenzano a loro volta le proprietà del materiale [46]. La forma amorfa è trasparente e presenta una duttilità superiore, mentre la struttura parzialmente cristallina (30-40%) è opaca e bianca e mostra buona resistenza, rigidità e durezza [47].

Il PET può essere rigido o semirigido in base al processo produttivo utilizzato e presenta ottime proprietà meccaniche, stabilità dimensionale, tenacità e resistenza all'usura e al deterioramento causato dal contatto con diverse sostanze come oli, grassi, alcoli e idrocarburi [17]. È possibile trovare in commercio questo materiale sotto forma di pellicole, fibre o nastri, mentre in medicina viene usato nella realizzazione di protesi vascolari o sostituto di innesti [17].

### **1.3.3 Polietilene tereftalato glicole**

Il polietilene tereftalato glicole (PET-G) è un copolimero non cristallino [48], rappresenta una variante del PET per la sua trasformazione da uno stato semicristallino a uno amorfo e l'aggiunta di glicole determina l'abbassamento del valore di temperatura di fusione, non permettendo la trasformazione del materiale allo stato cristallino durante il riscaldamento. La temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ) del polimero è di circa 80°C, consentendo così una migliore gestione del materiale [49]. Queste caratteristiche definiscono le proprietà del PET-G come l'eccellente trasparenza e lucidità, notevole resistenza chimica, migliore manipolazione, elevata resistenza agli urti, notevole duttilità, eccellente inerzia chimica [22].

Inoltre, il PET-G può essere facilmente sottoposto a processi di termoformatura sottovuoto o sotto pressione, a metodi di estrusione, laminazione o alla piegatura a caldo ed è per questo che presenta un'ampia varietà di applicazioni in ambito commerciale e, soprattutto, nella fabbricazione degli allineatori ortodontici [22].

### **1.3.4 Polipropilene**

Il polipropilene (PP) è una delle materie plastiche più ampiamente prodotte. È un polimero termoplastico utilizzato in un'ampia varietà di applicazioni e viene prodotto tramite una reazione di polimerizzazione a catena a partire dal monomero propilene [50]. Il PP mostra una struttura parzialmente cristallina ed ha proprietà simili al polietilene ad alta densità ma si presenta più robusto, resistente al calore e meno flessibile per la presenza dei gruppi metilici sulle catene che provocano un aumento il valore di temperatura di transizione vetrosa e una rotazione limitata delle catene stesse. Inoltre, questo polimero si presenta come un materiale inodore e incolore e possiede anche altre proprietà tra cui una elevata resistenza chimica, stabilità dimensionale, bassa densità, elevata resistenza al carico e alla trazione e alto potenziale di riciclabilità [50].

### **1.3.5 Policarbonato**

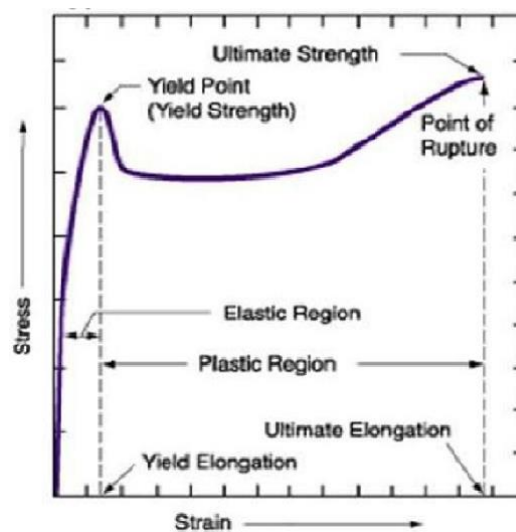
Il policarbonato (PC) è un materiale termoplastico caratterizzato da un'eccellente resistenza agli urti, elevata stabilità dimensionale, basso assorbimento d'acqua e trasparenza che lo rendono molto adatto in campo ortodontico [51]. Le sue proprietà sono molto simili a quelle del polimetilmetacrilato (PMMA), ma il PC offre una maggiore resistenza meccanica ed è utilizzabile in un intervallo di temperature più ampio con un'elevata resistenza alla distorsione termica [26]. Il PC ha anche un'elevata trasparenza nello spettro della luce visibile e presenta un comportamento di trasmissione della luce più elevato rispetto a quella del vetro. Tuttavia, questo polimero è suscettibile a processi di degradazione, ingiallimento o erosione, in quanto presenta una bassa durezza superficiale ed è poco resistente agli agenti atmosferici e ai raggi ultravioletti [26,51].

## **1.4 Proprietà dei materiali termoplastici**

Gli allineatori ortodontici in materiale termoplastico dovrebbero esercitare forze continue e controllate per produrre i movimenti dentali programmati [26,52]. Idealmente, gli allineatori dovrebbero presentare un'elevata resilienza, bassa durezza, eccellente trasparenza, buona elasticità, resistenza alle varie sollecitazioni, bassa citotossicità ed elevata biocompatibilità [36]. I polimeri termoplastici, oltre a possedere proprietà diverse tra loro, rispondono diversamente agli stress meccanici determinati dai movimenti masticatori, ai cambiamenti termici provocati dal processo di termoformatura e dall'ambiente orale e agli stress chimici come l'esposizione agli enzimi salivari e il consumo di sostanze coloranti [36,53].

### 1.4.1 Proprietà meccaniche e fisiche

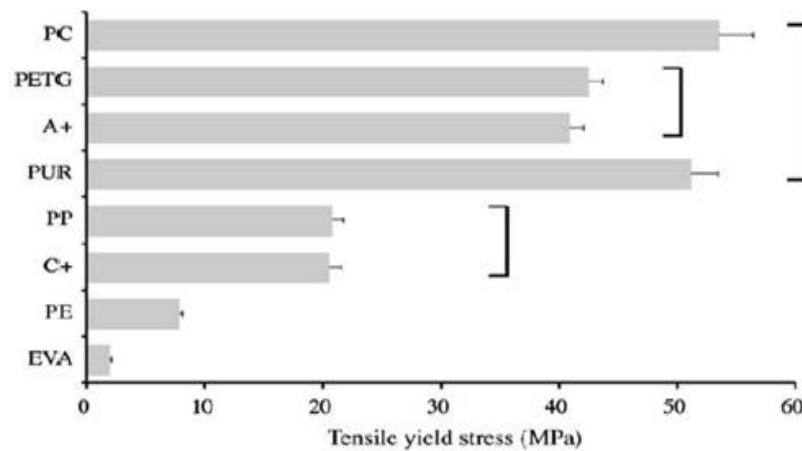
Da un punto di vista clinico, gli allineatori subiscono forze di breve durata nel momento in cui vengono inseriti nel cavo orale e anche forze a lungo termine a causa del movimento dentale programmato [45,52]. Generalmente, i polimeri termoplastici quando sono sottoposti a forze di breve durata, entro il limite elastico della curva sforzo-deformazione (Figura 2), la forza è direttamente proporzionale alla deformazione (legge di Hooke) per cui il materiale mostra un comportamento elastico ritornando alla sua dimensione e forma originale dopo aver rimosso la forza applicata [54].



**Figura 2.** Grafico della curva stress-strain di un materiale termoplastico [54].

Per la fabbricazione degli allineatori, è necessario che i materiali termoplastici abbiano certe caratteristiche come un'elevata resistenza allo snervamento e alla trazione, una maggiore tenacità e un'adeguata rigidità [22]. La resistenza allo snervamento rappresenta la sollecitazione oltre la quale un materiale inizia a deformarsi, passando da un comportamento elastico reversibile ad un comportamento plastico. La resistenza alla trazione è lo sforzo massimo in cui, se il carico non viene ridotto, il materiale si rompe o si frattura mentre la tenacità rappresenta la capacità del materiale di assorbire energia prima della sua rottura [54]. Lo studio di Ryokawa et al. [55] ha dimostrato come la tensione di snervamento degli allineatori dipendeva dalla composizione chimica dei polimeri, in particolare dal grado di cristallinità (Figura 3). Gli Autori [55] hanno confrontato otto diversi tipi di materiali termoplastici (PET-G, PC, PP, PUR, A+ o copoliestere, C+ o copolimero di polipropilene/etilene, PE o polietilene

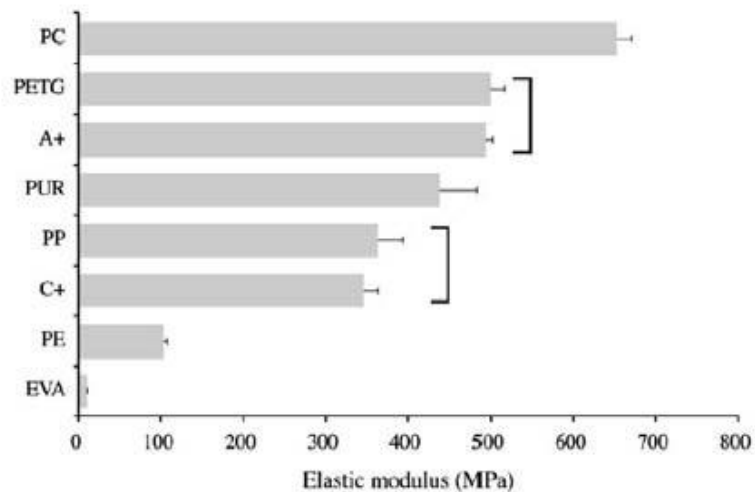
ed EVA o etilene vinil acetato) immersi in una soluzione artificiale creata per simulare l'ambiente orale.



**Figura 3.** Confronto della tensione di snervamento di diversi polimeri per allineatori [55].

I polimeri amorfi (PC, PET-G e PUR) mostravano una maggiore tensione di snervamento rispetto a quelli semicristallini (PP, PE ed EVA). Oltre a ciò, anche l'orientamento molecolare e la Tg influenzavano le proprietà meccaniche dei polimeri. Al di sotto della Tg, i polimeri amorfi e semicristallini si comportavano in modo molto simile perché presentavano un comportamento meccanico rigido. Al di sopra della Tg, si evidenziava una modifica nel comportamento dei polimeri amorfi e semicristallini. I polimeri amorfi si ammorbidiscono e diventano elastomeri flessibili o persino un liquido viscoso [55]. Anche i polimeri semicristallini diventavano flessibili a seconda del grado di cristallinità ma, una volta superata ampiamente la Tg, si dissolve la fase cristallina del polimero [55].

Il modulo di elasticità definisce il rapporto tra tensione e deformazione del materiale e, nel caso degli allineatori, è opportuno che essi presentino una certa rigidità per esercitare le forze che determineranno gli spostamenti dentali pianificati. Difatti, un allineatore con un modulo elastico più elevato potrà possedere una capacità di erogazione della forza maggiore sotto sforzo costante [39]. Al contrario, un basso modulo elastico determinerebbe delle forze insufficienti a effettuare i movimenti ortodontici [22]. Tuttavia, un aumento della temperatura all'interno del cavo orale e la capacità di assorbimento dell'acqua causano la diminuzione del modulo elastico del materiale termoplastico causando un'applicazione ridotta delle forze ortodontiche durante la prima fase di trattamento con allineatori [56]. Ryokawa et al. [55] hanno misurato anche il modulo elastico dei polimeri termoplastici dalla tensione elastica e dallo sforzo (Figura 4).

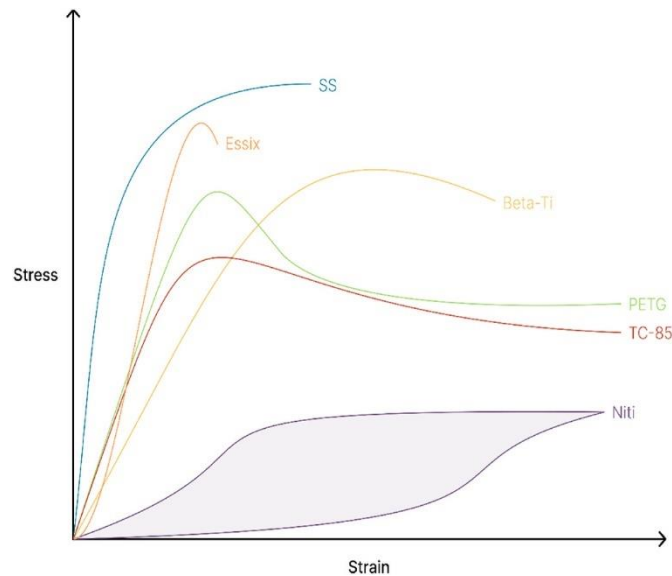


**Figura 4.** Confronto dei moduli elastici di diversi polimeri per allineatori [55].

I moduli elastici di PC, PET-G e A+ erano aumentati significativamente rispetto ai campioni originali dopo l'esposizione all'ambiente orale. Al contrario, PP, C+, PE ed EVA presentavano moduli elastici significativamente diminuiti. Inoltre, non sono stati osservati cambiamenti significativi nel polimero PUR.

La resilienza di un materiale rappresenta la sua capacità di assorbire energia in conseguenza a deformazioni elastiche e di rilasciarla nel momento in cui si scarica e questo scarico viene descritto in ortodonzia come la misura della forza esercitata da un materiale per spostare i denti [57]. Gli allineatori in materiale termoplastico assorbono meno energia in quanto si deformano in modo permanente sotto determinati carichi e presentano una resilienza notevolmente inferiore rispetto agli archi metallici [58,59]. Infatti, un solo arco in nichel-titanio potrebbe risolvere l'affollamento dentale rispetto a una serie di allineatori trasparenti in quanto immagazzina l'energia e la trasferisce ai denti in un tempo limitato.

La Figura 5 mostra un confronto tra le curve stress-strain di diversi materiali a scopo ortodontico [22].



**Figura 5.** Grafico della curva stress-strain di materiali ortodontici [22]: SS (acciaio), Beta-Ti (Beta-titanio), Niti (Nickel titanio), Essix (retainer in materiale trasparente), PET-G (allineatore in materiale termoplastico), TC-85 (allineatore in resina fotopolimerizzabile con stampa 3D).

Per forze a lungo termine, i materiali termoplastici presentano proprietà viscoelastiche che influenzano le prestazioni dell'allineatore stesso [54]. La loro viscoelasticità è dimostrata dal fatto che da un lato, sotto l'azione di una forza esterna, questi polimeri recuperano (totalmente o parzialmente) la deformazione applicata e ritornano alla forma iniziale mentre dall'altro, si oppongono alla deformazione causata dall'applicazione di una sollecitazione esterna.

La risposta di questi materiali dipende, oltre dall'entità della forza applicata, anche dal tempo e dalla temperatura. Dopo che l'allineatore viene posizionato in arcata, il comportamento viscoelastico del materiale gli permette di deformarsi e di allungarsi e viene assorbita energia la quale, una parte, verrà utilizzata per generare le forze necessarie per i movimenti dentali programmati [60]. Inoltre, lo stress a cui è sottoposto l'allineatore durante il suo adattamento nel cavo orale lo mantiene a una deformazione costante e ciò si traduce in una riduzione delle forze esercitate (rilassamento da stress) [34].

Il rilassamento da stress rappresenta uno tra i fattori più importanti nel determinare l'efficienza degli allineatori trasparenti e può essere osservato applicando una quantità fissa di deformazione al materiale polimerico e misurando il carico richiesto per mantenerlo in funzione nel tempo [61]. Nonostante sia preferibile l'applicazione di forze costanti in ortodonzia [62], la riduzione delle forze ortodontiche con gli allineatori termoplastici è di tipo esponenziale a causa dell'affaticamento del materiale che provoca un abbassamento drastico della forza esercitata nelle prime ore di utilizzo dell'allineatore [34].



Dopo un utilizzo prolungato, la forza generata dall'allineatore per la stessa deformazione diminuisce grazie al comportamento viscoelastico del materiale termoplastico. Questa fase di rilassamento da stress è influenzata dalla struttura chimica del polimero, dalla temperatura della cavità orale, dall'entità della forza e dalle caratteristiche fisiche del materiale utilizzato [53].

Lombardo et al. [34] hanno valutato le proprietà meccaniche e il rilassamento da stress di materiali termoplastici in PET-G e PU, mono e multistrato, sottoposti a un carico e temperatura costante per 24h. I risultati hanno dimostrato che i materiali monostrato presentavano una resistenza significativa allo stress assoluto e alla velocità di rilassamento mentre quelli multistrato avevano un rilassamento da stress costante e una resistenza assoluta allo stress quattro volte inferiore a quella dei materiali monostrato. Inoltre, i materiali multistrato hanno generalmente mostrato tassi di rilassamento dello stress inferiori e valori di stress iniziale inferiori rispetto al monostrato. Pertanto, gli allineatori ortodontici presenti sul mercato svilupperanno prestazioni diverse in base allo spessore e al materiale utilizzato [34].

#### **1.4.2 Proprietà di resistenza chimica, capacità di assorbimento dell'acqua e l'influenza dell'ambiente orale**

Fattori strutturali (strutture molecolari e cristalline) e ambientali (temperatura, umidità) possono influenzare le proprietà meccaniche dei polimeri [45,55]. Generalmente i polimeri amorfi appaiono più chiari grazie alla capacità di trasmissione della luce visibile, mentre i polimeri semicristallini e cristallini sono opachi perché formati da una miscela di fasi amorphe e cristalline con diversi indici di rifrazione [45,55]. I polimeri con bassa cristallinità presentano un'elevata flessibilità ed elasticità ma una bassa resistenza alla trazione e alla resistenza chimica e una diminuita stabilità [45]. Clinicamente, i polimeri con elevata flessibilità ed elasticità aderiscono perfettamente alle morfologie dei denti e rendono più confortevoli le manovre di inserimento e rimozione degli allineatori nel cavo orale. Inoltre, questi tipi di polimeri garantiscono anche una continuità dell'espressione della forza durante il trattamento ortodontico [45].

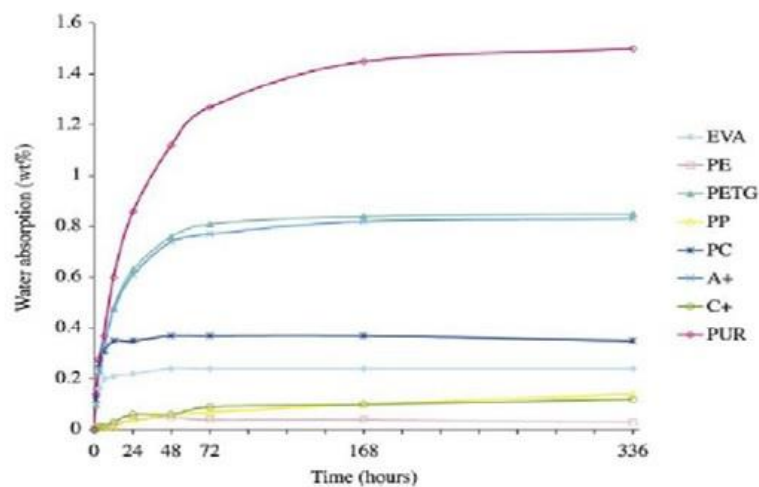
Gli allineatori invisibili sono costantemente esposti agli enzimi salivari e alle variazioni di temperatura dell'ambiente orale influenzando negativamente anche la composizione chimica dei polimeri termoplastici che li costituiscono. Alcuni poliesteri come il PC e la poliammide possono subire il processo di idrolisi irreversibile con conseguente degradazione della struttura polimerica [54]. Pertanto, i materiali termoplastici usati per la fabbricazione degli allineatori invisibili devono essere resistenti all'idrolisi e alla degradazione da parte dell'acqua [54].

È importante considerare anche che la temperatura della cavità orale può arrivare fino a 57°C dopo il consumo di una bevanda calda e può richiedere diversi minuti per tornare alla temperatura naturale. Tali variazioni influiscono sulle proprietà meccaniche dei materiali termoplastici, come lo dimostrano diversi studi in letteratura [37,55,63,64]. Anche la resistenza dell'allineatore alla fessurazione superficiale durante l'esposizione all'ambiente orale è di fondamentale importanza. Dalaie et al. [64], simulando le variazioni di temperatura che si verificano nel cavo orale attraverso termociclatori per 22h al giorno fino a 14 giorni, hanno analizzato i valori di durezza, spessore e modulo di flessione di due allineatori in PET-G di spessori diversi (0.8 e 1 mm). Gli Autori hanno osservato variazioni significative di durezza solo nell'allineatore con spessore 0.8 mm. Questo risultato potrebbe essere attribuito ai cambiamenti nelle strutture cristalline e amorphe dei polimeri o al rilascio di plastificanti a causa dell'esposizione a cicli termici intermittenti.

Iijima et al. [37] hanno osservato una riduzione significativa delle proprietà meccaniche dei polimeri PET-G, PP e PU con diverse strutture cristalline e temperature di transizione vetrosa dopo 2500 cicli termici. Nel dettaglio, i valori più bassi sono stati riscontrati nei materiali in PP e PU allo stato cristallino o semicristallino, rispettivamente, per il Tg più alto (155.5°C) e per quello più basso (29.6°C). Gli Autori hanno concluso che le proprietà meccaniche di tutti i materiali termoplastici sono state alterate dalle variazioni di temperatura e che, in particolare, i polimeri poliuretanicici hanno mostrato un'eccellente memoria di forma per tutte le variazioni di temperatura intraorale. Lo studio in vivo di Bucci et al. [63] ha valutato i cambiamenti di spessore nel tempo di una serie di allineatori attivi e passivi in PET-G durante l'esposizione a diverse variazioni di temperatura nel cavo orale e alle normali funzioni orali e alle abitudini parafunzionali. L'analisi è stata condotta dopo che gli allineatori sono stati indossati dai pazienti per 22h al giorno fino a 10 giorni. I risultati ottenuti hanno mostrato riduzioni minime dello spessore degli allineatori tali da non riuscire a influenzare le prestazioni cliniche dei dispositivi, indicando anche il PET-G come un polimero con adeguata stabilità dimensionale nell'ambiente orale.

Oltre alle variazioni di temperatura del cavo orale, anche l'assorbimento di molecole d'acqua può avere effetti negativi sulle proprietà meccaniche dei polimeri termoplastici causandone la degradazione irreversibile [26,65]. L'espansione igroscopica intraorale dei polimeri può alterare l'adattamento dell'allineatore in arcata, influenzando così le forze ortodontiche necessarie per i movimenti dentali. Pertanto, il materiale termoplastico ideale dovrebbe avere un basso assorbimento d'acqua [26,65]. Tra le proprietà studiate da Ryokawa et al. [55], è stato

analizzato anche il comportamento di assorbimento dell'acqua di diversi tipi di materiali polimerici in funzione del tempo (Figura 6).

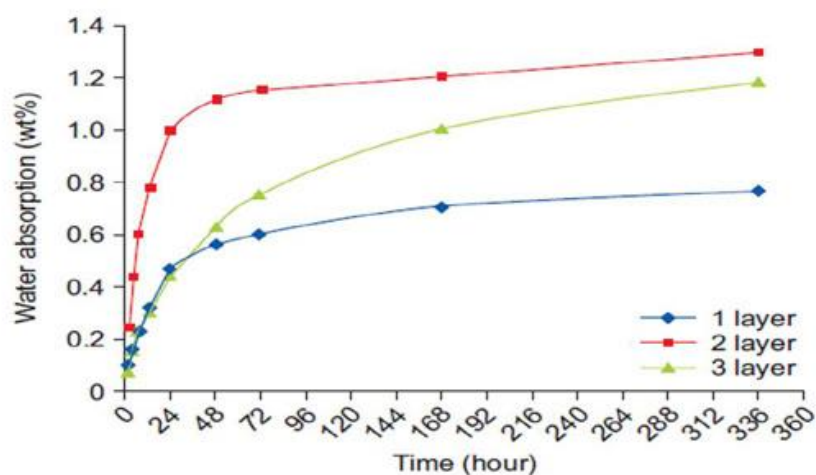


**Figura 6.** Capacità di assorbimento dell'acqua dipendente dal tempo (fino a 2 settimane) nei principali polimeri termoplastici [55].

I polimeri EVA, PET-G, PC, A+ e PUR mostrano un forte assorbimento d'acqua nelle prime 24 ore prima di avvicinarsi al livello di saturazione, il quale varia a seconda del polimero corrispondente. I polimeri PE, PP e C+ presentano un modesto aumento di assorbimento d'acqua entro 72 ore prima di raggiungere il loro limite di saturazione corrispondente. Il polimero PUR ha mostrato il più alto assorbimento d'acqua di circa 1.5% rispetto al suo peso, seguito da PET-G e A+. Il polimero PE ha avuto il più basso assorbimento d'acqua con circa 0.03% rispetto al peso dopo 2 settimane.

La capacità di assorbimento dell'acqua nei polimeri termoplastici è influenzata da diversi fattori, tra cui la formazione di legami idrogeno tra la molecola d'acqua e i gruppi idrofili dei polimeri e il livello di volume libero a seconda della struttura polimerica amorfa o cristallina. Pertanto, i polimeri cristallini ad alta densità molecolare mostrano un tasso inferiore di assorbimento d'acqua mentre i polimeri amorfi mostrano tassi più elevati di assorbimento d'acqua a causa del volume libero notevolmente più grande [55].

Ahn et al. [66] hanno realizzato un allineatore ortodontico ibrido a tre strati con lo scopo di ottimizzare le proprietà meccaniche. Il primo strato di questo allineatore era composto da uno strato esterno termoplastico PET-G rigido, uno strato centrale termoplastico PU morbido e un nucleo interno in resina rinforzata. Gli Autori [66] hanno valutato il comportamento di assorbimento dell'acqua dipendente dal tempo e dal numero di strati (Figura 7).

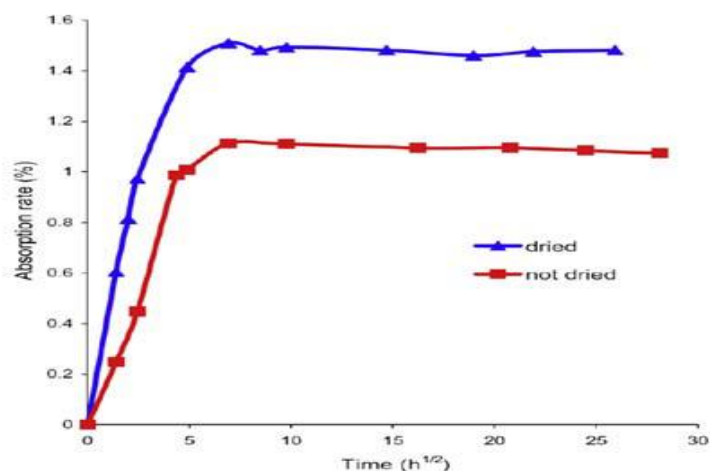


**Figura 7.** Comportamento di assorbimento dell'acqua dipendente dal tempo (fino a 2 settimane) in base al numero di strati che compongono l'allineatore [66].

La dipendenza dal tempo era molto simile a quella mostrata dallo studio di Ryokawa et al. [55]. Il più basso assorbimento d'acqua (0.77% rispetto al peso dopo 336 ore) è stato osservato per i campioni monostrato, mentre i campioni a doppio strato mostrano il più alto assorbimento d'acqua. L'aggiunta di un terzo strato determina un assorbimento d'acqua medio tra il monostrato e il doppio strato. Questo risultato ha dimostrato come il terzo strato in PET-G protegge il PU sottostante dall'assorbimento d'acqua così che il tasso complessivo si riduce rispetto all'allineatore a doppio strato [66]. Ciò è molto importante considerando che il rigonfiamento del polimero indotto dall'assorbimento d'acqua dopo l'esposizione intraorale potrebbe causare un cambiamento dimensionale dell'allineatore ortodontico.

Un'altra conseguenza potrebbe essere la degradazione irreversibile della catena del polimero mediante idrolisi [66].

Boubakri et al. [65] hanno studiato la cinetica della diffusione dell'acqua nel polimero PU. La Figura 8 mostra l'effetto dell'essiccazione sul tasso di assorbimento dell'acqua.



**Figura 8.** Tasso di assorbimento dell'acqua dipendente dal tempo per campioni in PU sottoposti o meno all'essiccazione [65].

I campioni in PU sottoposti ad essiccazione (a  $T = 70^{\circ}\text{C}$  per 48h) mostravano una curva crescente del tasso di assorbimento dell'acqua rispetto a quelli non essiccati. Inoltre, il livello di saturazione dei campioni in PU essiccati era significativamente più elevato. Pertanto, gli Autori [65] hanno constatato che il tempo necessario per raggiungere il livello di saturazione dipende dalla cinetica di diffusione, dallo spessore degli strati polimerici e dalla temperatura. Questi risultati sono in accordo con altri studi sul polimero termoplastico PU [55,66]. L'assorbimento delle molecole d'acqua rompe i legami idrogeno fra i gruppi funzionali di PU (C=O e N-H) influenzando negativamente alcune proprietà meccaniche come la resistenza alla trazione, il modulo di Young e la resistenza all'usura e causando un aumento della mobilità molecolare [55,67,68]. Quest'ultima è responsabile della diminuzione di  $T_g$  e della riorganizzazione della struttura della catena polimerica determinando un aumento del volume libero [65].

Tamburrino et al. [69] hanno analizzato l'assorbimento d'acqua di diversi materiali termoplastici utilizzati per la produzione di allineatori termoformati come Duran, (PET-G, Sheu dental GmbH), Biolon (PET-G, Dreve Dentamid GmbH) e Zendura (PU, Zendura Dental). L'invecchiamento intraorale è stato simulato con saliva artificiale a  $T = 37^{\circ}\text{C}$  per 7 giorni. Il tasso di assorbimento di fluido del materiale Duran è notevolmente inferiore (0.375% rispetto al peso) a confronto con quello di Zendura (0.719% rispetto al peso). Oltre al maggiore assorbimento d'acqua, gli Autori hanno osservato un peggioramento delle proprietà meccaniche del materiale Zendura proprio a causa della distruzione dei legami intramolecolari da parte delle molecole d'acqua [69].

Anche lo studio di Daniele et al. [70] ha valutato la capacità di assorbimento dell'acqua di dischi commerciali in PET-G (Erkodur), PET (Essix Plastic e Ghost Aligner) e PU (Zendura) rispetto

al tempo. Erkodur presentava una tendenza di saturazione iperbolica che aumentava con la temperatura e una quantità di acqua assorbita di circa  $8 \mu\text{g}/\text{mm}^3$  a  $37^\circ\text{C}$ , mentre i dischi in PET avevano la più bassa capacità di assorbire l'acqua con l'aumento della temperatura. Al contrario, Zendura presentava non solo maggiori quantità di acqua assorbita ( $15 \mu\text{g}/\text{mm}^3$  a  $37^\circ\text{C}$ ) ma anche una diversa tendenza nel comportamento di saturazione a  $70^\circ\text{C}$ , rivelando una possibile piccola dissoluzione nella fase liquida. Questi risultati hanno evidenziato come un maggiore assorbimento di acqua possa provocare aumenti di volume e alterazioni meccaniche del materiale. Le scansioni al microscopio elettronico a scansione (SEM) confermavano le proprietà igroscopiche dei polimeri, più evidenti nei dischi PU dove l'aspetto superficiale passava da rugoso a liscio all'aumentare della temperatura.

Zhang et al. [26] hanno osservato la capacità di assorbimento d'acqua di miscele di polimeri PET-G/PC/PU, in diversi rapporti e combinazioni, rispetto al polimero PET-G sotto forma di due materiali commerciali Erkodur e Biolon. Il composto PET-G/PC/PU (con rapporto di miscelazione 80/10/10) presentava il più basso assorbimento d'acqua dopo 336 ore (0.52% in peso) rispetto a Erkodur (0.80% in peso) e Biolon (0.81% in peso). Sono stati ottenuti risultati simili con il rapporto di miscelazione di 70/10/20 (0.57% in peso). Pertanto, gli Autori hanno concluso che il tasso di assorbimento d'acqua di PET-G/PC/PU sia direttamente proporzionale al rapporto di miscelazione di PU [26].

### **1.4.3 Proprietà ottiche e trasparenza degli allineatori**

I materiali termoplastici usati per la fabbricazione degli allineatori invisibili dovrebbero presentare una buona trasmittanza della luce trasmettendo idealmente almeno l'80% della luce visibile. I polimeri amorfi presentano un'elevata translucenza e rappresentano il materiale ideale per gli allineatori rispetto ai polimeri cristallini che sono altamente opachi e antiestetici. Il poliuretano, il poliestere, il polivinilcloruro e il policarbonato sono alcuni dei polimeri che dimostrano proprietà ottiche adatte alla fabbricazione degli allineatori ortodontici [71].

In considerazione del fatto che l'estetica è la caratteristica principale in ortodonzia invisibile, è fondamentale che la trasparenza di ogni singolo allineatore non venga alterata durante l'utilizzo intraorale di circa due settimane [71]. Tuttavia, la trasparenza e la stabilità del colore degli allineatori sono influenzati dal consumo di bevande colorate, dall'esposizione ai raggi ultravioletti e dall'utilizzo di collutori [43]. Nonostante gli ortodontisti raccomandino ai pazienti di rimuovere l'allineatore prima di mangiare o bere, spesso queste raccomandazioni vengono ignorate e la trasparenza del dispositivo viene alterata a causa dell'assorbimento dei

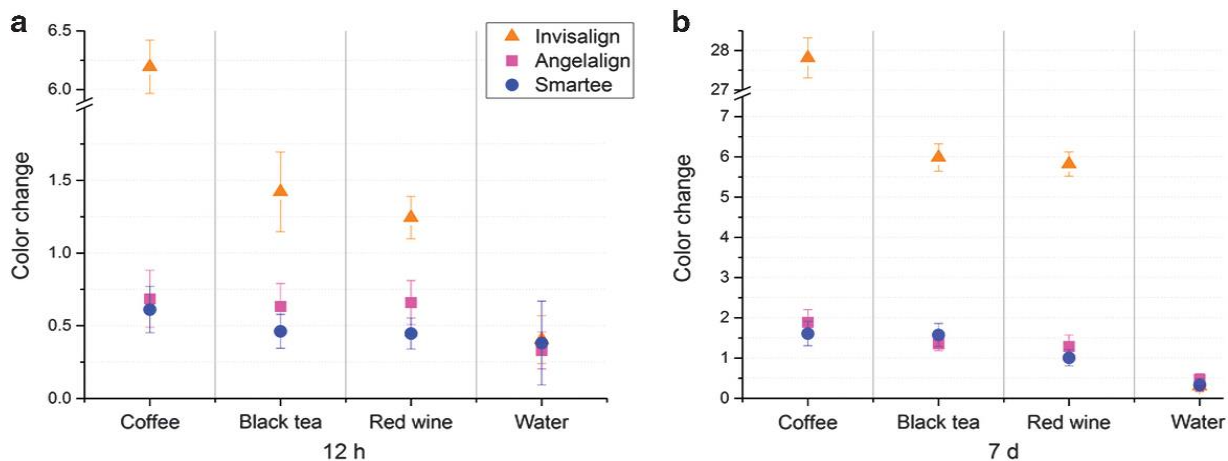
pigmenti ingeriti da parte del materiale termoplastico [43]. Difatti, è stato osservato che quasi il 50% dei pazienti non rimuove gli allineatori durante l'assunzione di cibi e bevande, compromettendo così l'estetica [71].

In letteratura sono riportati diversi studi che analizzano la stabilità del colore e la trasparenza degli allineatori invisibili dopo l'esposizione ad agenti coloranti, disinfettanti e saliva [43,53,70–74].

Lombardo et al. [53] hanno valutato i valori di trasmittanza e di assorbanza di tre tipi di allineatori ortodontici (Invisalign, Align Technology; All-In, Micerium; F22 Aligner, Sweden & Martina) dopo due cicli di invecchiamento, fino a 14 giorni ciascuno, a temperatura costante immersi in una soluzione di saliva artificiale e colorante alimentare. Tutti gli allineatori testati hanno raggiunto valori di trasmittanza più bassi e di assorbanza più elevati dopo l'invecchiamento in vitro ma senza alcuna differenza statisticamente significativa. Tuttavia, gli allineatori F22 erano più trasparenti, seguiti da Invisalign e All-In, sia prima che dopo l'invecchiamento.

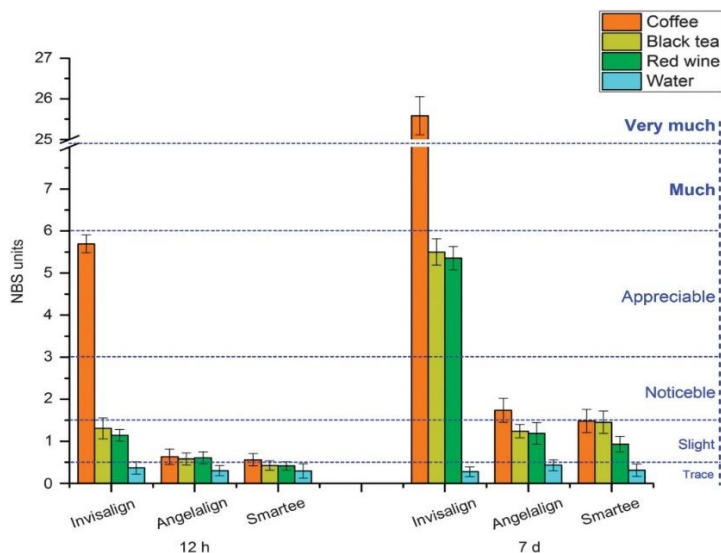
Liu et al. [71] hanno osservato le stabilità cromatiche di tre tipi di allineatori (Invisalign, Angelalign e Smartee) dopo l'immersione in sostanze coloranti (caffè, tè nero e vino rosso) a 12 ore e 7 giorni. L'allineatore Invisalign era composto dal materiale SmartTrack (PU multistrato combinato con un elastomero integrato), Angelalign dal policarbonato termoplastico (PC) mentre Smartee dal polimero polietilene tereftalato glicole (PET-G). Le variazioni colorimetriche ( $\Delta E^*$ ) sono state calcolate sulla base del sistema di colori "Commission Internationale de l'Eclairage"  $L^*a^*b^*$  (CIE  $L^*a^*b^*$ ) e successivamente convertite in unità del National Bureau of Standards (NBS).

La Figura 9 mostra come gli allineatori Invisalign hanno raggiunto valori medi di  $\Delta E^*$  significativamente più alti (da 0.30 a 27.81) rispetto agli allineatori Angelalign e Smartee (valori  $\Delta E^*$  da 0.33 a 1.89 e 0.32 a 1.61, rispettivamente).



**Figura 9.** Cambiamenti colorimetrici nei tre tipi di allineatori immersi nelle sostanze coloranti: (a) immersione per 12h; (b) immersione per 7 giorni [71].

Dopo 12h di immersione, Invisalign presentava cambiamenti colorimetrici maggiori per l'esposizione al caffè rispetto agli altri tipi di allineatori che mostravano solo lievi variazioni di colore. Dopo 7 giorni, gli allineatori Invisalign erano più suscettibili alla pigmentazione, mentre Angelalign e Smartee hanno mostrato solo cambiamenti di colore leggermente distinguibili (Figura 10).



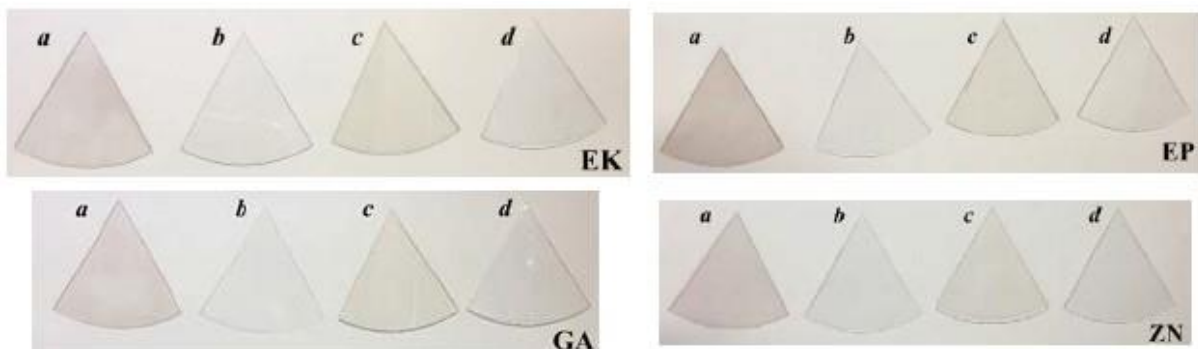
**Figura 10.** Valutazioni NBS dei cambiamenti colorimetrici dei tre tipi di allineatori [71].

Anche lo studio di Bernard et al. [43] ha evidenziato risultati simili. Sono stati valutati cambiamenti colorimetrici negli allineatori Invisalign, ClearCorrect (fabbriati in PU) e Minor Tooth Movement (composti da Essix Ace, un polimero rappresentato dal 95% di un copoliestere



identificato come PET-G e dal 5% di un materiale sconosciuto) dopo l'esposizione a diverse sostanze colorate (caffè, tè nero, vino rosso, Coca Cola) fino a 12h e a 7 giorni. Gli allineatori ortodontici Invisalign hanno subito i maggior cambiamenti di colore dopo 12h o 7 giorni di esposizione al caffè o al vino rosso rispetto agli allineatori ClearCorrect e Minor Tooth Movement. D'altra parte, l'immersione nel tè nero fino a 7 giorni ha determinato la formazione di macchie estrinseche rimovibili sulla superficie di tutti gli allineatori testati.

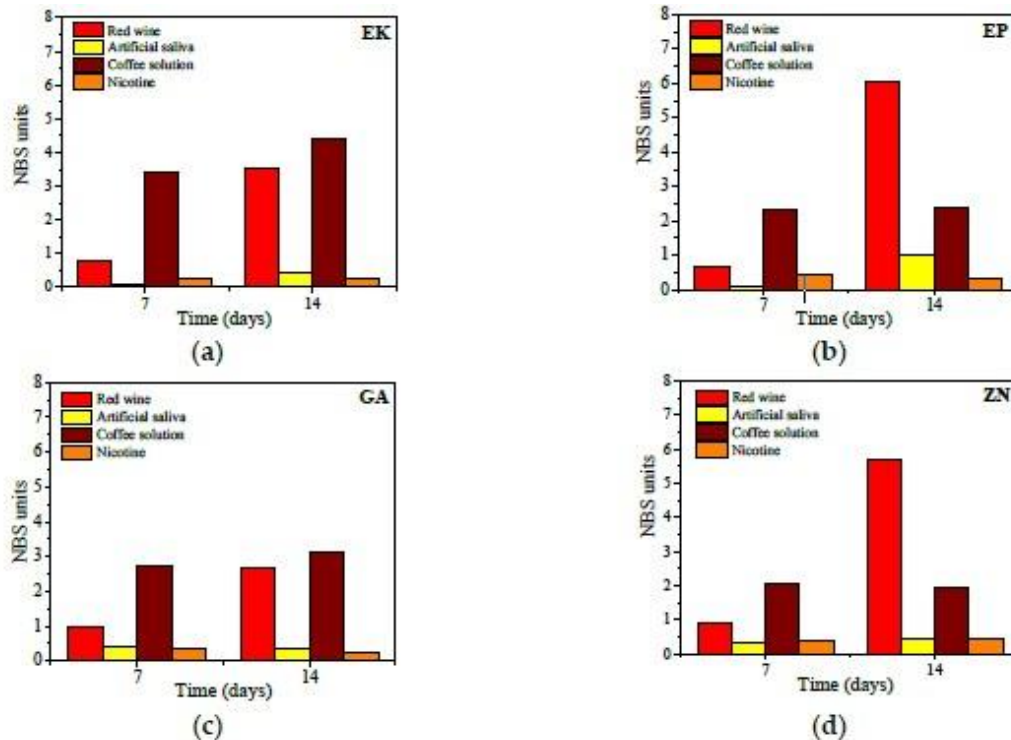
Oltre alla capacità di assorbimento dell'acqua nel tempo, Daniele et al. [70] hanno osservato la stabilità cromatica dei dischi termoplastici commerciali Erkodur (EK) in PET-G, Essix Plastic (EP) in PET, Ghost Aligner (GA) in PET e Zendura (ZN) in PU, prima e dopo 14 giorni di immersione in saliva artificiale e in sostanze di uso comune (vino rosso, caffè e nicotina). La Figura 11 mostra le ispezioni visive dei dischi di materiali termoplastici delle diverse marche prima e dopo 14 giorni di immersione nelle soluzioni. Le variazioni di colore percepibili a occhio nudo sono state osservate per tutti i campioni immersi nel vino rosso o nel caffè, mostrando rispettivamente colori rosa e marrone chiaro.



**Figura 11.** Ispezione visiva dei materiali termoplastici delle diverse marche commerciali dopo 14 giorni di immersione nelle diverse soluzioni: (a) vino rosso; (b) saliva artificiale; (c) caffè; (d) nicotina [70].

Questi risultati sono confermati e quantificati dalle misurazioni colorimetriche riportate in Figura 12. Secondo le valutazioni stabilite dal sistema NBS, dopo 7 giorni di immersione tutti i materiali termoplastici mostravano valori NBS che oscillano tra modifiche colorimetriche quasi impercettibili ( $NBS < 0.5$ ) e lievi cambiamenti ( $NBS < 1.5$ ), ad eccezione dell'immersione nella soluzione di caffè. In quest'ultimo caso, i campioni di dischi EP, GA e ZN mostravano una variazione colorimetrica percepibile ( $NBS < 3$ ), mentre nel campione EK si osservava un cambiamento di colore marcato ( $NBS > 3$ ). Dopo 14 giorni di immersione nella soluzione di nicotina, tutti i campioni hanno mostrato soltanto lievi variazioni di colore, mentre l'esposizione nel vino rosso ha determinato modifiche colorimetriche percepibili, soprattutto

per EP e ZN ( $NBS > 3$ ). Infine, l'immersione nel caffè ha provocato marcate variazioni colorimetriche nel campione EK mentre gli altri dischi presentavano solo variazioni percepibili (valori NBS da 1.5 a 3.0).



**Figura 12.** Misurazioni colorimetriche espresse dal sistema NBS dei dischi commerciali in materiale termoplastico dopo 7 e 14 giorni di immersione nelle diverse soluzioni: (a) EK; (b) EP; (c) GA; (d) ZN [70].

Pertanto, l'esposizione degli allineatori invisibili a bevande coloranti come il vino rosso e il caffè provoca evidenti variazioni colorimetriche mentre la nicotina e la saliva artificiale determinano cambiamenti di colore trascurabili [70].

Porojan et al. [72] hanno osservato i cambiamenti ottici del materiale termoplastico PET-G di diverse marche commerciali (Duran, Biolon e Crystal) relativi all'esposizione di bevande pigmentate (caffè, tè nero e Coca Cola) e detergenti (agenti chimici sotto forma di polvere e compresse e spazzolatura) a 24h, 48h e dopo 7 giorni. Le misurazioni colorimetriche ( $\Delta E^*$ ) sono state effettuate prima della termoformatura, dopo la termoformatura e dopo i tempi di immersione considerati. Dopo il processo di termoformatura, sono stati registrati lievi cambiamenti di colore ( $\Delta E^* = 0.63$  per Duran,  $\Delta E^* = 0.77$  per Biolon e  $\Delta E^* = 1.25$  per Crystal). Per quanto riguarda l'esposizione alle sostanze colorate, dopo 24h i cambiamenti di colore si riscontravano maggiormente per l'immersione nel caffè, seguito dalla Coca Cola, acqua distillata e tè nero. Le stesse variazioni colorimetriche sono state ritrovate dopo i 7 giorni di

immersione. Dopo 48h, i cambiamenti di colore sono diminuiti nel seguente ordine di sostanze: caffè, acqua distillata, Coca Cola e, infine, thè nero. In relazione al metodo di pulizia degli allineatori, dopo 24h le variazioni colorimetriche erano significativamente inferiori per l'uso di agenti chimici rispetto alla spazzolatura meccanica. Pertanto, gli Autori hanno evidenziato per tutti i dischi commerciali in PET-G lievi cambiamenti colorimetrici dopo 2h, i quali diventavano maggiori dopo 48h di esposizione, indipendentemente dal tipo di sostanza o metodo di pulizia utilizzato.

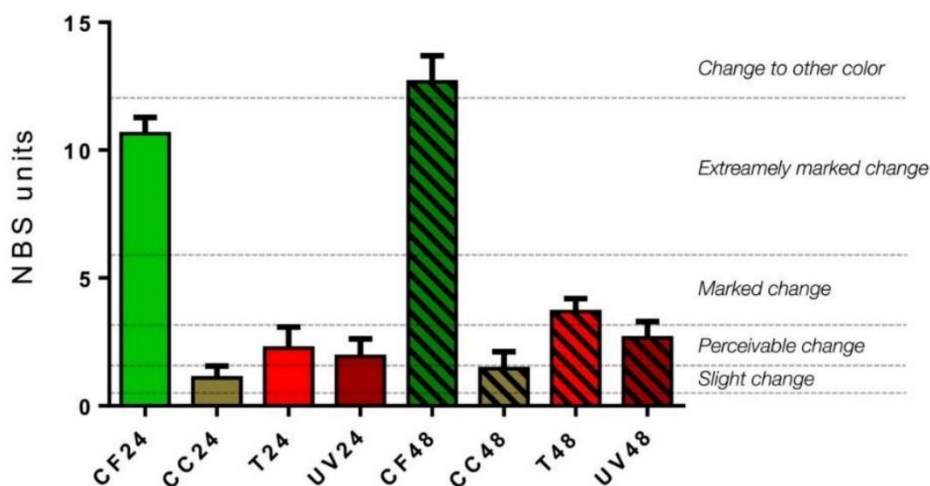
Memè et al. [73] hanno effettuato una valutazione colorimetrica sugli allineatori ortodontici Invisalign per osservare eventuali variazioni di colore e di trasparenza. L'analisi comprendeva l'esposizione in vitro di pezzi di materiale termoplastico degli allineatori Invisalign a caffè, thè, Coca Cola e radiazioni ultraviolette per 24 e 48h. L'ispezione visiva degli allineatori dopo 48h di immersione in vitro ha evidenziato un cambiamento colorimetrico abbastanza marcato nei campioni trattati nel caffè e nel thè, un lieve ingiallimento nei campioni esposti ai raggi UV, mentre non è stata osservata alcuna alterazione colorimetrica dopo l'esposizione alla Coca Cola (Figura 13).



**Figura 13.** Parti di allineatori Invisalign dopo 48h di esposizione al caffè (CF), Coca Cola (CC), thè (T) e radiazioni ultraviolette (UV) rispetto al controllo (Ctrl) [73].

Questi risultati sono stati quantificati dall'analisi colorimetrica secondo il sistema NBS e sono in accordo con lo studio di Bernard et al [43].

La Figura 14 mostra come l'immersione nel caffè determinava variazioni colorimetriche estremamente evidenti già a 24h, provocando addirittura il cambiamento dell'allineatore Invisalign con un altro tipo di colore dopo 48h. L'esposizione degli allineatori Invisalign al thè comportava una modifica colorimetrica percepibile a 24h, la quale diventava più marcata dopo 48h. Infine, l'immersione nella Coca Cola e il trattamento ai raggi UV determinavano solo lievi variazioni di colore dell'allineatore per entrambi i tempi di attesa considerati. Quindi, la stabilità cromatica dei materiali termoplastici può essere influenzata negativamente dalla pigmentazione di sostanze esterne, causando cambiamenti estetici legati alla perdita di trasparenza [73].



**Figura 14.** Misurazioni colorimetriche mediante il sistema NBS di allineatori sottoposti a trattamenti di invecchiamento a 24 e 48h: caffè (CF24 e CF48), Coca Cola (CC24 e CC48), tè (T24 e T48) e radiazioni UV (UV24 e UV48) [73].

Infine, lo studio recente di Daniele et al. [74] ha riportato un'analisi comparativa della maggior parte degli allineatori invisibili in commercio sulla stabilità verso sostanze pigmentate di uso comune, le loro proprietà fisico-chimiche e ottiche, nonché il loro comportamento di assorbimento dell'acqua. La valutazione comprendeva cinque tipologie di allineatori ortodontici, di cui tre sono realizzati in PET-G (Erkodur, Essix Plastic e Ghost Aligner), uno è un polimero a base di PU (Zendura), mentre l'ultimo è composto da una miscela di PU e PET-G (Invisalign), come confermato dalle analisi di diffrazione dei raggi X (XRD) e dalla spettroscopia infrarossa di Fourier (ATR-FTIR), con diversi gradi di cristallinità che influenzano la trasparenza di ciascun allineatore. In particolare, i materiali a base di PET-G presentavano i più bassi valori di cristallinità ma anche quelli più elevati in termini di trasparenza indicati dalla spettroscopia UV-visibile. Le misurazioni effettuate per valutare le variazioni di colore degli allineatori dopo le immersioni fino a 14 giorni hanno dimostrato come tutte le sostanze considerate contribuivano ad alterare le loro proprietà estetiche, soprattutto dopo l'esposizione al vino rosso e al caffè. Inoltre, gli allineatori Invisalign mostravano un cambiamento evidente verso altri colori, probabilmente a causa del processo di termoformatura che ha provocato la formazione di una superficie rugosa che intrappola residui di impurità, come confermato dalle osservazioni SEM.

Tutti gli studi sopra citati hanno evidenziato che gli allineatori a base di poliuretano non forniscono un'adeguata stabilità cromatica rispetto ai materiali in PET-G in quanto più suscettibili all'assorbimento dei pigmenti contenuti in diverse sostanze.

#### **1.4.4 Proprietà termiche**

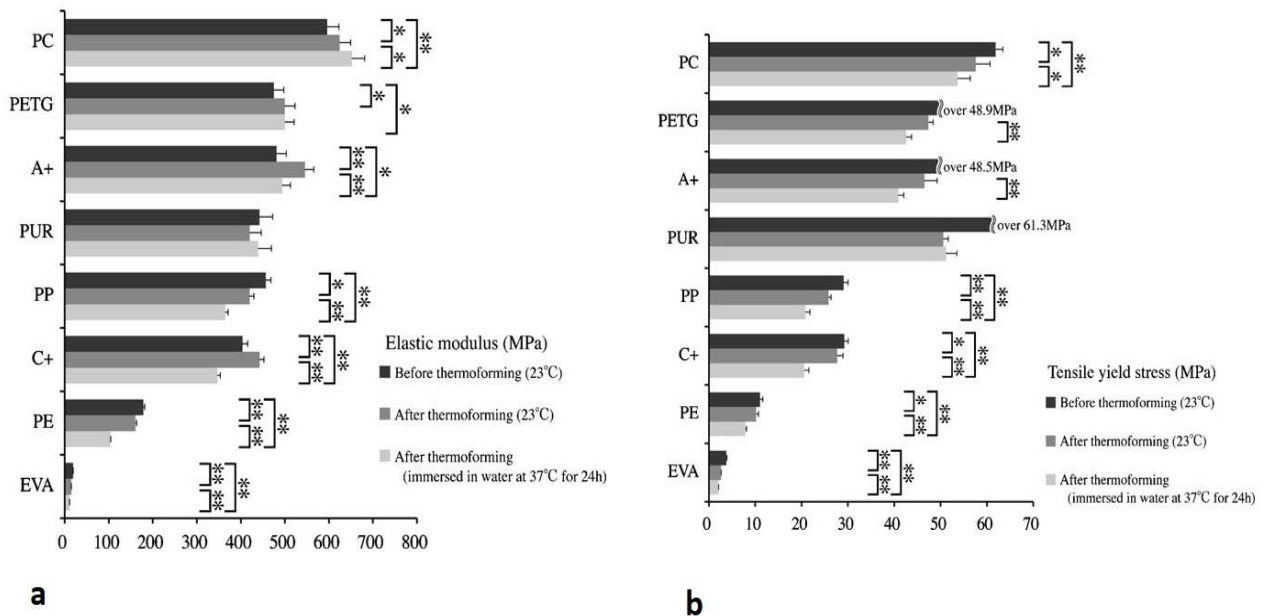
I materiali termoplastici rappresentano polimeri lineari o leggermente ramificati con forti legami covalenti intramolecolari e forze intermolecolari di van der Waals deboli [22]. A temperature elevate, questi legami si sciolgono mentre durante il raffreddamento le catene molecolari si solidificano in nuove forme. Questi polimeri non subiscono cambiamenti chimici a temperature alterate per cui le fasi di ammorbidimento per riscaldamento e indurimento per raffreddamento si possono ripetere [22]. Allo stato solido, i materiali termoplastici per allineatori si presentano semi-cristallini con filamenti amorfi di polimeri dispersi in mezzo. I polimeri cristallini sono più trasparenti con punti di fusione e temperatura di transizione vetrosa ben definiti [34]. Il processo di termoformatura rappresenta la fase finale di fabbricazione degli allineatori in cui la capacità del materiale termoplastico di adattarsi o conformarsi ai modelli di arcate dentarie è un requisito essenziale. A una temperatura definita di circa 110°C, la capacità di adattamento del PU è superiore a quella di altri tipi di materiali [75].

#### **1.5 Influenza del processo di termoformatura**

Determinate proprietà dei polimeri termoplastici vengono influenzate dal processo di termoformatura utilizzato per la fabbricazione degli allineatori ortodontici [63,76]. Tra queste alterazioni, è stata osservata una riduzione significativa dello spessore dei materiali dopo la termoformatura [58,68,76–78]. Ulteriori aspetti circa le alterazioni dei materiali termoplastici influenzati dalla termoformatura e/o dal ciclo meccanico o termico durante l'uso intraorale sono rappresentati da una maggiore solubilità e assorbimento dell'acqua e una minore trasparenza [68,76,77]. L'assorbimento dell'acqua da parte dei fogli polimerici che compongono gli allineatori insieme al carico meccanico determinavano una riduzione della forza fino al 50% dopo 24 ore per il rilassamento [34,77]. Tuttavia, i cambiamenti più significativi provocati dal processo di termoformatura sembrano essere rappresentati dalla riduzione dello spessore e dalla modifica delle forme geometriche dell'allineatore. Questo aspetto è di massima rilevanza in quanto clinicamente le forze ortodontiche esercitate dall'allineatore possono essere drasticamente influenzate [78].

Uno degli studi più rilevanti che ha osservato l'effetto della termoformatura, con esposizione o meno all'acqua, sui diversi dischi commerciali in materiale termoplastico (PET-G, PC, PP, PUR, A+, C+, PE ed EVA) risale al 2006 da Ryokawa et al. [55]. In considerazione del fatto che le proprietà meccaniche variano in base al grado di cristallinità dei polimeri [55], anche il processo di termoformatura può provocare dei cambiamenti in questi materiali. I polimeri

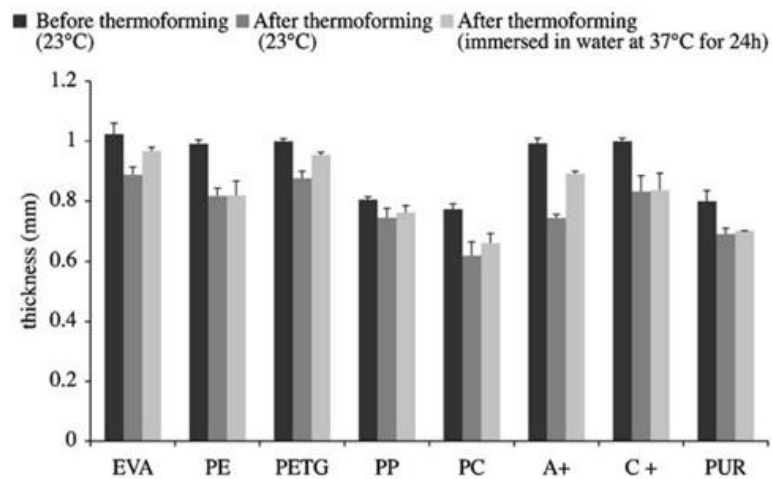
cristallini mostrano generalmente un aumento del grado di cristallinità con la termoformatura e, quindi, dovrebbe aumentare sia il modulo elastico sia la tensione di snervamento [79]. Tuttavia, i materiali cristallini (PP, PE ed EVA) esaminati da Ryokawa et al. [55], mostravano valori ridotti per entrambe le proprietà appena citate, ad eccezione del polimero C+. I materiali amorfi privi di zone cristalline (PC, PET-G, A+) presentavano valori di tensioni di snervamento ridotti ma un aumento del modulo elastico tranne per PUR (Figura 15).



**Figura 15.** Confronto delle proprietà meccaniche studiate dei polimeri termoplastici prima e dopo la termoformatura e insieme all'immersione in acqua a 37 °C per 24h: **(a)** valori dei moduli elastici (Mpa) e **(b)** delle tensioni di snervamento a trazione (Mpa), confrontati per ciascuna condizione. Differenze statisticamente significative: \*p-value < 0.05, \*\*p-value < 0.01.

Questi risultati sembravano essere dovuti a differenze nell'orientamento molecolare di ciascun polimero. La diminuzione del peso molecolare a causa del riscaldamento dato dalla termoformatura potrebbe aver influenzato negativamente le proprietà meccaniche. Inoltre, nonostante la termoformatura determini l'aumento del grado di cristallinità dei polimeri termoplastici con conseguente miglioramento delle proprietà meccaniche [79], il rapido raffreddamento che avviene subito dopo il processo di riscaldamento rende difficile lo sviluppo della cristallizzazione. Pertanto, le proprietà meccaniche dei polimeri termoplastici erano ridotte a causa della diminuzione del peso molecolare. Nel caso del polimero C+, la presenza di uno stabilizzatore all'interno della struttura favoriva una lieve cristallizzazione grazie al suo controllo sulla diminuzione del peso molecolare [55].

Oltre all'influenza sulle proprietà meccaniche, la termoformatura determinava una riduzione di spessore dei materiali polimerici analizzati, con variazioni che oscillavano tra il 74.9% e il 92.6% rispetto alle dimensioni originali (Figura 16). La successiva esposizione all'acqua per 24h determinava un comportamento misto tra i polimeri studiati, con PE che mostrava il tasso più basso di espansione lineare seguito da C+, PUR, PP, PC, PET-G, EVA e A+ [55].



**Figura 16.** Variazioni di spessore dei polimeri studiati misurate prima e dopo la sola termoformatura e dopo la termoformatura e la successiva immersione in acqua per 24h [55].

Pertanto, lo spessore dei materiali termoplastici era influenzato da determinate differenze di temperatura tra cui la temperatura di riscaldamento per la termoformatura e i punti di fusione dei polimeri cristallini o di rammollimento dei polimeri amorfi, il tempo di riscaldamento e il peso molecolare [55].

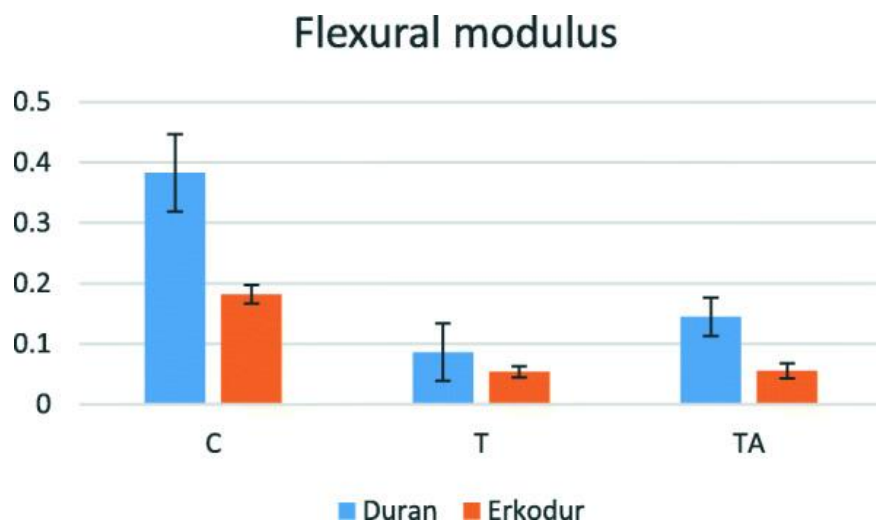
L'influenza della termoformatura sulle proprietà fisiche e meccaniche di diversi tipi di materiali termoplastici (due a base di copoliestere, Essix A+ ed Essix ACE, e gli altri due in PET-G, Duran ed eCligner) è stata descritta nello studio di Ryu et al. [76]. Gli Autori hanno dimostrato che la termoformatura riduce la trasparenza dei materiali termoplastici analizzati. Più precisamente, dopo il processo di termoformatura, la trasparenza dei campioni eCligner di spessore 0.5 e 0.75 mm è stata notevolmente ridotta rispetto a quella dei campioni Duran ed Essix A+ dello stesso spessore. Il campione Essix ACE di spessore 0.75 mm ha mostrato una significativa riduzione della sua trasparenza rispetto al materiale eCligner dello stesso spessore. Anche la trasparenza dei campioni Duran ed Essix A+ si è notevolmente modificata dopo la termoformatura. Inoltre, la durezza di tutti i materiali termoplastici non ha riportato differenze significative rispetto ai loro valori pre-termoformatura mentre è stato registrato un aumento della capacità di assorbimento dell'acqua dopo la termoformatura. Un significativo aumento

della solubilità in acqua è stato osservato per i campioni di Duran, Essix A+ ed Essix ACE rispetto a eCligner. Infine, i campioni Essix A+ ed Essix ACE hanno mostrato una maggiore durezza superficiale dopo il processo di termoformatura. Pertanto, gli Autori hanno suggerito di scegliere il materiale termoplastico più adatto in funzione del trattamento richiesto, in quanto alcuni di essi mostravano una significativa diminuzione della resistenza alla flessione dopo la termoformatura con deformazioni permanenti durante il trattamento ortodontico [76].

Un'altra ricerca condotta da Bucci et al. [63] ha evidenziato come il processo di termoformatura determinava una riduzione dello spessore degli allineatori ortodontici. Lo studio comprendeva due tipi di allineatori realizzati in PET-G, uno passivo e l'altro attivo, con spessore iniziale di 0.75 mm. Dopo la termoformatura, sono stati identificati diversi spessori sulla superficie occlusale degli allineatori che variavano da un valore minimo di 0.38 mm ad un massimo di 0.69 mm. Tuttavia, si è concluso che le variazioni di spessore non sembrano influenzare negativamente le prestazioni cliniche degli allineatori.

Sono stati riportati risultati simili anche nello studio in vitro di Dalaie et al. [64], i quali hanno analizzato l'influenza della termoformatura e dell'invecchiamento intraorale sulle proprietà termomeccaniche di due dischi in PET-G di diverso spessore (Duran = 1 mm ed Erkodur = 0.8 mm).

In entrambi i materiali, il modulo di flessione era diminuito significativamente dopo la termoformatura (88% in Duran e 70% in Erkodur), tuttavia, senza alcuna differenza significativa in base all'invecchiamento (Figura 17).

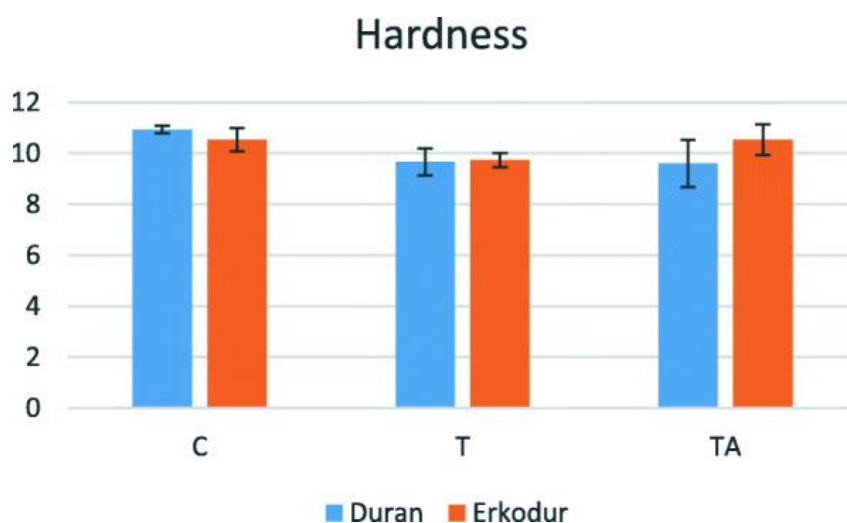


**Figura 17.** Variazioni del modulo di flessione in base ai materiali testati e ai trattamenti: senza termoformatura (C), dopo termoformatura (T) e dopo la termoformatura e l'invecchiamento in vitro (TA) [64].



In altre parole, la termoformatura avrebbe un ruolo dominante rispetto all'invecchiamento in vitro nell'influire negativamente le proprietà meccaniche dei materiali polimerici. Considerando che la riduzione dello spessore degli allineatori diminuisce dopo la termoformatura [76], la riduzione del modulo di flessione sembra giustificabile [64].

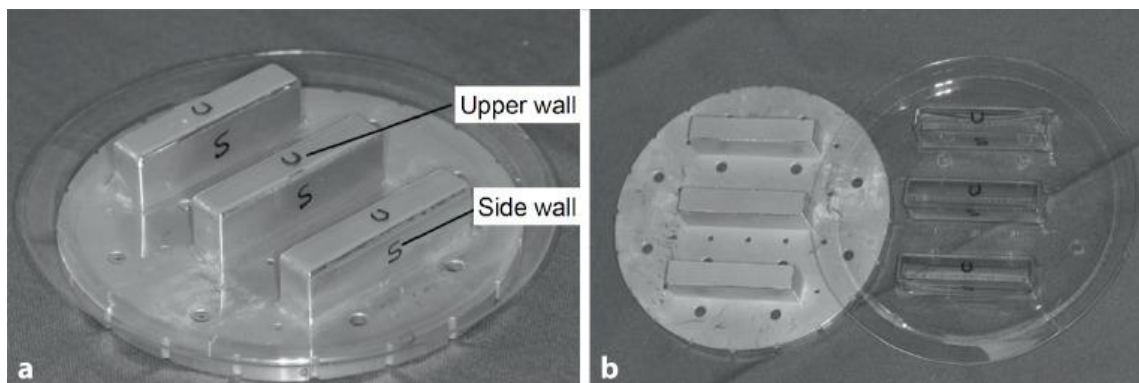
Un'altra proprietà da considerare per i materiali termoplastici è la durezza. Uno studio precedente di Kohda et al. [80] ha concluso che esiste una forte relazione tra la durezza dei diversi allineatori (Duran, Erkodur e Hardcast) e la quantità di forza applicata da essi. Pertanto, i cambiamenti nella durezza possono indicare variazioni corrette nella forza applicata e di conseguenza l'efficienza del trattamento ortodontico con allineatori [80]. Sempre Dalaie et al. [64] hanno rilevato che la durezza era diminuita significativamente dopo la termoformatura di circa 7.6% senza alcuna differenza tra i due tipi di materiali. Questi risultati sono in disaccordo con quanto descritto nello studio di Ryu et al. [76]. La Figura 18 mostra che la durezza del materiale Duran dopo la termoformatura non cambiava in base alla presenza o meno dell'invecchiamento mentre in Erkodur i valori di durezza pre-termoformatura non si modificavano in presenza dell'invecchiamento, a differenza della sola termoformatura dove la durezza del materiale diminuiva [64].



**Figura 18.** Variazioni della durezza in base ai materiali testati e ai trattamenti: senza termoformatura (C), dopo termoformatura (T) e dopo la termoformatura e l'invecchiamento in vitro (TA) [64].

L'invecchiamento orale simulato in vitro con cicli termici da Dalaie et al. [64] ha determinato una maggiore durezza del materiale Erkodur, a differenza dei valori ridotti riscontrati in Duran. Questo aumento della durezza può essere attribuito a cambiamenti nelle strutture cristalline e amorfe durante i cicli termici intermittenti [64].

Uno studio recente di Golkhani et al. [78] ha confrontato le proprietà meccaniche di diversi materiali per allineatori ortodontici (Essix ACE ed Essix PLUS a base di copoliestere, Duran Plus in PET-G e Zendura in PU) dopo il processo di termoformatura. A tal proposito, sono stati realizzati modelli a forma di parallelepipedo con dimensioni  $50 \times 10 \text{ mm}^2$  tramite una piastra in alluminio con le geometrie richieste. Dopo la termoformatura di tutti i materiali da analizzare, i fogli sono stati rimossi dalla piastra e come campioni sono stati prelevati le parti superiori e laterali dei parallelepipedi (Figura 19).



**Figura 19.** Preparazione dei campioni termoformati da dischi di diversi materiali termoplastici: (a) piastra master in alluminio con le geometrie dei parallelepipedi per il processo di termoformatura e (b) campioni tagliati dal lato superiore (upper wall) e dalla parete laterale (side wall) contrassegnati rispettivamente con le lettere “U” e “S” [78].

I risultati hanno dimostrato come la riduzione dello spessore era estremamente disomogenea nelle diverse zone termoformate e dipendeva dalla forma geometrica che assumeva il polimero. Nel dettaglio, lo spessore era maggiormente ridotto nelle pareti laterali (S) rispetto le parti superiori (U). Questa situazione è paragonabile alla termoformatura dei materiali termoplastici sui modelli di arcate dentarie per realizzare gli allineatori, con le superfici occlusali di molari e premolari e le zone buccali/linguali dei singoli denti. Anche lo studio di Elkholy et al. [77] ha riportato che la geometria adoperata per realizzare la termoformatura dei polimeri influiva sulla riduzione dello spessore e, pertanto, anche sull'erogazione della forza. Infatti, è stata osservata una variazione di spessore, dall'8% al 17%, rispettivamente per le superfici piane e le forme inclinate. Clinicamente, ciò comporterebbe un evidente riduzione di rigidità del materiale nelle zone buccali/linguali degli allineatori e, come conseguenza, l'applicazione di movimenti ortodontici meno controllati [77].

Ancora, Golkhani et al. [78] hanno osservato che la termoformatura ha provocato una riduzione significativa della forza di tutti i materiali testati. Ciò è in accordo con i risultati mostrati in studi precedenti [56,58,68,77]. In particolare, Elkholy et al. [77] hanno osservato una

significativa riduzione delle forze fino al 75% dopo la termoformatura dei dischi termoplastici e ciò era stato attribuito esclusivamente alle variazioni di spessore riscontrate.

Tuttavia, Golkhani et al. [78] hanno giustificato che il cambiamento delle forze espresse dai materiali termoplastici, oltre lo spessore, era dovuto principalmente alle alterazioni delle loro proprietà meccaniche a causa della termoformatura. Difatti, è stata riscontrata una diminuzione significativa del modulo di Young per tutti i materiali termoformati. Un comportamento simile è stato riportato anche nei due recenti studi di Ryu [76] e Ihssen [56], nei quali viene riportata la diminuzione significativa dei valori del modulo di Young nei materiali termoplastici anche dopo l'invecchiamento per cicli termici.

In conclusione, le proprietà meccaniche dei materiali termoplastici utilizzati per la fabbricazione degli allineatori ortodontici sono influenzate negativamente dal processo di termoformatura insieme all'invecchiamento intraorale. Questa diminuzione potrebbe essere attribuita alla parziale modifica della struttura molecolare del polimero, da amorfa a cristallina, durante la termoformatura, dove la fase cristallina potrebbe influenzare le proprietà elastiche del materiale [76].

## 1.6 Elementi ausiliari nel trattamento con allineatori

Nonostante sia richiesta una determinata flessibilità da parte degli allineatori invisibili per il loro inserimento e rimozione nelle arcate dentarie, è importante anche che il dispositivo ortodontico abbia una certa ritenzione nel cavo orale. In genere, per migliorare la ritenzione degli allineatori si utilizzano gli elementi ausiliari o attachments. Questi elementi sono utilizzati per migliorare la prevedibilità di specifici movimenti dentali [81,82]. La posizione di questi attachments su determinati denti può migliorare l'applicazione della forza ortodontica [83]. L'applicazione degli attachments con un allineatore mal posizionato potrebbe non soltanto provocare una diminuzione delle forze, ma potrebbe anche causare movimenti dentali indesiderati [83]. Gli attachments possono avere diverse configurazioni e dimensioni [84,85] e sono riportati nella classificazione mostrata in Figura 20.

Configuration	Width (mesiodistally)	Height (occlusogingivally)	Prominence (buccolingually)
Ellipsoid	2 mm	3 mm	0.75 or 1 mm
Vertical ellipsoid	2.5 mm	4 mm	2 mm
Rectangular	2 mm	3, 4 or 5 mm	0.5 or 1.0 mm
Beveled	2 mm	3, 4 or 5 mm	0.25 mm at beveled side and 1.25 mm at the opposite side
Pyramidal	3 mm	4 mm	1.5 mm
Quarter-sphere	1.5 mm (radius)	2.5 mm (diameter)	1.5 mm (radius)

**Figura 20.** Classificazione delle tipologie di attachments [86].

Considerando le dimensioni minime degli attachments e le loro funzioni, è necessario che l'adesione alle superfici dentali sia il più possibile precisa. Un qualsiasi errore legato al loro posizionamento mediante un template di trasferimento, contenente le sagome degli attachments pianificati virtualmente, si traduce in movimenti dentali non pianificati [87]. Sono stati proposti diversi protocolli di adesione per il posizionamento clinico degli attachments. In linea generale, i compositi a bassa viscosità, ad alta viscosità o una loro combinazione vengono utilizzati per riempire ogni nicchia del template. Weckmann et al. [87] hanno dimostrato che la produzione di attachments con resina composita ad alta viscosità attraverso una procedura a due fasi rappresenterebbe un protocollo più preciso con un minimo debordamento di composito. Gli Autori hanno proposto di utilizzare solo compositi fluidi e di forare le sagome del template per favorire la fuoriuscita del composito in eccesso [87].

La consistenza e la viscosità dei compositi possono influenzare la posizione e la forma degli attachments e sono fondamentali per le prestazioni di questi elementi ausiliari e la ritenzione dell'allineatore [88]. È importante posizionare adeguatamente la resina composita all'interno delle nicchie del template durante la procedura clinica di adesione. Per valutare la tipologia di composito più adatta per la produzione degli attachments, è stato realizzato un confronto tra la resina composita fluida, il composito ortodontico e il composito da restauro dentale, concludendo che nessuno di questi influisce sul volume e sulla forma degli attachments e, pertanto, si possono tranquillamente utilizzare per la realizzazione degli elementi ausiliari [89]. Feinberg et al. [90] hanno confrontato la trasparenza, la durezza e la resistenza all'invecchiamento intraorale dei compositi restaurativi e ortodontici sotto forma di attachments osservando un cambiamento nelle proprietà per entrambi i materiali nel tempo. Inoltre, il composito ortodontico ha mostrato una durezza quasi maggiore rispetto al composito da restauro. Pertanto, anche i materiali adesivi ortodontici potrebbero essere utilizzati per la realizzazione degli attachments [90].

### **1.7 Sterilizzazione dei dispositivi medici**

In ogni laboratorio, clinica e strutture ospedaliere, la sterilizzazione dei dispositivi medici è di primaria importanza e ha dei protocolli di regolamentazione ben specifici [91]. Per definizione, la sterilizzazione consiste nell'eliminare tutti i tipi di organismi biologici e può essere ottenuta mediante procedure fisiche o chimiche [91]. È importante ricordare che tutti quei processi che non uccidono tutti i tipi di microbi non sono considerati metodi di sterilizzazione ma rientrano nell'ambito della disinfezione con l'utilizzo di antisettici, agenti di decontaminazione,

germicidi o disinfettanti. Attualmente, le metodiche principali di sterilizzazione riconosciute sono rappresentate dal calore secco, vapore, ossido di etilene, perossido di idrogeno con o senza plasma, irradiazione e ozono. Tuttavia, i dispositivi medici sono realizzati con materiali differenti e richiedono specifici metodi di trattamento così da non compromettere in maniera significativa le loro proprietà [91].

### **1.7.1. Sterilizzazione a calore secco**

La sterilizzazione a calore secco è uno dei metodi di sterilizzazione più antichi ed è maggiormente utilizzato nel settore farmaceutico dove viene adoperato come parte della trasformazione asettica [92]. Inoltre, è usato per sterilizzare oggetti, vetri, materiali senza componente acquosa e protesi in silicone. In ambiente ospedaliero, il calore secco ad alta temperatura (circa 150-180°C) dovrebbe essere utilizzato solo per i materiali in cui la procedura al vapore è inefficace o che questa potrebbe danneggiarli [93]. In odontoiatria, il calore secco è stato applicato anche per sterilizzare strumenti con lo scopo di ridurre la corrosione degli oggetti taglienti [93]. Il calore secco richiede temperature molto elevate, con maggior tempo di esposizione, per inattivare i microbi resistenti sui materiali rispetto alla tecnica con il vapore. Difatti, un ottimale sterilizzazione si verifica con temperature elevate come 105-190°C e in condizioni di disidratazione. Pertanto, la sterilizzazione a calore secco viene impiegata principalmente per materiali che non resistono al vapore (ad esempio il vetro) o che non vengono attraversati da esso (come il silicone e le protesi) [93].

Le alte temperature utilizzate (anche maggiori di quelle usate nella tecnica a vapore) limitano il suo utilizzo su diversi tipi di materiali e di polimeri termosensibili, a meno che non si voglia sterilizzare a temperature più basse per periodi estremamente lunghi e in condizioni di disidratazione [92].

### **1.7.2. Sterilizzazione a vapore**

La procedura con vapore è un altro metodo di sterilizzazione tradizionale, semplice, disponibile e facile da applicare. Nelle strutture sanitarie, la maggior parte dei materiali e dei dispositivi medici sono realizzati con materiali che sono adatti per la sterilizzazione a vapore per la loro stabilità al calore, tranne i dispositivi a base di materiali polimerici poiché sensibili al calore e all'umidità [91]. La sterilizzazione a vapore è capace di inattivare tutte le entità biologiche, inclusi i prioni. Determinate condizioni come l'umidità satura, pressione e temperature elevate (ad esempio, 104-138°C) sono ottimali per questa procedura. A temperature più basse, il tempo

di esposizione dovrà essere maggiore nel momento in cui questa tecnica viene applicata per materiali che tollerano temperature inferiori [93].

Attualmente, la sterilizzazione a vapore è considerata la procedura più compatibile con l'ambiente in quanto non rilascia agenti tossici e rifiuti che possano nuocere la salute umana. Tuttavia, l'alta temperatura e umidità vengono tollerate soltanto da poche materie plastiche e da alcuni metalli [92]. In linea generale, il numero di materiali di natura plastica che possono essere sterilizzati a vapore varierà considerevolmente in base alla temperatura di sterilizzazione selezionata. Il protocollo standard prevede che la sterilizzazione a vapore venga effettuata a 121°C per 15-20 min [93]. È possibile attuare una sterilizzazione più rapida, a circa 134°C per 3-4 minuti, o una più lunga, con tempo di esposizione di circa 30 minuti a 115°C. È necessario che il dispositivo venga raffreddato prima dell'utilizzo per evitare ustioni post-sterilizzazione [93]. L'autoclave a vapore saturo viene ampiamente utilizzata eliminare focolai patogeni per contaminazioni e infezioni nosocomiali. Tuttavia, a causa dei suoi effetti negativi su diversi tipi di materiali può essere sostituito in genere da altre procedure di sterilizzazione come l'ossido di etilene, il perossido di idrogeno, l'irradiazione e l'ozono [93].

### **1.7.3. Sterilizzazione con ossido di etilene**

La sterilizzazione con ossido di etilene è una procedura impiegata per la maggior parte dei dispositivi e strumenti sanitari. La procedura prevede l'esposizione dei materiali all'ossido di etilene, che rappresenta un potente agente alchilante sotto forma di gas che distrugge il DNA dei microrganismi per impedirne la riproduzione. Inoltre, è un processo principalmente chimico caratterizzato da quattro fattori principali (concentrazione del gas, umidità, temperatura e tempo) [91].

Questa procedura di sterilizzazione richiede un preliminare pre-condizionamento del dispositivo e successivamente, a causa dell'utilizzo di gas tossici, richiede un'aerazione post-sterilizzazione anche piuttosto lunga ed è necessaria per rendere sicuri gli oggetti sterilizzati, pertanto, è necessaria una manipolazione speciale e un importante controllo da parte degli operatori [93]. L'ossido di etilene può essere applicato come procedura alternativa per i materiali sensibili alla temperatura o all'umidità come plastica, gomma e metalli in caso di esposizione continua. Inoltre, rappresenta un agente gassoso ideale grazie alle sue caratteristiche come l'elevata diffusività, permeabilità e delicatezza per la maggior parte dei dispositivi medici. Principalmente, questo metodo viene utilizzato per sterilizzare apparecchiature mediche o materiali che possono sopportare solo basse temperature (25-55°C)

[91]. A causa della bassa temperatura utilizzata, è necessario un lungo tempo di esposizione affinché la procedura con ossido di etilene sia efficace. La sterilizzazione con ossido di etilene è stata messa a confronto con metodi chimici meno pericolosi, tossici e dispendiosi, come l'ozono e il perossido di idrogeno in ambito ospedaliero e come l'irraggiamento nelle industrie.

#### **1.7.4. Sterilizzazione con perossido di idrogeno**

Il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) rappresenta una procedura alternativa all'ossido di etilene per molti dispositivi medici nel contesto ospedaliero. La sterilizzazione con perossido di idrogeno (con plasma) è una tecnica non tossica che richiede basse temperature ( $37-44^\circ C$ ) ma un'elevata concentrazione iniziale del perossido di idrogeno [94]. Non è una procedura altamente penetrante ma viene sempre più impiegata per la sterilizzazione di superfici delle apparecchiature. Con l'utilizzo del plasma, questo metodo di sterilizzazione bisogna applicare determinati parametri come la concentrazione di  $H_2O_2$  ( $6-18\text{ mg/L}$ ), la temperatura ( $37-44^\circ C$ ,  $< 55^\circ C$ ), la presenza e la durata del plasma e le pressioni, vuoto (ad es.  $< 50\text{ Pa}$ ,  $< 0.5\text{ Torr}$ ) e l'esposizione (tempo di sterilizzazione) [93]. Inizialmente si crea uno stato di vuoto dopo il posizionamento del materiale nella camera, con tempo variabile a seconda della presenza di umidità. Successivamente, viene iniettata una soluzione acquosa di perossido di idrogeno che, sotto forma di gas, verrà vaporizzata all'interno della camera per potersi diffondere uniformemente attorno al materiale da sterilizzare. Le molecole gassose attive uccidono tutti i microrganismi presenti. Una volta concluso il processo, la pressione interna ritorna a quella atmosferica, senza alcun residuo per l'ambiente circostante [93]. Il perossido di idrogeno presenta eccellenti proprietà antimicrobiche contro una vasta gamma di microrganismi, comprese le endospore batteriche. Inoltre, è un forte agente ossidante e reagisce principalmente con le proteine contenenti cisteina creando legami disolfuro. Questa ossidazione delle frazioni amminoacidiche all'interno di una data proteina può causare danni secondari [94]. Un altro meccanismo di inattivazione può essere attraverso reazioni intracellulari.

Nonostante il perossido di idrogeno con plasma abbia eccellenti proprietà microbicide, presenta una scarsa penetrazione.  $H_2O_2$  viene in genere utilizzato sotto forma di vapore per molti materiali e dispositivi medici. Inoltre, è compatibile con molti polimeri tranne alcuni che potrebbero andare incontro a degradazione (ad esempio, acrilici, gomme naturali, e biorassorbibili come poliglicolide e poliestere) [93].

### **1.7.5. Sterilizzazione con irradiazione**

La sterilizzazione mediante radiazioni è una procedura efficace per molti materiali e può avvenire tramite radiazioni ionizzanti o non ionizzanti. Le radiazioni possono provenire da sorgenti gamma, fasci di elettroni o raggi X [91]. Le radiazioni ionizzanti richiedono dosi di irradiazione forti (11-40 kGy). È un metodo di sterilizzazione abbastanza rapido e può determinare una penetrazione profonda tranne nei materiali densi, metalli e acqua. L'irradiazione viene impiegata a livello industriale o per la fabbricazione di dispositivi monouso ma non in ambito ospedaliero a causa delle sorgenti adoperate, ed è necessario il massimo controllo della procedura per garantire la sicurezza dei lavoratori [93]. L'irraggiamento è stato riconosciuto come strumento di sterilizzazione dal momento in cui è stato dimostrato che i raggi X inattivano i microrganismi [91]. Tuttavia, la sua applicazione pratica ha seguito l'uso dell'ossido di etilene per il miglioramento continuo dei materiali plastici, della disponibilità di acceleratori di fasci di elettroni e materiali radioattivi e di una maggiore regolamentazione sull'utilizzo dell'ossido di etilene [91]. L'irradiazione gamma fornisce protoni con elevata penetrazione e un'esposizione più lunga ma produce rifiuti radioattivi tossici. Il fascio elettronico utilizza elettroni con una penetrazione limitata, una breve esposizione e non contengono rifiuti tossici. I raggi X forniscono protoni che presentano una penetrazione profonda, una veloce esposizione e non contengono prodotti tossici. Un altro fattore da considerare è che le radiazioni non sarebbero in grado di effettuare più di un ciclo di sterilizzazione senza influenzare negativamente i materiali polimerici [93].

### **1.7.6. Sterilizzazione con ozono**

Recentemente è stata introdotta la sterilizzazione tramite ozono ( $O_3$ ) dei dispositivi medici in ambito sanitario. È un processo sicuro in quanto l'esposizione all'ozono avviene all'interno di una apposita camera, non rilascia residui tossici ed maggiormente penetrabile rispetto al perossido di idrogeno (con plasma), tuttavia, non arrivando ai livelli dell'ossido di etilene, vapore, calore secco o irradiazione [94]. Nella procedura di sterilizzazione ad ozono gassoso a bassa temperatura, i parametri tipici richiesti sono rappresentati dal vuoto, il tempo, la temperatura, la concentrazione di ozono, l'umidità e la pressione. La concentrazione di ozono è in genere a 85 mg/L per 15 minuti a una temperatura di 30-36°C [93]. Le temperature applicate in genere sono basse così da poterlo applicare anche ai materiali sensibili alla temperatura. La sterilizzazione tramite ozono può avvenire sia in fase acquosa sia sotto forma di gas [94].



La procedura tramite miscela gassosa è una tecnica di sterilizzazione del tutto nuova e affidabile per i dispositivi medici [94]. Per quanto riguarda questa metodica, l'ozono, che è un potente ossidante, deve essere in grado di penetrare tutte le zone del materiale da sterilizzare, il quale dovrà essere resistente all'ossidazione. È richiesta la presenza di una certa umidità per far sì che l'ozono gassoso risulti efficace. La produzione di  $O_3$  avviene per mezzo di una scarica elettrica che passa attraverso l'ossigeno ( $O_2$ ). Grazie alle sue proprietà termodinamiche,  $O_3$  è un prodotto metastabile e, pertanto, viene prodotto al momento poiché si decompone lentamente a temperature ambiente e abbastanza rapidamente in presenza di temperature più elevate [93]. La sterilizzazione mediante esposizione all'ozono è indicata principalmente per i materiali sensibili al calore visto che le temperature massime si aggirano ai  $36^\circ C$ . La procedura è considerata sicura perché non determina emissioni tossiche e il breve tempo di esposizione non provoca ustioni di natura accidentale [93].

## **2. CARATTERIZZAZIONE CHIMICO-FISICA DEGLI ALLINEATORI INVISIBILI LINEO CON SPETTROSCOPIA MICRO-RAMAN**

Le moderne metodiche di progettazione e produzione assistite al computer (CAD/CAM) sono principalmente impiegate nella fabbricazione degli allineatori termoplastici per il trattamento delle malocclusioni dentali [10,20,95]. Si è già ampiamente discusso che le caratteristiche biomeccaniche degli allineatori presenti in commercio sono influenzate non solo dalle proprietà del materiale termoplastico utilizzato ma anche dal processo di termoformatura e dall'ambiente intraorale [10,76]. Attualmente, i polimeri termoplastici più utilizzati per la fabbricazione degli allineatori sono rappresentati dal poliuretano (PU) e da poliesteri come il polietilene tereftalato glicole (PET-G) [39,70].

La letteratura scientifica ha evidenziato come il processo di termoformatura potrebbe causare variazioni nelle proprietà morfologiche e meccaniche del polimero [76]. Oltre a ciò, il posizionamento degli allineatori termoplastici nelle arcate dentarie li sottopone continuamente a carichi meccanici, variazioni di temperatura intraorale e all'influenza di pigmenti salivari e alimentari [96]. Ciò potrebbe provocare abrasioni, alterazioni superficiali, cambiamenti di colore, degradazione del polimero e, pertanto, alterare le prestazioni del dispositivo [55,73,96]. Anche i metodi di igienizzazione dell'allineatore possono influenzare l'integrità strutturale del materiale termoplastico. Tutte queste alterazioni comportano una perdita significativa di resistenza meccanica e di trasparenza dell'allineatore, il quale rappresenta il requisito essenziale nel trattamento ortodontico invisibile [53,71].

Nonostante le raccomandazioni dei clinici di indossare sempre allineatori tranne quando si mangia, si beve o per le manovre di igiene orale, molti pazienti assumono sostanze pigmentate (vino rosso, caffè, tè, Coca Cola) o fumano con i loro dispositivi ortodontici [34]. Da qui, la necessità di simulare le condizioni dell'ambiente intraorale con l'esposizione a diverse sostanze, tra cui la nicotina e il fumo di sigaretta, così da valutare al meglio eventuali cambiamenti strutturali e/o ottici degli allineatori invisibili.

Di seguito, l'attività sperimentale riporta l'analisi di caratterizzazione chimico-fisica del materiale termoplastico utilizzato per la fabbricazione degli allineatori Lineo dopo il processo di termoformatura e l'esposizione alle sostanze di uso quotidiano. La spettroscopia micro-Raman è stata utilizzata per identificare eventuali cambiamenti nella composizione chimica e, pertanto, criticità in termini di morfologia e/o struttura del polimero in questione.

## 2.1 Materiali e Metodi

### 2.1.1 Preparazione dei campioni

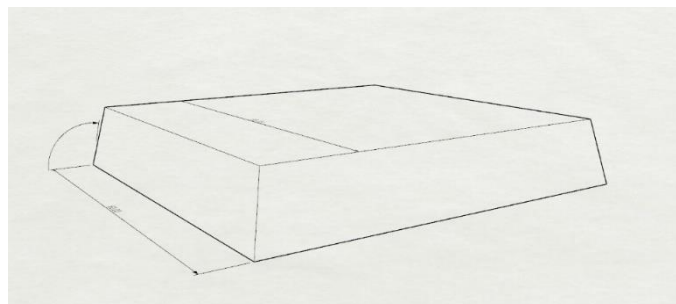
Il materiale termoplastico da caratterizzare è stato fornito in dischi del diametro di 120 mm con spessore pari a 0.8 mm (Figura 21).



**Figura 21.** Dischi in materiale termoplastico forniti dall'azienda produttrice degli allineatori Lineo.

Nel dettaglio, tre di questi dischi sono stati sottoposti al trattamento di termoformatura mentre un quarto disco, non sottoposto allo stampaggio a caldo, è stato utilizzato come confronto per la valutazione dell'influenza della termoformatura sulla caratterizzazione del materiale.

Per la necessità di ottenere superfici da cui ricavare campioni idonei, in termini di forma e di dimensioni, si è deciso di realizzare un oggetto con una geometria semplice su cui termoformare il materiale invece di un modello di arcate dentarie. Pertanto, è stata preparata una sagoma stampata a forma di piramide tronca a base rettangolare che è stata usata come modello per il processo di termoformatura (Figura 22). La temperatura usata per il riscaldamento era di 160°C/165°C. È stata applicata una quota di termoformatura di 20 mm con un angolo di 11° per ridurre l'attrito durante l'estrazione del materiale termoformato dallo stampo.



**Figura 22.** Modello a piramide tronca a base rettangolare utilizzato come stampo nella fase di termoformatura.

Dopo la termoformatura, i modelli sono stati rimossi e, per ottenere campioni idonei, è stata utilizzata la superficie orizzontale del materiale termoformato. Da questa, sono stati ricavati ventitré campioni ( $n = 23$ ) di dimensioni  $1 \times 1.5$  cm (Figura 23). Un campione non termoformato ( $n = 1$ ), sempre di dimensioni  $1 \times 1.5$  cm, è stato ottenuto dal quarto disco non sottoposto allo stampaggio a caldo.



**Figura 23.** Alcuni dei campioni termoformati ricavati dalla superficie orizzontale del modello piramidale ottenuto.

### **2.1.2 Trattamento dei campioni con sostanze di uso comune**

È fondamentale valutare se l'assunzione di bevande o l'uso di determinate sostanze o disinfettanti, che si potrebbero utilizzare per igienizzare gli allineatori, possano in qualche modo influenzare la caratterizzazione chimico-fisica del materiale di cui sono composti.

A tal scopo, sono stati utilizzati ventidue campioni termoformati ( $n = 22$ ). Ogni singolo campione è stato inserito in un contenitore di plastica da 5 ml riempito di una determinata soluzione liquida (Figura 24). Preliminarmente, i pezzi sono stati divisi in maniera casuale in base al tempo di immersione delle sostanze considerate (Tabella 1). Nel caso del disinfettante a base di argento colloidale, i campioni termoformati ( $n = 2$ ) sono stati trattati per un massimo di 3 ore al giorno, simulando così le manovre di igienizzazione dell'allineatore. Per quanto riguarda il fumo di sigaretta e la soluzione di saliva e fumo, il tempo di esposizione valutato consisteva nel raggiungimento di un quantitativo di fumo pari al consumo diretto di 10 ( $n = 2$ ) e 20 ( $n = 2$ ) sigarette. Per far ciò, sono stati creati due fori su ciascun coperchio di quattro contenitori di plastica. Un foro collegato con una cannucchia è stato usato come ingresso per il fumo espirato mentre l'altro è stato lasciato libero per la fuoriuscita del fumo dal contenitore. Un soggetto fumatore, in maniera volontaria, ha effettuato l'atto di espirazione del fumo seguendo il disegno sperimentale appena citato.



**Figura 24.** Alcuni dei contenitori di plastica da 5 ml riempiti con soluzioni coloranti.

Sostanze di uso comune	Tempi di esposizione	
	10 giorni (n = 11 campioni)	15 giorni (n = 11 campioni)
Caffè solubile	1	1
Thè nero	1	1
Vino rosso	1	1
Coca Cola	1	1
Disinfettante a base di argento colloidale	1*	1*
Saliva artificiale	1	1
Nicotina liquida	1	1
Fumo di sigaretta	1**	1**
Saliva artificiale + fumo	1**	1**
Saliva artificiale + nicotina	1	1
Saliva artificiale + caffè	1	1

**Tabella 1.** Tempi di esposizione stabiliti per il trattamento con le sostanze considerate.

\*3 ore al giorno;

\*\*una quantità di fumo corrispondente a 10 e 20 sigarette.

Le sostanze utilizzate sono state le seguenti:

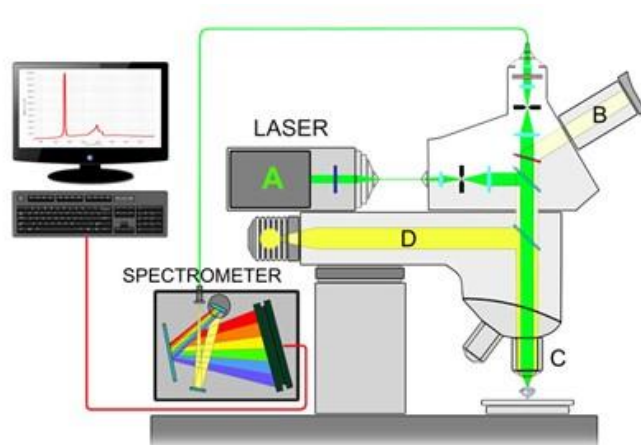
1. Caffè solubile: 6 gr di polvere di caffè (Nescafé Classic, Svizzera) sono stati aggiunti a 200 ml di acqua deionizzata (Milli-Q) bollente.
2. Thè senza zucchero (30 mg/150 ml, Earl Grey Twinings, Londra, Inghilterra).
3. Vino rosso (San Crispino, Cantine Ronco) non diluito.
4. Coca Cola® (Coca-Cola® Company, Atlanta, GA, USA).
5. Disinfettante a base di argento colloidale.
6. Saliva artificiale: 120 ml di saliva artificiale (Biotène Oral Balance, GlaxoSmithKline Consumer Healthcare S.p.A.) sono stati diluiti in 480 ml di acqua deionizzata.

7. Nicotina liquida: la soluzione di nicotina è stata ottenuta mediante infusione di filtri di sigarette in acqua deionizzata e successivamente filtrata.
8. Fumo di sigaretta (una certa quantità di fumo prodotto dal consumo di 10/20 sigarette).
9. Saliva artificiale e fumo.
10. Soluzione di saliva e nicotina in rapporto 1:1.
11. Soluzione di saliva e caffè in rapporto 1:1.

Tutti i campioni sono stati immersi in una vasca piena d'acqua a  $T = 37^{\circ}\text{C}$  fino alle tempistiche stabilite. Inoltre, i pezzi sono stati risciacquati ogni 24h con acqua deionizzata e immersi in sostanza fresca. Una volta raggiunti i tempi di esposizione programmati, tutti i campioni sono stati prelevati dai contenitori con le sostanze considerate, immersi in acqua Milli-Q per il lavaggio, posti negli ultrasuoni per 5 minuti e, infine, sono stati adeguatamente asciugati prima di essere analizzati per la caratterizzazione chimico-fisica.

### 2.1.3 Spettroscopia micro-Raman

È stata eseguita l'analisi spettroscopica micro-Raman per studiare la composizione chimico-fisica dei campioni polimerici in esame. Inizialmente, sono state effettuate misurazioni preliminari per individuare il setup idoneo per l'analisi. Tramite lo spettrometro micro-Raman (XploRA Plus, Horiba), è stata applicata una sorgente laser con due tipologie di lunghezza d'onda (638 e 785 nm) con un obiettivo 100X, reticolo da 1200 gr/mm, con un tempo di acquisizione di 10 secondi per 5 accumuli in un intervallo compreso tra 200 e 3200  $\text{cm}^{-1}$  (Figure 25-26).



**Figura 25.** Sistema della spettroscopia micro-Raman utilizzata per l'attività sperimentale.

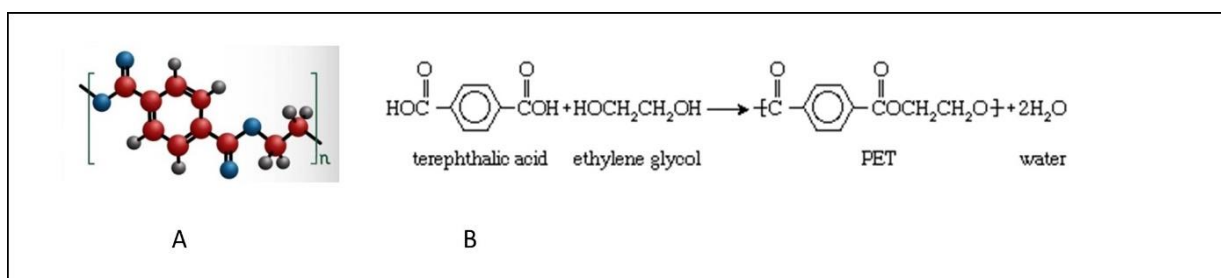


**Figura 26.** Spettrometro micro-Raman (XploRA Plus, Horiba) usato per la caratterizzazione.

## 2.2 Risultati

Le misurazioni ottenute con la spettroscopia micro-Raman acquisite a lunghezza d'onda di 638 nm mostravano un grande contributo da parte della fluorescenza mentre le misure a 785 nm evidenziavano i picchi caratteristici [97] ai modi vibrazionali del polimero polietilene tereftalato glicole (PET-G). La figura 27 e la tabella 2 mostrano, rispettivamente, la struttura del PET-G e dei suoi relativi picchi.

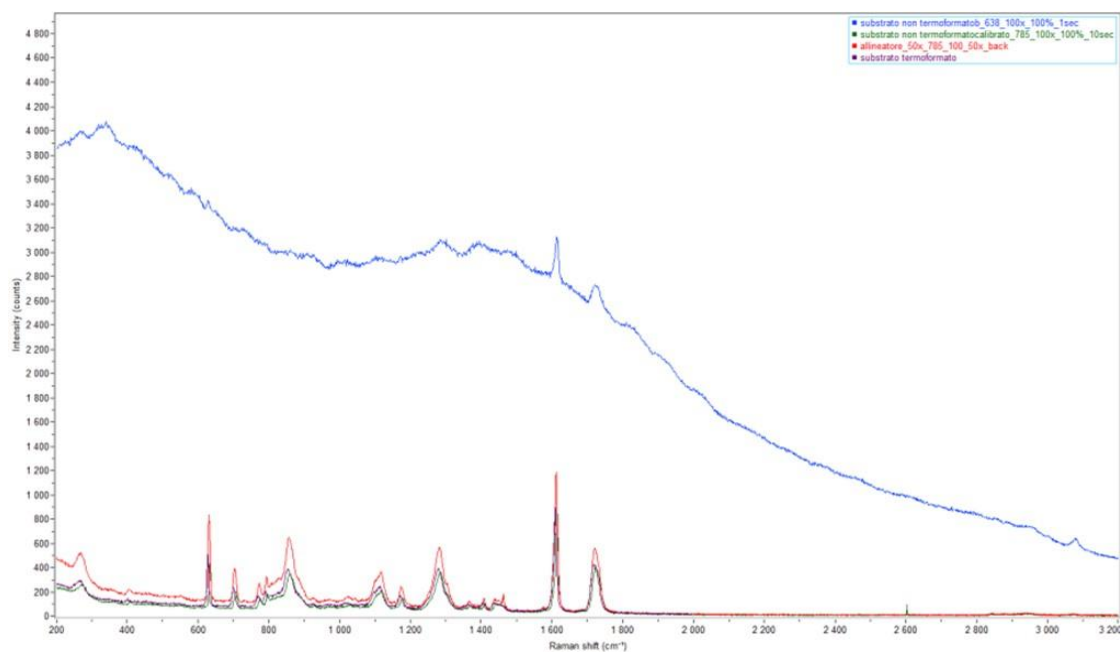
Gli spettri Raman acquisiti dalle due lunghezze d'onda, sia per i campioni testing (termoformati e non) sia per l'allineatore stesso, sono mostrati in figura 28.



**Figura 27.** (A) Struttura del PET-G; (B) Schema del processo di esterificazione a partire dall'acido tereftalico e dal glicole etilenico.

Raman (cm <sup>-1</sup> )	Assegnazioni*
3,082 w	CH stretching
3,068 w	CH stretching
3,000 w	CH stretching
2,960 w	CH <sub>2</sub> stretching
1,730 m	C = O stretching
1,615 s	C = C stretching (ring)
1,450 w	CH deformation
1,412 vw	C – C stretching (ring)
1,370 vw	CH <sub>2</sub> wagging
1,282 m	C – C stretching (ring), C – O stretching
1,270 m	C – C stretching (ring), C – O stretching
1,245 sh,w	C – C stretching (ring), C – O stretching
1,175 w	CH in plane bending (ring)
1,117 w	CH in plane bending (ring), C – O stretching
1,038 vw	C – C stretching (glycol)
890 vw	CH <sub>2</sub> rocking
853 w	C – C stretching (ring breathing), C – O stretching
797 w	CH out of plane bending (ring)
633 s	CCC in plane bending (ring)
407 vw	asymetric ring torsion
272 w	C – C stretching (ring), CCC bending (ring)

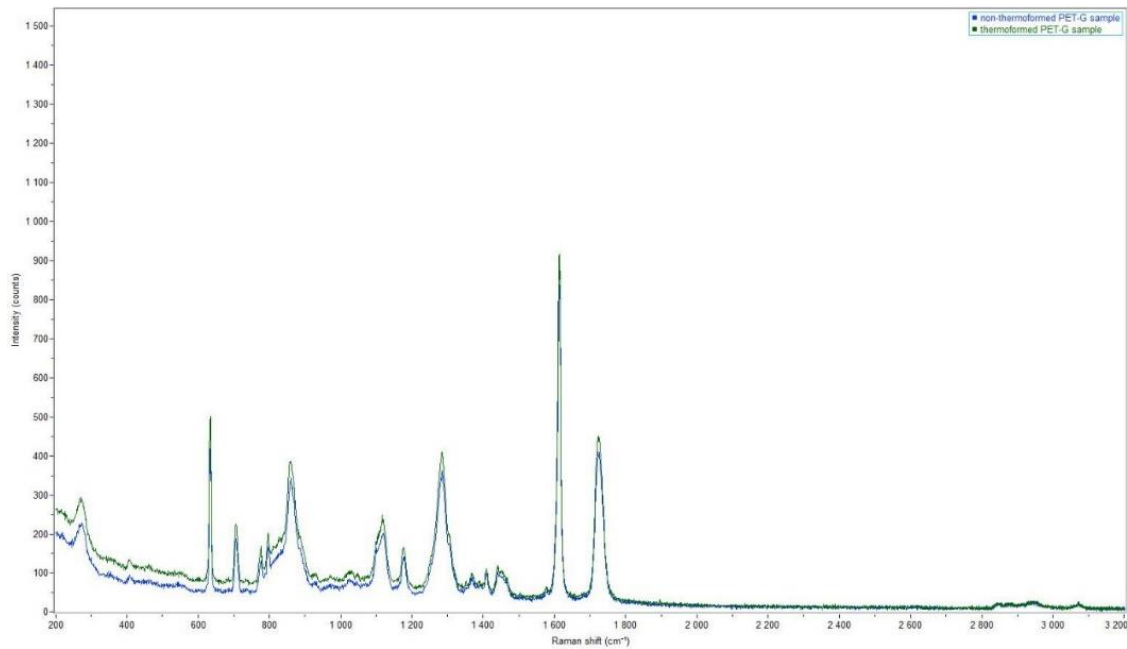
**Tabella 2.** Assegnazione dei picchi osservati al micro-Raman relativi al PET-G [97].  
\*abbreviazioni usate: s-strong, m-moderate, w-weak, v-very, sh-shoulder.



**Figura 28.** Spettri Raman relativi a: (1) campione testing in PET-G non termoformato a 638 nm (**blu**) e 785 nm (**verde**), (2) campione testing in PET-G termoformato (**viola**) e allineatore (**rosso**) a 785 nm.



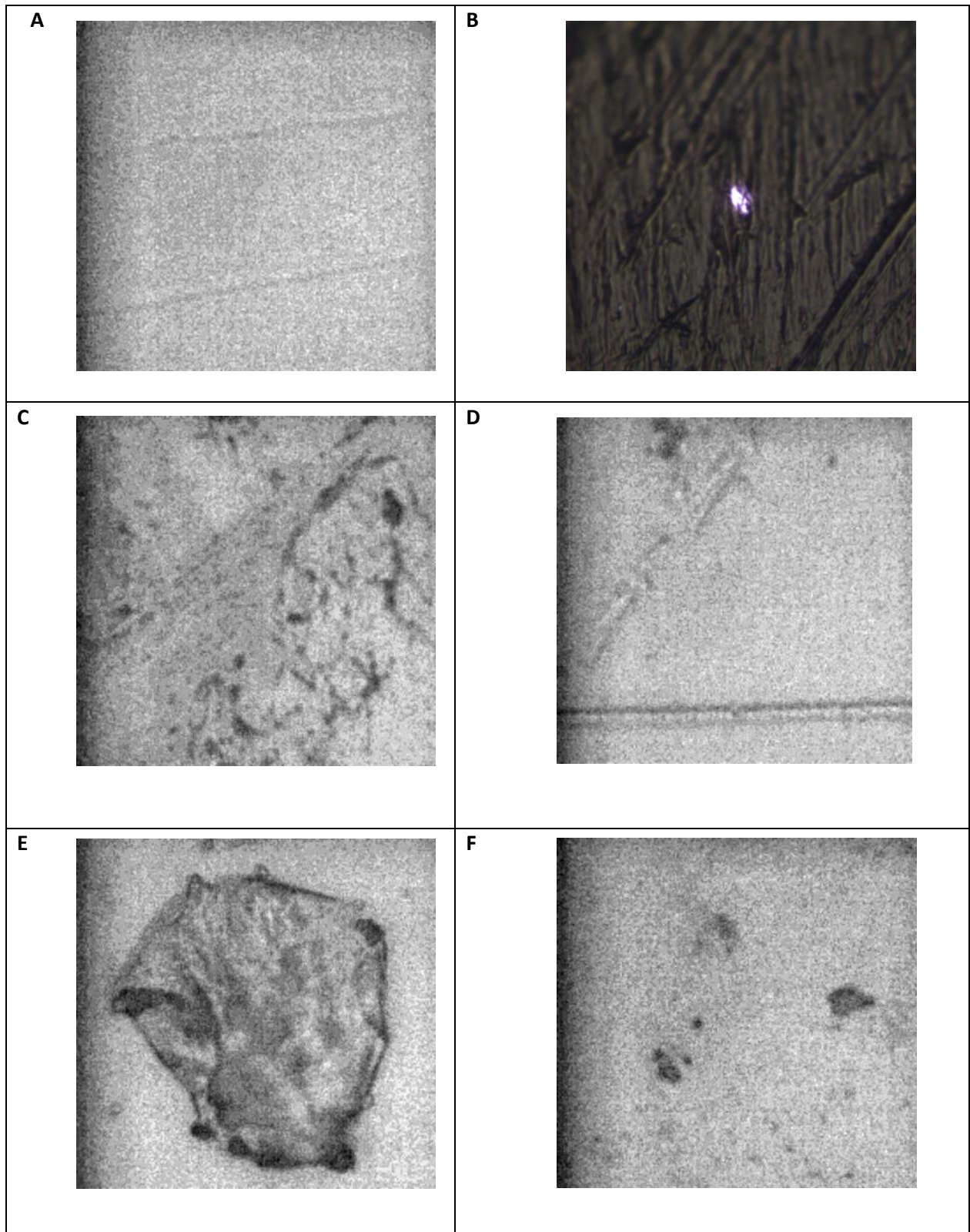
Prima dell'esposizione alle sostanze coloranti, è stato valutato il ruolo della termoformatura nella caratterizzazione fisico-chimica del polimero PET-G, confrontando due campioni (n = 1 termoformato, n = 1 non termoformato). L'analisi spettroscopica non mostrava alcun cambiamento di segnale tra i picchi caratteristici del PET-G dopo il trattamento termico, pertanto, la struttura del polimero non veniva alterata dalla termoformatura utilizzata per la realizzazione dell'allineatore (Figura 29).



**Figura 29.** Spettri Raman dei campioni in PET-G non termoformati (**blu**) e termoformati (**verdi**) a 785 nm.

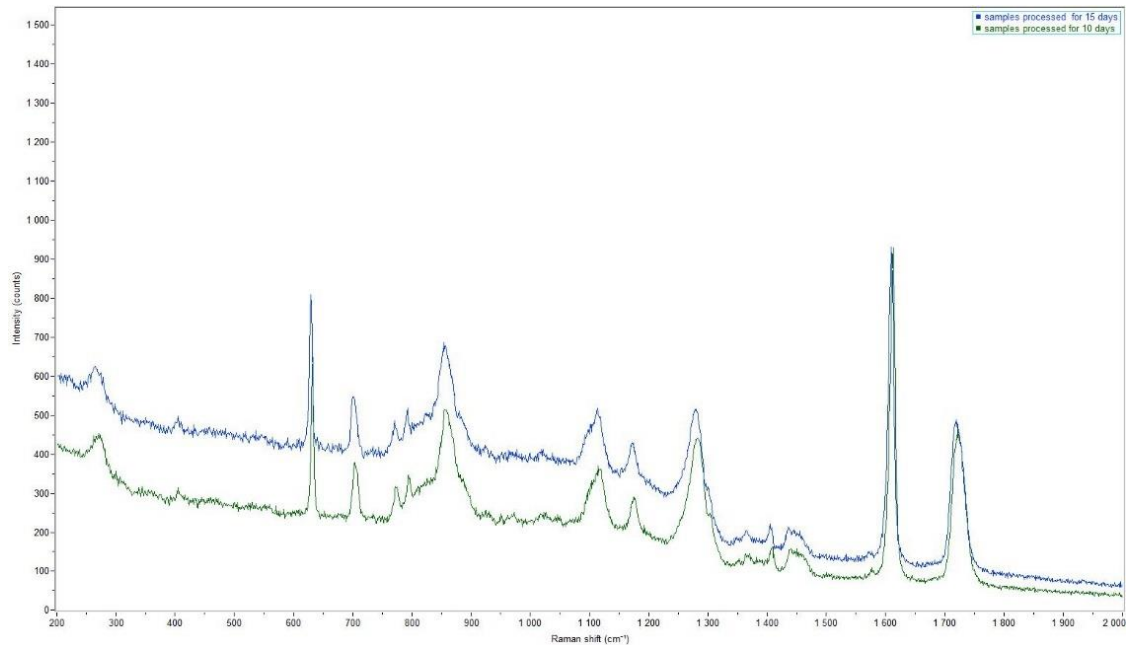
Tuttavia, l'indagine morfologica evidenziava come la superficie del campione termoformato sia caratterizzata da rugosità, fori e rigature rispetto alla superficie uniforme e omogenea del pezzo non trattato termicamente (Figura 30).

L'allineatore, essendo un dispositivo termoformato, possiede le stesse caratteristiche morfologiche del campione testing piatto, il quale verrà utilizzato per l'immersione nei diversi solventi e/o agenti pigmentati.



**Figura 30.** Analisi morfologica al microscopio ottico con ingrandimento 100x: (A) campione non termoformato; (B) allineatore; (C-F) campione termoformato.

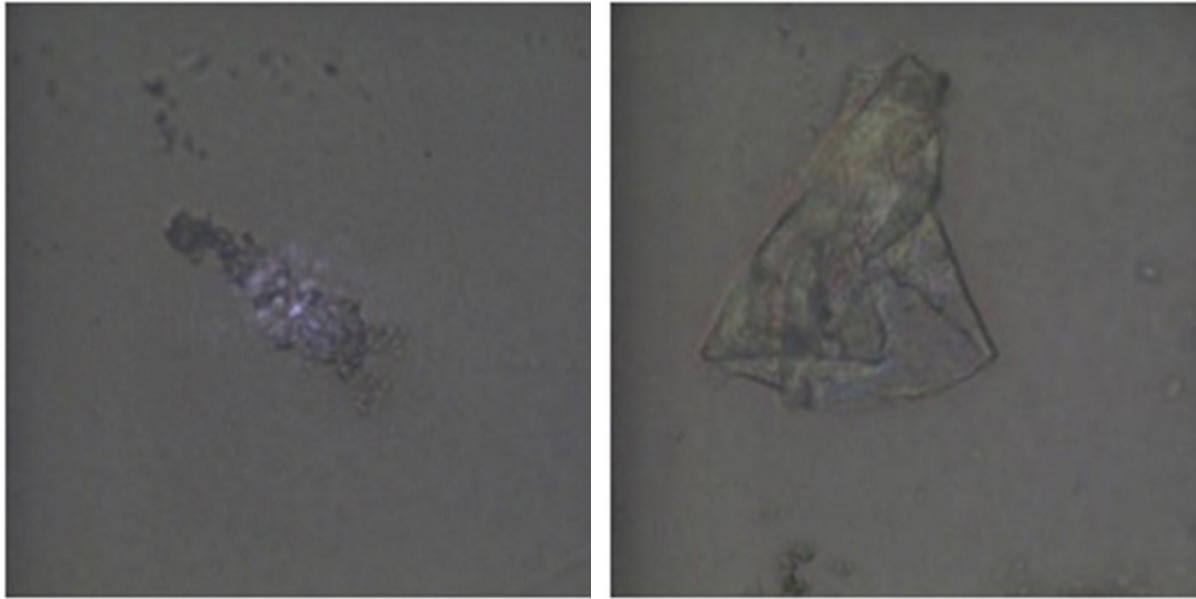
Dall'analisi degli spettri Raman ottenuti per tutti i campioni immersi nelle diverse sostanze (n = 22), non sono state riscontrate differenze tra quelli trattati a 10 e a 15 giorni (Figura 31). Pertanto, le caratteristiche che verranno evidenziate sono assimilabili al singolo solvente e/o agente utilizzato indipendentemente dalla durata del trattamento stesso.



**Figura 31.** Spettri Raman rappresentativi dei segnali trovati sulla superficie dei campioni sottoposti ai diversi trattamenti per 10 (**verde**) e 15 giorni (**blu**).

Tutti gli spettri acquisiti erano indicativi del polimero PET-G, qualunque sia l'agente utilizzato. Tuttavia, l'indagine morfologica evidenziava la presenza di zone erose e cambiamenti morfologici del polimero solo nei campioni immersi nella nicotina. Inoltre, in tutti i campioni si riscontravano diversi fenomeni di fluorescenza dovuti all'accumulo di residui di sostanze in corrispondenza delle rugosità e rigature del materiale termoformato (Figure 32-38).

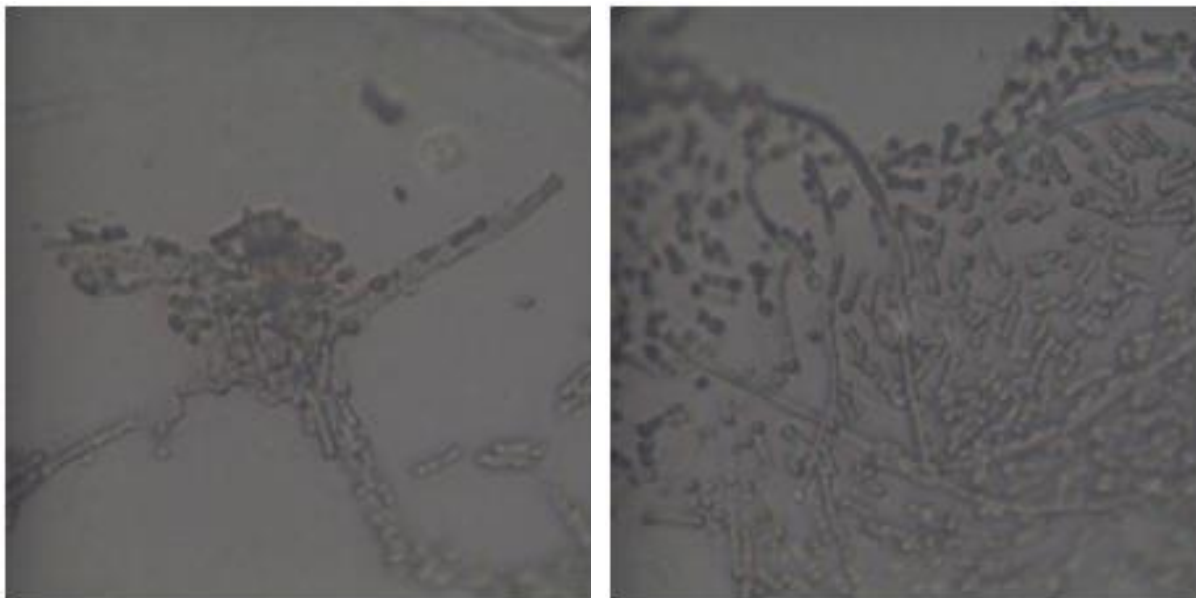
Oltre a ciò, erano presenti residui fibrosi di origine accidentale, attribuibili a fibre di cotone, sulla superficie dei campioni immersi nella soluzione di saliva artificiale e caffè (a 10 e 15 giorni) e in quelli trattati con disinfettante ad argento colloidale per 15 giorni (Figura 39).



(A)

(B)

**Figura 32.** Analisi morfologica dei campioni in PET-G immersi nel caffè. Presenza di residui con una discreta fluorescenza diffusa (A-B).



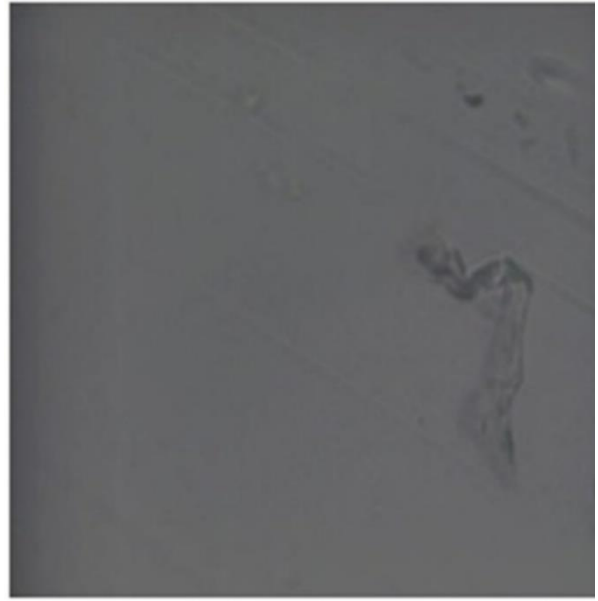
(A)

(B)

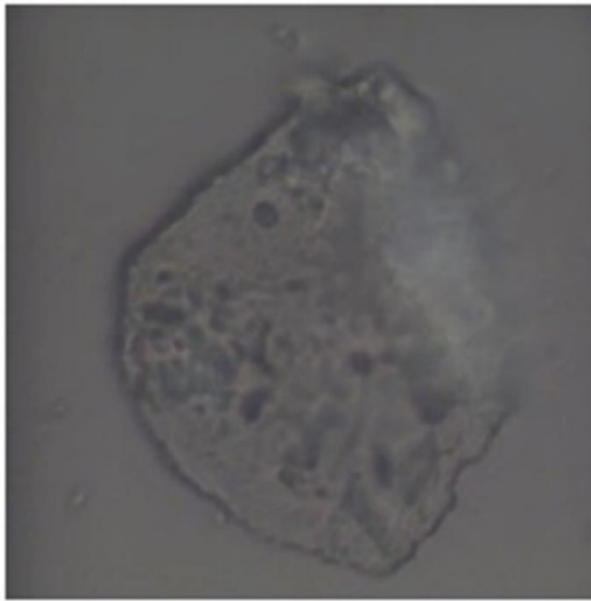
**Figura 33.** Analisi morfologica dei campioni in PET-G immersi in una soluzione di tè senza zucchero. Presenza di strutture ad albero molto fluorescenti (A-B).



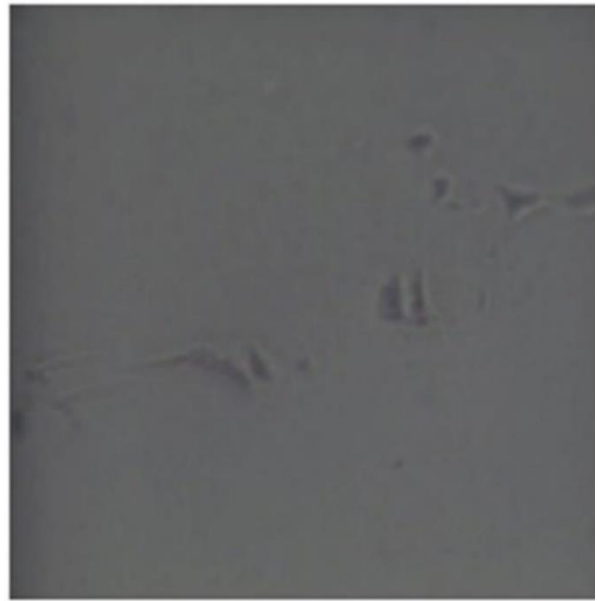
(A)



(B)

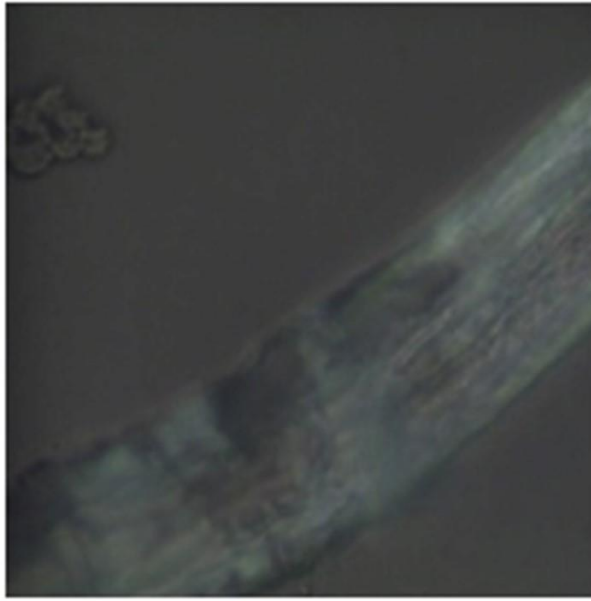


(C)

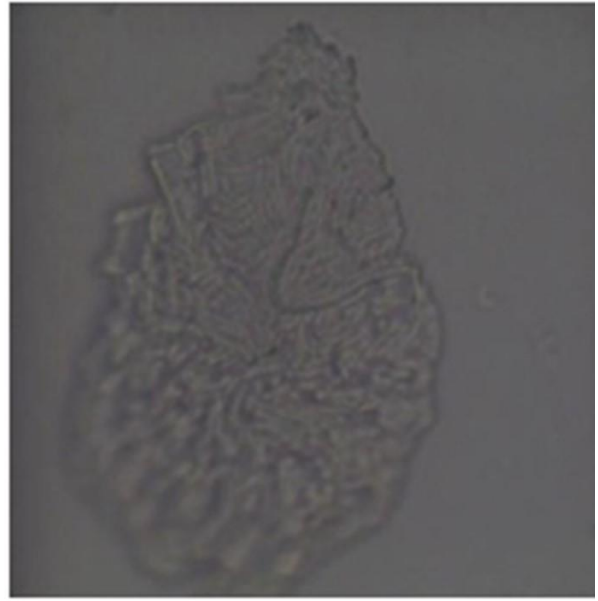


(D)

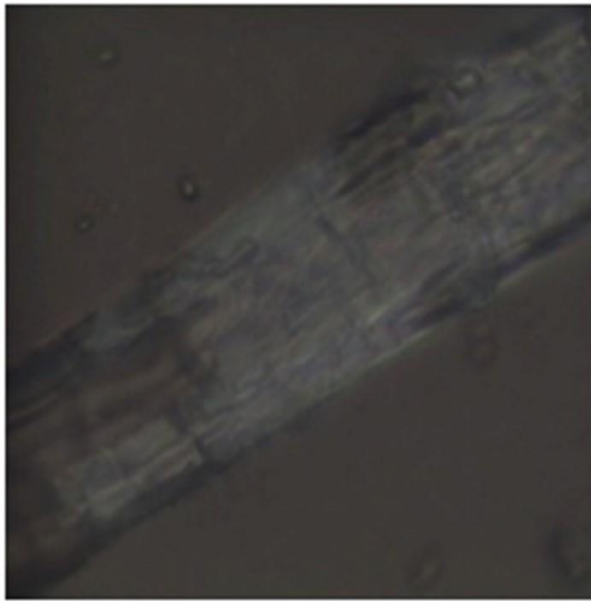
**Figura 34.** Analisi morfologica dei campioni in PET-G immersi nella Coca Cola (A-B) e nel vino rosso (C-D). Non sono presenti alcun tipo di strutture né fluorescenza.



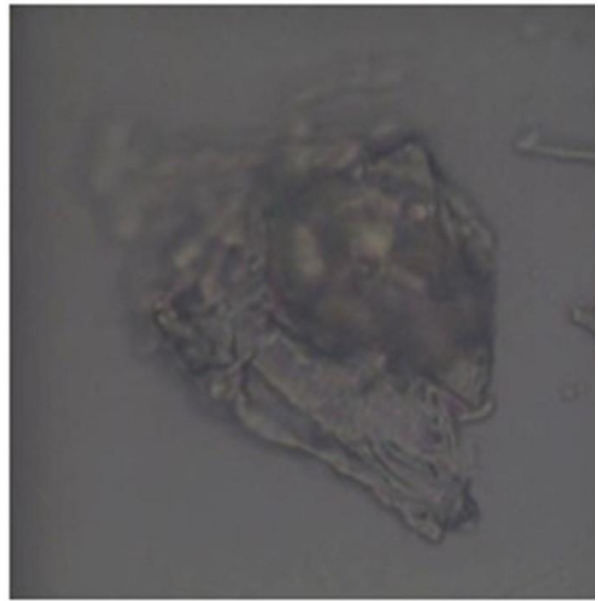
(A)



(B)

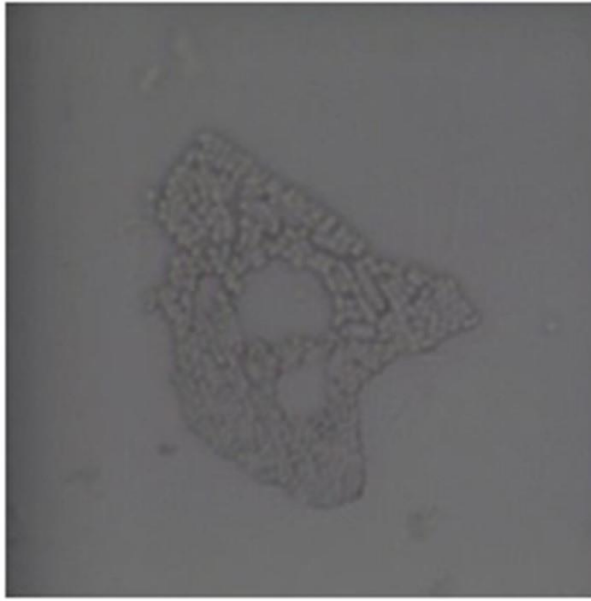


(C)



(D)

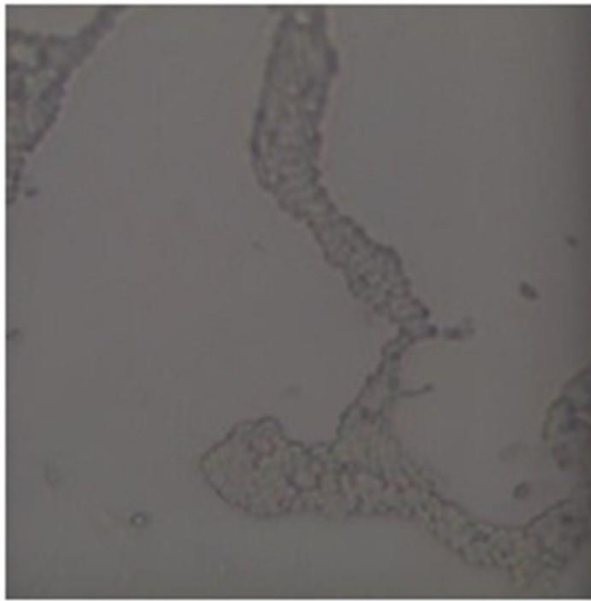
**Figura 35.** Analisi morfologica dei campioni in PET-G immersi nell'argento colloidale (A-B) e in una soluzione di saliva artificiale e caffè (C-D). Oltre le strutture usuali, sono presenti strutture ampie e fibrose non fluorescenti simili a fibre di cotone.



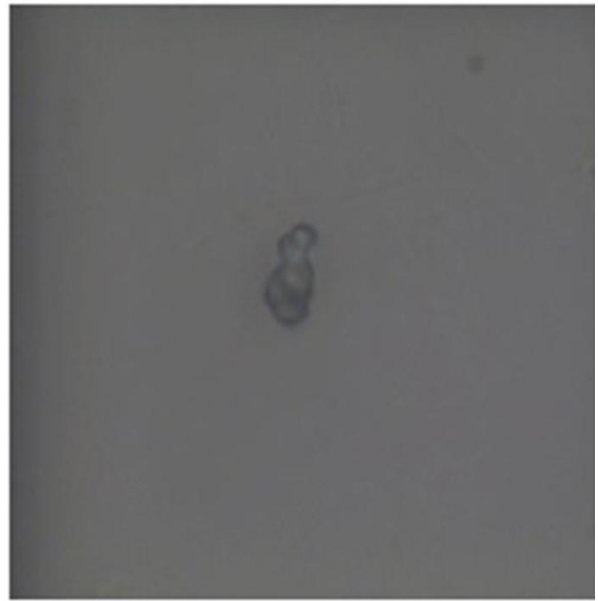
(A)



(B)

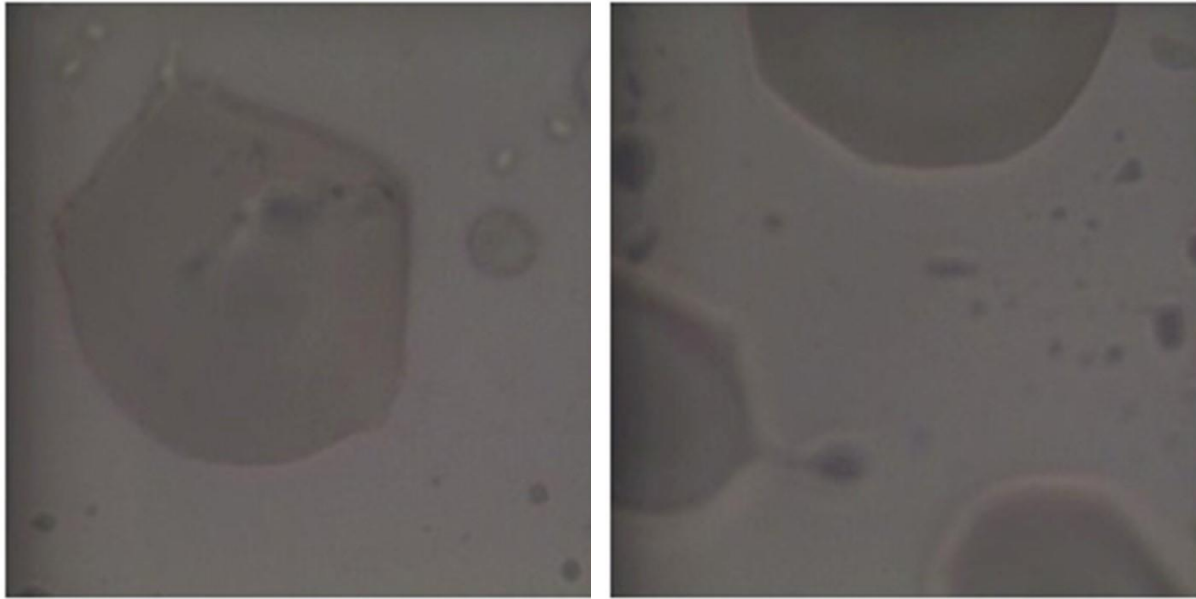


(C)



(D)

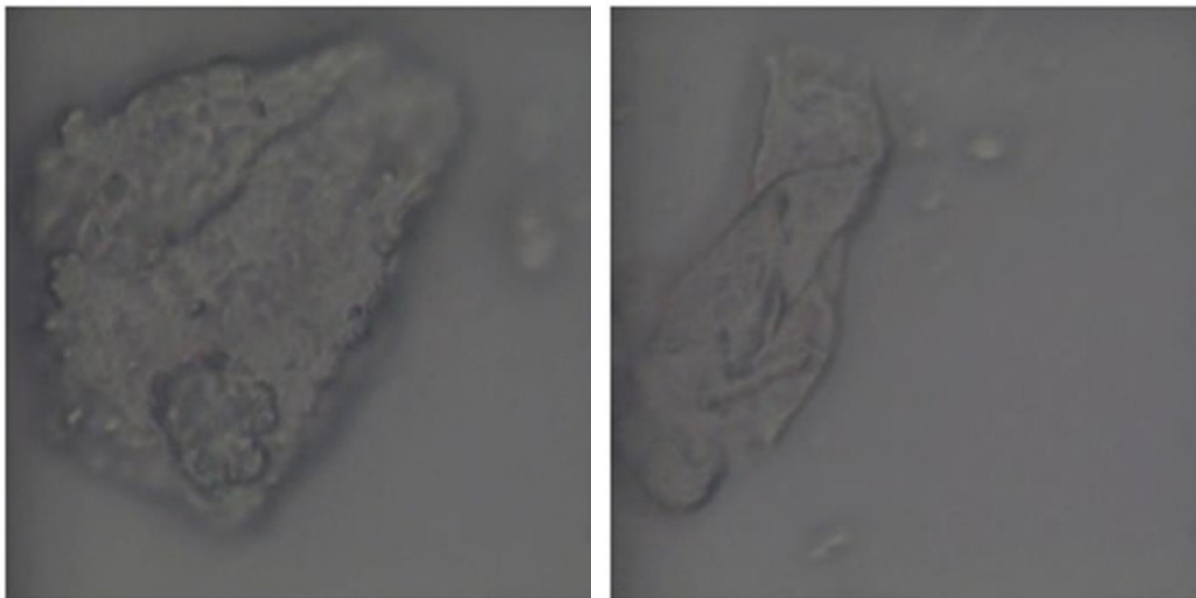
**Figura 36.** Analisi morfologica dei campioni in PET-G immersi in nicotina liquida (A-B) e in una soluzione di saliva artificiale e nicotina (C-D). Presenza di depositi carboniosi, dovuti al surriscaldamento locale, e strutture a bacchette che determinano poca fluorescenza.



(A)

(B)

**Figura 37.** Analisi morfologica dei campioni in PET-G immersi in saliva artificiale e in una soluzione di saliva con fumo di sigaretta (A-B). Presenza di macchie circolari più o meno regolari, senza strutture fibrose né a bacchetta.

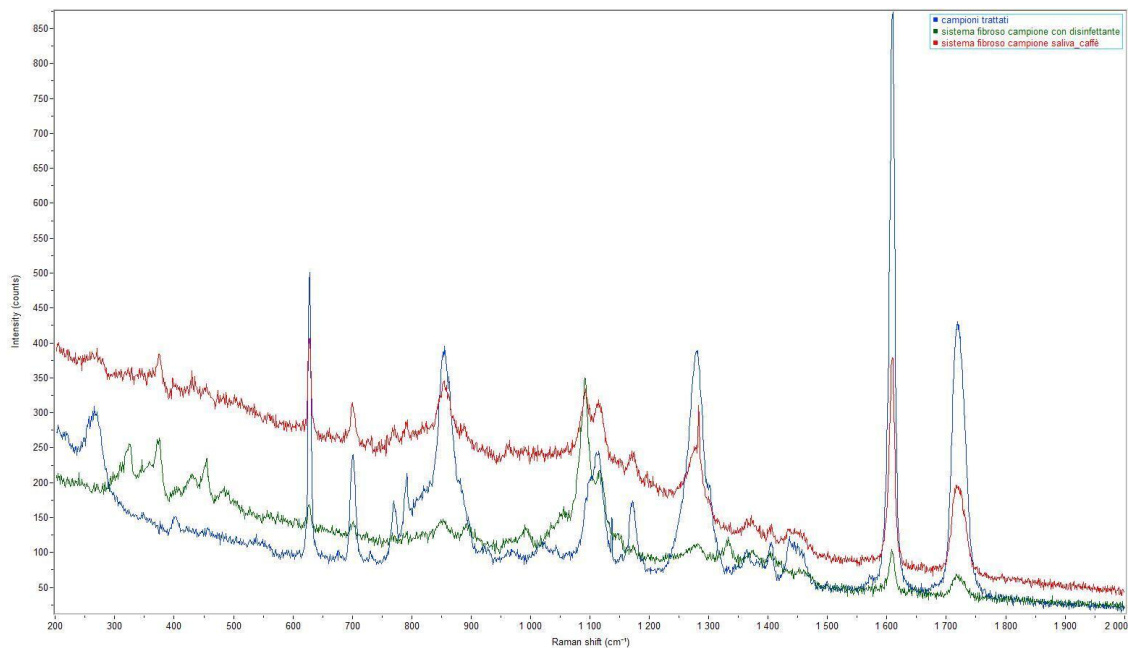


(A)

(B)

**Figura 38.** Analisi morfologica dei campioni in PET-G esposti al fumo di sigaretta (A-B). Presenza di depositi con poca fluorescenza, senza strutture fibrose o a bacchetta o macchie circolari.





**Figura 39.** Spettri Raman rappresentativi di alcuni tipi di segnale trovati sulla superficie dei campioni in PET-G. I picchi osservati corrispondono a quelli di corpi estranei simili a fibre di cotone trovati sulla superficie dei pezzi immersi nella soluzione di saliva e caffè (**rosso**) e in quelli trattati con argento colloidale (**verde**) rispetto a uno spettro Raman rappresentativo di campioni trattati con altre sostanze (**blu**).

## 2.3 Discussioni

Le caratteristiche qualitative degli allineatori invisibili sono strettamente correlate non solo al materiale utilizzato e al processo di stampaggio per la produzione, ma anche ai cambiamenti relativi all'ambiente orale nel quale vengono adoperati.

Questa ricerca sperimentale riporta le caratteristiche chimico-fisiche del polietilene tereftalato glicole (PET-G), utilizzato per la fabbricazione degli allineatori invisibili Lineo (Micerium Lab), in seguito all'esposizione di sostanze e agenti di uso quotidiano. La spettroscopia micro-Raman è una tecnica di analisi chimica non distruttiva che fornisce informazioni dettagliate sulla struttura chimica, le fasi e le interazioni polimorfe e molecolari. È integrato con un microscopio ottico il quale, concentrando il laser sul campione, consente l'analisi di piccole regioni [98].

L'originalità di questo lavoro consiste nel caratterizzare il materiale termoplastico dopo un'esposizione prolungata (15 giorni) a diverse sostanze, pari al periodo di utilizzo clinico di un singolo allineatore durante un trattamento ortodontico. Questo aspetto ha una rilevanza fondamentale in quanto viene osservato il comportamento strutturale del polimero simulando l'invecchiamento intraorale.

Sebbene l'analisi micro-Raman non abbia rivelato alcun cambiamento nella struttura chimica del PET-G (Figura 29), il processo di termoformatura, impiegato per la produzione degli allineatori, ha causato evidenti alterazioni superficiali del polimero tra cui rugosità, fori e rigature (Figura 30). Anche Porojan et al. [72] hanno notato un aumento di rugosità di questo materiale, seppur insignificante. Al contrario, lo studio di Zhang et al. [26] ha evidenziato come la superficie del campione in PET-G sia più liscia dopo la termoformatura.

Alterazioni delle proprietà fisiche del PET-G sono state riportate anche dopo l'esposizione intraorale [26]. L'analisi micro-Raman effettuata dopo i vari tempi di immersione programmati per le sostanze selezionate ha dimostrato che la struttura del PET-G non viene alterata e che i fenomeni di fluorescenza riscontrati sono dovuti solo all'accumulo di residui (Figure 32-38). Gli unici cambiamenti morfologici sono stati rilevati nei campioni trattati con nicotina, poiché l'interazione tra il laser micro-Raman e i residui carboniosi ha provocato la formazione locale di aree di combustione del materiale. Inoltre, nei campioni immersi nella soluzione di saliva e caffè e in quelli trattati con disinfettante a base di argento colloidale, sono stati rilevati corpi estranei accidentali di natura fibrosa, la cui composizione e picchi caratteristici sono probabilmente assimilabili a fibre di cotone (Figura 39) [99]. La presenza di queste strutture estranee viene ritenuta casuale e, per questo, al momento prive di significato ai fini della ricerca sperimentale in atto.

In ambiente orale, eventuali variazioni di colore del materiale polimerico si possono associare all'assorbimento o alla penetrazione di sostanze coloranti a contatto [52,53,100]. Le caratteristiche superficiali dei materiali termoformati potrebbero accelerare l'accumulo di pigmento con conseguente perdita di trasparenza [101]. Daniele et al. [70] hanno riscontrato alterazioni nelle proprietà ottiche degli allineatori realizzati in PET-G e PU, soprattutto dopo l'esposizione al caffè o al vino rosso, a causa delle impurità depositate in superficie. Tuttavia, Porojan et al. [72] hanno dimostrato che le variazioni di colore dei campioni di PET-G non dipendono tanto dalla rugosità superficiale ma dalla penetrazione all'interno del materiale stesso. In questa ricerca non sono state riscontrate variazioni sostanziali a livello colorimetrico o quantomeno queste non sono tali da essere rilevate dalla tecnica spettroscopica impiegata. Pertanto, sarebbe opportuno in futuro valutare i cambiamenti nelle proprietà ottiche e di trasparenza del PET-G con i tempi di esposizione a lungo termine proposti in questo lavoro (10 e 15 giorni) con strumenti di indagini più appropriati.

### **3. EFFICACIA DI UN SISTEMA DI STERILIZZAZIONE A BASE DI OZONO GASSOSO NELL'AMBITO DEI PROCESSI DI PRODUZIONE AZIENDALI DEGLI ALLINEATORI INVISIBILI LINEO**

La contaminazione ambientale è causata da microrganismi che si sviluppano nelle strutture, nelle attrezzature o negli ambienti aziendali a causa dell'inefficacia dei protocolli di igiene [102]. Negli ultimi anni, il sistema sanitario si è concentrato sulla necessità di adottare nuove procedure di sanificazione per ottimizzare la qualità di produzione dei vari dispositivi medici e la sicurezza sul lavoro negli ambienti professionali, minimizzando la deposizione di agenti patogeni sulle superfici e la loro trasmissione [103–105]. Esistono diverse procedure di sterilizzazione (calore secco, vapore, perossido di idrogeno, ossido di etilene e irraggiamento) che hanno come obiettivo l'ottenimento di ambienti e/o dispositivi germ-free [93]. Tuttavia, alcuni di questi metodi possono avere effetti indesiderati su determinati materiali, tra cui la fusione e l'ossidazione di alcuni metalli o la degradazione dei polimeri, pertanto, è necessario scegliere il sistema di sterilizzazione più adatto al tipo di dispositivo da sanificare [93].

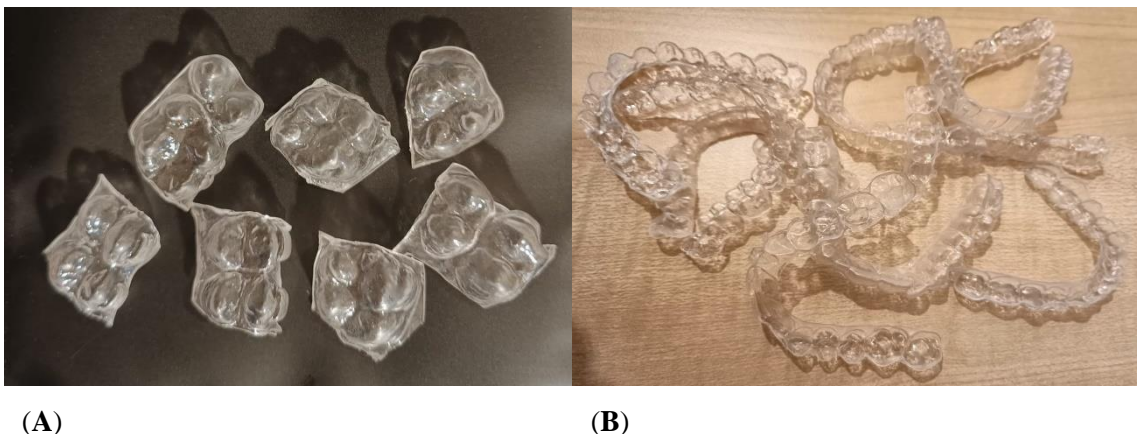
Recentemente è stato proposto l'uso dell'ozono ( $O_3$ ) come agente sterilizzante [106,107] e per la decontaminazione di vari ambienti [108–110] sotto forma di una miscela di gas  $O_3/O_2$ , acqua ozonizzata, soluzione salina ozonizzata oppure ozono associato ad altre sostanze [111–113]. L'ozono ha un'ampia applicazione in ambito medico poiché possiede molteplici proprietà, tra cui quelle antimicrobiche (battericida, virucida e fungicida), immunostimolanti, immunomodulatorie, antinfiammatorie, biosintetiche (per l'attivazione del metabolismo di carboidrati, proteine, lipidi) e analgesiche [114]. Principalmente l'ozono agisce sui microrganismi inducendo la distruzione delle pareti cellulari attraverso reazioni di perossidazione dei substrati alterando, così, sia le strutture che le funzionalità delle biomolecole [107]. Grazie alle sue caratteristiche, è stato proposto l'utilizzo di  $O_3$  in odontoiatria per il trattamento di lesioni cariose iniziali, per la sterilizzazione dei canali radicolari e di tasche parodontali, per potenziare la guarigione di lesioni nei tessuti molli del cavo orale come ulcere o lesioni erpetiche, per trattamenti desensibilizzanti su denti sensibili, per le perimplantiti o come igienizzante per protesi dentarie [114]. Nel settore ortodontico, la richiesta di apparecchi estetici, come gli allineatori invisibili, è aumentata in modo significativo [115]. I clinici raccomandano ai pazienti vari metodi di pulizia con disinfettanti o compresse durante il trattamento ortodontico per prevenire la formazione di biofilm sulla superficie dell'allineatore [116]. Tuttavia, sarebbe opportuno che nei laboratori ortodontici vengano applicate delle procedure di sanificazione dei dispositivi prodotti poiché i microrganismi ambientali possono

depositarsi sulle loro superfici, ad esempio durante le procedure di rifinitura dell'allineatore. Pertanto, l'obiettivo di questa seconda attività sperimentale consiste nel valutare l'efficacia di un metodo di sterilizzazione innovativo che potrebbe essere inserito negli steps finali di produzione degli allineatori invisibili. L'idea si basa sull'utilizzo di un sistema a base di una miscela gassosa  $O_3/O_2$  con l'intento di eliminare la contaminazione microbica presente sulla superficie degli allineatori direttamente all'interno della loro singola confezione.

### 3.1 Materiali e Metodi

#### 3.1.1 Suddivisione e contaminazione dei campioni

Preliminarmente, sono stati preparati cinquanta campioni ( $n = 50$ ) in polietilene tereftalato glicole (PET-G) che consistono in pezzi di allineatori Lineo (Micerium Lab). Per far ciò, dieci singoli allineatori sono stati tagliati in diverse parti prelevando per lo studio sperimentale soltanto frammenti a forma di premolari e molari (Figura 40).



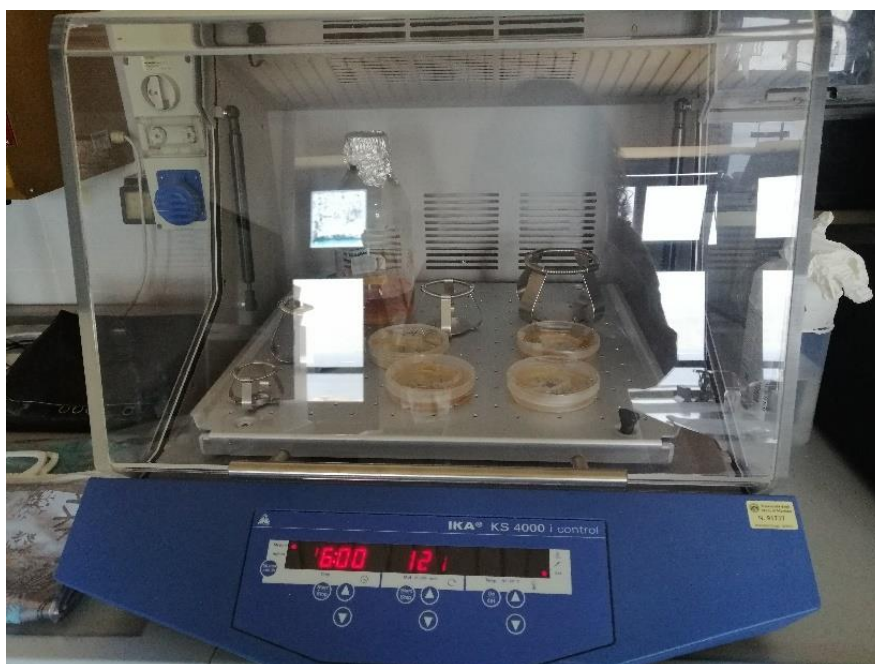
**Figura 40.** Materiale utilizzato per l'attività sperimentale. Parti di allineatori di premolari e molari utilizzati come campioni per i test (A) e gli allineatori Lineo da cui sono stati prelevati i campioni (B).

Per valutare a quali periodi di esposizione l'ozono gassoso era efficace nell'eliminare la carica microbica contenuta nella superficie dei campioni, sono state previste le seguenti tempistiche: 24, 48 e 72h. Inoltre, era necessario anche il confronto del suo potenziale microbicida con quello di un disinfettante conosciuto in ambito medico. Pertanto, si è scelto di utilizzare una soluzione liquida di clorexidina digluconato al 2% come controllo negativo. Il controllo positivo era rappresentato da campioni di allineatori non sottoposti ad alcun trattamento di disinfezione, simulando la situazione reale in cui gli allineatori vengono inviati ai clinici per iniziare il trattamento ortodontico senza che vengano sanificati. La tabella 3 riporta la suddivisione in gruppi, effettuata in modo casuale, di tutti i campioni di allineatori.

GRUPPO	N° (n <sub>tot</sub> = 50)
Trattamento con ozono gassoso (24h)	10
Trattamento con ozono gassoso (48h)	10
Trattamento con ozono gassoso (72h)	10
Clorexidina digluconato 2% (controllo negativo)	10
Nessun trattamento (controllo positivo)	10

**Tabella 3.** Divisione dei campioni in gruppi in base alla tipologia di trattamento adottata.

Per ottenere la contaminazione microbica che può verificarsi durante i processi di produzione degli allineatori all'interno dei laboratori ortodontici, tutti i campioni sono stati sottoposti a maneggiamento fino a un massimo di dieci minuti. Successivamente, ogni pezzo di allineatore è stato inserito singolarmente in apposite provette Falcon sterili e si è proceduto alla coltura microbiologica. Nel dettaglio, sotto cappa di sicurezza biologica, in ogni provetta è stato inserito 4 mL di terreno di coltura sterile rappresentato dal brodo di Lisogenia (LB) e, successivamente, tutti i campioni sono stato sottoposti a incubazione a 37°C in agitazione per 20 ore per mezzo di un'incubatrice (KS 4000 i control, IKA) così da raggiungere la crescita esponenziale della popolazione microbica (Figura 41).



**Figura 41.** Incubatrice utilizzata per la coltura microbiologica.

### 3.1.2 Generatore di ozono

La produzione di una determinata concentrazione di  $O_3$  avviene mediante generatori di ozono, i quali sono alimentati da un trasformatore elevatore di tensione che è collegato ad una scheda elettronica deputata al controllo di tutti i comandi dati dall'operatore [117]. L'energia elettrica erogata dal trasformatore viene utilizzata per dividere la molecola di  $O_2$  in  $O$  atomico, che combinandosi con le altre molecole di  $O_2$ , permette la formazione della molecola  $O_3$  [118]. Quindi viene ottenuta una miscela di gas di  $O_3/O_2$  che fuoriesce da un tubo in silicone con un puntale dedicato collegato al generatore.

La miscela di gas  $O_3/O_2$ , utilizzata per questa ricerca, è stata prodotta da un generatore di ozono (CUBO) fornito dall'azienda Terminter Company (Messina, Italia) che utilizza l'aria ambientale come fonte di ossigeno (Figura 42). Questa apparecchiatura ha diverse funzioni come generatore d'aria sanificata con alto potere ossidante, alta capacità di degradare complessi composti organici non biodegradabili, disinfezione degli ambienti con riduzione del carico batterico e degradazione di odori. La miscela gassosa ozonizzata prodotta corrisponde a 10gr/h. Il tempo ciclico di ozonizzazione è di 6 cicli di 45' con 15' stand-by. La tensione di alimentazione è 110 W, la potenza massima applicata è 220 ~ 240 V e la temperatura di funzionamento va da +5 a +35 °C.

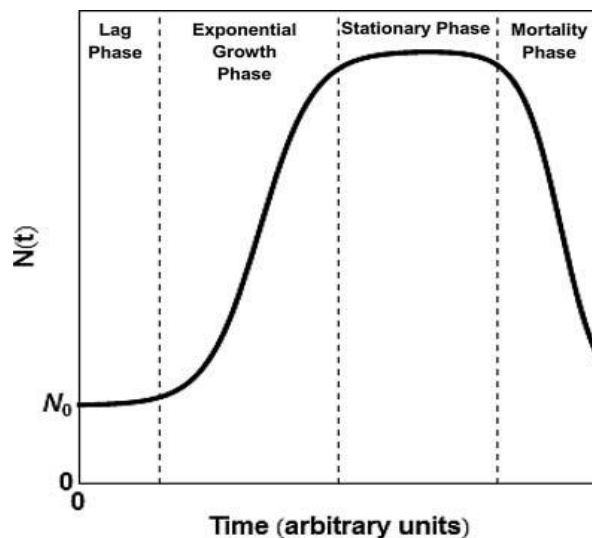
Nella seguente attività sperimentale, trenta campioni ( $n = 30$ ) sono stati esposti alla miscela gassosa  $O_3/O_2$  a temperatura ambiente (28 °C).



**Figura 42.** Generatore di ozono (CUBO) utilizzato per l'esposizione alla miscela gassosa  $O_3/O_2$  dei campioni di allineatori.

### 3.1.3 Misurazione della densità ottica

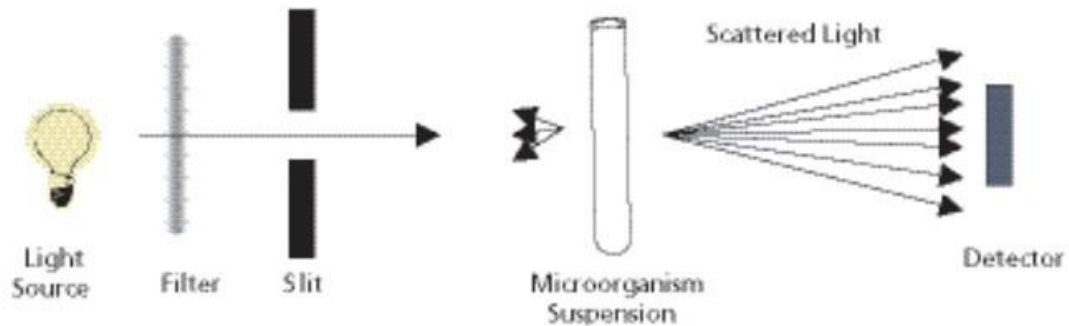
In linea generale, la crescita di una popolazione microbica è caratterizzata dal susseguirsi di quattro fasi principali [119]. Una volta che i microrganismi vengono inoculati in un terreno di crescita, si assiste a una fase di latenza in cui, prima di duplicarsi, avviene la sintesi di tutti gli enzimi necessari per la crescita microbica. Successivamente, i microrganismi iniziano a replicarsi crescendo in maniera esponenziale (fase esponenziale o logaritmica). Questa fase è fortemente influenzata dal tipo di microrganismo considerato e dalla condizioni ambientali come le caratteristiche del terreno di coltura e la temperatura di crescita [119]. L'esaurimento dei nutrienti disponibili del terreno colturale e il progressivo accumulo dei prodotti di rifiuto microbici comportano l'inizio della fase stazionaria (o di plateau), in cui si assiste a un rapporto equilibrato tra le cellule in divisione e quelle in morte cellulare e, pertanto, il numero dei microrganismi in coltura resta costante. Infine, la coltura microbica raggiunge uno stadio di morte, con la presenza o meno di lisi cellulare, dove la conta totale (numero di cellule vive e morte) rimane costante ma la conta vitale è diminuita (Figura 43) [120].



**Figura 43.** Schema di una tipica curva di crescita microbica [120].

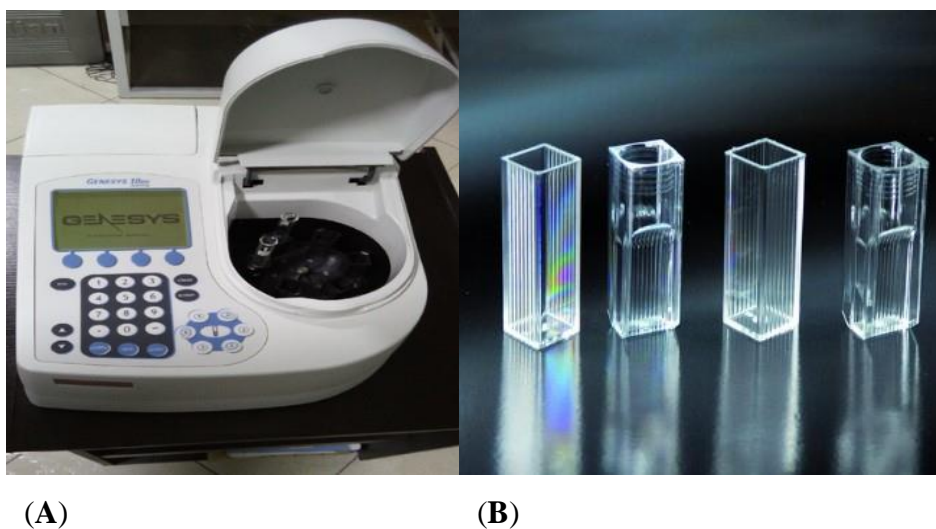
Sono molteplici le procedure per determinare il numero di cellule microbiche in una coltura e la scelta dipende dal tipo di microrganismo e dall'obiettivo predisposto. La misurazione della densità ottica (OD) è un metodo di tipo indiretto che determina la torbidità della coltura mediante uno spettrofotometro, il quale rileva la percentuale di luce trasmessa da una coltura (trasmittanza) nel momento in cui viene attraversata da un fascio di luce incidente. Il valore

riscontrato viene espresso in termini di assorbanza ed è proporzionale al numero di cellule presenti (Figura 44) [121–124].



**Figura 44.** Diffusione della luce nella spettrofotometria. In presenza di una sospensione microbica, la luce che raggiunge il rivelatore viene ridotta disperdendo la luce nelle cellule in sospensione. Questa diminuzione nella luce che raggiunge il rivelatore determina l'apparenza di un aumento nell'assorbanza del campione [125].

Per valutare la crescita microbica delle colture iniziali ottenute dal maneggiamento delle parti di allineatori e l'eventuale riduzione microbica finale dopo i trattamenti di sanificazione previsti, viene osservata la massa cellulare mediante la misurazione della densità ottica con lo spettrofotometro GENESYS UV-vis 10S (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) impostato a una lunghezza d'onda di 600 nm ( $OD_{600}$ ) [126]. Le cuvette monouso in PS ottico con volume 0.5-2 mL (Bio Scientifica) contenevano i prelievi delle singole colture microbiche e sono state utilizzate per misurare le densità ottiche di tutti i campioni (Figura 45).

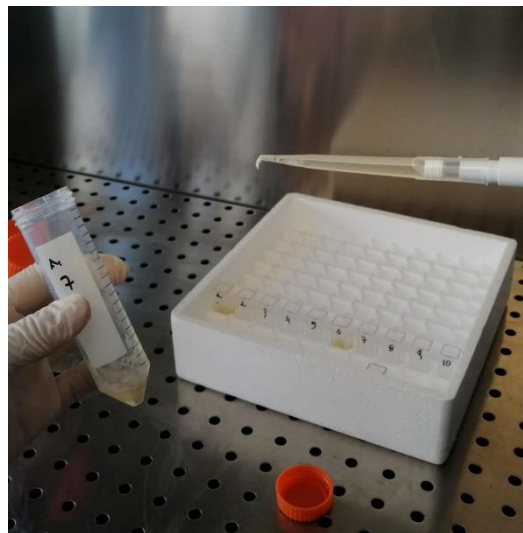


**Figura 45.** Strumentario usato per la misurazione della densità ottica delle colture microbiche.



Inizialmente, sotto cappa biologica sono stati trasferiti 2 mL di terreno di coltura LB sterile in una cuvette, mediante una pipetta da laboratorio (P100) con puntale sterile, per preparare il “bianco” di lettura allo spettrofotometro. Questa procedura preliminare viene effettuata prima di ottenere le misure OD delle colture iniziali e finali.

Dopo i periodi di incubazione previsti per le colture microbiche, sotto cappa sono stati prelevati 2 mL di coltura dalle provette contenenti i campioni incubati per essere trasferiti all'interno delle cuvette corrispondenti. Per evitare contaminazioni tra le diverse colture, i puntali della pipetta sono stati cambiati ad ogni prelievo (Figura 46). Le cuvette sono state inserite uno alla volta nello spettrofotometro e, partendo sempre dal bianco, è stata eseguita la lettura delle densità ottiche riscontrate. È stato necessario preparare 2 repliche per misurare l'OD di ciascun campione e calcolare la media dei valori, limitando così il margine di errore. Tutte le misurazioni OD delle colture microbiche iniziali e finali per tutti i gruppi sono state accuratamente registrate.



**Figura 46.** Prelievo delle colture microbiche post-incubazione e trasferimento nelle cuvette per la misura delle densità ottiche.

#### **3.1.4 Trattamento di sterilizzazione a base di ozono gassoso**

Il sistema di sterilizzazione con il generatore di ozono CUBO prevedeva l'erogazione della miscela di gas  $O_3/O_2$  prodotta direttamente all'interno dei packaging predisposti per i singoli allineatori da inviare al clinico. Per far ciò, è stato adoperato un tubo di diffusione in silicone collegato da una parte al generatore di ozono e dall'altra a un puntale di piccole dimensioni usato per la penetrazione del gas all'interno delle confezioni (Figura 47).



**Figura 47.** Generatore di ozono collegato al tubo di diffusione con un puntale simile ad un ago di minime dimensioni.

Per l'attività sperimentale, la Micerium Lab ha fornito trenta packaging Lineo con adesivi sigillanti per ogni pezzo di allineatore da trattare con ozono gassoso.

Il protocollo ideato per questa ricerca sperimentale includeva i seguenti passaggi:

1. Preliminarmente è stato realizzato un foro, delle stesse dimensioni del puntale predisposto per la fuoriuscita del gas dal generatore, su una delle due superfici piane della confezione per allineatori;
2. Sotto cappa biologica, ciascun pezzo di allineatore precedentemente contaminato è stato inserito all'interno della confezione e accuratamente sigillato utilizzando una termosigillatrice portatile;
3. Tutte i packaging con all'interno i campioni ( $n = 30$ ) sono state riempite con la miscela di gas  $O_3/O_2$  attraverso il puntale correttamente inserito nel foro previsto;
4. Una volta che i packaging sono stati riempiti completamente, i fori sono stati immediatamente chiusi in maniera ermetica con gli adesivi (Figura 48).



**Figura 48.** Packaging per allineatori Lineo riempite di gas  $O_3/O_2$ .

Una volta raggiunti i tempi di esposizione stabiliti per ciascun gruppo di trattamento con ozono gassoso (24h, 48h e 72h), sotto cappa biologica le confezioni sono state aperte singolarmente per trasferire ogni pezzo di allineatore in provette Falcon sterili. Quindi, è stata effettuata la coltura microbiologica per ogni gruppo. Sempre sotto cappa, in ogni Falcon contenente i campioni sono stati trasferiti 4 mL di terreno di coltura LB sterile e si è proceduto all'incubazione a 37°C in agitazione per 20 ore nell'incubatrice (KS 4000 i control, IKA) così da raggiungere la crescita esponenziale della popolazione microbica.

Per il controllo negativo, i dieci pezzi di allineatori, ciascuno nella propria provetta, sono stati immersi in 4 mL di clorexidina digluconato al 2% per circa 2 ore [127] e, una volta raggiunta la tempistica, sono stati incubati a 37°C in agitazione per 20 ore. Per il controllo positivo, i campioni non trattati sono rimasti a temperatura ambiente nelle loro Falcon e successivamente sono stati incubati a 37°C in agitazione per 20 ore insieme al gruppo di controllo negativo.

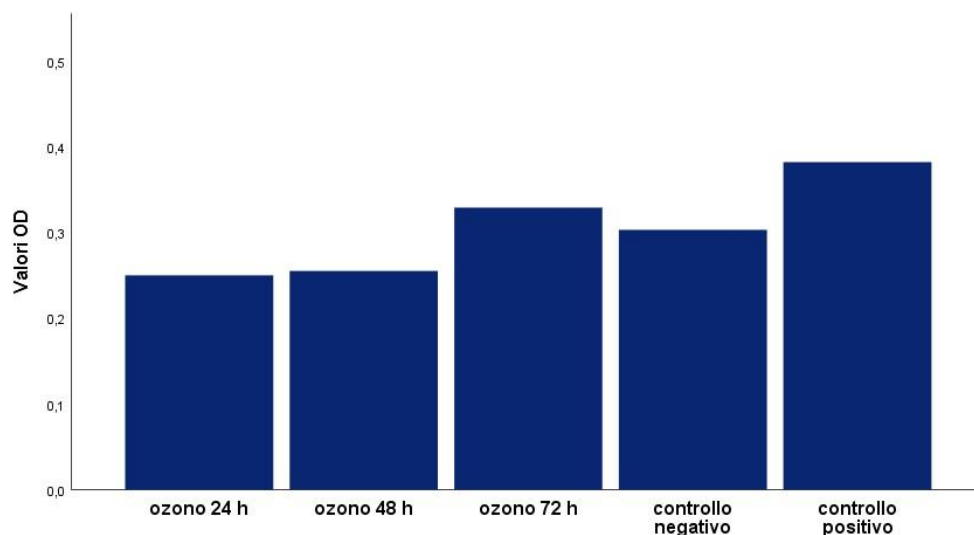
### 3.1.5 Analisi statistica

Tutti i dati sono stati riportati come medie e deviazioni standard (DS). Il test di Kolmogorov-Smirnov osservava una distribuzione non normale delle variabili numeriche e, pertanto, è stato applicato un approccio non parametrico. È stato utilizzato il test di Kruskal-Wallis per confrontare le misurazioni OD appartenenti alle colture microbiche dei campioni trattati con ozono gassoso, nei diversi tempi di esposizione considerati, e anche con gli OD misurati per i gruppi di controllo (negativo e positivo). I valori di significatività sono stati adattati in base alla correzione di Bonferroni per test multipli. Inoltre, è stato usato anche il test dei segni per ranghi di Wilcoxon per confrontare i valori di OD prima e dopo il trattamento con ozono gassoso, per le diverse tempistiche, e quelli dei gruppi di controllo. Un p-value < 0.05 è stato considerato statisticamente significativo. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software SPSS 25.0 (IBM SPSS Statistics, New York, USA) per il sistema operativo Windows.

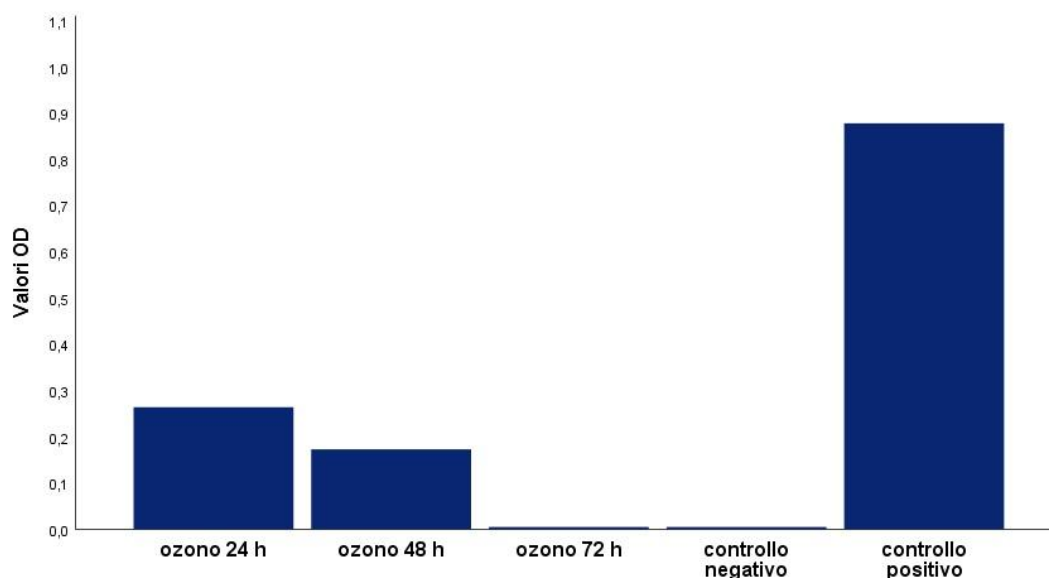
### 3.2 Risultati

Le statistiche descrittive basate sulle medie dei valori di densità ottica (OD) per ciascun gruppo (trattamento con ozono gassoso, gruppo controllo positivo e gruppo controllo negativo) sono riportate nei grafici a istogramma di seguito descritti (Figure 49-50).

I valori medi delle densità ottiche e delle deviazioni standard (DS) delle colture microbiche per tutti i gruppi sono descritti nella tabella 4.



**Figura 49.** Statistica descrittiva dei valori OD medi iniziali delle colture microbiche per i gruppi trattati con ozono gassoso nelle diverse tempistiche (24h, 48h e 72h) e per i controlli negativo e positivo.



**Figura 50.** Statistica descrittiva dei valori OD medi finali delle colture microbiche per i gruppi trattati con ozono gassoso nelle diverse tempistiche (24h, 48h e 72h) e per i controlli negativo e positivo.

Gruppo	N°	Valori OD iniziali (media ± DS)	Valori OD finali (media ± DS)	<i>p</i> -Value (Test di Wilcoxon)
Trattamento con ozono gassoso (24h)	10	0.25 ± 0.82	0.26 ± 0.25	0.959
Trattamento con ozono gassoso (48h)	10	0.25 ± 0.07	0.17 ± 0.18	0.262
Trattamento con ozono gassoso (72h)	10	0.33 ± 0.09	0	0.005*
Controllo negativo	10	0.30 ± 0.05	0	0.005*
Controllo positivo	10	0.38 ± 0.09	0.88 ± 0.07	0.005*

\* *P*-value < 0.05 è considerato statisticamente significativo.

**Tabella 4.** Misurazioni delle densità ottiche (OD) delle colture microbiche.

Il test di Kruskal-Wallis ha dimostrato che la distribuzione dei valori medi degli OD è cambiata in modo significativo tra i gruppi.

Nei confronti multipli, sono state rilevate differenze statisticamente significative tra le misurazioni OD iniziali dei gruppi trattati con la miscela di gas O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> per 24h e 48h con il gruppo di controllo positivo (*p*-value = 0.004 e *p*-value = 0.032, rispettivamente) (Tabella 5).

Misurazioni OD iniziali		Misurazioni OD finali	
Gruppo 1-Gruppo 2	<i>p</i> -Value	Gruppo 1-Gruppo 2	<i>p</i> -Value
Ozono 24h - Ozono 48h	1.000	Ozono 24h – Ozono 48h	1.000
Ozono 24h - Ozono 72h	0.234	Ozono 24h – Ozono 72h	0.035*
Ozono 24h – Controllo negativo	0.432	Ozono 24h – Controllo negativo	0.043*
Ozono 24h – Controllo positivo	0.004*	Ozono 24h – Controllo positivo	0.197
Ozono 48h - Ozono 72h	0.968	Ozono 48h – Ozono 72h	0.150
Ozono 48h – Controllo negativo	1.000	Ozono 48h – Controllo negativo	0.181
Ozono 48h - Controllo positivo	0.032*	Ozono 48h – Controllo positivo	0.048*
Ozono 72h – Controllo negativo	1.000	Ozono 72h – Controllo negativo	1.000
Ozono 72h – Controllo positivo	1.000	Ozono 72h – Controllo positivo	0.000*
Control negativo – Controllo positivo	1.000	Controllo negativo – Controllo positivo	0.000*

\* *P*-value < 0.05 è considerato statisticamente significativo.

**Tabella 5.** Confronti multipli sulla distribuzione dei valori medi iniziali e finali degli OD tra i gruppi in base al test di Kruskal-Wallis con correzione di Bonferroni.

Confrontando i valori medi delle densità ottiche iniziali e finali all'interno dei singoli gruppi, il test di Wilcoxon ha evidenziato differenze significative nel trattamento con ozono gassoso per 72h (*p*-value = 0.005) e in entrambi i gruppi di controllo (*p*-value = 0.005) (Tabella 4).

I confronti multipli tra le misurazioni finali degli OD ha rivelato differenze altamente significative tra il gruppo di campioni trattato con gas O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> per 72h e il controllo positivo e tra il controllo negativo con clorexidina digluconato al 2% e il controllo positivo (*p*-value < 0.001). Differenze statisticamente significative sono state riscontrate anche tra i valori medi di densità ottiche finali dei gruppi trattati con ozono gassoso per 24h e 72h (*p*-value = 0.035), tra il gruppo trattato con ozono per 24h e il controllo negativo (*p*-value = 0.043) e tra il controllo positivo e il gruppo trattato con ozono per 48h (*p*-value = 0.048) (Tabella 5).

### 3.3 Discussioni

L'utilizzo di procedure di sanificazione in campo medico è essenziale per controllare le infezioni incrociate e garantire la sicurezza del paziente [128]. Per quanto riguarda la sterilizzazione dei dispositivi medici, è necessario considerare eventuali effetti avversi sui materiali di cui sono costituiti. I polimeri termoplastici per allineatori invisibili, come il PET-G, non dovrebbero essere sterilizzati con metodi basati sul calore in quanto possono subire la degradazione termica e idrolisi (in particolare in autoclave) con conseguente perdita dell'integrità strutturale del dispositivo [129]. L'ossido di etilene è una procedura in grado di sterilizzare la maggior parte dei polimeri impiegati per i dispositivi medici, ma il suo uso è

limitato a causa del suo potenziale cancerogeno per l'uomo in quanto rilascia residui e sottoprodotti tossici [93]. La sterilizzazione per irraggiamento potrebbe essere una valida alternativa per apparecchiature costituite da polimeri che non tollerano le procedure basate sul calore [91].

Negli ultimi anni sono stati implementati nuovi metodi di sterilizzazione, come il perossido di idrogeno e l'ozono ( $O_3$ ), i quali non possiedono capacità di penetrazione rispetto alle procedure tradizionali. Il perossido di idrogeno non rilascia residui o agenti cancerogeni ma non può essere applicato a polimeri con capacità assorbente e, pertanto, non è molto utilizzato nelle industrie di fabbricazione di apparecchiature mediche [93]. La sterilizzazione mediante ozono gassoso (miscela di gas  $O_3/O_2$ ) si basa su un processo di ossidazione che può essere utilizzato sui dispositivi medici realizzati con polimeri resistenti ad alti livelli di umidità relativa (> 80%). A differenza del perossido di idrogeno, che è un agente sterilizzante di superficie, l'ozono sembra avere una maggiore capacità di diffusione e penetrazione. La letteratura scientifica ha già dimostrato l'efficacia biocida dell'ozono (sotto forma di acqua e gas) e in determinati tempi di esposizione. Thanomsu et al. [130] hanno rilevato cambiamenti ultrastrutturali significativi di alcune colture batteriche a 60 minuti di esposizione a  $O_3$  e inattivazione con lisi della membrana cellulare dopo 90 minuti. Tuttavia,  $O_3$  non ha mostrato efficacia battericida contro tutte le cellule dopo il periodo di trattamento massimo (150 minuti). Al contrario, Sharma et al. [108] hanno testato l'efficacia battericida dell'ozono a 25 ppm su superfici plastiche per i ceppi batterici responsabili di infezioni nosocomiali in un breve periodo di esposizione. In questa direzione, lo studio pilota di Fontes et al. [131] ha dimostrato come una singola esposizione di una bassa dose di 20  $\mu g$  di  $O_3/mL$  in una miscela di gas  $O_3/O_2$  per 5 minuti abbia eliminato ceppi batterici potenzialmente patogeni nelle infezioni nosocomiali, specialmente con resistenza nota agli antibiotici. Infine, un recente studio di Rangel et al. [132] ha rilevato che l'esposizione di una bassa concentrazione di ozono gassoso a 10h e 12h non ha inibito la crescita batterica di determinati gram-positivi e gram-negativi, ma ha interferito con la loro vitalità cellulare, con conseguente aumento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e cambiamenti strutturali significativi.

Questa seconda attività sperimentale si è concentrata sul potenziale di sterilizzazione di un metodo sperimentale basato su una miscela di gas  $O_3/O_2$  prodotta da un generatore (CUBO, Terminer Company). Il gas prodotto è stato trasferito direttamente nelle confezioni contenenti gli allineatori mediante un puntale, associato al tubo in silicone del generatore, che non permetteva alcuna fuoriuscita nell'ambiente esterno. Questa procedura potrebbe essere inclusa nei processi aziendali finali di produzione e confezionamento degli allineatori così da abbattere

la carica microbica che potrebbe annidarsi sulla superficie dei dispositivi. Poiché l'O<sub>3</sub> gassoso viene applicato direttamente all'interno del packaging, non vi alcun pericolo di tossicità negli ambienti lavorativi. La valutazione della capacità microbica di questo procedimento tramite la misurazione della densità ottica (OD) è stata effettuata a 24h, 48h e 72h, dal momento in cui veniva introdotto l'ozono gassoso all'interno dei packaging ortodontici.

I risultati ottenuti dai confronti multipli tra le misurazioni iniziali di OD (Tabella 5) hanno evidenziato come la contaminazione microbica, ottenuta dal maneggiamento dei campioni, non differiva in modo significativo tra i gruppi tranne nel controllo positivo, in quanto il suo valore OD medio era superiore rispetto a quello ottenuto per i gruppi trattati con ozono per 24h ( $0.38 \pm 0.09$  vs  $0.25 \pm 0.82$ ) e 48h ( $0.38 \pm 0.09$  vs  $0.25 \pm 0.07$ ). Tuttavia, questo risultato non ha influenzato l'obiettivo di questa ricerca, anzi, rappresentava la conferma della presenza di crescita microbica sulla superficie dei campioni di allineatori. Il confronto tra le misure OD iniziali e finali all'interno di tutti i gruppi ha dimostrato come la capacità antimicrobica del trattamento con ozono gassoso sia influenzata dai tempi di esposizione (Tabella 4). La miscela di gas O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> prodotta da questa metodica era microbica al tempo massimo di esposizione considerato (72h) poiché la carica microbica era pari a zero. È interessante notare come questo risultato sia equivalente a quello del trattamento con clorexidina digluconato al 2%, sottolineando ulteriormente l'efficacia dell'ozono gassoso. Inoltre, a 48h l'ozono ha determinato una riduzione dei valori finali di OD ipotizzando un effetto microbiostatico, mentre a 24h non è stato rilevato alcun cambiamento. Il gruppo di controllo positivo ha sottolineato la crescita esponenziale della coltura microbica presente (Tabella 4).

Inoltre, il confronto delle misurazioni medie finali di OD tra i diversi gruppi (Tabella 5) ha evidenziato come l'esposizione dell'ozono per 24h non ha eliminato i microrganismi presenti rispetto all'esposizione per 72h e al trattamento con clorexidina ( $0.26 \pm 0.25$  vs 0). Difatti, non c'era alcuna differenza tra il trattamento con ozono gassoso per 24h e il controllo positivo ( $p$ -value = 0.197). Anche il risultato ottenuto dall'esposizione per 48h non differiva dal trattamento fino a 24h ( $p$ -value = 1.000), tuttavia la miscela gassosa O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> ha mostrato effetti antimicrobici a 48h rispetto al controllo positivo ( $0.17 \pm 0.18$  vs  $0.88 \pm 0.07$ ). Infine, la capacità microbica dell'esposizione di O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> per 72h è stata ulteriormente evidenziata a confronto con il controllo positivo e questo risultato era equivalente a quello ottenuto dalla comparazione tra il controllo negativo e il controllo positivo (0 vs  $0.88 \pm 0.07$ ).

Questo contributo sperimentale introduce nuovi obiettivi di ricerca circa lo sviluppo di procedure il più possibili idonee per la sterilizzazione degli allineatori invisibili nell'ambito della produzione aziendale. I tempi di esposizione prolungati che sono stati considerati in questa



ricerca evidenziano il potenziale biocida dell'ozono gassoso contenuto all'interno dei packaging per allineatori. Tuttavia, si deve considerare che la temperatura e l'umidità ambientale, il materiale di cui è fatta la superficie d'azione e i diversi tipi di biofilm possono influenzare l'azione microbica di O<sub>3</sub> [133,134]. Pertanto, oltre a misurare la densità ottica microbica, le ricerche future dovrebbero effettuare ulteriori indagini per individuare eventuali cambiamenti cellulari. Fattori come la vitalità cellulare, i livelli di ROS, i cambiamenti ultrastrutturali o la permeabilità di membrana cellulare dovrebbero essere studiati soprattutto quando l'esposizione di O<sub>3</sub> non inibisce la crescita microbica.

#### **4. OTTIMIZZAZIONE DELLE FORME DEGLI ATTACHMENTS E DELL'INTERFACCIA SMALTO-COMPOSITO NEL TRATTAMENTO CON GLI ALLINEATORI INVISIBILI LINEO**

Ad oggi, gli allineatori invisibili sono ampiamente utilizzati e rappresentano il risultato di nuovi materiali e delle moderne tecnologie in campo ortodontico [135]. Sul mercato esistono diverse tipologie di allineatori che vengono continuamente ottimizzati per ottenere movimenti dentali anche complessi [20,83,136,137]. Per migliorare la ritenzione dell'allineatore in arcata e, soprattutto, per controllare la qualità del movimento ortodontico, ci si avvale dell'utilizzo di elementi ausiliari (attachments) in resina composita adesi alle superfici vestibolari dei denti interessati mediante un particolare template [15,136,138,139].

Diversi fattori come la posizione, la conformazione, la dimensione e il numero di attachments, influenzano l'inserzione dell'allineatore nelle arcate dentarie e di conseguenza ciò si riflette sull'efficacia del trattamento ortodontico [88,140,141]. Inoltre, è essenziale seguire un preciso protocollo di posizionamento degli attachments sui denti in quanto un'adesione imprecisa potrebbe determinare movimenti dentali scorretti, influenzando sulla validità del trattamento [87]. Oltre a mantenere nel tempo le sue caratteristiche durante tutto il trattamento in ambiente orale, la resina composita con cui sono composti gli attachments deve riprodurre fedelmente le forme pianificate virtualmente per riempimento completo delle nicchie del template [90,142,143]. Inoltre, è stato già dimostrato che l'utilizzo di resine composite di diversa viscosità comportano un livello di accuratezza equivalente sia nelle forme sia nei volumi degli attachments [89]. Tuttavia, nonostante non siano presenti in letteratura linee guida precise circa la scelta del materiale più idoneo, il composito ortodontico a media viscosità ha mostrato una maggiore tendenza a creare overflow rispetto al composito flow a bassa viscosità [89].

La procedura clinica di posizionamento degli attachments rappresenta uno step critico che deve garantire l'integrità degli elementi ausiliari [144]. Tuttavia, spesso i clinici rischiano di non ricreare correttamente le sagome preformate del template determinando difetti nelle forme o nei volumi degli attachments o eccessi di materiale composito attorno agli elementi ausiliari. Pertanto, questa terza attività sperimentale si focalizza sulla ricerca di una procedura operativa innovativa, al tempo stesso semplice e predicibile, per ottimizzare le forme degli attachments durante il loro posizionamento clinico sugli elementi dentari. Questa metodica consiste nell'utilizzo di due tipologie speciali di templates per creare gli attachments, ciascuno con diverse caratteristiche strutturali e funzionali. La valutazione comprende l'ipotesi che questa nuova procedura possa limitare il rischio di creare spessori debordanti o imprecisioni di forma

che potrebbero causare l'insuccesso dei movimenti dentali preposti o dell'adattamento degli allineatori in arcata. Infine, viene inclusa anche un'analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM) per valutare la qualità di adesione tra attachment e superficie dentale.

#### **4.1 Materiali e Metodi**

##### **4.1.1 Preparazione e suddivisione dei modelli di arcate dentali**

Per valutare l'efficacia di questa tecnica, da un punto di vista sia operativo che qualitativo, si è pensato di realizzare una prima ricerca sperimentale in vitro. A tal proposito, sono stati realizzati quattro modelli in gesso di arcate dentarie utilizzando denti estratti. Gli elementi dentali sono stati scelti in base ai seguenti criteri di inclusione: estrazioni per motivi ortodontici, parodontali o protesici e con corona dentale sana. I denti con lesioni cariose, corone protesiche o amalgama o restauri compositi sono stati esclusi da questa ricerca. Una volta estratti, tutti i denti sono stati conservati in soluzione fisiologica e successivamente suddivisi secondo la loro anatomia morfologica per creare modelli di arcate dentali superiori e/o inferiori, con la base in gesso extra-duro (Figura 51).

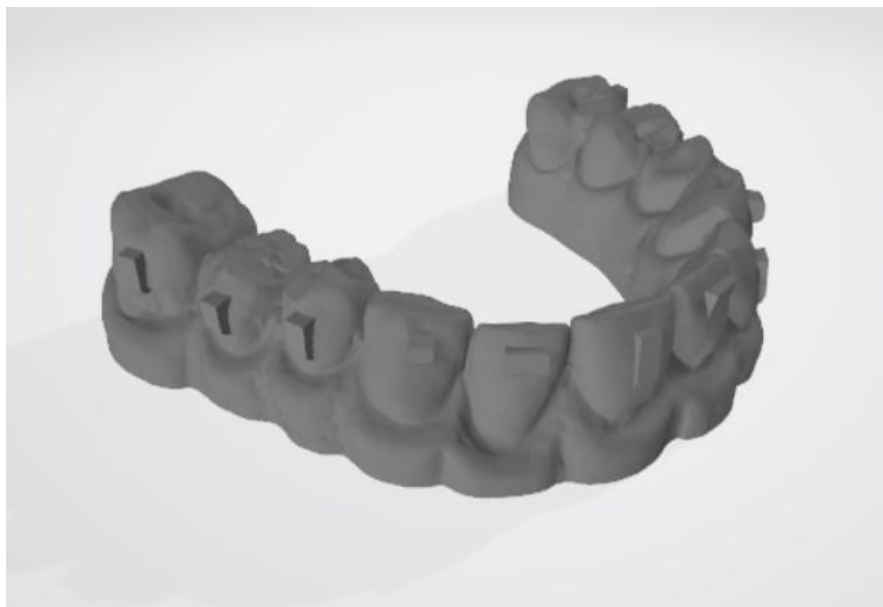


**Figura 51.** Uno dei quattro modelli di arcate dentarie realizzato con denti estratti e base in gesso.

Dopo la creazione dei prototipi, sono state effettuate le scansioni digitali di tutti i modelli utilizzando uno scanner (Itero Element Flex, Align Technology) per ottenere quattro file di stereolitografia (STL). Successivamente, questi file sono stati inviati al laboratorio ortodontico di Micerium Lab per la fabbricazione dei templates da usare per il posizionamento degli attachments. Dopo il processo di segmentazione in digitale delle arcate, il laboratorio ha provveduto alla pianificazione virtuale degli attachments per tutti i modelli, selezionando forme e posizioni per ogni dente presente sui prototipi (Figure 52-55).



**Figura 52.** Prototipo 1 con visione degli attachments posizionati con pianificazione virtuale.



**Figura 53.** Prototipo 2 con visione degli attachments posizionati con pianificazione virtuale.



**Figura 54.** Prototipo 3 con visione degli attachments posizionati con pianificazione virtuale.



**Figura 55.** Prototipo 4 con visione degli attachments posizionati con pianificazione virtuale.

Preliminarmente i modelli di arcate dentarie sono stati divisi in due gruppi in base alla procedura operativa:

1. Gruppo sperimentale (modelli con attachments realizzati con tecnica indiretta);
2. Gruppo controllo (modelli con attachments realizzati con tecnica diretta).

La metodica sperimentale adottata consiste in una procedura di posizionamento “indiretta” mediante l’utilizzo di due tipi di templates. Il primo template è stato fabbricato con dei fori della stessa forma e posizione delle cavità corrispondenti agli attachments da creare e viene utilizzato durante la fase di mordenzatura dello smalto degli elementi dentari (mordenzatura “selettiva”) (Figura 56). Il secondo template è costituito dalle nicchie predisposte per gli attachments riempite di resina composita ad alta viscosità (ENAMEL plus HRi Enamel, GDF GmbH) non polimerizzata (Figura 57). Il riempimento delle sagome del template è stato effettuato dal laboratorio di Micerium Lab, il quale hanno provveduto a inserire questo template in un packaging adatto che lo riparava dalla luce ambientale e dal calore per poi inviarlo e realizzare l’esperimento in vitro.

La tabella 6 riporta i quattro prototipi suddivisi per ciascun gruppo di appartenenza.



**Figura 56.** Template pre-forato.



**Figura 57.** Template con composito predosato non polimerizzato.

Gruppo	Prototipo	Numero totale dei denti	Numero totale di attachments posizionati
Sperimentale	1	14	14
	2	12	12
Controllo	3	12	12
	4	12	12

**Tabella 6.** Descrizione dei gruppi dei modelli di arcate dentarie realizzati in vitro.

#### 4.1.2 Tecniche di posizionamento per attachments di tipo diretto e indiretto: procedure operative

Il posizionamento degli attachments prevede le stesse fasi operative (pretrattamento dello smalto, bonding e realizzazione degli attachments in composito) in entrambi i gruppi. Nel dettaglio, sono state eseguite le seguenti fasi operative:

##### 1. *Pretrattamento dello smalto.*

- Sperimentale: Inizialmente è stato posizionato il template pre-forato sugli elementi dentari dei modelli di arcate dentarie di questo gruppo e, con il template in situ, è stato applicato un gel di acido di ortofosforico al 37% (ENA Etch, Micerium S.p.A.) per 30 secondi in corrispondenza dello smalto dentale esposto dai fori del template (Figura 58). Dopo aver rimosso il template, gli elementi dentari sono stati risciacquati con abbondante acqua e asciugati con l'aria.



**Figura 58.** Mordenzatura selettiva dello smalto con il template pre-forato.

- **Controllo:** è stato applicato un gel di acido di ortofosforico al 37% (ENA Etch, Micerium S.p.A.) per 30 secondi sulla superficie vestibolare dei denti dei modelli di arcate dentarie di questo gruppo (Figura 59). Successivamente, gli elementi dentari sono stati risciacquati con abbondante acqua e asciugati con aria.



**Figura 59.** Mordenzatura dello smalto in base alla posizione orientativa degli attachments.

## 2. Bonding.

- **Sperimentale:** è stato applicato con un microbrush uno strato sottile di adesivo (ENA Bond, Micerium S.p.A.) su tutte le superfici mordenzate, le quali sono state poi fotopolimerizzate per 20 secondi utilizzando una lampada fotopolimerizzante ad alta potenza (Bluephase G4 Ivoclar Vivadent) (Figura 60).



**Figura 60.** Applicazione dell'adesivo ENA Bond sulle superfici dentali mordenzate.



- Controllo: è stato applicato con un microbrush uno strato sottile di adesivo (ENA Bond, Micerium S.p.A.) su tutte le superfici mordenzate, le quali sono state poi fotopolimerizzate per 20 secondi utilizzando una lampada fotopolimerizzante ad alta potenza (Bluephase G4 Ivoclar Vivadent) (Figura 61).



**Figura 61.** Applicazione dell'adesivo ENA Bond sulle superfici dentali mordenzate.

### 3. *Realizzazione degli attachments in composito.*

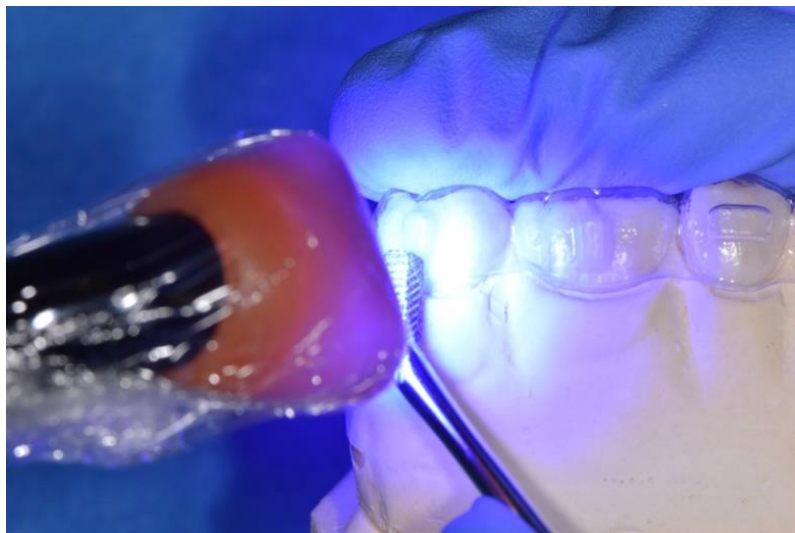
- Sperimentale: è stato inserito il secondo template con composito precaricato non polimerizzato direttamente sui denti del modello da trattare e, con una leggera pressione attorno ad ogni attachment da realizzare, ogni cavità del template contenente resina composita è stata fotopolimerizzata con lampada ad alta potenza (Bluephase G4 Ivoclar Vivadent) secondo le istruzioni del materiale (Figure 62-64). Non sono state eseguite operazioni di rifinitura e lucidatura dopo la rimozione del template dal modello.



**Figura 62.** Visione del template predosato con composito fotopolimerizzabile.



**Figura 63.** Template predosato inserito sul modello di arcata dentaria da trattare.



**Figura 64.** Fotopolimerizzazione di ogni singolo attachment.

- Controllo: prima di posizionare il template, le cavità predisposte per gli attachments sono state caricate con composito a bassa viscosità (ENAMEL plus HRi®Flow HF, GDF GmbH) e successivamente è stato adattato nei denti del modello considerato per la fotopolimerizzazione delle nicchie degli attachments secondo le istruzioni del materiale (Figure 65-66).

Non sono state eseguite operazioni di rifinitura e lucidatura dopo la rimozione del template dal modello.



**Figura 65.** Visione del template da caricare con composito fotopolimerizzabile.

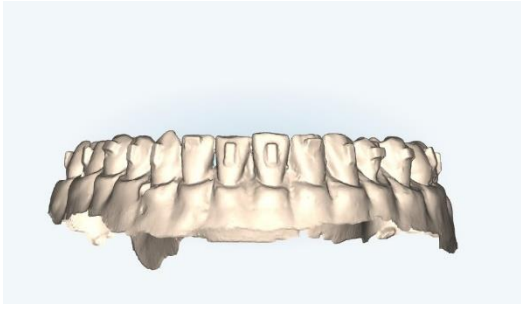


**Figura 66.** Controllo post-fotopolimerizzazione degli attachments.

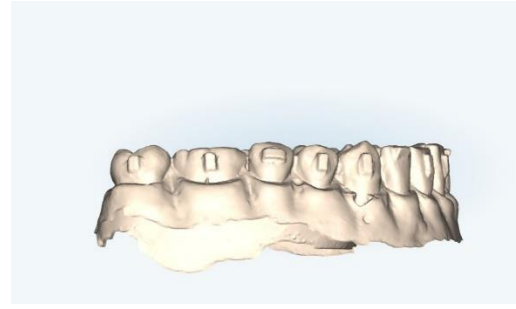
### **4.1.3 Analisi tridimensionale (3D)**

Per valutare l'accuratezza degli attachments in entrambe le metodiche, sono state effettuate le scansioni digitali, tramite lo scanner Itero Element Flex (Align Technology), di tutti i modelli di arcate dentarie dopo il posizionamento degli attachments.

Di seguito, vengono riportate le immagini rilevate dallo scanner in visione frontale, laterale e occlusale (Figure 67-70).



(A)



(B)

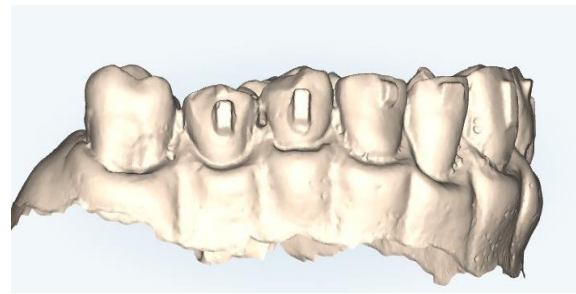


(C)

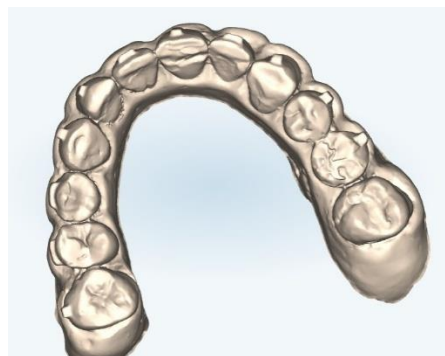
**Figura 67.** Scansione digitale del prototipo 1 dopo il posizionamento degli attachments.



(A)



(B)

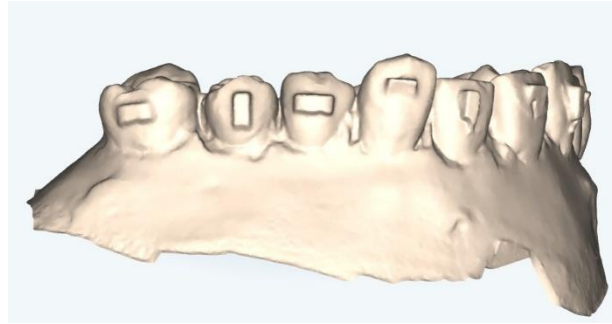


(C)

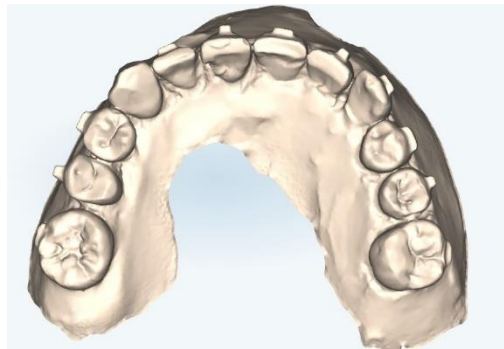
**Figura 68.** Scansione digitale del prototipo 2 dopo il posizionamento degli attachments.



(A)

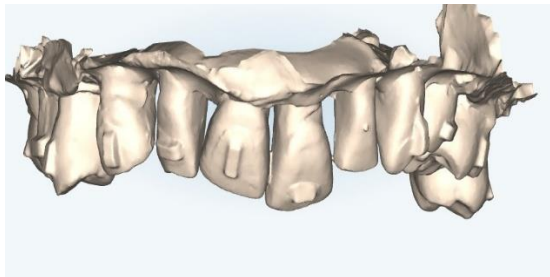


(B)

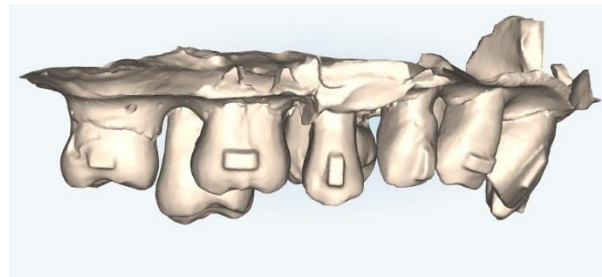


(C)

**Figura 69.** Scansione digitale del prototipo 3 dopo il posizionamento degli attachments.



(A)



(B)



(C)

**Figura 70.** Scansione digitale del prototipo 4 dopo il posizionamento degli attachments.

Questi modelli ottenuti dalle scansioni 3D, sotto forma di file STL, sono stati allineati con i modelli 3D di pianificazione virtuale degli attachments forniti dal laboratorio ortodontico di Micerium Lab utilizzando il software Cloud Compare (versione 2.13). Cloud Compare è un software open source che consente l'elaborazione di nuvole di punti 3D e mesh triangolari ottenute da scansioni 3D.

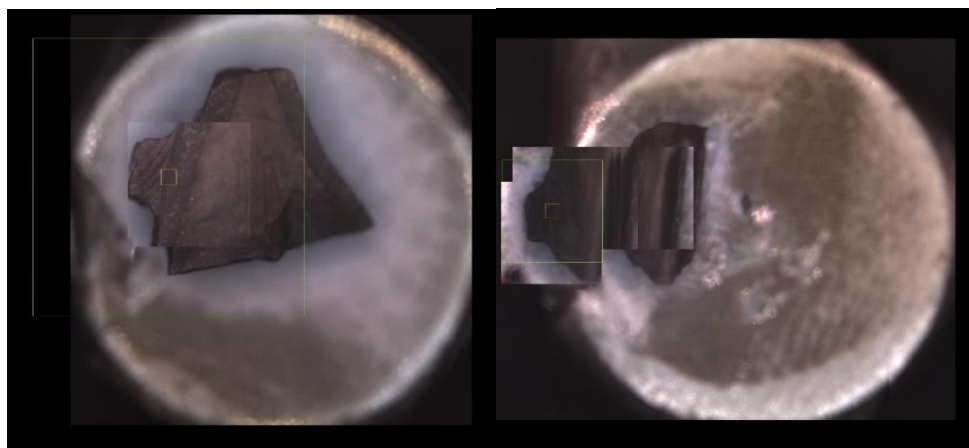
Inizialmente la sovrapposizione dei modelli è stata eseguita manualmente attraverso la funzione di selezione di coppie di punti che ha permesso di allineare due modelli per volta selezionando quattro coppie di punti equivalenti in entrambe le entità.

Successivamente, l'allineamento è stato perfezionato mediante l'algoritmo del "punto più vicino iterativo" o "Iterative Closest Point" (ICP) [145]. L'ICP può registrare automaticamente con precisione due modelli 3D. Attraverso una mappa colorimetrica è stato possibile determinare lo scostamento tra i file di pianificazione virtuale e quelli post-inserimento clinico corrispondenti allo stesso prototipo, così da valutare gli eccessi e i difetti della resina composita attorno agli attachments.

#### **4.1.4 Analisi al microscopio elettronico a scansione**

Dopo aver effettuato l'analisi tridimensionale di tutti i prototipi, tre denti (incisivo, premolare e molare) per ogni modello sono stati utilizzati per la microscopia elettronica a scansione (SEM). Ogni dente è stato sezionato verticalmente al centro dell'attachment utilizzando un disco diamantato raffreddato ad acqua per esporre l'interfaccia tra lo smalto dentale e la resina composita. I campioni ottenuti sono stati fissati con glutaraldeide al 2% (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA) in tampone fosfato 0.1 M (Sigma-Aldrich).

Una volta fissati, sono stati disidratati con etanolo e acetato di n-amile. Successivamente, è stato applicato il critical point (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germania) per asciugare tutti i campioni, dopo che la superficie fratturata è stata rivestita con un sistema di sputtering Plasma Sciences CrC-100 Turbo-Pumped ed è stata osservata utilizzando il microscopio elettronico a scansione Phenom G2 Pro (Phenom-World B.V., Eindhoven, Paesi Bassi) [146,147] (Figure 71-72).



(A)

(B)

**Figura 71.** Visione macroscopica dei denti sezionati per l'analisi al SEM: (A) campione del gruppo controllo; (B) campione del gruppo sperimentale.



**Figura 72.** Microscopio elettronico a scansione Phenom G2 Pro usato per l'attività sperimentale.

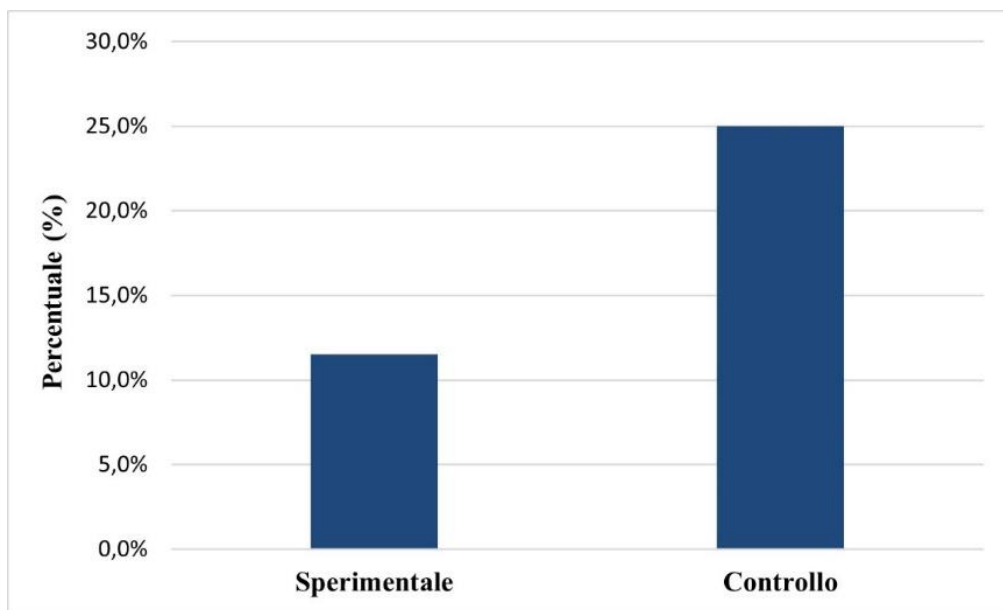
#### 4.1.5 Analisi statistica

Le variabili qualitative sono state riportate come percentuali (%) mentre le variabili numeriche come medie e deviazioni standard (DS). Il test di Kolmogorov-Smirnov osservava una distribuzione non normale delle variabili numeriche e, pertanto, è stato applicato un approccio non parametrico. È stato utilizzato il test di Chi-quadrato per confrontare la distribuzione dei distacchi e dei difetti di morfologia degli attachments dopo il loro posizionamento nei due gruppi. Inoltre, è stato anche usato il test U di Mann-Whitney per confrontare i valori massimi di eccesso e di difetto attorno agli attachments posizionati. Un p-value < 0.05 è stato considerato

statisticamente significativo. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software SPSS 25.0 (IBM SPSS Statistics, New York, USA) per il sistema operativo Windows.

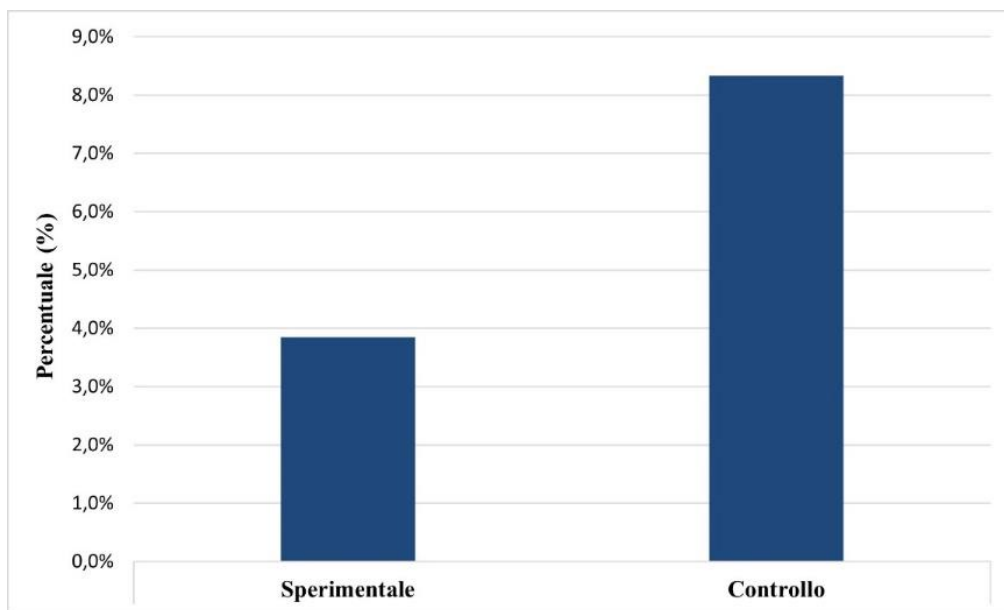
## 4.2 Risultati

La statistica descrittiva evidenziava che nel gruppo sperimentale con tecnica indiretta di posizionamento, dopo la procedura clinica 3 attachments presentavano difetti morfologici (11.5%) per due primi molari e un secondo premolare, mentre il gruppo controllo con tecnica diretta mostrava morfologie alterate in 6 attachments (25%) per due incisivi centrali, due laterali, un canino e un primo molare. Il test Chi-Quadrato non ha mostrato differenze significative ( $p$ -value = 0.281) (Figura 73). Per quanto riguarda il distacco degli attachments dalle superfici dentali dopo il loro posizionamento, nel gruppo sperimentale è andato perso 1 attachment (3.8%), corrispondente al primo molare, mentre nel gruppo controllo sono stati osservati 2 attachments staccati (8.3%), corrispondenti all'incisivo laterale e al canino. Il test Chi-Quadrato non ha mostrato differenze significative ( $p$ -value = 0.602) (Figura 74).



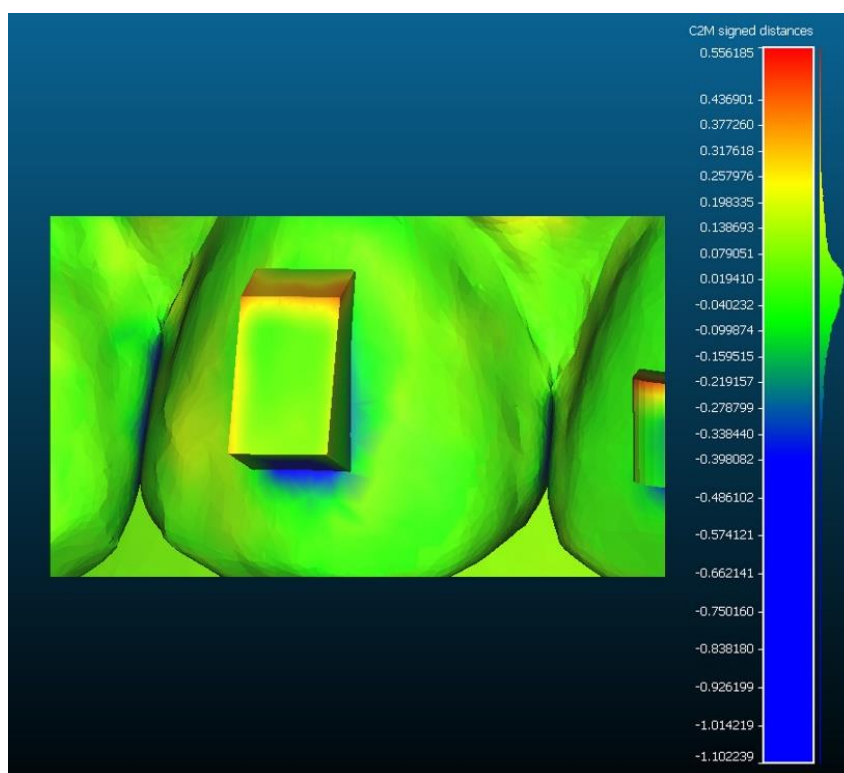
**Figura 73.** Distribuzione degli attachments con difetti morfologici nei gruppi considerati.





**Figura 74.** Distribuzione degli attachments persi nei gruppi considerati.

Attraverso l'analisi delle deviazioni è stata ottenuta una mappa colorimetrica che mostra le deviazioni massime dal modello di riferimento (Figura 75). Il difetto di composito (aree mancanti) attorno all'attachment è rappresentato dal colore blu, mentre il colore rosso rappresenta l'eccesso di resina.



**Figura 75.** Un esempio di mappa colorimetrica dell'elemento dentario 2.4 del prototipo 1.

La tabella 7 mostra i risultati dei debordamenti e dei difetti di composito attorno gli attachments per ciascun elemento dentario in entrambe le procedure cliniche considerate. Il test U di Mann-Whitney non ha riscontrato alcuna differenza statisticamente significativa sia per i valori massimi in eccesso ( $p$ -value = 0.938) che in difetto ( $p$ -value = 0.460).

Denti	MODELLO 1		MODELLO 2		MODELLO 3		MODELLO 4	
	Eccesso Max [mm]	Difetto Max [mm]	Eccesso Max [mm]	Difetto Max [mm]	Eccesso Max [mm]	Difetto Max [mm]	Eccesso Max [mm]	Difetto Max [mm]
1.7	0.349	-0.557	/	/	/	/	/	/
1.6	0.214	-0.541	0.418	-0.378	0.448	-0.603	0.291	-0.647
1.5	0.535	-0.742	0.428	-0.579	0.499	-0.571	0.331	-0.548
1.4	0.556	-0.742	0.428	-0.579	0.499	-0.641	0.485	-0.591
1.3	0.556	-0.547	0.425	-0.545	/	/	0.405	-0.514
1.2	0.555	-0.546	0.360	-0.404	1.380	-0.564	0.405	-0.514
1.1	0.416	-0.449	0.363	-0.491	0.674	-0.574	0.204	-0.502
2.1	0.429	-0.455	0.284	-0.565	0.674	-0.605	0.277	-0.652
2.2	0.508	-0.782	0.340	-0.627	0.694	-0.568	/	/
2.3	0.508	-0.782	0.746	-0.932	0.694	-0.719	0.527	-0.747
2.4	0.421	-0.942	0.767	-0.950	0.601	-0.719	0.399	-0.512
2.5	0.476	-0.984	1.254	-1.029	0.601	-0.599	0.346	-0.548
2.6	0.476	-1.102	/	/	1.380	-0.820	0.313	-0.647
2.7	0.556	-1.102	/	/	/	/	/	/

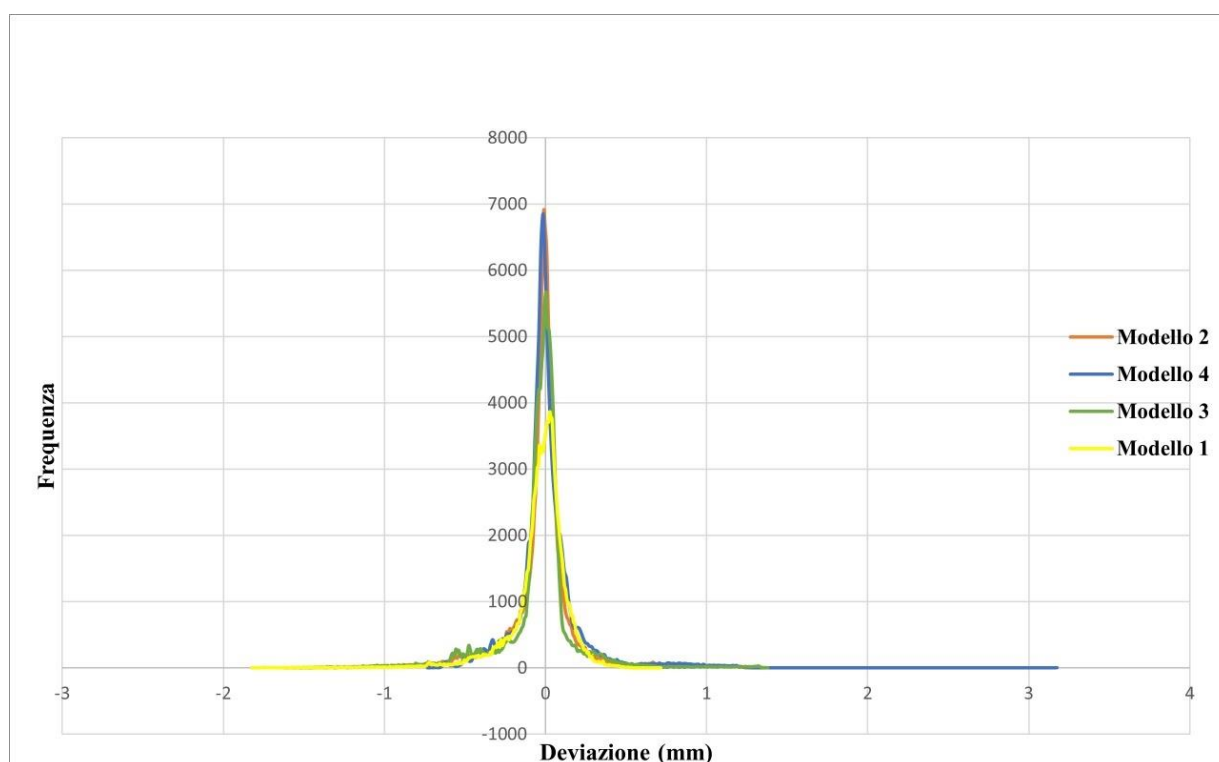
**Tabella 7.** Valori massimi di eccesso e di difetto di composito attorno agli attachments per i denti dei modelli considerati.

I risultati della deviazione ottenuti sono stati esportati ed elaborati per ottenere i valori medi e di deviazione standard per ogni coppia di modelli scansionati (Tabella 8).

La Figura 76 mostra la distribuzione delle deviazioni standard per tutti i modelli di arcate dentarie.

Prototipi	Media (mm)	DS (mm)
Modello 1	-9.91E-05	4.89E-04
Modello 2	-7.27E-05	5.34E-04
Modello 3	-1.12E-04	5.29E-04
Modello 4	3.32E-05	7.01E-04

**Tabella 8.** Valori di medie e deviazioni standard (DS) dei prototipi di arcate dentarie corrispondenti.

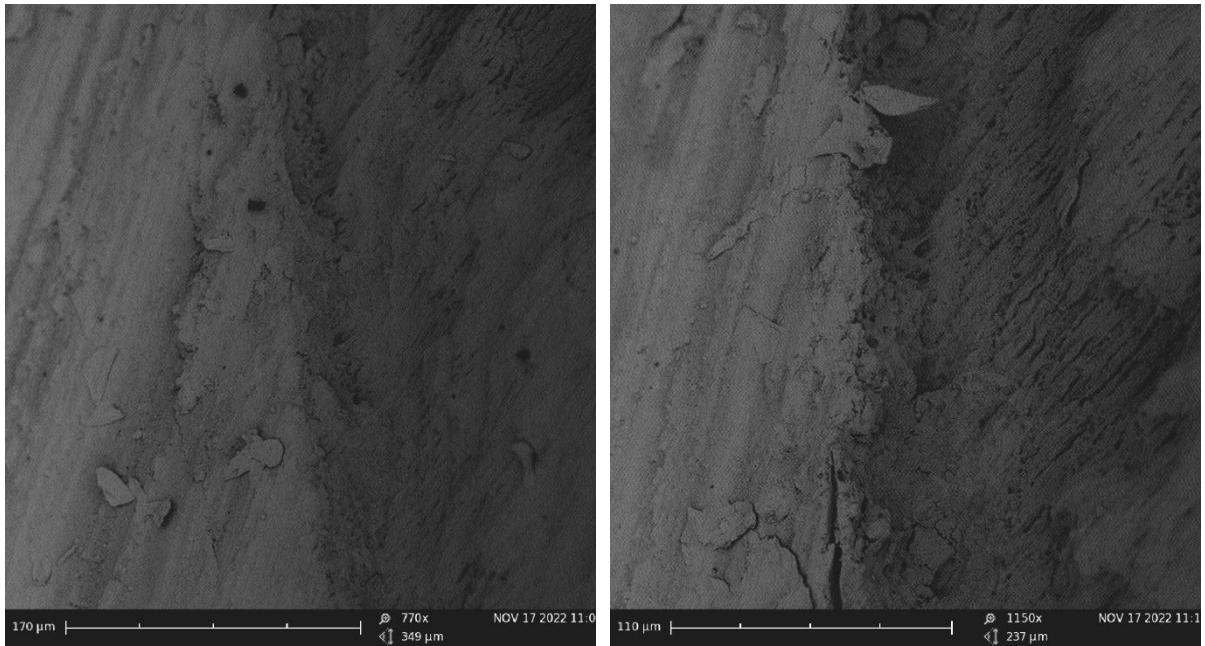


**Figura 76.** Distribuzione delle deviazioni nei modelli di arcate dentarie dei gruppi sperimentale e controllo.

Le osservazioni al SEM dell'interfaccia di adesione tra smalto dentale e composito nei gruppi sperimentale e controllo sono mostrate nelle Figure 77-78.

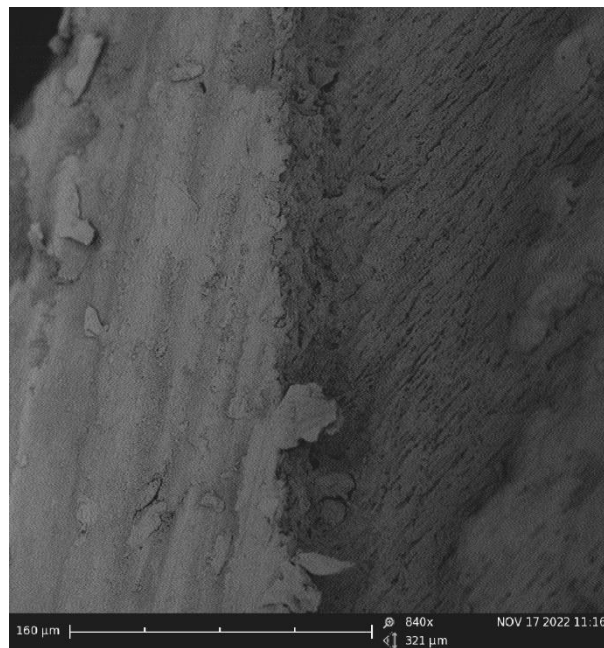
La Figura 77 evidenzia un'adesione compatta e unificata tra il materiale e il tessuto dentale senza evidenti gap con la tecnica indiretta di posizionamento degli attachments.

Tuttavia, nel gruppo controllo, è evidente la linea di demarcazione tra composito e smalto con importanti gap e diverse bolle d'aria all'interno della resina composita (Figura 78).



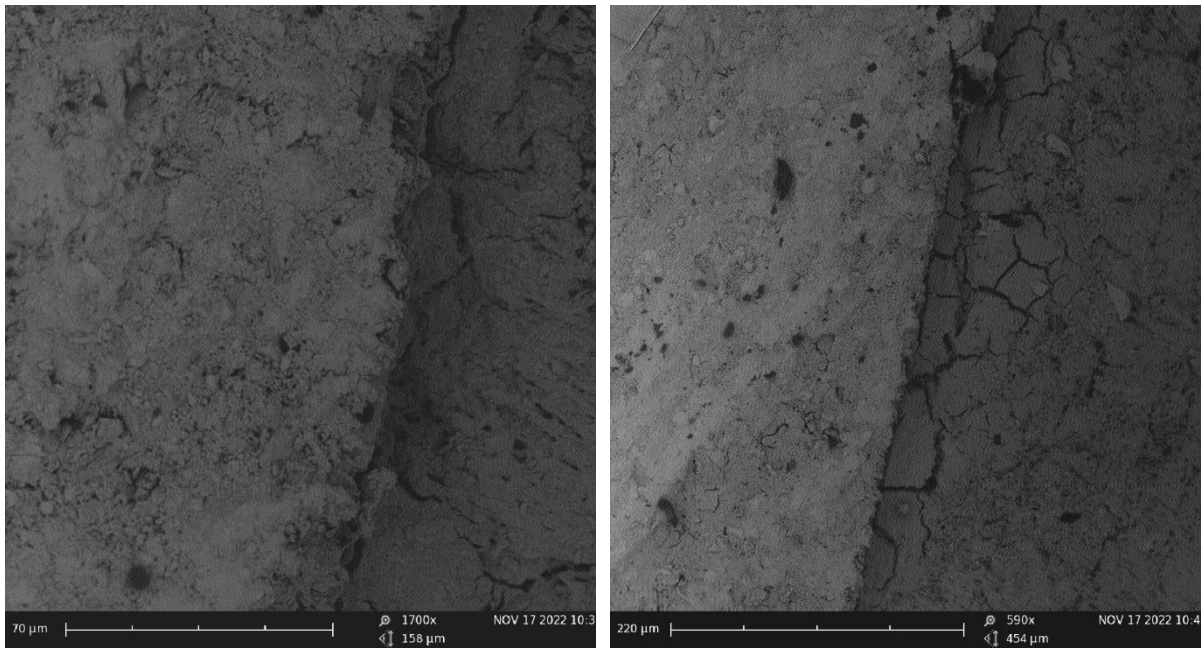
(A)

(B)



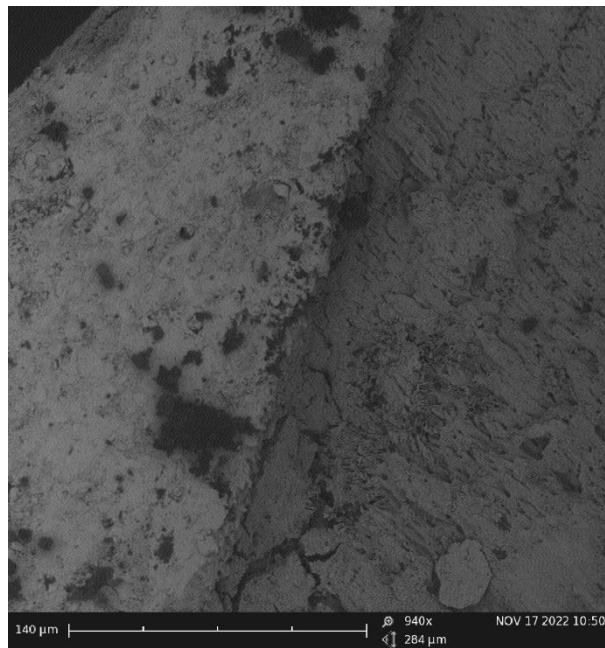
(C)

**Figura 77.** Immagini al SEM rappresentative dell'interfaccia smalto-composito tra dente e attachment nel gruppo sperimentale.



(A)

(B)



(C)

**Figura 78.** Immagini al SEM rappresentative dell'interfaccia smalto-composito tra dente e attachment nel gruppo controllo.

### 4.3 Discussioni

Il trattamento ortodontico con allineatori invisibili è sempre più richiesto grazie alle loro importanti proprietà estetiche rispetto alle apparecchiature fisse [148,149] ed è altamente efficace in quanto ad oggi consente di eseguire anche movimenti ortodontici complessi [137,150]. È indubbio che l'utilizzo di elementi ausiliari (attachments) in composito, posizionati sulle superfici vestibolari dei denti mediante tecniche adesive, hanno un ruolo decisivo nell'effettuare determinati movimenti dentali. Uno dei requisiti fondamentali è riportare clinicamente la posizione precisa dell'attachment pianificata virtualmente. Tuttavia, la ricerca scientifica si è esposta poco su questo concetto con studi principalmente descrittivi [84]. Attualmente, la procedura clinica impiegata per il posizionamento degli attachments nel cavo orale avviene grazie all'utilizzo di un template di trasferimento con le sagome degli attachments pianificati, le quali vengono riempite di resina composita. Dopo aver pretrattato la superficie vestibolare con tecniche adesive, il template viene posizionato nell'arcata dentaria considerata per far aderire correttamente ogni attachment con il dente a cui corrisponde e avviene la polimerizzazione di ciascun elemento ausiliario posizionato [151]. Al di là della forma, la posizione dell'attachment determina l'efficacia del movimento ortodontico scaturito [88,152]. L'analisi agli elementi finiti effettuata da Barone et al. [11] dimostra che la variazione del posizionamento di un attachment sulla superficie dentale non influenza la sua efficacia clinica. Al contrario, cambiando l'orientamento si assiste a una lieve variazione delle prestazioni di questi elementi.

Pertanto, è indispensabile minimizzare gli errori nella fase clinica di posizionamento degli attachments, sia per la scelta del composito più adatto sia per il corretto uso del template di trasferimento [87]. D'Antò et al. [89] hanno osservato che tre tipi di resine composite (composito fluido, composito da conservativa e composito ortodontico) erano adatti a realizzare clinicamente gli attachment poiché riproducevano fedelmente la forma, anche se il composito ortodontico riportava valori di overflow più elevati. Barreda et al. [142] hanno rilevato che l'utilizzo di due resine bulk-fill, a basso stress da contrazione da polimerizzazione, per realizzare gli attachments presentavano alterazioni superficiali senza compromissione della forma. Ancora, Mantovani et al. [143] hanno evidenziato come la resina bulk-fill è più appropriata per la procedura clinica di posizionamento degli attachments rispetto al composito fluido, consentendo un miglior adattamento dell'allineatore. Sfortunatamente, ad oggi non esiste un protocollo standard clinico di adesione degli attachments e, quindi, la scelta della tecnica impiegata è esclusivamente operatore-dipendente.

Per cercare di ovviare il più possibile agli errori che il clinico può commettere durante la procedura di posizionamento degli attachments, l'obiettivo di questa ricerca consiste in una valutazione preliminare in vitro di una tecnica sperimentale clinica innovativa semplice, ma al tempo stesso efficace, e che possa ridurre anche i tempi alla poltrona rispetto alla procedura standard. Inoltre, è una procedura pensata anche per i clinici generalisti che si avvicinano a effettuare casi ortodontici con allineatori invisibili e che hanno poca esperienza circa il posizionamento degli attachments sulle superfici dentarie. La tecnica sperimentale adottata è stata definita "indiretta", che si differenzia da quella standard "diretta", richiamando il bonding indiretto con mascherine di trasferimento usata soprattutto in ortodonzia linguale, e comprende l'utilizzo di due tipologie diverse di templates. Entrambi i templates sono stati progettati dalla stessa pianificazione virtuale degli attachments da realizzare ma si differenziano per la funzionalità. Il template pre-forato dovrebbe aiutare il clinico a mordenzare selettivamente solo la superficie dentale interessata grazie ai fori della stessa forma delle sagome per attachments. Ciò potrebbe ottimizzare la procedura di mordenzatura dello smalto che viene sottovalutata in quanto spesso i clinici non seguono la posizione esatta dell'attachment e mordenzano l'intera superficie. Una mordenzatura "selettiva" comporterebbe anche un'adesione selettiva da parte del bonding adesivo utilizzato e della resina composita. Dopo aver preparato il dente, il secondo template con resina composita predosata non pre-polimerizzata veniva inserito immediatamente nel modello di arcata dentaria da trattare e successivamente veniva effettuata la polimerizzazione per ciascun attachment.

Il confronto tra la tecnica sperimentale e quella standard ha evidenziato importanti risultati. Innanzitutto, il distacco degli attachments post-procedura era abbastanza simile tra di loro (sperimentale  $n = 1$ , controllo  $n = 2$ ). Ciò mette in risalto come la procedura indiretta sia clinicamente efficace. Inoltre, il distacco potrebbe essere giustificabile dal fatto che erano previsti un numero di attachments da posizionare uguale a quello dei denti presenti (nella realtà clinica questo non accade) per entrambi i gruppi, quindi, i templates risultavano essere molto ritentivi. L'analisi macroscopica degli attachments realizzati, ha evidenziato che erano presenti maggiori difetti morfologici nel gruppo controllo rispetto a quello sperimentale ( $n = 6$  vs  $n = 3$ ) ma la differenza non era significativa. È interessante notare che sia per il distacco sia per i difetti morfologici degli attachments, nel gruppo controllo sono maggiormente interessati gli elementi dentari anteriori rispetto ai posteriori, mentre quest'ultimi si riscontrano tra i difetti e i distacchi del gruppo sperimentale. Tuttavia, l'analisi al SEM dell'interfaccia smalto-composito ha evidenziato un'adesione ottimale nel gruppo sperimentale rispetto al gruppo con tecnica standard, in cui era evidente il debole legame tra la resina composito e il tessuto dentale (Figure

77-78). Questo risultato spiegherebbe che, nonostante l'elevata ritenzione del template al momento della sua disinserzione, l'intima adesione tra smalto e composito degli attachment nella tecnica indiretta non permette agli attachments di staccarsi soprattutto nelle zone di curvatura dell'arcata (canino-incisivo) dove la ritenzione è massima. Inoltre, per ovviare ai difetti morfologici riscontrati nel gruppo sperimentale, è indispensabile un'alta precisione da parte dei laboratori nell'inserimento del composito all'interno delle nicchie preposte per gli attachments (soprattutto nelle curvature anatomiche di premolari e molari). Infine, l'analisi della distribuzione delle deviazioni mostrava che non c'è alcuna differenza clinicamente significativa tra le due procedure in termini di precisione per le medie e deviazioni standard simili in tutte le scansioni effettuate (Figura 76).

Questa attività sperimentale avvia lo sviluppo di nuove procedure cliniche di posizionamento di attachments semplici e predicibili, ma al tempo stesso precise, come questa appena descritta con l'uso di due templates di diverse funzioni. Sarebbe opportuno effettuare altre prove, ad esempio, considerare nella valutazione dell'efficacia della tecnica anche l'influenza della complessità della procedura realizzata in vivo.



## 5. CONCLUSIONI

Questa tesi si è concentrata su un'indagine ad ampio spettro relativa agli allineatori invisibili Lineo. Su specifiche commissioni da parte dell'azienda Micerium Lab, i tre contributi sperimentali, descritti nei capitoli precedenti, hanno evidenziato importanti conclusioni che forniscono le basi necessarie per lo sviluppo di nuove tematiche di ricerca per procedure sempre più innovative e predicibili che possano ottimizzare le prestazioni degli allineatori invisibili.

La caratterizzazione chimico-fisica del materiale termoplastico PET-G descritta nella prima attività sperimentale ha evidenziato che né il processo di termoformatura né l'esposizione alle diverse sostanze coloranti di uso quotidiano fino a 15 giorni determinavano variazioni o modifiche strutturali del polimero. Inoltre, l'esposizione intraorale e il contatto con i pigmenti colorati di bevande, nicotina o fumo di sigaretta causavano un accumulo di depositi sulla superficie irregolare del materiale termoformato. Pertanto, le caratteristiche superficiali del materiale in PET-G fino a 15 giorni di esposizione erano attribuite esclusivamente alle sostanze utilizzate.

Il secondo contributo di ricerca ha messo in evidenza come la procedura di sterilizzazione proposta per gli allineatori Lineo, basata sull'esposizione diretta della miscela gassosa  $O_3/O_2$  all'interno del loro packaging, determinava un effetto microbicida a 72 ore. È stata osservata anche una possibile capacità microbiostatica per un tempo di esposizione più breve (48 ore). Questo innovativo sistema di sterilizzazione potrebbe essere integrato come step finale nei processi di produzione degli allineatori Lineo, in particolare dopo le manovre di rifinitura e lucidatura, impedendo così la trasmissione di microrganismi patogeni che si possono inoculare sulle superfici di questi dispositivi. Inoltre, è una procedura sicura poiché è un sistema chiuso, senza alcun pericolo di tossicità, e qualsiasi inalazione da parte dei lavoratori e dei medici è insignificante.

Per ultimo, la procedura sperimentale indiretta di posizionamento degli attachments, esposta nella terza attività scientifica, mediante due tipologie di templates, uno pre-forato e l'altro pre-dosato con resina composita, si è dimostrata affidabile e semplice a livello operativo. Il template pre-forato aiuterebbe il clinico ad effettuare una mordenzatura "selettiva" dello smalto dentale favorendo così le manovre successive di bonding e di adesione della resina composita già contenuta all'interno delle sagome predisposte nel secondo template. L'interfaccia smalto-composito ottenuta dalle immagini SEM dimostrava una perfetta adesione tra il tessuto dentale e il materiale che costituisce l'attachment.

## BIBLIOGRAFIA

1. Vlaskalic, V.; Boyd, R. Orthodontic Treatment of a Mildly Crowded Malocclusion Using the Invisalign System. *Aust. Orthod. J.* **2001**, *17*, 41–46.
2. Lagravère, M.O.; Flores-Mir, C. The Treatment Effects of Invisalign Orthodontic Aligners: A Systematic Review. *J. Am. Dent. Assoc.* **2005**, *136*, 1724–1729, doi:10.14219/jada.archive.2005.0117.
3. Kesling, H.D. The Philosophy of the Tooth Positioning Appliance. *Am. J. Orthod. Oral Surg.* **1945**, *31*, 297–304, doi:10.1016/0096-6347(45)90101-3.
4. HI, N. The Vacuum Formed Dental Contour Appliance. *N. Y. State Dent. J.* **1964**, *30*, 385–390.
5. Lawrence, B. Vacuum Molding Machine. In *Google Patents*; 1957.
6. Ponitz, R.J. Invisible Retainers. *Am. J. Orthod.* **1971**, *59*, 266–272, doi:10.1016/0002-9416(71)90099-6.
7. McNamara, J.A. Invisable Retainers. *J Clin Orthod* **1985**, *19*, 570–578.
8. Sheridan, J.J.; LeDoux, W.; McMinn, R. Essix Retainers: Fabrication and Supervision for Permanent Retention. *J. Clin. Orthod.* **1993**, *27*, 37–45.
9. Beers, A.C.; Choi, W.; Pavlovskaja, E. Computer-Assisted Treatment Planning and Analysis. *Orthod. Craniofacial Res.* **2003**, *6*, 117–125, doi:10.1034/j.1600-0544.2003.224.x.
10. Martorelli, M.; Gerbino, S.; Giudice, M.; Ausiello, P. A Comparison between Customized Clear and Removable Orthodontic Appliances Manufactured Using RP and CNC Techniques. *Dent. Mater.* **2013**, *29*, doi:10.1016/j.dental.2012.10.011.
11. Barone, S.; Paoli, A.; Razionale, A. V; Savignano, R. Computational Design and Engineering of Polymeric Orthodontic Aligners. *Int. j. numer. method. biomed. eng.* **2017**, *33*, 2839, doi:10.1002/cnm.2839.
12. Wong, B.H.; Scholz, R.P.; Turpin, D.L. Invisalign A to Z. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* **2002**, *121*, 540–541, doi:10.1067/mod.2002.123036.
13. Hajeer, M.Y.; Millett, D.T.; Ayoub, A.F.; Siebert, J.P. Current Products and Practices: Applications of 3D Imaging in Orthodontics: Part I. *J. Orthod.* **2004**, *31*, 62–70, doi:10.1179/146531204225011346.
14. Melkos, A.B. Advances in Digital Technology and Orthodontics: A Reference to the Invisalign® Method. *Med. Sci. Monit.* **2005**, *11*.
15. Hennessy, J.; Al-Awadhi, E.A. Clear Aligners Generations and Orthodontic Tooth

- Movement. *J. Orthod.* **2016**, *43*, 68–76, doi:10.1179/1465313315Y.0000000004.
16. Djeu, G.; Shelton, C.; Maganzini, A. Outcome Assessment of Invisalign and Traditional Orthodontic Treatment Compared with the American Board of Orthodontics Objective Grading System. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* **2005**, *128*, 292–298, doi:10.1016/j.ajodo.2005.06.002.
  17. Ganta, G.K.; Cheruvu, K.; Ravi, R.K.; Reddy, R.P. Clear Aligners, the Aesthetic Solution: A Review. *Int. J. Dent. Mater.* **2021**, *03*, 90–95, doi:10.37983/ijdm.2021.3304.
  18. Boyd, R.L.; Waskalic, V. Three-Dimensional Diagnosis and Orthodontic Treatment of Complex Malocclusions with the Invisalign Appliance. *Semin. Orthod.* **2001**, *7*, 274–293, doi:10.1053/sodo.2001.25414.
  19. Cuperus, A.M.R.; Harms, M.C.; Rangel, F.A.; Bronkhorst, E.M.; Schols, J.G.J.H.; Breuning, K.H. Dental Models Made with an Intraoral Scanner: A Validation Study. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* **2012**, *142*, 308–313, doi:10.1016/j.ajodo.2012.03.031.
  20. Weir, T. Clear Aligners in Orthodontic Treatment. *Aust. Dent. J.* **2017**, *62*, 58–62, doi:10.1111/adj.12480.
  21. Nayar, S.; Bhuminathan, S.; Bhat, W. Rapid Prototyping and Stereolithography in Dentistry. *J. Pharm. Bioallied Sci.* **2015**, *7*, S216–S219, doi:10.4103/0975-7406.155913.
  22. Bichu, Y.M.; Alwafi, A.; Liu, X.; Andrews, J.; Ludwig, B.; Bichu, A.Y.; Zou, B. Advances in Orthodontic Clear Aligner Materials. *Bioact. Mater.* **2023**, *22*, 384–403, doi:10.1016/j.bioactmat.2022.10.006.
  23. Szuhaneck, C.; Fleser, T.; Grigore, A. Applications of Thermoplastic Materials in the Fabrication of Orthodontic Aligners. *Mater. Plast.* **2015**, *52*, 385–387.
  24. Bajpai, A.K.; Bajpai, J.; Saini, R.K.; Agrawal, P.; Tiwari, A. Smart Biomaterial Devices: Polymers in Biomedical Sciences. In *Smart Biomaterial Devices: Polymers in Biomedical Sciences*; CRC Press, 2016; pp. 1–227 ISBN 9781498707015.
  25. Ward, I.M.; Sweeney, J. *Mechanical Properties of Solid Polymers*; 2012;
  26. Zhang, N.; Bai, Y.; Ding, X.; Zhang, Y. Preparation and Characterization of Thermoplastic Materials for Invisible Orthodontics. *Dent. Mater. J.* **2011**, *30*, 954–959, doi:10.4012/dmj.2011-120.
  27. Maus, A. Characterization and Analysis of Polymers. *Macromol. Chem. Phys.* **2008**, *209*, 1515–1515, doi:10.1002/macp.200800286.
  28. Massy, J. A Little Book about BIG Chemistry: The Story of Man-Made Polymers. In *SpringerBriefs in Materials*; 2017; pp. 1–77.
  29. Radlmaier, V.; Heckel, C.; Winnacker, M.; Erber, A.; Koerber, H. Effects of Thermal

- Cycling on Polyamides during Processing. *Thermochim. Acta* **2017**, *648*, 44–51, doi:10.1016/j.tca.2016.12.011.
30. Oliveira, T.A.; Oliveira, R.R.; Barbosa, R.; Azevedo, J.B.; Alves, T.S. Effect of Reprocessing Cycles on the Degradation of PP/PBAT-Thermoplastic Starch Blends. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *168*, 52–60, doi:10.1016/j.carbpol.2017.03.054.
  31. Ginjupalli, K.; Shavi, G.V.; Averineni, R.K.; Bhat, M.; Udupa, N.; Nagaraja Upadhya, P. Poly( $\alpha$ -Hydroxy Acid) Based Polymers: A Review on Material and Degradation Aspects. *Polym. Degrad. Stab.* **2017**, *144*, 520–535, doi:10.1016/j.polymdegradstab.2017.08.024.
  32. Butt, F.I.; Muhammad, N.; Hamid, A.; Moniruzzaman, M.; Sharif, F. Recent Progress in the Utilization of Biosynthesized Polyhydroxyalkanoates for Biomedical Applications – Review. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *120*, 1294–1305, doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.09.002.
  33. Dupaix, R.B.; Boyce, M.C. Finite Strain Behavior of Poly(Ethylene Terephthalate) (PET) and Poly(Ethylene Terephthalate)-Glycol (PETG). *Polymer (Guildf)*. **2005**, *46*, 4827–4838, doi:10.1016/j.polymer.2005.03.083.
  34. Lombardo, L.; Martines, E.; Mazzanti, V.; Arreghini, A.; Mollica, F.; Siciliani, G. Stress Relaxation Properties of Four Orthodontic Aligner Materials: A 24-Hour in Vitro Study. *Angle Orthod.* **2017**, *87*, 11–18, doi:10.2319/113015-813.1.
  35. Condò, R.; Mampieri, G.; Giancotti, A.; Cerroni, L.; Pasquantonio, G.; Divizia, A.; Convertino, A.; Mecheri, B.; Maiolo, L. SEM Characterization and Ageing Analysis on Two Generation of Invisible Aligners. *BMC Oral Health* **2021**, *21*, doi:10.1186/s12903-021-01676-z.
  36. Ma, Y.S. on.; Fang, D.Y. u.; Zhang, N.; Ding, X.J. i.; Zhang, K.Y. a.; Bai, Y.X. in. Mechanical Properties of Orthodontic Thermoplastics PETG/ PC2858 after Blending. *Chin. J. Dent. Res.* **2016**, *19*, 43–48, doi:10.3290/j.cjdr.a35696.
  37. Iijima, M.; Kohda, N.; Kawaguchi, K.; Muguruma, T.; Ohta, M.; Naganishi, A.; Murakami, T.; Mizoguchi, I. Effects of Temperature Changes and Stress Loading on the Mechanical and Shape Memory Properties of Thermoplastic Materials with Different Glass Transition Behaviours and Crystal Structures. *Eur. J. Orthod.* **2015**, *37*, 665–670, doi:10.1093/ejo/cjv013.
  38. Tang, D.; Noordover, B.A.J.; Sablong, R.J.; Koning, C.E. Metal-Free Synthesis of Novel Biobased Dihydroxyl-Terminated Aliphatic Polyesters as Building Blocks for Thermoplastic Polyurethanes. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2011**, *49*, 2959–2968,

doi:10.1002/pola.24732.

39. Alexandropoulos, A.; Al Jabbari, Y.S.; Zinelis, S.; Eliades, T. Chemical and Mechanical Characteristics of Contemporary Thermoplastic Orthodontic Materials. *Aust. Orthod. J.* **2015**, *31*, 165–170, doi:10.21307/aoj-2020-151.
40. Barone, S.; Paoli, A.; Neri, P.; Razionale, A.V.; Giannese, M. Mechanical and Geometrical Properties Assessment of Thermoplastic Materials for Biomedical Application. *Lect. Notes Mech. Eng.* **2017**, *0*, 437–446, doi:10.1007/978-3-319-45781-9\_44.
41. Osswald, T.A.; Baur, E.; Brinkmann, S.; Oberbach, K.; Schmachtenberg, E. International Plastics Handbook. In *International Plastics Handbook*; 2006; pp. i–xvii ISBN 3-446-22905-1.
42. Frick, A.; Rochman, A. Characterization of TPU-Elastomers by Thermal Analysis (DSC). *Polym. Test.* **2004**, *23*, 413–417.
43. Bernard, G.; Rompré, P.; Tavares, J.R.; Montpetit, A. Colorimetric and Spectrophotometric Measurements of Orthodontic Thermoplastic Aligners Exposed to Various Staining Sources and Cleaning Methods. *Head Face Med.* **2020**, *16*, doi:10.1186/s13005-020-00218-2.
44. Gupta, D.K.; Tuli, A.; Jain, A. 3D Printed Material Application in Orthodontics. In *Proceedings of the Materials Today: Proceedings*; 2020; Vol. 28, pp. 1635–1642.
45. Condo', R.; Pazzini, L.; Cerroni, L.; Pasquantonio, G.; Lagana', G.; Pecora, A.; Mussi, V.; Rinaldi, A.; Mecheri, B.; Licoccia, S.; et al. Mechanical Properties of “Two Generations” of Teeth Aligners: Change Analysis during Oral Permanence. *Dent. Mater. J.* **2018**, *37*, 835–842, doi:10.4012/dmj.2017-323.
46. McKeen, L.W. Polyester Plastics. In *Permeability Properties of Plastics and Elastomers*; William Andrew Publishing, 2017; pp. 95–114 ISBN 978-0-323-50859-9.
47. Lanaro, M.; Booth, L.; Powell, S.K.; Woodruff, M.A. Electrofluidodynamic Technologies for Biomaterials and Medical Devices: Melt Electrospinning. In *Electrofluidodynamic Technologies (EFDTs) for Biomaterials and Medical Devices: Principles and Advances*; Woodhead Publishing, 2018; pp. 37–69 ISBN 9780081017463.
48. Latko-Duralek, P.; Dydek, K.; Boczkowska, A. Thermal, Rheological and Mechanical Properties of PETG/RPETG Blends. *J. Polym. Environ.* **2019**, *27*, 2600–2606, doi:10.1007/s10924-019-01544-6.
49. Hassan, M.H.; Omar, A.M.; Daskalakis, E.; Hou, Y.; Huang, B.; Strashnov, I.; Grieve,

- B.D.; Bártolo, P. The Potential of Polyethylene Terephthalate Glycol as Biomaterial for Bone Tissue Engineering. *Polymers (Basel)*. **2020**, *12*, 1–12, doi:10.3390/polym12123045.
50. Reddy, M.M.; Vivekanandhan, S.; Misra, M.; Bhatia, S.K.; Mohanty, A.K. Biobased Plastics and Bionanocomposites: Current Status and Future Opportunities. *Prog. Polym. Sci.* **2013**, *38*, 1653–1689, doi:10.1016/j.progpolymsci.2013.05.006.
  51. Bendler, J. *Handbook of Polycarbonate Science and Technology*; 1999;
  52. Fang, D.; Zhang, N.; Chen, H.; Bai, Y. Dynamic Stress Relaxation of Orthodontic Thermoplastic Materials in a Simulated Oral Environment. *Dent. Mater. J.* **2013**, *32*, 946–951, doi:10.4012/dmj.2013-131.
  53. Lombardo, L.; Arreghini, A.; Maccarrone, R.; Bianchi, A.; Scalia, S.; Siciliani, G. Optical Properties of Orthodontic Aligners—Spectrophotometry Analysis of Three Types before and after Aging. *Prog. Orthod.* **2015**, *16*, doi:10.1186/s40510-015-0111-z.
  54. Gold, B.P.; Siva, S.; Duraisamy, S.; Idaayath, A.; Kannan, R. Properties of Orthodontic Clear Aligner Materials - A Review. *J. Evol. Med. Dent. Sci.* **2021**, *10*, 3288–3294, doi:10.14260/jemds/2021/668.
  55. Ryokawa, H.; Miyazaki, Y.; Fujishima, A.; Miyazaki, T.; Maki, K. The Mechanical Properties of Dental Thermoplastic Materials in a Simulated Intraoral Environment. *Orthod. Waves* **2006**, *65*, 64–72, doi:10.1016/j.odw.2006.03.003.
  56. Ihssen, B.A.; Willmann, J.H.; Nimer, A.; Drescher, D. Effect of in Vitro Aging by Water Immersion and Thermocycling on the Mechanical Properties of PETG Aligner Material. *J. Orofac. Orthop.* **2019**, *80*, 292–303, doi:10.1007/s00056-019-00192-8.
  57. Kusy, R. Orthodontic Biomaterials: From the Past to the Present. *Angle Orthod.* **2002**, *72*, 501–512.
  58. Kwon, J.S.; Lee, Y.K.; Lim, B.S.; Lim, Y.K. Force Delivery Properties of Thermoplastic Orthodontic Materials. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* **2008**, *133*, 228–234, doi:10.1016/j.ajodo.2006.03.034.
  59. Abdallah, M.N.; Lou, T.; Retrouvey, J.M.; Suri, S. Biomaterials Used in Orthodontics: Brackets, Archwires, and Clear Aligners. In *Advanced Dental Biomaterials*; 2019; pp. 541–579 ISBN 9780081024768.
  60. Macri, M.; Murmura, G.; Varvara, G.; Traini, T.; Festa, F. Clinical Performances and Biological Features of Clear Aligners Materials in Orthodontics. *Front. Mater.* **2022**, *9*, doi:10.3389/fmats.2022.819121.
  61. Carniel, E.L.; Fontanella, C.G.; Stefanini, C.; Natali, A.N. A Procedure for the

- Computational Investigation of Stress-Relaxation Phenomena. *Mech. Time-Dependent Mater.* **2013**, *17*, 25–38, doi:10.1007/s11043-013-9209-1.
62. Owman-Moll, P.; Kuroi, J.; Lundgren, D. Continuous versus Interrupted Continuous Orthodontic Force Related to Early Tooth Movement and Root Resorption. *Angle Orthod.* **1995**, *65*, doi:10.1043/0003-3219(1995)065<0395:CVICOF>2.0.CO;2.
63. Bucci, R.; Rongo, R.; Levatè, C.; Michelotti, A.; Barone, S.; Razionale, A.V.; D'Antò, V. Thickness of Orthodontic Clear Aligners after Thermoforming and after 10 Days of Intraoral Exposure: A Prospective Clinical Study. *Prog. Orthod.* **2019**, *20*, doi:10.1186/s40510-019-0289-6.
64. Dalaie, K.; Fatemi, S.M.; Ghaffari, S. Dynamic Mechanical and Thermal Properties of Clear Aligners after Thermoforming and Aging. *Prog. Orthod.* **2021**, *22*, doi:10.1186/s40510-021-00362-8.
65. Boubakri, A.; Elleuch, K.; Guermazi, N.; Ayedi, H.F. Investigations on Hygrothermal Aging of Thermoplastic Polyurethane Material. *Mater. Des.* **2009**, *30*, 3958–3965, doi:10.1016/j.matdes.2009.05.038.
66. Ahn, H.W.; Kim, K.A.; Kim, S.H. A New Type of Clear Orthodontic Retainer Incorporating Multi-Layer Hybrid Materials. *Korean J. Orthod.* **2015**, *45*, 273–274, doi:10.4041/kjod.2015.45.6.273.
67. Yang, B.; Huang, W.M.; Li, C.; Li, L. Effects of Moisture on the Thermomechanical Properties of a Polyurethane Shape Memory Polymer. *Polymer (Guildf)*. **2006**, *47*, 1348–1356, doi:10.1016/j.polymer.2005.12.051.
68. Gerard Bradley, T.; Teske, L.; Eliades, G.; Zinelis, S.; Eliades, T. Do the Mechanical and Chemical Properties of Invisalign™ Appliances Change after Use? A Retrieval Analysis. *Eur. J. Orthod.* **2016**, *38*, 27–31, doi:10.1093/ejo/cjv003.
69. Tamburrino, F.; D'Antò, V.; Bucci, R.; Alessandri-Bonetti, G.; Barone, S.; Razionale, A.V. Mechanical Properties of Thermoplastic Polymers for Aligner Manufacturing: In Vitro Study. *Dent. J.* **2020**, *8*, doi:10.3390/dj8020047.
70. Daniele, V.; Macera, L.; Taglieri, G.; Di Giambattista, A.; Spagnoli, G.; Massaria, A.; Messori, M.; Quagliarini, E.; Chiappini, G.; Campanella, V.; et al. Thermoplastic Disks Used for Commercial Orthodontic Aligners: Complete Physicochemical and Mechanical Characterization. *Materials (Basel)*. **2020**, *13*, doi:10.3390/ma13102386.
71. Liu, C.L.; Sun, W.T.; Liao, W.; Lu, W.X.; Li, Q.W.; Jeong, Y.; Liu, J.; Zhao, Z.H. Colour Stabilities of Three Types of Orthodontic Clear Aligners Exposed to Staining Agents. *Int. J. Oral Sci.* **2016**, *8*, 246–253, doi:10.1038/ijos.2016.25.

72. Porojan, L.; Vasiliu, R.D.; Porojan, S.D.; Bîrdeanu, M.I. Surface Quality Evaluation of Removable Thermoplastic Dental Appliances Related to Staining Beverages and Cleaning Agents. *Polymers (Basel)*. **2020**, *12*, doi:10.3390/POLYM12081736.
73. Memè, L.; Notarstefano, V.; Sampalmieri, F.; Orilisi, G.; Quinzi, V. Atr-Ftir Analysis of Orthodontic Invisalign® Aligners Subjected to Various in Vitro Aging Treatments. *Materials (Basel)*. **2021**, *14*, 1–10, doi:10.3390/ma14040818.
74. Daniele, V.; Macera, L.; Taglieri, G.; Spera, L.; Marzo, G.; Quinzi, V. Color Stability, Chemico-Physical and Optical Features of the Most Common Petg and Pu Based Orthodontic Aligners for Clear Aligner Therapy. *Polymers (Basel)*. **2022**, *14*, doi:10.3390/polym14010014.
75. Zafeiriadis, A.A.; Karamouzos, A.; Athanasiou, A.E.; Eliades, T.; Palaghias, G. An in Vivo Spectrophotometric Evaluation of Vivera® and Essix® Clear Thermoplastic Retainer Discolouration. *Australas. Orthod. J.* **2018**, *34*, 3–10, doi:10.21307/aoj-2020-053.
76. Ryu, J.H.; Kwon, J.S.; Jiang, H.B.; Cha, J.Y.; Kim, K.M. Effects of Thermoforming on the Physical and Mechanical Properties of Thermoplastic Materials for Transparent Orthodontic Aligners. *Korean J. Orthod.* **2018**, *48*, 316–325, doi:10.4041/kjod.2018.48.5.316.
77. Elkholly, F.; Schmidt, S.; Amirkhani, M.; Schmidt, F.; Lapatki, B.G. Mechanical Characterization of Thermoplastic Aligner Materials: Recommendations for Test Parameter Standardization. *J. Healthc. Eng.* **2019**, doi:10.1155/2019/8074827.
78. Golkhani, B.; Weber, A.; Keilig, L.; Reimann, S.; Bourauel, C. Variation of the Modulus of Elasticity of Aligner Foil Sheet Materials Due to Thermoforming. *J. Orofac. Orthop.* **2022**, *83*, 233–243, doi:10.1007/s00056-021-00327-w.
79. Landel, R.F.; Nielsen, L.E. *Mechanical Properties of Polymers and Composites*; 1993;
80. Kohda, N.; Iijima, M.; Muguruma, T.; Brantley, W.A.; Ahluwalia, K.S.; Mizoguchi, I. Effects of Mechanical Properties of Thermoplastic Materials on the Initial Force of Thermoplastic Appliances. *Angle Orthod.* **2013**, *83*, 476–483, doi:10.2319/052512-432.1.
81. Wheeler, T.T. Orthodontic Clear Aligner Treatment. *Semin. Orthod.* **2017**, *23*, 83–89, doi:10.1053/j.sodo.2016.10.009.
82. Shakir, H.; Al Noor, S.; Al-Joubori, S.K. Retention of Different Orthodontic Aligners According to Their Thickness and the Presence of Attachments. *Int. J. Med. Res. Heal. Sci.* **2018**, *7*, 115–121.



83. Simon, M.; Keilig, L.; Schwarze, J.; Jung, B.A.; Bourauel, C. Forces and Moments Generated by Removable Thermoplastic Aligners: Incisor Torque, Premolar Derotation, and Molar Distalization. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* **2014**, *145*, 728–736, doi:10.1016/j.ajodo.2014.03.015.
84. Dasy, H.; Dasy, A.; Asatrian, G.; Rózsa, N.; Lee, H.F.; Kwak, J.H. Effects of Variable Attachment Shapes and Aligner Material on Aligner Retention. *Angle Orthod.* **2015**, *85*, 934–940, doi:10.2319/091014-637.1.
85. Elkholy, F.; Mikhaiel, B.; Repky, S.; Schmidt, F.; Lapatki, B.G. Effect of Different Attachment Geometries on the Mechanical Load Exerted by PET-G Aligners during Derotation of Mandibular Canines: An in Vitro Study. *J. Orofac. Orthop.* **2019**, *80*, 315–326, doi:10.1007/s00056-019-00193-7.
86. Dalaie, K.; Ghaffari, S. Importance of Attachments in Treatment with Clear Aligners: A Narrative Review: *J. Dent. Sch. Shahid Beheshti Univ. Med. Sci.* **2020**, *38*, 41–47.
87. Weckmann, J.; Scharf, S.; Graf, I.; Schwarze, J.; Keilig, L.; Bourauel, C.; Braumann, B. Influence of Attachment Bonding Protocol on Precision of the Attachment in Aligner Treatments. *J. Orofac. Orthop.* **2020**, *81*, 30–40, doi:10.1007/s00056-019-00204-7.
88. Savignano, R.; Valentino, R.; Razionale, A. V.; Michelotti, A.; Barone, S.; D’Antò, V. Biomechanical Effects of Different Auxiliary-Aligner Designs for the Extrusion of an Upper Central Incisor: A Finite Element Analysis. *J. Healthc. Eng.* **2019**, 9687127, doi:10.1155/2019/9687127.
89. D’Antò, V.; Muraglie, S.; Castellano, B.; Candida, E.; Sfondrini, M.F.; Scribante, A.; Grippaudo, C. Influence of Dental Composite Viscosity in Attachment Reproduction: An Experimental in Vitro Study. *Materials (Basel)*. **2019**, *12*, 4001, doi:10.3390/ma12234001.
90. Feinberg, K.B. owma.; Souccar, N.M.; Kau, C.H.; Oster, R.A.; Lawson, N.C. Translucency, Stain Resistance, and Hardness of Composites Used for Invisalign Attachments. *J. Clin. Orthod.* **2016**, *50*, 170–176.
91. Mubarak, M.T.; Ozsahin, I.; Ozsahin, Di.U. Evaluation of Sterilization Methods for Medical Devices. In Proceedings of the 2019 Advances in Science and Engineering Technology International Conferences, ASET 2019; 2019.
92. Rutala, W.A.; Weber, D.J. Disinfection and Sterilization: An Overview. *Am. J. Infect. Control* **2013**, *41*, doi:10.1016/j.ajic.2012.11.005.
93. Rogers, W.J. The Effects of Sterilization on Medical Materials and Welded Devices. In *Joining and Assembly of Medical Materials and Devices*; 2013; pp. 79–130 ISBN

9781845695774.

94. Rutala, W.A.; Weber, D.J. Disinfection, Sterilization, and Antisepsis: An Overview. *Am. J. Infect. Control* **2019**, *47*, A3–A9, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ajic.2019.01.018>.
95. Ben Gasseem, A.A. Does Clear Aligner Treatment Result in Different Patient Perceptions of Treatment Process and Outcomes Compared to Conventional/Traditional Fixed Appliance Treatment: A Literature Review. *Eur. J. Dent.* **2022**, *16*, 274–285.
96. Schuster, S.; Eliades, G.; Zinelis, S.; Eliades, T.; Bradley, T.G. Structural Conformation and Leaching from in Vitro Aged and Retrieved Invisalign Appliances. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* **2004**, *126*, 725–728, doi:[10.1016/j.ajodo.2004.04.021](https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2004.04.021).
97. Bistričić, L.; Borjanović, V.; Leskovac, M.; Mikac, L.; McGuire, G.E.; Shenderova, O.; Nunn, N. Raman Spectra, Thermal and Mechanical Properties of Poly(Ethylene Terephthalate) Carbon-Based Nanocomposite Films. *J. Polym. Res.* **2015**, *22*, doi:[10.1007/s10965-015-0680-z](https://doi.org/10.1007/s10965-015-0680-z).
98. Mariani, M.M.; Day, P.J.R.; Deckert, V. Applications of Modern Micro-Raman Spectroscopy for Cell Analyses. *Integr. Biol.* **2010**, *2*, 94–101, doi:[10.1039/b920572a](https://doi.org/10.1039/b920572a).
99. Puchowicz, D.; Giesz, P.; Kozanecki, M.; Cieślak, M. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) in Cotton Fabrics Analysis. *Talanta* **2019**, *195*, 516–524, doi:[10.1016/j.talanta.2018.11.059](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.11.059).
100. Zafeiriadis, A.A.; Karamouzos, A.; Athanasiou, A.E.; Eliades, T.; Palaghias, G. In Vitro Spectrophotometric Evaluation of Vivera Clear Thermoplastic Retainer Discolouration. *Aust. Orthod. J.* **2014**, *30*, 192–200.
101. Jindal, P.; Juneja, M.; Siena, F.L.; Bajaj, D.; Breedon, P. Mechanical and Geometric Properties of Thermoformed and 3D Printed Clear Dental Aligners. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* **2019**, *156*, 694–701, doi:[10.1016/j.ajodo.2019.05.012](https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2019.05.012).
102. La Rosa, G.; Fratini, M.; Della Libera, S.; Iaconelli, M.; Muscillo, M. Viral Infections Acquired Indoors through Airborne, Droplet or Contact Transmission. *Ann. Ist. Super. Sanita* **2013**, *49*, 124–132, doi:[10.4415/ANN-13-02-03](https://doi.org/10.4415/ANN-13-02-03).
103. Amato, A.; Caggiano, M.; Amato, M.; Moccia, G.; Capunzo, M.; De Caro, F. Infection Control in Dental Practice during the Covid-19 Pandemic. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 1–12, doi:[10.3390/ijerph17134769](https://doi.org/10.3390/ijerph17134769).
104. Moccia, G.; Motta, O.; Pironti, C.; Proto, A.; Capunzo, M.; De Caro, F. An Alternative Approach for the Decontamination of Hospital Settings. *J. Infect. Public Health* **2020**, *13*, 2038–2044, doi:[10.1016/j.jiph.2020.09.020](https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.09.020).
105. Pironti, C.; Motta, O.; Proto, A. Development of a New Vapour Phase Methodology for

- Textiles Disinfection. *Clean. Eng. Technol.* **2021**, *4*, doi:10.1016/j.clet.2021.100170.
106. Rosenblum, J.; Ge, C.; Bohrerova, Z.; Yousef, A.; Lee, J. Ozonation as a Clean Technology for Fresh Produce Industry and Environment: Sanitizer Efficiency and Wastewater Quality. *J. Appl. Microbiol.* **2012**, *113*, 837–845, doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05393.x.
  107. Martinelli, M.; Giovannangeli, F.; Rotunno, S.; Trombetta, C.M.; Montomoli, E. Water and Air Ozone Treatment as an Alternative Sanitizing Technology. *J. Prev. Med. Hyg.* **2017**, *58*, E48–E52, doi:10.15167/2421-4248/jpmh2017.58.1.757.
  108. Sharma, M.; Hudson, J.B. Ozone Gas Is an Effective and Practical Antibacterial Agent. *Am. J. Infect. Control* **2008**, *36*, 559–563, doi:10.1016/j.ajic.2007.10.021.
  109. Elvis, A.M.; Ekta, J.S. Ozone Therapy: A Clinical Review. *J. Nat. Sci. Biol. Med.* **2011**, *2*, 66–70, doi:10.4103/0976-9668.82319.
  110. Wallace, C.A. New Developments in Disinfection and Sterilization. *Am. J. Infect. Control* **2016**, *44*, e23–e27, doi:10.1016/j.ajic.2016.02.022.
  111. Aydogan, A.; Gurol, M.D. Application of Gaseous Ozone for Inactivation of *Bacillus Subtilis* Spores. *J. Air Waste Manag. Assoc.* **2006**, *56*, 179–185, doi:10.1080/10473289.2006.10464443.
  112. Breidablik, H.J.; Lysebo, D.E.; Johannessen, L.; Skare; Andersen, J.R.; Kleiven, O. Effects of Hand Disinfection with Alcohol Hand Rub, Ozonized Water, or Soap and Water: Time for Reconsideration? *J. Hosp. Infect.* **2020**, *105*, 213–215, doi:10.1016/j.jhin.2020.03.014.
  113. Tonon, C.C.; Panariello, B.H.D.; Spolidorio, D.M.P.; Gossweiler, A.G.; Duarte, S. Antibiofilm Effect of Ozonized Physiological Saline Solution on Peri-Implant-Related Biofilm. *J. Periodontol.* **2021**, *92*, 1151–1162, doi:10.1002/JPER.20-0333.
  114. Tiwari, S.; Avinash, A.; Katiyar, S.; Aarthi Iyer, A.; Jain, S. Dental Applications of Ozone Therapy: A Review of Literature. *Saudi J. Dent. Res.* **2017**, *8*, 105–111, doi:10.1016/j.sjdr.2016.06.005.
  115. Hirani, S.; Patel, U.; Patel, N. Invisible Orthodontics-a Review. *IOSR J. Dent. Med. Sci* **2016**, *15*, 56–62.
  116. Charavet, C.; Gourdain, Z.; Graveline, L.; Lupi, L. Cleaning and Disinfection Protocols for Clear Orthodontic Aligners: A Systematic Review. *Healthc.* **2022**, *10*, doi:10.3390/healthcare10020340.
  117. Díaz, R.; Menéndez, D.; Tabares, F. High Frequency Ozone Generation System. *Ozone Sci. Eng.* **2001**, *23*, 171–176, doi:10.1080/01919510108961999.

118. Facta, M.; Salam, Z. bin; Buntat, Z. Bin The Development of Ozone Generation with Low Power Consumption. In Proceedings of the 2009 Innovative Technologies in Intelligent Systems and Industrial Applications, CITISIA 2009; 2009; pp. 440–445.
119. Thurston, C.F. Microbial Physiology and Metabolism. *Nature* **1977**, *266*, 92–92, doi:10.1038/266092a0.
120. Micha, P.; Corradini, M.G. Microbial Growth Curves: What the Models Tell Us and What They Cannot. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2011**, *51*, 917–945, doi:10.1080/10408398.2011.570463.
121. Koch, A.L. Some Calculations on the Turbidity of Mitochondria and Bacteria. *BBA - Biochim. Biophys. Acta* **1961**, *51*, 429–441, doi:10.1016/0006-3002(61)90599-6.
122. Swinehart, D.F. The Beer-Lambert Law. *J. Chem. Educ.* **1962**, *39*, 333–335, doi:10.1021/ed039p333.
123. Koch, A.L. Turbidity Measurements of Bacterial Cultures in Some Available Commercial Instruments. *Anal. Biochem.* **1970**, *38*, 252–259, doi:10.1016/0003-2697(70)90174-0.
124. Zaccanti, G.; Del Bianco, S.; Martelli, F. Measurements of Optical Properties of High-Density Media. *Appl. Opt.* **2003**, *42*, 4023, doi:10.1364/ao.42.004023.
125. Sutton, S. Measurement of Microbial Cells by Optical Density. *J. Valid. Techn* **2011**, *17*, 46–49.
126. Mytilinaios, I.; Salih, M.; Schofield, H.K.; Lambert, R.J.W. Growth Curve Prediction from Optical Density Data. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *154*, 169–176, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.035.
127. Vianna, M.E.; Gomes, B.P.F.A.; Berber, V.B.; Zaia, A.A.; Ferraz, C.C.R.; De Souza-Filho, F.J. In Vitro Evaluation of the Antimicrobial Activity of Chlorhexidine and Sodium Hypochlorite. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **2004**, *97*, 79–84, doi:10.1016/S1079-2104(03)00360-3.
128. Mohapatra, S. Sterilization and Disinfection. In *Essentials of Neuroanesthesia*; 2017; pp. 929–944 ISBN 9780128054307.
129. Told, R.; Ujfalusi, Z.; Pentek, A.; Kerényi, M.; Banfai, K.; Vizi, A.; Szabo, P.; Melegh, S.; Bovari-Biri, J.; Pongracz, J.E.; et al. A State-of-the-Art Guide to the Sterilization of Thermoplastic Polymers and Resin Materials Used in the Additive Manufacturing of Medical Devices. *Mater. Des.* **2022**, *223*, doi:10.1016/j.matdes.2022.111119.
130. Thanomsub, B.; Anupunpisit, V.; Chanphetch, S.; Watcharachaipong, T.; Poonkhum, R.; Srisukonth, C. Effects of Ozone Treatment on Cell Growth and Ultrastructural Changes

- in Bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **2002**, *48*, 193–199, doi:10.2323/jgam.48.193.
131. Fontes, B.; Cattani Heimbecker, A.M.; de Souza Brito, G.; Costa, S.F.; van der Heijden, I.M.; Levin, A.S.; Rasslan, S. Effect of Low-Dose Gaseous Ozone on Pathogenic Bacteria. *BMC Infect. Dis.* **2012**, *12*, doi:10.1186/1471-2334-12-358.
  132. Rangel, K.; Cabral, F.O.; Lechuga, G.C.; Carvalh, J.P.R.S.; Villas-Bôas, M.H.S.; Midlej, V.; De-Simone, S.G. Detrimental Effect of Ozone on Pathogenic Bacteria. *Microorganisms* **2022**, *10*, doi:10.3390/microorganisms10010040.
  133. Moore, G.; Griffith, C.; Peters, A. Bactericidal Properties of Ozone and Its Potential Application as a Terminal Disinfectant. *J. Food Prot.* **2000**, *63*, 1100–1106, doi:10.4315/0362-028X-63.8.1100.
  134. Patil, S.; Valdramidis, V.P.; Karatzas, K.A.G.; Cullen, P.J.; Bourke, P. Assessing the Microbial Oxidative Stress Mechanism of Ozone Treatment through the Responses of Escherichia Coli Mutants. *J. Appl. Microbiol.* **2011**, *111*, 136–144, doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05021.x.
  135. Rossini, G.; Parrini, S.; Deregibus, A.; Castroflorio, T. Controlling Orthodontic Tooth Movement with Clear Aligners - An Updated Systematic Review Regarding Efficacy and Efficiency. *J. Aligner Orthod.* **2017**, *1*, 7–20.
  136. Simon, M.; Keilig, L.; Schwarze, J.; Jung, B.A.; Bourauel, C. Treatment Outcome and Efficacy of an Aligner Technique - Regarding Incisor Torque, Premolar Derotation and Molar Distalization. *BMC Oral Health* **2014**, *14*, doi:10.1186/1472-6831-14-68.
  137. Ravera, S.; Castroflorio, T.; Garino, F.; Daher, S.; Cugliari, G.; Deregibus, A. Maxillary Molar Distalization with Aligners in Adult Patients: A Multicenter Retrospective Study. *Prog. Orthod.* **2016**, *17*, doi:10.1186/s40510-016-0126-0.
  138. Krieger, E.; Seiferth, J.; Marinello, I.; Jung, B.A.; Wriedt, S.; Jacobs, C.; Wehrbein, H. Invisalign® Treatment in the Anterior Region: Were the Predicted Tooth Movements Achieved? *J. Orofac. Orthop.* **2012**, *73*, 365–376, doi:10.1007/s00056-012-0097-9.
  139. Papadimitriou, A.; Mousoulea, S.; Gkantidis, N.; Kloukos, D. Clinical Effectiveness of Invisalign® Orthodontic Treatment: A Systematic Review. *Prog. Orthod.* **2018**, *19*, doi:10.1186/s40510-018-0235-z.
  140. Gomez, J.P.; Peña, F.M.; Martínez, V.; Giraldo, D.C.; Cardona, C.I. Initial Force Systems during Bodily Tooth Movement with Plastic Aligners and Composite Attachments: A Three-Dimensional Finite Element Analysis. *Angle Orthod.* **2015**, *85*, 454–460, doi:10.2319/050714-330.1.
  141. Garino, F.; Castroflorio, T.; Daher, S.; Ravera, S.; Rossini, G.; Cugliari, G.; Deregibus,

- A. Effectiveness of Composite Attachments in Controlling Upper-Molar Movement with Aligners. *J. Clin. Orthod.* **2016**, *50*, 341–347.
142. Barreda, G.J.; Dzierewianko, E.A.; Muñoz, K.A.; Piccoli, G.I. Surface Wear of Resin Composites Used for Invisalign® Attachments. *Acta Odontol. Latinoam.* **2017**, *30*, 90–95.
143. Mantovani, E.; Castroflorio, E.; Rossini, G.; Garino, F.; Cugliari, G.; Deregibus, A.; Castroflorio, T. Scanning Electron Microscopy Analysis of Aligner Fitting on Anchorage Attachments. *J. Orofac. Orthop.* **2019**, *80*, 79–87, doi:10.1007/s00056-018-00167-1.
144. Rocke, P.A. A Simple Technique for Placing Invisalign Attachments. *J. Clin. Orthod.* **2008**, *42*, 594.
145. Lo Giudice, R.; Galletti, C.; Tribst, J.P.M.; Melenchón, L.P.; Matarese, M.; Miniello, A.; Cucinotta, F.; Salmeri, F. In Vivo Analysis of Intraoral Scanner Precision Using Open-Source 3D Software. *Prosthesis* **2022**, *4*, 554–563, doi:10.3390/prosthesis4040045.
146. Rosa, M.A.; Gugliandolo, P.; Favaloro, A.; Vermiglio, G.; Centofanti, A.; Bruschetta, D.; Rizzo, G. Morpho-Structural Alterations of Sub-Chondral Bone Tissue in Patients with Osteoarthritis: A Scanning Electron Microscopy Study. *Ital. J. Anat. Embryol.* **2015**, *120*, 71–81.
147. Lo Giudice, R.; Rizzo, G.; Centofanti, A.; Favaloro, A.; Rizzo, D.; Cervino, G.; Squeri, R.; Costa, B.G.; La Fauci, V.; Lo Giudice, G. Steam Sterilization of Equine Bone Block: Morphological and Collagen Analysis. *Biomed Res. Int.* **2018**, *2018*, doi:10.1155/2018/9853765.
148. Levrini, L.; Mangano, A.; Montanari, P.; Margherini, S.; Caprioglio, A.; Abbate, G.M. Periodontal Health Status in Patients Treated with the Invisalign® System and Fixed Orthodontic Appliances: A 3 Months Clinical and Microbiological Evaluation. *Eur. J. Dent.* **2015**, *9*, 404–410, doi:10.4103/1305-7456.163218.
149. White, D.W.; Julien, K.C.; Jacob, H.; Campbell, P.M.; Buschang, P.H. Discomfort Associated with Invisalign and Traditional Brackets: A Randomized, Prospective Trial. *Angle Orthod.* **2017**, *87*, 801–808, doi:10.2319/091416-687.1.
150. Khosravi, R.; Cohanım, B.; Hujoel, P.; Daher, S.; Neal, M.; Liu, W.; Huang, G. Management of Overbite with the Invisalign Appliance. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* **2017**, *151*, 691-699.e2, doi:10.1016/j.ajodo.2016.09.022.
151. Chen, W.; Qian, L.; Qian, Y.; Zhang, Z.; Wen, X. Comparative Study of Three Composite Materials in Bonding Attachments for Clear Aligners. *Orthod. Craniofacial*

*Res.* **2021**, *24*, 520–527, doi:10.1111/ocr.12465.

152. Iliadi, A.; Koletsi, D.; Eliades, T. Forces and Moments Generated by Aligner-Type Appliances for Orthodontic Tooth Movement: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Orthod. Craniofacial Res.* **2019**, *22*, 248–258, doi:10.1111/ocr.12333.