



UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara



José Francisco Santos Simões da Rocha

**Efeito do processo de envelhecimento sobre propriedades físicas e biológicas
de biomateriais utilizados como *abutments***

Araraquara

2018



**UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara**



José Francisco Santos Simões da Rocha

**Efeito do processo de envelhecimento sobre propriedades físicas e biológicas
de biomateriais utilizados como *abutments***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral, Área de Concentração – Prótese.

Orientadora: Prof^a Dr^a Janaina Habib Jorge

Araraquara

2018

Rocha, José Francisco Santos Simões da

Efeito do processo de envelhecimento sobre propriedades físicas e biológicas de biomateriais utilizados como abutments / José Francisco Santos Simões da Rocha. -- Araraquara: [s.n.], 2018

67 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Reabilitação oral) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Janaína Habib Jorge

1. Próteses e implantes 2. Propriedades físicas
3. Biofilmes 4. Técnicas de cultura de células I. Título

**UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara**

José Francisco Santos Simões da Rocha

**Efeito do processo de envelhecimento sobre propriedades físicas e biológicas
de biomateriais utilizados como *abutments***

COMISSÃO JULGADORA

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
REABILITAÇÃO ORAL**

Presidente e Orientadora: Prof^a. Dr^a. Janaina Habib Jorge

2º Examinador: Prof. Dr. Gelson Luis Adabo

3º Examinador: Prof^a. Dr^a. Vanessa Migliorini Urban

Araraquara, 10 de setembro de 2018

DADOS CURRICULARES

José Francisco Santos Simões da Rocha

Nascimento: 24 de julho de 1987

Filiação: Pai: Francisco Simões da Rocha

Mãe: Sandra Regina dos Santos Rocha

2006-2010: Curso de Graduação em Odontologia na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2013-2015: Curso de Pós-Graduação *Lato Sensu* em Implantodontia.

2016 a 2017: Estágio Docência nas Disciplinas de Prótese Parcial Removível I e II na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Dedico este trabalho a Deus,
que nos ensina o caminho da partilha
compartilhando conosco a Vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida e por sempre colocar pessoas boas ao meu lado.

Aos meus pais, Francisco e Sandra, que sempre me amaram e se preocuparam muito com a minha educação, apesar da difícil condição financeira.

Aos meus irmãos, Mateus e Lucas, pelo companheirismo e amizade que sempre tivemos. Sinto-me grato por ter duas pessoas tão íntegras e “do bem” como irmãos.

À minha namorada, Debora, por ter tornado minha vida muito mais bonita! Agradeço por ter uma pessoa tão linda e amorosa caminhando ao meu lado. Também sou grato por todo seu companheirismo, apoio e paciência durante esse período de mestrado.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Janaína Habib Jorge, por sua orientação, paciência, compreensão e ajuda neste trabalho.

Aos professores da minha banca, Prof. Dr. Gelson Luis Adabo e Prof^a. Dr^a. Vanessa Migliorini Urban, pela disponibilidade e contribuição para melhoria deste trabalho. Também sou grato ao Prof. Gelson pela solicitude e gentileza em todos os momentos que precisei de sua ajuda, incluindo para o uso do Laboratório do Departamento de Materiais Dentários e Prótese.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Mollo Júnior, pela parceria na pesquisa e ajuda para obtenção de materiais. Também sou grato pela sua contribuição como professor membro da banca de qualificação desse trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Marlise Inês Klein, pela sua contribuição para a qualificação desse trabalho e pelo seu exemplo de professora pesquisadora comprometida com a Ciência e com o bem-estar da sociedade. Levarei sempre comigo seu exemplo de cientista.

À Prof^a. Dr^a. Maria Silvia Maurício Rigolin, pela orientação e solicitude em todos os momentos que precisei. Também sou grato pela parceria nos experimentos e pela boa energia que me transmitiu.

À Prof^a. Dr^a. Paula Aboud Barbugli, por compartilhar seus conhecimentos de forma tão gentil. Agradeço por todo apoio dado para realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Danny Omar Mendoza Marin, pela ajuda na interpretação dos resultados.

À Prof^a. Dr^a. Érica Dorigatti D'Ávila, pela ajuda na realização desse trabalho.

Aos colegas Maria Isabel, Jacqueline, Vinicius e Camila Foggi pelos ensinamentos técnicos de laboratório e pela boa convivência.

À Lígia, pelo apoio técnico e pela amizade.

Ao Prof. João Victor Schiavon, pela gentileza de me permitir usar o laboratório da Faculdade de Química de Araraquara (UNESP).

À Conexão Sistemas de Próteses Ltda., pela doação dos corpos de prova utilizados nesta pesquisa.

Ao Ministério da Educação e à CAPES, por terem me dado apoio financeiro durante o período de mestrado.

Enfim, agradeço a todos os professores, colegas, técnicos, funcionários e entidades que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

“Quando o mundo estiver unido na busca do conhecimento, e não mais lutando por dinheiro e poder, então nossa sociedade poderá enfim evoluir a um novo nível.”

Le Livros

Rocha JFSS. Efeito do processo de envelhecimento sobre propriedades físicas e biológicas de biomateriais utilizados como *abutments* [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara da UNESP; 2018.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do envelhecimento de materiais comumente usados como pilares de próteses implanto-suportadas (*abutments*) sobre suas características físicas de superfície (rugosidade, energia livre de superfície e molhabilidade) e propriedades biológicas (metabolismo de fibroblastos orais e formação de biofilme fúngico). Para isso, discos (N=62) com rugosidade inferior a 0,2 μm foram confeccionados em zircônia (ZrO_2) do tipo Y-TZP (yttrium-stabilized tetragonal zirconia polycrystalline) e em titânio (Ti) comercialmente puro, e foram submetidos a um processo de envelhecimento simulado em autoclave a 134°C (pressão de 2 bar) por 20 horas. ZrO_2 e Ti envelhecidos foram comparados aos seus homólogos não envelhecidos. Os materiais também foram comparados entre si, nas condições envelhecida e não envelhecida. Para os testes biológicos, os grupos também foram comparados a um controle positivo de poliestireno. Todos os testes, exceto o de rugosidade, foram realizados após a formação de película salivar sobre os discos. Os testes biológicos utilizados foram de Alamar Blue (n=9) para avaliar o metabolismo de fibroblastos da gengiva humana (FGH) e de contagem de colônias viáveis (n=9) para verificar a formação de biofilme de uma cepa padrão de *Candida albicans* (ATCC90028) sobre os materiais. Além disso, microscopia eletrônica de varredura (MEV) (n=2) foi realizada para avaliação da morfologia dos fibroblastos e dos microrganismos. Para a análise estatística, foram utilizados os testes paramétricos *t*-teste para amostras pareadas para a rugosidade, *t*-teste para amostras independentes para energia livre de superfície, molhabilidade e metabolismo dos fibroblastos, e ANOVA *one-way* com correção de Welch e teste post-hoc de Games-Howell para contagem de colônias viáveis. Utilizou-se um nível de significância de $\alpha = 0,05$ para todas as análises de inferência. Os resultados mostraram que o processo de envelhecimento não alterou a rugosidade dos materiais testados (ZrO_2 e Ti), mas aumentou a energia livre de superfície e a molhabilidade de ambos. Além disso, o envelhecimento não teve efeito sobre o metabolismo dos fibroblastos FGH nem alterou a quantidade de colônias viáveis dos biofilmes de *Candida albicans* cultivados sobre os discos de ZrO_2 ou Ti. Quando os materiais foram comparados entre si, a ZrO_2 apresentou menores valores de rugosidade em comparação ao Ti. Além disso, a ZrO_2 apresentou maior energia livre de superfície e maior molhabilidade. Para os testes biológicos, não houve alteração do metabolismo de fibroblastos FGH entre os materiais, porém ocorreu menor crescimento de *Candida albicans* sobre a ZrO_2 . A análise das imagens de MEV confirmou os resultados encontrados nos testes biológicos. Concluiu-se que o processo de envelhecimento simulado em autoclave não influenciou o crescimento de fibroblastos FGH ou de *Candida albicans* sobre ZrO_2 ou Ti, mas a ZrO_2 apresentou menor formação de biofilme fúngico em comparação com o Ti.

Palavras-chave: Próteses e implantes. Propriedades físicas. Biofilmes. Técnicas de cultura de células.

Rocha JFSS. Effect of the aging process on physical and biological properties of biomaterials used as *abutments* [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara da UNESP; 2018.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of aging of commonly used abutments on their surface physical characteristics (roughness, surface free energy and wettability) and biological properties (oral fibroblasts metabolism and formation of fungal biofilm). For this purpose, discs (N=62) with roughness less than 0.2 μm were made in yttrium-stabilized tetragonal zirconia polycrystalline (Y-TZP) zirconia (ZrO_2) and in commercially pure titanium (Ti), and underwent a simulated aging process in autoclave at 134 °C (pressure of 2 bar) for 20 hours. ZrO_2 and Ti were compared to their unaged counterparts. The materials were also compared to each other in the aged and unaged conditions. For the biological tests, the groups were also compared to a positive control of polystyrene. All tests, except roughness, were performed after the formation of salivary film on the discs. The biological tests used were Alamar Blue (n=9) to evaluate the metabolism of human gingival fibroblasts (HGF) and colony counting test (n=9) to verify the biofilm formation of a reference strain of *Candida albicans* (ATCC90028) on the materials. In addition, scanning electron microscopy (SEM) (n=2) was performed to evaluate the morphology of fibroblasts and microorganisms. For statistical analysis, the t-test for paired samples was used for roughness, t-test for independent samples was used for surface free energy, wettability and fibroblasts metabolism, and one-way ANOVA with Welch correction and Games-Howell post-hoc test was used for colony counting test. A significance level of $\alpha = 0.05$ was used for all inference analyzes. The results showed that the aging process did not alter the roughness of the tested materials (ZrO_2 and Ti), but it increased their surface free energy and wettability. In addition, aging had no effect on the metabolism of HGF fibroblasts nor did it change the amount of viable colonies of *Candida albicans* biofilms cultured on ZrO_2 or Ti discs. When the materials were compared to each other, ZrO_2 presented lower roughness values in comparison to Ti. In addition, ZrO_2 presented higher surface free energy and wettability. For the biological tests, there was no alteration in the metabolism of HGF fibroblasts between the materials, but there was a lower growth of *Candida albicans* on ZrO_2 . SEM analysis confirmed the results found in the biological tests. It was concluded that the autoclave aging process did not influence the growth of HGF fibroblasts or *Candida albicans* on ZrO_2 or Ti, but ZrO_2 presented less fungal biofilm formation compared to Ti.

Keywords: Prostheses and implants. Biofilms. Cell culture techniques. Physical properties.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 PROPOSIÇÃO	15
3 REVISÃO DA LITERATURA	16
4 MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Materiais Testados	31
4.2 Grupos Experimentais	31
4.3 Delineamento do Estudo	31
4.4 Limpeza dos Corpos de Prova	32
4.5 Envelhecimento dos Corpos de Prova	32
4.6 Coleta de Saliva para Formação de Película Salivar	33
4.7 Propriedades Físicas	33
4.7.1 Rugosidade superficial média (Ra)	33
4.7.2 Energia livre de superfície (ELS)	34
4.7.3 Molhabilidade	35
4.8 Propriedades Biológicas	35
4.8.1 Esterilização dos corpos de prova	35
4.8.2 Metabolismo de fibroblastos gengivais cultivados sobre as amostras de Ti e ZrO ₂	35
4.8.3 Formação de biofilme de <i>Candida albicans</i> sobre as amostras de Ti e ZrO ₂	36
4.9 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	38
4.10 Análise Estatística	38
5 RESULTADOS	40
5.1 Propriedades Físicas	40
5.1.1 Rugosidade superficial média (Ra)	40
5.1.2 Energia livre de superfície (ELS)	41
5.1.3 Molhabilidade	43
5.2 Propriedades Biológicas	44
5.2.1 Metabolismo de fibroblastos gengivais cultivados sobre as amostras de Ti e ZrO ₂	44
5.2.2 Formação de biofilme de <i>Candida albicans</i> sobre as amostras de Ti e ZrO ₂	45
5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	47
6 DISCUSSÃO	50
7 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	56
ANEXO A	64

1 INTRODUÇÃO

O implante dentário tem sido uma importante ferramenta para a substituição de dentes perdidos. Sua indicação vai desde casos com grande demanda estética, como a substituição de um único elemento anterior, até casos com grande demanda funcional, atuando na retenção de próteses totais fixas ou removíveis. Nos casos de reabilitação fixa, pilares intermediários (*abutments*) são parafusados sobre os implantes para fixação da prótese. Esses pilares geralmente são confeccionados com material metálico e/ou cerâmico, ambos apresentando adequada biocompatibilidade¹.

Para que o implante se mantenha em função ao longo do tempo, é fundamental que alguns fatores sejam observados, entre eles, a presença de um bom selamento promovido pelo tecido gengival junto à superfície do pilar². Esse selamento evita a infiltração de microrganismos, prevenindo o aparecimento de inflamação na gengiva (mucosite) e no osso (peri-implantite)³. Assim, é desejável que as superfícies dos *abutments* favoreçam a adesão de células para formação do epitélio juncional, responsável pelo selamento biológico, e que essas superfícies tenham características que dificultem a colonização por microrganismos, evitando a ocorrência de doenças peri-implantares.

As doenças peri-implantares envolvem diversos microrganismos, com predomínio de bactérias anaeróbias Gram-negativas⁴. Dentre os microrganismos presentes na peri-implantite, pode-se destacar as chamadas bactérias do “complexo vermelho”, *Porphyromonas gingivalis*⁵⁻¹¹, *Treponema denticola*^{7-9,11,12} e *Tannerella forsythia*^{6,8,9,11,12}. Também são encontradas bactérias do gênero *Prevotella spp.*^{5,13,14} principalmente as espécies *Prevotella intermedia*^{6,7,9,12} e *Prevotella nigrescens*^{6,8,12}. Além dessas, bactérias dos gêneros *Streptococcus spp.*^{5,6,8,14,15}, *Staphylococcus spp.*^{9,12,14} e *Fusobacterium spp.*^{13,15}, como a espécie *Fusobacterium nucleatum*^{12,5,6,8}, são frequentemente associadas à peri-implantite. Microrganismos oportunistas como a *Candida spp.*^{6,12,16-18} também podem estar presentes.

Candida albicans é o fungo mais prevalente na cavidade oral, e sua ocorrência está associada com estomatite protética¹⁹. Próteses totais removíveis retidas por implantes (*overdentures*) podem ser removidas para a higienização, ao contrário dos implantes e *abutments* que permanecem in situ, favorecendo a infecção por espécies fúngicas. *Candida albicans* tem sido relatada como uma

espécie oportunista nas lesões peri-implantares^{17,18} e a formação de biofilmes nessas superfícies pode acarretar em infecções com subsequente morbidade, uma vez que os biofilmes fúngicos são difíceis de tratar devido à sua maior resistência a agentes antimicrobianos.

Por essa razão, as infecções fúngicas associadas ao uso de próteses sobre implantes podem levar à remoção dos materiais implantados e consequente perda da prótese. A superfície do *abutment* pode fornecer o substrato necessário para a formação de biofilmes fúngicos e, portanto, pode ser considerada um potencial reservatório para infecção por *Candida albicans*²⁰. Adicionalmente, alguns estudos^{20,21} enfatizam a relevância da película salivar e seus constituintes no processo de adesão fúngica inicial. De acordo com Bürgers et al.²⁰, a mucina pode servir como um receptor para a adesão de *Candida albicans*, enquanto que a albumina pode atuar como agente bloqueador no complexo processo de adesão. Além disso, os materiais com diferentes composições e propriedades hidrofóbicas apresentam diversas maneiras de absorção de mucina salivar, adesão inicial e posterior formação de biofilme²¹. Normalmente, a película salivar sobre os biomateriais aumenta a energia livre de superfície, reduzindo o número de células aderidas^{22,23}. Devido à capacidade de adesão dos microrganismos nas superfícies de *abutments*²⁴, a barreira formada pelo tecido gengival ao redor dos mesmos deve ser efetiva para que não ocorra a perda precoce do implante por deficiência no processo de osseointegração. Além disso, essa barreira deve permanecer com esta efetividade ao longo do tempo mesmo com a renovação celular e envelhecimento dos biomateriais, para que não haja a perda tardia, como resultado de doença peri-implantar.

A adesão de microrganismos e de células epiteliais aos biomateriais envolve uma série de fatores, entre os quais as características da superfície desses materiais, como energia livre, molhabilidade e rugosidade^{22,23,25-35}. Energia livre é uma característica de superfície relacionada à diferença que existe na força de atração entre as moléculas que estão no interior de uma substância e as moléculas que estão na superfície. As moléculas da superfície realizam menor número de interações, o que faz com que possuam maior energia média em relação às moléculas do interior do líquido. Uma das formas de medir a energia livre de uma superfície é através do ângulo de contato formado por gotas de líquidos depositadas sobre a mesma. Molhamento é a capacidade de um líquido se espalhar por uma

superfície. O molhamento completo da superfície ocorre quando as forças de adesão são superiores às forças de coesão. Forças de adesão são aquelas que fazem com que partículas de um material atraiam partículas de outros materiais, enquanto que forças de coesão são aquelas que fazem com que as partículas de um mesmo material permaneçam unidas. Rugosidade é o conjunto das irregularidades microgeométricas presentes em uma superfície, e pode ser medida através de um aparelho chamado rugosímetro.

Ao longo do tempo, os materiais protéticos podem ter suas propriedades físicas alteradas quando expostos na cavidade oral em função da umidade, acidez, temperatura e cargas mecânicas da mastigação³⁶. Assim, o processo de envelhecimento ocorre naturalmente e pode acarretar em alterações nas propriedades superficiais dos biomateriais, tais como: rugosidade superficial, hidrofilicidade e energia livre de superfície³⁶. Alguns estudos simulam o envelhecimento de materiais através de técnicas como a ciclagem mecânica ou a ciclagem hidrotérmica³⁷⁻⁴².

O presente estudo consistiu na investigação da influência do envelhecimento por ciclagem hidrotérmica de materiais usados como pilares de próteses implanto-suportadas (zircônia e titânio) sobre as propriedades físicas (rugosidade, energia livre de superfície e molhabilidade) desses materiais, assim como sobre as propriedades biológicas de adesão, morfologia e metabolismo de células humanas e capacidade de formação de biofilme de *Candida albicans*. A literatura apresenta poucos estudos avaliando a adesão de diferentes células às superfícies protéticas submetidas ao envelhecimento, especialmente após a formação de película salivar. Assim, a relação entre o processo de envelhecimento, características superficiais de biomateriais e propriedades biológicas de células gengivais e fúngicas ainda permanece controversa, justificando a importância do presente estudo.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de um processo de envelhecimento artificial hidrotérmico em amostras de titânio e zircônia sobre:

1. Características de superfície (rugosidade, energia livre de superfície e molhamento);
2. Adesão, morfologia e metabolismo de fibroblastos orais e capacidade de formação de biofilme de *Candida albicans*.

Além disso, buscou-se fazer uma comparação entre os materiais, tanto antes quanto após o processo de envelhecimento. A hipótese nula do estudo é que o envelhecimento de amostras de titânio e zircônia não altera as suas características de superfície, assim como a adesão, a morfologia e o metabolismo de fibroblastos orais e a capacidade de formação de biofilme de *Candida albicans*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Ainda existem muitas dúvidas sobre os mecanismos de interação bacteriana com os materiais utilizados na reabilitação oral com implantes. Outras características da superfície, além da rugosidade superficial, parecem ser extremamente importantes em relação à formação do biofilme. Diferentes métodos de adesão de bactérias foram relatados em relação aos diferentes materiais. Essa revisão de literatura traz informações relevantes sobre o comportamento de células da cavidade oral e de microrganismos depositados sobre amostras de materiais utilizados na reabilitação oral com implantes. A relação da topografia do material com o processo de adesão e proliferação celular também foi avaliada pelos estudos. Cabe ressaltar que poucos estudos foram encontrados na literatura em relação ao fungo *Candida albicans*. Além disso, a partir da revisão de literatura descrita, não foi encontrado nenhum trabalho que avaliasse o efeito do processo de envelhecimento de amostras de titânio e zircônia sobre a formação de biofilme de *Candida albicans*, justificando a importância do presente estudo.

Scarano et al.⁴³, em 2004, compararam a adesão microbiana sobre titânio e zircônia. Dez pacientes receberam dispositivos acrílicos removíveis que foram adaptados na região dos dentes posteriores. Discos de titânio comercialmente puro e de zircônia com rugosidades semelhantes foram colados nesses dispositivos e permaneceram na boca por um período de 24 horas. Após esse período, os discos foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foi observado que a superfície coberta por bactérias sobre os discos de zircônia foi significativamente menor que a dos discos de titânio. Os autores concluíram que a zircônia pode ser um material adequado para fabricação de *abutments* com baixo potencial de colonização microbiana.

Degidi et al.⁴⁴, em 2006, realizaram uma avaliação histológica dos tecidos peri-implantares ao redor de cicatrizadores de titânio e de zircônia com rugosidades semelhantes. Para isso, pacientes utilizaram os cicatrizadores durante 6 meses e, após esse período, o tecido gengival ao redor dos mesmos foi removido cirurgicamente. Foram realizados diversos testes de processos associados à inflamação, entre os quais os de infiltrado inflamatório e densidade de microvasos. O infiltrado inflamatório foi mais presente e mais extenso nos espécimes de titânio. Os maiores valores de densidade de microvasos também foram observados para o titânio.

Os autores concluíram que os tecidos ao redor dos componentes de titânio apresentaram maiores níveis de inflamação e, possivelmente, maior quantidade de bactérias associadas.

Em 2009, Al-Marzouk e Al-Azzawi⁴⁵ analisaram o efeito da rugosidade superficial de porcelanas polidas ou glazeadas sobre a adesão de *Streptococcus mutans* orais. Foram preparados discos metalo-cerâmicos que foram divididos aleatoriamente em quatro grupos, referente ao método de acabamento superficial. Foi mensurado o valor da rugosidade superficial média (Ra) de todos os espécimes com um perfilômetro. Os discos foram inoculados em tubos de ensaio que continham uma suspensão bacteriana dos microrganismos, e incubados durante 24 horas a 37 °C. Os espécimes foram transferidos para solução salina estéril e agitados por 1 minuto em um misturador vórtex. Alíquotas das diluições obtidas foram espalhadas em meio seletivo ágar mitis salivarius bacitracina (MSB). As colônias bacterianas foram contadas a partir do fator de diluição e expressas em unidades formadoras de colônias. A superfície glazeada apresentou o menor valor de rugosidade superficial e exibiu a menor quantidade de adesão bacteriana. Não houve diferenças significativas entre os outros métodos de acabamento superficial na adesão. Os autores concluíram que houve uma correlação positiva entre o valor de rugosidade superficial da porcelana e a quantidade de adesão de *S. mutans* nas superfícies testadas.

Em geral, os biofilmes microbianos (bacterianos ou fúngicos) são considerados fatores de virulência, uma vez que aumentam a resistência dos microrganismos frente às defesas do hospedeiro. Assim, a formação do biofilme pode causar resistência aos agentes antimicrobianos e, muitas vezes, resultar em infecções graves e persistentes. Com menor frequência, os implantes dentários podem ser considerados um reservatório para infecção por *Candida albicans*. Dessa forma, Bürgers et al.²⁰ (2010) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a adesão inicial de fungos a três tipos de titânio texturizado e uma zircônia e correlacionar esses achados com as diferenças nas características da superfície, como rugosidade média (Ra) e energia livre de superfície (ELS). Além disso, os autores investigaram a influência de proteínas salivares (mucina e albumina) sobre essa adesão. Os fungos aderentes foram quantificados por meio de um ensaio bioluminométrico. A menor quantidade de células fúngicas foi encontrada em titânio jateado, enquanto os implantes de zircônia não mostraram potencial na redução da adesão de *C. albicans*. A influência da ELS na formação de biofilme fúngico pareceu ser mais importante do que a influência de Ra. A

proteína mucina aumentou o acúmulo de *C. albicans*. Em contraste, não foi possível afirmar que a albumina esteja envolvida no processo de adesão do mesmo fungo.

No estudo realizado por van Brakel et al.⁴⁶, em 2011, foram investigadas as condições dos tecidos moles ao redor de *abutments* de zircônia e de titânio. Pacientes totalmente edêntulos receberam dois implantes mandibulares para posterior tratamento com próteses tipo *overdenture*. Cada paciente recebeu um *abutment* de zircônia e um de titânio imediatamente após a cirurgia de colocação dos implantes e permaneceu com os mesmos em boca durante os três primeiros meses do período de cicatrização. Testes de profundidade de sondagem, sangramento à sondagem e recessão gengival foram realizados após duas semanas e três meses a partir da instalação dos pilares. Os resultados mostraram que não houve diferença entre os materiais para os parâmetros de sangramento à sondagem e recessão gengival, após os períodos de duas semanas e três meses. Com relação à profundidade de sondagem, esta foi igual para ambos os materiais após duas semanas, porém foi menor para a zircônia após três meses. Também foi realizado um teste para detecção e contagem de microrganismos frequentemente relatados no sulco peri-implantar. Não foram encontradas diferenças com relação aos microrganismos entre os grupos de titânio e zircônia.

Al-Radha et al.⁴⁷ (2012) compararam diferentes superfícies em relação à adesão das espécies bacterianas *Streptococcus mitis* e *Prevotella nigrescens*. As superfícies testadas foram zircônia polida, titânio polido, titânio jateado com zircônia, e titânio jateado com zircônia e tratado com ácido fluorídrico. Todas as superfícies foram analisadas quanto à rugosidade, molhabilidade e energia livre de superfície. Discos de cada tipo de superfície foram encubados com 2 mL de suspensão (75×10^7 UFC/mL) de cada microrganismo separadamente, por um período de 6 horas, submetidos a uma rotação suave. A adesão bacteriana foi verificada através de microscopia de fluorescência e a porcentagem de área coberta por bactérias foi calculada. O teste de adesão foi realizado com e sem a formação de película salivar prévia à inoculação dos microrganismos. A rugosidade média de todos os grupos foi inferior a $0,2 \mu\text{m}$, porém os valores encontrados para os grupos de zircônia e de titânio polidos foram significativamente menores que os valores dos demais grupos. Com relação à molhabilidade pela água, os grupos de zircônia e titânio jateado com zircônia apresentaram valores de ângulo de contato maiores (mais hidrofóbicos) que o obtido para o grupo de titânio. Os valores de energia livre das superfícies de zircônia e de

titânio jateado com zircônia foram menores que o da superfície de titânio. O teste de adesão bacteriana apresentou menores valores de área recoberta por ambos os microrganismos para os grupos de zircônia e de titânio recoberto por zircônia em relação ao grupo de titânio. Além disso, a formação da película salivar reduziu significativamente a quantidade das bactérias aderidas. Os autores concluíram que a energia livre de superfície e o tipo de material parecem ser os fatores mais importantes na adesão bacteriana a materiais protéticos lisos.

O desenvolvimento de materiais cerâmicos de alto desempenho tem contribuído para a reabilitação oral com implantes mais estéticos em substituição às ligas de titânio. No entanto, a formação do biofilme sobre a superfície desses materiais continua sendo um problema e desempenha um papel importante na etiologia da peri-implantite. Assim, Al-Ahmad et al.⁴⁸ (2013) realizaram um estudo com o objetivo de examinar in vivo a adesão bacteriana inicial em seis diferentes materiais de implantes. Os materiais testados foram: titânio usinado (Ti-m), titânio modificado (TiUnite®), ZiUnite®, zircônia reforçada com alumina e usinada (ATZ-m), zircônia reforçada com alumina e jateada (ATZ-s), zircônia usinada (TZP-A-m) e esmalte bovino como controle. Todos os materiais foram examinados após 30 e 120 minutos de exposição oral. A coloração com DAPI foi utilizada para análise quantitativa dos microrganismos inicialmente aderentes. Os microrganismos aderentes iniciais foram visualizados por hibridação in situ com fluorescência (FISH) e quantificados por microscopia confocal de varredura a laser (MCVL). Os alvos das sondas oligonucleóticas foram *Eubacteria*, *Veillonella spp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces naeslundii* e *Streptococcus spp.* A análise DAPI mostrou que o aumento do tempo de exposição oral resultou em uma quantidade crescente de bactérias aderentes. O nível mais alto de colonização foi no ZiUnite®, com o menor ocorrendo no esmalte bovino, seguido pelo Ti-m. Esta colonização precoce correlacionou-se significativamente com as rugosidades superficiais dos materiais. FISH e MCVL não apresentaram diferenças significativas em relação à composição bacteriana total. No entanto, *Streptococcus spp.* foi o principal colonizador para todos os materiais investigados. Os autores concluíram que, nos tempos de exposição oral de 30 e 120 minutos, a formação de biofilme inicial, apesar da película salivar adquirida, é influenciada direta ou indiretamente pela topografia da superfície do material. Superfícies altamente polidas podem minimizar o risco de formação de biofilme e, possivelmente, a peri-implantite.

Moon et al.⁴⁹ (2013) investigaram as diferenças na adesão de fibroblastos da gengiva humana (FGH) sobre discos com superfícies de titânio (usinado, polido ou revestido por nitreto de titânio) e zircônia (usinada ou polida). Foram realizados os testes de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para avaliação da morfologia celular, MTT para avaliação da viabilidade celular, MTT após aplicação de ondas ultrassônicas sobre os discos para avaliação da força de adesão, e os testes semi-quantitativo RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) e de Western blot para avaliação da expressão de proteínas de adesão. Todos os testes foram realizados após os períodos de 1, 3, 5 e 7 dias de crescimento celular, com exceção dos testes de MEV de Western blot que foram realizados após 1 e 5 dias de crescimento. Fotografias de MEV revelaram que os fibroblastos cresceram com forma alongada de acordo com o padrão das ranhuras presentes na superfície do titânio usinado. As células sobre a zircônia usinada apresentaram-se mais planas e curtas. Os demais grupos apresentaram diversas formas celulares, tais como fusão, arredondada e alongada. O teste de MTT mostrou haver crescimento e proliferação das células ao longo do tempo, sem diferença entre os grupos. Para o teste de MTT após aplicação de ondas ultrassônicas foi observado que as células apresentaram um alto grau de destacamento das superfícies no período de 1 dia, enquanto que, para os períodos subsequentes, esse destacamento foi menor, sem diferença entre os grupos. O teste RT-PCR mostrou que a expressão de algumas proteínas de adesão, como a vinculina e a paxilina, aumentou ao longo do tempo. O teste de Western blot confirmou que havia maior expressão dessas proteínas após 5 dias em comparação à 1 dia de crescimento das células. Os autores concluíram que as diferentes superfícies tiveram pouca influência na adesão das células, e que a força de adesão está mais relacionada ao tempo que as células ficam em contato com as superfícies. Também concluíram que proteínas de adesão, especialmente a vinculina e a paxilina, podem contribuir para uma boa adesão dos fibroblastos às superfícies dos *abutments*.

A perda tardia do implante pode ser devida a uma ruptura entre o implante e os tecidos mineralizados após o estabelecimento da osseointegração e isso pode ocorrer devido à sobrecarga oclusal ou infecção microbiana. Em 2014, de Avila et al.⁵⁰ realizaram uma revisão de literatura com o objetivo de investigar a relação entre biofilme e doença peri-implantar, com ênfase nos tipos de superfícies de pilares de implantes. Indivíduos com doença periodontal têm uma grande quantidade de microrganismos patogênicos na bolsa periodontal. Se os indivíduos perdem os

dentes, esses microrganismos permanecem viáveis dentro na cavidade oral e podem influenciar diretamente a microbiota peri-implantar. Assim, as bactérias remanescentes podem aderir nas superfícies dos implantes e induzir peri-implantite, podendo causar destruição do osso alveolar e a perda subsequente do implante. Estudos demonstraram diferenças na formação de biofilme em materiais odontológicos e essas variações podem estar associadas às características físicas e químicas das superfícies. No caso de pacientes parcialmente desdentados afetados por doença periodontal, o tipo ideal de *abutment* a ser utilizado deve ser aquele que promova adesão mínima de bactérias periodonto-patogênicas. Portanto, é clinicamente relevante saber como as bactérias se comportam frente às diferentes superfícies, a fim de desenvolver novos materiais e / ou novos tipos de tratamento de superfícies que reduzam ou inibam a adesão de microrganismos patogênicos.

A adesão dos tecidos peri-implantares parece ser influenciada pelas características superficiais do biomaterial. No entanto, a maioria dos estudos mencionados tem focado na rugosidade superficial ou molhabilidade da superfície, sendo também importante a avaliação de outras propriedades como o parâmetro de rugosidade Sdq (raiz quadrada da inclinação da superfície). Por essa razão, Kim et al.⁵¹ (2015) realizaram um estudo para explorar as correlações entre a adesão de fibroblastos e as propriedades de superfície de materiais utilizados como pilares de implantes. Seis tipos de superfícies foram analisados: liga de titânio usinado (SM), liga de Co-Cr-Mo usinada (CCM), liga de titânio revestida com nitreto (TiN), liga de titânio anodizado (AO), revestimento de resina composta em liga de titânio (R) e zirconia (Zr). Vários parâmetros de superfície foram medidos, incluindo rugosidade, ângulo de contato com a água (WCA) e Sdq. A adesão de células HGF-1 foi investigada e as correlações foram analisadas usando uma análise de regressão múltipla. Os resultados mostraram que a ligação da célula HGF-1 foi maior nos grupos SM, TiN e Zr do que nos outros grupos e menor no grupo CCM. A partir da análise de regressão múltipla, a ligação das células HGF-1 foi significativamente correlacionada com Sdq e WCA. Quando o grupo R foi excluído, apenas o WCA mostrou correlação significativa com a fixação dos fibroblastos. Dentro das limitações do estudo, os autores concluíram que a ligação celular de fibroblastos gengivais humanos foi principalmente correlacionada com WCA.

O sucesso em longo prazo da reabilitação com implantes dentários depende não somente da integração do implante no osso circundante, mas também da

qualidade do selamento de tecido mole. Assim, Liu et al.⁵² (2015) realizaram um estudo objetivando estabelecer uma modificação de superfície para a zircônia, bem como avaliar sua influência na adesão de fibroblastos e de bactérias orais. Nesse estudo, zircônia revestida com polidopamina (PDA) foi preparada e as características da superfície foram avaliadas (microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica, ângulo de contato, espectroscopia foto-eletrônica de raios-X e espectroscopia Raman). A adesão, proliferação, morfologia, síntese de proteínas e expressão gênica dos fibroblastos gengivais humanos (FGHs) sobre a zircônia revestida por PDA também foram analisadas. Além disso, a adesão de *Streptococcus gordonii* e *Streptococcus mutans* à zircônia após o revestimento de PDA foi avaliado por microscopia eletrônica de varredura e coloração live/dead. Os resultados demonstraram que o revestimento com PDA aumentou significativamente a adesão e proliferação celular em comparação com a zircônia sem revestimento. FGHs exibiram alto grau de espalhamento e secretaram alto nível de colágeno tipo I em discos modificados por PDA. Além disso, o número de bactérias aderentes na zircônia diminuiu significativamente após o revestimento. Os autores sugeriram que o PDA é capaz de modificar a superfície da zircônia, influenciar o comportamento dos FGHs e reduzir a adesão bacteriana.

Os materiais utilizados como pilares de implantes dentários estão em íntimo contato com os tecidos moles circundantes. Assim, sua biocompatibilidade é crucial, podendo influenciar na condição do osso e da gengiva adjacentes. A biocompatibilidade dos materiais utilizados como pilares de implantes dentários depende de vários fatores, incluindo a natureza do material, sua composição química, rugosidade, hidrofiliabilidade e energia superficial. Por esse motivo, Rutkunas et al.⁵³ (2015) realizaram um estudo com o objetivo de comparar a viabilidade e a adesão de fibroblastos gengivais humanos (FGHs) cultivados sobre diversos materiais dentários utilizados na reabilitação com implantes. As superfícies dos materiais testados foram avaliadas usando um perfilador de imagens ópticas. Para a toxicidade do material e avaliação da adesão celular, utilizaram-se células de fibroblastos gengivais humanos primários. Para avaliar a força da adesão celular, os fibroblastos gengivais foram cultivados nos materiais testados e submetidos a forças de cisalhamento lateral pela aplicação de intensidades de agitação de 300 e 500 rpm. A expressão de quinases de adesão focal (FAKs) e a fosforilação em células cultivadas nos espécimes foram registradas por ELISA. Houve uma tendência da força de adesão dos fibroblastos em

diminuir na seguinte ordem: titânio jateado, titânio polido, zircônia jateada, zircônia polida, liga de ouro, liga de cobalto-cromo. Níveis mais elevados de proteína total, bem como de fosfo-FAK, foram registados em FGHs cultivados em titânio rugoso. Os autores concluíram que o tipo de material e a técnica de processamento de superfície têm um impacto na interação de fibroblastos gengivais com materiais utilizados como pilares de implantes dentários.

O entendimento das propriedades físico-químicas e mecânicas de cerâmicas de materiais utilizados como *abutments* poderia ajudar a identificar o material ideal no que diz respeito ao selamento gengival. Assim, Brunot-Gohin et al.⁵⁴ (2016) realizaram um estudo objetivando comparar a resposta biológica do tecido epitelial cultivado em cerâmicas de dissilicato de lítio (LS₂) e zircônia (ZrO₂). Para isso, ambos os biomateriais foram preparados com dois tratamentos de superfície diferentes: com e sem polimento. Células de epitélio foram cultivada sobre as amostras para simular o tecido peri-implantar. O ângulo de contato, a hidrofobicidade e a rugosidade dos materiais, bem como o comportamento tecidual (migração e adesão celular) foram avaliados. Melhor migração celular foi observada na cerâmica de ZrO₂. A adesão celular, porém, foi menor neste material polido do que no LS₂ com ou sem polimento. O aumento da rugosidade superficial nas amostras de LS₂ melhorou a adesão celular, acarretando em um aumento de até 13%. Os autores concluíram que o LS₂ pode ser modificado usando simples mudanças de superfície para modular a adesão de tecidos moles.

Bactérias patogênicas, assim como ocorre nos dentes naturais, podem aderir nas superfícies dos *abutments* de implantes e causar doença peri-implantar, podendo acarretar na perda do implante. Assim, de Avila et al.⁵⁵, em 2016, realizaram um estudo in vitro para avaliar a influência das propriedades físicas e químicas de dois materiais utilizados como pilares de implantes, titânio (Ti) e zircônia (ZrO₂), na formação de biofilme de bactérias patogênicas. Discos de esmalte bovino (EB) serviram como grupo controle. Biofilmes simples e mistos de *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*, formados sobre as superfícies dos materiais, foram avaliados quantitativa e qualitativamente, após 7 dias de incubação, por microscopia de varredura confocal e unidade de formação de colônias. Além disso, a rugosidade média (Ra) e a energia livre de superfície foram avaliadas para cada material. A rugosidade média em todos os discos foi menor ou igual a 0,21 µm e não afetou a adesão bacteriana. O titânio apresentou um maior grau de hidrofiliicidade em

comparação com o EB após 90 minutos de imersão na saliva. A energia livre superficial não apresentou diferenças entre os materiais. Biofilmes monoespécies formados por *P. gingivalis* em Ti e biofilme de espécies mistas em ZrO₂ exibiram pequeno número de células nas superfícies das amostras. As superfícies dos *abutments* de ZrO₂ mostraram uma diminuição no biofilme anaeróbio em comparação com Ti e EB. Os autores concluíram que as superfícies dos materiais podem ter um impacto significativo na formação de biofilme.

Até o ano de 2016, poucos estudos haviam sido feitos com o objetivo de avaliar a adesão e a capacidade proliferativa de células epiteliais à zircônia. Assim, nesse ano, Okabe et al.⁵⁶ avaliaram a influência das propriedades de rugosidade e molhabilidade sobre a adesão de células epiteliais em zircônia comparada com titânio e alumina. Para a realização do estudo, células epiteliais orais humanas foram cultivadas em amostras de cada material. A morfologia e a viabilidade celular foram avaliadas. Além disso, a expressão gênica de algumas proteínas também foi verificada por meio de ensaios moleculares. Os resultados mostraram que a rugosidade não influenciou na molhabilidade dos materiais testados. Além disso, a morfologia das células ligadas aos espécimes foi semelhante entre todos os grupos. Após 2 horas de cultivo das células sobre os espécimes, não houve diferença significativa na viabilidade celular entre os diferentes materiais. Entretanto, após 24 horas de cultivo celular, o número de células viáveis foi maior nas superfícies de zircônia do que em titânio. Os autores concluíram que as propriedades de adesão de células epiteliais na zircônia são comparáveis com as do titânio.

Os pilares de implantes dentários deveriam possuir as seguintes características: assegurar a estabilidade de tecidos moles e duros; não causar, ou limitar, o desgaste da conexão implante / *abutment*; exibir baixas taxas de acúmulo de biofilme; ser biocompatível; e ser esteticamente aceitável. Levando em consideração essas características, Mehl et al.⁵⁷ (2016) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar as propriedades de adesão de fibroblastos gengivais humanos em três diferentes materiais utilizados como *abutments*, em uma resina adesiva usada para unir pilares bi-partidos e em dentina humana. Para isso, discos de dissilicato de lítio (LS), dióxido de zircônio (ZrO₂), cimento resinoso adesivo (AR), titânio (Ti) e dentina humana (DH) foram fabricados com três níveis diferentes de rugosidade superficial (rugosa, usinada e polida). Rugosidade (Ra e Rz), ângulo de contato com a água e forças de desprendimento celular foram medidos. A força de desprendimento celular foi medida

para células individuais usando espectroscopia de força de célula única. Os resultados mostraram que a rugosidade da superfície influenciou significativamente o ângulo de contato com a água para todos os materiais. No geral, DH mostrou o menor ângulo de contato, seguido por LS, Ti, ZrO₂ e AR. A comparação das forças de separação celular entre materiais com superfícies rugosas e usinadas não revelou diferenças significativas, com exceção do ZrO₂ em relação ao DH com superfícies rugosas. Para superfícies polidas, a DH apresentou a maior força de desprendimento, seguida por Ti, AR e ZrO₂, que não diferiram significativamente entre si e LS; Ti / AR foi significativamente diferente do LS. Com exceção de DH, onde superfícies polidas exibiram a maior força de separação celular, a maioria das superfícies usinadas apresentou maiores forças de destacamento celular do que superfícies polidas ou rugosas. Os autores concluíram que pilares dos implantes deveriam, idealmente, ser fornecidos com uma rugosidade superficial usinada para melhor adesão celular.

Pereira et al.⁵⁸ (2016) avaliaram os efeitos de diferentes protocolos de envelhecimento utilizados para simular o processo de degradação que ocorre nas zircônias utilizadas em próteses. Avaliaram a transformação da fase tetragonal para monoclinica (t→m) através de difração de raio-X, a microtopografia por microscopia eletrônica de varredura, a resistência à flexão pelo teste de flexão biaxial, e a rugosidade superficial média (Ra). Os protocolos de envelhecimento incluíram autoclavagem a 134°C por 20 horas, imersão em água destilada a 37°C durante 1 ano, ciclagem mecânica, e associação entre autoclavagem e ciclagem mecânica. Os protocolos que envolveram o uso da autoclave apresentaram as maiores porcentagens de conteúdo de fase monoclinica. A rugosidade média foi maior no grupo controle em relação aos grupos envelhecidos. As imagens fotomicrográficas mostraram não haver diferença na microtopografia de todos os grupos. Com relação à resistência à flexão, nenhum protocolo testado apresentou efeito deletério em relação ao controle, sendo que os grupos submetidos ao envelhecimento em água destilada a 37°C e autoclavagem foram os que apresentaram os maiores valores.

De Avila et al.⁵⁹ (2017) compararam dois materiais usados como pilares protéticos em próteses implanto-suportadas (titânio e zircônia) quanto à adesão microbiana e formação de biofilme. Inicialmente, discos desses materiais tiveram suas propriedades físicas de rugosidade e energia livre de superfície medidas e comparadas. A rugosidade de ambos os materiais foi semelhante e a energia livre de superfície foi um pouco maior para a zircônia. Os discos foram, então, expostos a

uma comunidade microbiana da saliva e avaliados após os períodos de 16 e 48 horas para verificar a fase de adesão e formação de biofilme, respectivamente. A quantidade e qualidade das bactérias aderidas aos discos foram avaliadas por diferentes métodos, entre eles contagem de colônias viáveis, microscopia confocal e determinação do perfil bacteriano pela técnica de sequenciamento de DNA. O teste de contagem de colônias viáveis apresentou diferença estatisticamente significativa entre os materiais, com maior número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) para a zircônia em relação ao titânio, para os dois períodos avaliados. A microscopia confocal também revelou que a densidade de bactérias foi maior para a zircônia em ambos os períodos. Com relação ao perfil das bactérias, os resultados mostraram que a quantidade de filotipos foi similar para ambos os materiais em ambos os períodos avaliados. Os autores concluíram que as fases de adesão inicial e formação de biofilme são afetadas pelo tipo de material, sendo que a zircônia acumulou mais bactérias e biofilme em relação ao titânio.

Dutra et al.⁶⁰ (2017) investigaram a influência do envelhecimento a baixa temperatura (low-temperature degradation) e do desgaste com brocas diamantadas em uma zircônia do tipo Y-TZP sobre suas características físicas de superfície e susceptibilidade à adesão bacteriana. O envelhecimento foi simulado através da esterilização em autoclave (134°C, 2 bar, 20 horas). Os testes físicos utilizados foram de análise de fase por difração de Raio-X, rugosidade superficial, ângulo de contato com água deionizada, e análise micromorfológica por microscopia de força atômica. A adesão bacteriana foi verificada pelo teste de contagem de colônias viáveis, a partir do plaqueamento de biofilmes polimicrobianos de 6 horas sobre os materiais testados. A análise de fase mostrou que o desgaste com brocas diamantadas e o envelhecimento provocaram a transformação de fase da zircônia (t→m), com consequente aumento do conteúdo monoclinico. O desgaste com brocas diamantadas aumentou a rugosidade da zircônia. Já o envelhecimento causou diminuição desse parâmetro nos grupos submetidos ao desgaste, e não causou nenhuma alteração no grupo submetido apenas ao envelhecimento. As imagens fotomicrográficas mostraram que o desgaste com brocas provocou alterações na superfície, enquanto que o envelhecimento não modificou o padrão micromorfológico para nenhum dos grupos. O envelhecimento também reduziu o ângulo de contato da zircônia com a água, tornando-a mais hidrofílica. Por fim, o teste de contagem de colônias viáveis mostrou que nem o

desgaste com brocas nem o envelhecimento alteraram a adesão bacteriana sobre as superfícies testadas.

A formação de tecido mucoso ao redor dos *abutments* é fundamental para o sucesso do tratamento com implantes dentários. Assim, Fischer et al.⁶¹, em 2017, realizaram um estudo com o objetivo de avaliar o efeito do polimento da zircônia fabricada por computador (CAD / CAM) sobre respostas celulares importantes para a vedação tecidual. A zircônia CAD / CAM foi dividida em quatro grupos de acordo com o tipo de sistema para o polimento: controle (polidos com lixas de granulação 320), “acabamento grosseiro”, “acabamento e polimento médio” e “acabamento e polimento fino”. As superfícies foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia de força atômica (MFA) e perfilometria óptica (PO). Subsequentemente, os fibroblastos gengivais humanos (FGHs) foram semeados nas superfícies das amostras de zircônia. A proliferação foi medida através de análise quantitativa em MEV e pela quantidade de quinase por meio do teste ELISA. Os resultados mostraram um aumento na proliferação em todas as superfícies tratadas em comparação com o controle. Estes resultados sugerem a importância dos efeitos da metodologia de polimento do *abutment*, pois isso pode ter um impacto na formação do tecido mucoso.

Variáveis como o tipo de conexão protética e o nível de junção do pilar em relação à crista óssea podem influenciar a adesão dos tecidos duros e moles aos componentes protéticos. Devido à falta de dados relacionados a pilares de zircônia híbrida, Harlos et al.⁶² (2017) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar o selamento bacteriano in vitro na interface desse tipo de *abutment* e uma conexão do tipo Morse. Para a realização do estudo, os implantes e seus respectivos pilares foram divididos em 3 grupos: teste (10 conjuntos), controle positivo (3 conjuntos) e controle negativo (3 conjuntos). No grupo teste, 10 implantes foram contaminados com *Escherichia coli* e foi aplicado um torque ao pilar. Os controles positivos foram contaminados, mas nenhum torque foi aplicado ao pilar. O controle negativo consistiu de conjuntos não contaminados. Todos os espécimes foram imersos em tubos de ensaio contendo meio BHI para avaliação do crescimento microbiológico. Os resultados não mostraram diferença entre os grupos teste e controle negativo, concluindo-se que *abutments* de zircônia híbrida podem criar uma vedação satisfatória na interface do implante mesmo com torque de instalação.

O objetivo do estudo realizado por Huacho et al.⁶³, em 2017, foi avaliar as propriedades de rugosidade, energia livre de superfície e molhamento, bem como

propriedades antimicrobianas de adesão e biocompatibilidade de *abutment* revestidos por “diamond-like carbon” (DLC), um carbono com características físico-químicas próximas às do diamante. Avaliaram-se as propriedades antimicrobianas e de adesão de *Escherichia coli* e citotoxicidade com queratinócitos humanos (HaCaT). Além disso, também foi avaliada a capacidade de superfícies revestidas com DLC em impedir a migração de *E. coli* para a interface de implante hexagonal externo. Os resultados do estudo demonstram que as superfícies tratadas com DLC apresentaram discretas reduções na viabilidade celular ($p < 0,05$), enquanto os testes de energia de superfície, rugosidade, adesão bacteriana, propriedade antimicrobiana e infiltração bacteriana não mostraram diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$). Concluiu-se que o revestimento DLC parece ser um material biocompatível, com citotoxicidade leve, e que não influenciou nas propriedades físicas e biológicas avaliadas.

Mehl et al.⁶⁴, em 2017, realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a adesão de fibroblastos gengivais em três diferentes materiais utilizados como *abutments* após cinco diferentes procedimentos de limpeza. Para a realização do estudo, discos de dissilicato de lítio (LS), dióxido de zircônio (ZrO_2) e liga de titânio (Ti) foram fabricados, divididos em grupos e submetidos a um dos seguintes processos de limpeza: vapor (S), plasma de argônio (AP), ultrassom e desinfecção (UD), ultrassom e esterilização em autoclave (UA) ou fotofuncionalização com luz ultravioleta de alta intensidade (PF). A força de desprendimento celular (adesão) foi medida por espectroscopia de força celular única. Os resultados mostraram diferenças significativas na adesão celular nos diferentes materiais em função do método de limpeza ($P \leq 0,0001$). Para pilares de LS, não foram encontradas diferenças significativas entre os métodos de limpeza ($P > 0,05$). Para os espécimes de ZrO_2 , o método AP apresentou as maiores forças de desprendimento celular. Para os pilares de Ti, a UD apresentou as maiores forças de desprendimento celular.

Para o sucesso em longo prazo do tratamento com implantes, é necessária a formação de uma barreira tecidual capaz de proteger as estruturas biológicas peri-implantares da penetração de microrganismos. Diante disso, Rigolin et al.⁶⁵, em 2017, realizaram um estudo objetivando avaliar, *in vitro*, a influência das características físico-químicas de duas superfícies de *abutments* de implantes sobre a adesão de células epiteliais gengivais (OBA-9). Para este fim, foram utilizados espécimes em forma de disco de titânio (Ti) e zircônia (ZrO_2), imitando as superfícies dos componentes do pilar, enquanto discos de esmalte bovino (EB) e de vidro (GCS)

serviram como controles positivos e negativos, respectivamente. A rugosidade e a energia livre de superfície (ELS) de todos os materiais foram avaliadas previamente à adesão celular. Em sequência, o efeito de cada material na viabilidade (teste MTT) e morfologia (microscopia eletrônica de varredura) das células foi analisado após 1 e 24 horas. Os resultados de viabilidade celular mostraram que a rugosidade e a ELS não tiveram efeito sobre os dados de viabilidade celular ou sobre sua interação, independente de uma análise pós-contato de 1 ou 24 horas. No entanto, a avaliação microscópica mostrou que a fixação e o espalhamento das células aumentaram após 24 horas em Ti e ZrO₂ em relação ao EB, correspondendo aos maiores valores de ELS e rugosidade. Os autores concluíram que a ELS parece ser uma propriedade importante que interfere na qualidade do tecido mole ao redor dos implantes dentários.

A cerâmica tornou-se um material alternativo para a reabilitação protética devido à sua estética e resistência em longo prazo. Por isso, Dal Piva et al.⁶⁶ (2018) realizaram um estudo para avaliar a morfologia, formação de biofilme e viabilidade de fibroblastos gengivais humanos em contato com duas cerâmicas monolíticas após duas diferentes técnicas de acabamento: polimento ou glazeamento. Para isso, foram confeccionados 92 blocos de cada cerâmica, utilizando-se zircônia de alta translucidez parcialmente estabilizada por ítrio (YZHT) e silicato de lítio reforçado por zircônio (ZLS). Os blocos foram sinterizados e depois divididos de acordo com o acabamento de superfície: glazeamento (g) ou polimento (p). A rugosidade superficial (Ra e RSm) foi avaliada através de um rugosímetro de contato e perfilometria. Espécimes foram contaminados com *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* e *Candida albicans* por 16 horas. O biofilme foi quantificado pela contagem das unidades formadoras de colônia (UFC / mL) e analisado por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A viabilidade dos fibroblastos foi avaliada pelo ensaio MTT. Energia livre de superfície (ELS) também foi determinada. Os resultados mostraram que YZHT apresentou maior ELS que o ZLS. A perfilometria evidenciou maior homogeneidade nas superfícies polidas. A interação entre técnica de acabamento e microrganismos influenciou o número de UFC / mL. O ensaio MTT demonstrou comportamento citotóxico inicial para superfícies polidas. Imagens de MEV mostraram superfícies homogêneas, exceto para YZHT glazeado. Os autores observaram que as superfícies glazeadas apresentaram maior rugosidade, com tendência a acumular mais biofilme. Superfícies polidas apresentaram maior ELS; no entanto, foram temporariamente citotóxicas.

A adesão de microrganismos em substratos orais é a primeira e fundamental etapa na formação de biofilme patogênico. Em geral, as células de levedura têm notável potencial para aderir a superfícies do hospedeiro, como dentes ou mucosa, e a superfícies artificiais não biológicas, como materiais dentários. Dessa forma, Gökmenoglu et al.⁶⁷, em 2018, realizaram um estudo com o objetivo de comparar a suscetibilidade de *Candida albicans* em se aderir a diferentes partes do sistema de implantes dentários (implante de nível tecidual, implante de nível ósseo, pilar protético (*abutment*), cicatrizador, parafuso de cobertura e implante de superfície usinada). Os materiais ficaram em contato com a suspensão de *C. albicans* e a capacidade de formação de biofilme foi avaliada pelo teste XTT e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados mostraram que houve formação de uma fina camada de biofilme de *C. albicans* sobre a superfície de todos os materiais examinados. No entanto, ao examinar as imagens em MEV, o crescimento celular foi significativamente menor nas superfícies do implante em nível da gengiva, no *abutment* e na superfície usinada. Os autores concluíram que o tratamento nas superfícies dos implantes poderia ser uma opção para pacientes propensos à candidose bucal, pacientes imunossuprimidos e pacientes com tumor que estão sendo tratados com quimioterapia ou radiação.

O mecanismo de adesão e a arquitetura celular ao redor dos implantes e *abutments* são diferentes daqueles em torno dos dentes naturais, sendo encontrada nos biomateriais uma fixação precária com formação de lâmina basal deficiente. A fixação epitelial deficiente pode levar a invasão e colonização microbiana, causando inflamação dos tecidos moles e reabsorção óssea alveolar em um processo conhecido como peri-implantite. Assim, Kihara et al.⁶⁸ (2018) desenvolveram um novo peptídeo sintético (A10) para aumentar a ligação epitelial. A10 foi identificado a partir de um peptídeo bacteriano sintetizado. A10 e peptídeo ativador do receptor 4 ativado por protease (PAR4-AP, controle positivo) foram colocados sobre titânio comercialmente puro. O titânio tratado com peptídeo A10 apresentou alta capacidade de migração e adesão de células epiteliais. Não houve diferença significativa na liberação de citocinas inflamatórias entre o grupo tratado com A10 e o grupo não tratado. Esses resultados indicaram que o peptídeo A10 poderia induzir a adesão e migração de células epiteliais com baixa liberação de citocinas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais Testados

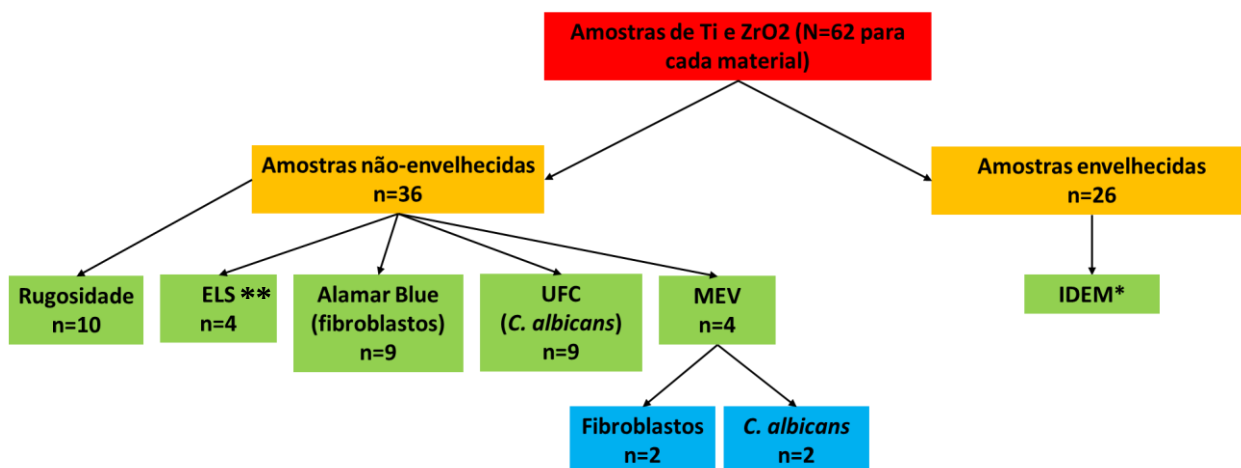
Sessenta e dois (N=62) discos de zircônia (ZrO_2) do tipo Y-TZP (yttrium-stabilized tetragonal zirconia polycrystalline) (Conexão Sistemas de Próteses Ltda., SP, Brasil) e de titânio comercialmente puro (Ti) (Conexão Sistemas de Próteses Ltda., SP, Brasil) foram confeccionados nas dimensões de 8 mm de diâmetro por 2 mm de espessura, com uma área total de aproximadamente 151 mm^2 ⁶⁹. A ZrO_2 foi usinada previamente à sinterização e não houve polimento após esse processo. Para padronização das amostras, somente discos com rugosidade superficial média (Ra) com valores entre $0,09 \mu\text{m}$ e $0,2 \mu\text{m}$ foram utilizados no estudo, uma vez que para os *abutments*, um valor de $0,2 \mu\text{m}$ tem sido aceito como o limiar de rugosidade média necessária para manter o selamento entre as células e a superfície e, consequentemente, a estabilidade do tecido mole⁷⁰.

4.2 Grupos Experimentais

Os grupos experimentais testados foram (n=36): zircônia não envelhecida (ZNE), zircônia envelhecida (ZE), titânio não envelhecido (TNE) e titânio envelhecido (TE). Como grupo controle (CT) para os testes biológicos, foram usados discos de poliestireno recortados do fundo de placas de cultivo de 24 poços, sendo que esse grupo não foi submetido ao processo de envelhecimento em autoclave. Os testes para análise das propriedades superficiais (rugosidade, energia livre e molhabilidade) e biológicas (adesão, morfologia e metabolismo de fibroblastos orais e capacidade de formação de biofilme de *Candida albicans*) descritos a seguir foram realizados nas amostras de Ti e ZrO_2 , antes e após o processo de envelhecimento.

4.3 Delineamento do Estudo

As amostras de Ti e ZrO_2 (N=62), após serem divididas nos dois grupos experimentais (com ou sem processo de envelhecimento), foram submetidas aos diferentes testes de acordo com o diagrama a seguir:



*O teste de rugosidade utilizou amostras pareadas, enquanto os demais testes utilizaram amostras independentes.

**Os dados obtidos no teste de energia livre de superfície (ELS) também foram utilizados para determinar a molhabilidade dos materiais pela água.

4.4 Limpeza dos Corpos de Prova

Para remover qualquer material orgânico aderido à superfície da zircônia e do titânio, foi realizada a limpeza dos discos de acordo com o seguinte protocolo: 1) Imersão dos corpos de prova por 20 minutos em acetona; 2) Imersão em tubos de ensaio contendo água destilada em ultrassom (Limp Sonic LS-0,8D, Embrasol Tec, Itanhaém, SP, Brasil) por 20 minutos; 3) Lavagem abundante com água destilada⁷¹.

4.5 Envelhecimento dos Corpos de Prova

Os discos de Ti e ZrO₂ foram submetidos a um envelhecimento acelerado em autoclave (Phoenix Luferco AB-25, Phoenix Ltda., Araraquara, SP, Brasil) a temperatura de 134°C com pressão de 2 bar (ISO 13356:2008)⁷² por 20 horas^{60,73,74}, a fim de induzir uma transformação expressiva da fase tetragonal em fase monoclinica (t→m) na superfície da zircônia. No envelhecimento realizado em autoclave, o efeito da pressão de vapor de água, a temperatura e o tempo decorrido representam uma base para estimar as taxas de degradação do material, e, portanto, sua vida útil⁷⁴⁻⁷⁶. Além disso, esse tempo de envelhecimento foi escolhido porque Pereira et al.⁷⁴ observaram que 20 horas é tempo suficiente para promover uma transformação de fase da zircônia acima de 50%, induzindo sua degradação hidrotérmica. Tem sido relatado na literatura que uma hora nessas condições equivale a aproximadamente três anos de envelhecimento in vivo^{73,76}.

4.6 Coleta de Saliva para Formação de Película Salivar

Após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da Faculdade de Odontologia de Araraquara (CAAE 68576317.0.0000.5416, Anexo A), foi coletada saliva de dois voluntários saudáveis, que receberam um termo de consentimento livre e esclarecido. A coleta foi realizada na mesma hora do dia, no período da manhã, ao longo de 30 minutos, após a higienização bucal, estando os voluntários em jejum. Os critérios de exclusão foram: pacientes com doenças sistêmicas; presença de cárie ativa e/ou doença periodontal; e uso de antibiótico nos últimos três meses. A saliva coletada foi colocada em tubos de Falcon e misturada na proporção 1:1 com uma solução tampão (50 mM KCl; 1 mM KPO_4 ; 1 mM CaCl; 1 mM MgCl_2). Em seguida, foi adicionada uma solução de PMSF (flúor fenilmetilsulfonil) 0,1 mM na proporção de 1:1000. A saliva foi levada para centrifugação (5500 g, 4 °C, 10 min) e o sobrenadante foi esterilizado por filtração com membrana de 0,22 μm (Corning, Corning, NY, EUA). Alíquotas foram armazenadas a -80°C até a utilização. A película salivar foi formada sobre as amostras de Ti e ZrO_2 para a medida da energia livre de superfície e molhabilidade pela água e para a realização dos testes biológicos.

4.7 Propriedades Físicas

4.7.1 Rugosidade superficial média (Ra)

A análise quantitativa da rugosidade superficial foi realizada com auxílio de um rugosímetro portátil^{20,77} (Mitutoyo surftest SJ-400, Mitutoyo Corporation, Kawasaki, Kanagawa, Japão) com precisão de leitura de 0,01 μm , comprimento de leitura de 2,5 mm, velocidade da ponta ativa de 0,5 mm/s e raio da ponta ativa de 5 μm . Foi utilizado o parâmetro Ra (rugosidade média), que corresponde à média aritmética dos valores absolutos das ordenadas de afastamento (picos e vales) em relação à linha média dentro do percurso de medição. Com o objetivo de padronizar as mensurações da rugosidade superficial das amostras, foi desenvolvido um dispositivo em resina acrílica com duas ranhuras paralelas entre si, e uma central definindo o norte dos discos. Este dispositivo foi colocado no rugosímetro, de forma que a ranhura central permaneceu sempre no mesmo sentido. Os corpos de prova de Ti e ZrO_2 foram posicionados no orifício do dispositivo, a ponta do rugosímetro foi posicionada paralelamente à primeira marcação e a primeira leitura foi realizada. Em seguida, outra leitura foi realizada na segunda marcação, e foi obtida a média entre

as duas leituras⁵⁹. Para avaliação do efeito do processo de envelhecimento, dez corpos de prova (n=10) de cada material tiveram sua rugosidade medida após os ciclos de envelhecimento em autoclave como descrito acima, lembrando que os mesmos corpos de prova tiveram sua rugosidade mensurada antes do processo de envelhecimento para a padronização das amostras (amostras pareadas).

4.7.2 Energia livre de superfície (ELS)

Os corpos de prova (n=4) foram colocados, individualmente, em orifícios de uma placa de 24 poços. Sobre cada amostra, 500 µL de saliva filtrada foram acrescentados e a placa foi incubada em estufa a 37°C, durante 60 minutos, para formação de película salivar. As amostras foram retiradas e transferidas para outra placa onde foram mantidas *overnight* a temperatura ambiente para secagem completa. A energia livre de superfície (ELS) foi obtida a partir da medição em goniômetro^{20,47,77} (ramé-hart 200 Standard Contact Angle Goniometer, ramé-hart instrument co., Succasunna, NJ, EUA) dos ângulos de contato estáticos (método da gota séssil) de líquidos contendo polaridades diferentes: água destilada com polaridade de 52,5 e diiodometano com 2,6. Cada corpo de prova de cada material foi posicionado em uma mesa entre a câmera e a lente. Todas as gotas dispensadas possuíam aproximadamente o mesmo volume (0,002 mL), padronizado manualmente de acordo com marcações no êmbolo da seringa. Um intervalo de 10 segundos foi estabelecido como tempo de acomodação da gota, para estabilização e interação do líquido com a superfície. Os ângulos de contato, formados entre a superfície de cada material e a gota correspondente a cada líquido foram calculados utilizando a equação de Laplace-Young⁷⁸.

Foram obtidos três valores de ângulos de contato para cada líquido em todas as amostras, medidos em diferentes ocasiões, sendo que os protocolos de limpeza e formação de película salivar foram repetidos antes de cada medição. Foi calculada a média dos valores de cada líquido sobre cada corpo de prova, e esses valores médios foram usados para o cálculo da energia livre de superfície. Esse cálculo foi realizado através de um software específico (DROPImage Advanced, ramé-hart instrument co., Succasunna, NJ, EUA), utilizando o conceito de componentes polares e dispersivos através do método da média geométrica de acordo com Owens e Wendt⁷⁹.

4.7.3 Molhabilidade

A partir dos valores de ângulos de contato com a água, obtidos para determinação da energia livre de superfície, foi avaliado o caráter hidrofílico ou hidrofóbico da zircônia e do titânio, submetidos ou não ao processo de envelhecimento. Quanto menor o ângulo de contato com a água, maior a molhabilidade da superfície e maior o seu caráter hidrofílico.

Os corpos de prova (n=4) foram os mesmos utilizados no teste de energia livre de superfície e, portanto, passaram pelos procedimentos descritos acima.

4.8 Propriedades Biológicas

4.8.1 Esterilização dos corpos de prova

Para a realização dos testes biológicos, as amostras de Ti e ZrO₂ não envelhecidas foram esterilizadas por radiação gama. Os corpos de prova submetidos ao envelhecimento tiveram sua esterilização dada pelo próprio processo de autoclavagem.

4.8.2 Metabolismo de fibroblastos gengivais cultivados sobre as amostras de Ti e ZrO₂

Fibroblastos da gengiva humana (FGH)⁴⁹ armazenados em estoque foram propagados em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) de baixa glicose (1 g/L) com 10% de soro fetal bovino, adicionado de glutamina (1%) e antibiótico (1%). O cultivo das células foi realizado em frascos para cultura de células com tampa contendo um filtro que permite a passagem de CO₂. Esses frascos foram incubados em estufa (Thermo Scientific Forma Series II Water-Jacket CO₂ Incubator, Thermo Fisher Scientific Instruments Co. Ltd., Shanghai, China) com 5% de CO₂, à temperatura de 37°C e ambiente com umidade controlada. Para realização dos testes, uma suspensão de aproximadamente $4,0 \times 10^5$ células/mL em meio de cultura foi preparada. Para isso, as células foram descoladas do fundo dos frascos com tripsina. Em seguida, essa suspensão foi colocada em um tubo de 15 mL e levada para uma centrífuga autobalanceável (Centribio 80-2B) por 5 minutos a 1500 rpm, com o objetivo de precipitar as células no fundo do tubo. Posteriormente, dentro da capela de fluxo laminar, o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 2 mL do mesmo meio de cultura. Uma alíquota de 100 µL foi retirada e adicionada a 100 µL de corante azul de Tripán. Dessa solução, 10 µL

foram removidos e introduzidos em câmara hemocitométrica tipo Neubauer onde, então, as células viáveis foram contadas com a utilização de um microscópio óptico com aumento de 40x. Em seguida, a suspensão foi ajustada a uma concentração de aproximadamente $4,0 \times 10^5$ células/mL de meio de cultura.

O metabolismo celular foi verificado por meio do teste Alamar Blue (AlamarBlue Cell Viability Reagent, Thermo Fisher Scientific, Life Technologies Corporation, Eugene, OR, EUA). Para isso, os corpos de prova foram colocados, individualmente, em orifícios de uma placa de 24 poços. Sobre cada amostra, 500 µL da saliva filtrada foram acrescentados e a placa foi incubada em estufa a 37°C, durante 60 minutos, para formação de película salivar. Os discos foram transferidos para uma nova placa com 500 µL do mesmo meio de cultura citado anteriormente. Em seguida, $3,0 \times 10^4$ células foram plaqueadas sobre cada amostra de Ti e ZrO₂ (n=3) e a placa foi incubada em estufa com 5% de CO₂, a 37°C por 24 horas. Posteriormente, para cada orifício da placa, foram colocados 30 µL de Alamar Blue diluídos em 270 µL de meio de cultura (10% do volume total). A placa foi, então, incubada por mais 24 horas. A fluorescência das células sobre as amostras, indicando a quantidade de metabolismo celular, foi medida após o período de 48 horas de crescimento celular com auxílio de um fluorômetro (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Fisher Scientific Instruments Co. Ltd., Shanghai, China) a 544 nm (comprimento de onda de excitação) e 590 nm (comprimento de onda de emissão). Os valores de fluorescência para os grupos de zircônia e titânio foram calculados na forma de porcentagens em relação ao grupo controle (poliestireno). O ensaio de Alamar Blue foi realizado em três ocasiões distintas, perfazendo um total de 9 amostras (n=9) para cada material, antes e após o envelhecimento.

4.8.3 Formação de biofilme de *Candida albicans* sobre as amostras de Ti e ZrO₂

Para realização dos procedimentos foi feita a reativação de uma cepa padrão de *Candida albicans* (ATCC 90028). A reativação dos microrganismos foi feita por meio da técnica de semeadura direta em placas com meio de cultura Agar Sabouraud Dextrose (ASD). As placas foram incubadas em estufa (Nova Etica 410-6ND, Ethik Technology, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil) por 48 horas à 37°C para formação de colônias. Cinco colônias foram dissolvidas em 10 mL de meio de cultura YNB (Yeast Nitrogen Base) para obtenção do pré-inóculo, que foi incubado em estufa a 37°C por 16 horas. Após esse período, uma alíquota do pré-inóculo foi

diluída em meio YNB na razão de 1:20 para obtenção do inóculo. A densidade óptica da solução foi medida em espectrofotômetro (Biospectro SP-220), com filtro de 540 nm, e o inóculo foi incubado por mais 8 horas em estufa a 37°C. Nova leitura em espectrofotômetro foi realizada para averiguar se houve crescimento dos micro-organismos até a fase de mid-log⁸⁰. Confirmado o crescimento dos micro-organismos, o tubo foi levado à centrifuga por 5 minutos para formação de *pellet*. Em seguida, o *pellet* foi lavado com solução tampão PBS (phosphate-buffered saline) por duas vezes. Os microrganismos foram ressuspensos em meio RPMI-1640 tamponado com MOPS (pH 7,0). Posteriormente, a densidade óptica da suspensão foi medida e normalizada para uma concentração de 1×10^6 células/mL⁸¹.

Em seguida, foi realizada a formação de um biofilme de 48 horas de *Candida albicans* sobre os discos. Para isso, amostras de Ti e ZrO₂ foram colocadas, individualmente, em orifícios de uma placa de 24 poços. Sobre cada amostra, 500 µL de saliva filtrada foram acrescentados e a placa foi incubada em estufa a 37°C, durante 60 minutos, para formação de película salivar. Os discos foram transferidos para uma nova placa contendo 750 µL do meio de cultura RPMI-1640 tamponado com MOPS (pH 7,0) e foram adicionados 750 µL do mesmo meio contendo células fúngicas na concentração de 1×10^6 células/mL em cada poço. A placa foi levada para incubação (Quimis Q3151A, Quimis Aparelhos Científicos, São Roque, SP, Brasil) sob agitação orbital (75 rpm) a 37°C, durante 90 minutos para adesão inicial dos microrganismos. Posteriormente, as células não aderidas foram removidas das amostras por lavagem com tampão PBS estéril, por duas vezes, e 1500 µL do mesmo meio de cultura foram colocados em cada poço da placa para formação do biofilme. A placa foi levada para incubação durante 24 horas a 37 °C sob agitação orbital (75 rpm). Após esse período, 750 µL de meio foram retirados dos poços e o mesmo volume foi adicionado. A placa foi, então, incubada novamente durante mais 24 horas, totalizando 48 horas de formação de um biofilme maduro. Após esse tempo, os discos foram lavados para remoção das células não aderentes através da transferência cuidadosa dos mesmos para uma placa contendo solução tampão PBS estéril.

Para a quantificação dos microrganismos, os corpos de prova com os biofilmes foram transferidos para tubos Falcon contendo 4,5 mL de solução tampão PBS e agitados durante 1 minuto em vórtex para o desprendimento dos biofilmes⁴⁵. Em seguida, o processo de diluição seriada foi realizado em tubos Eppendorf

contendo 900 µL de solução tampão PBS por meio da transferência de alíquotas de 100 µL da solução original. As diluições de 10^{-1} a 10^{-4} foram obtidas. Duas alíquotas de 10 µL das diluições de 10^{-2} até 10^{-4} foram gotejadas em placas de Petri contendo Ágar Sabouraud Dextrose (SDA). A seguir, todas as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Após esse período, as placas foram posicionadas sobre um contador de colônias manual e o número de colônias foi determinado. Os valores de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) foram calculados de acordo com a seguinte fórmula: $\text{UFC/mL} = \text{número de colônias} \times 10^n / q$, onde “n” equivale ao valor absoluto da diluição escolhida (de 2 a 4) e “q” equivale à quantidade, em mL, semeada de cada diluição nas placas (10 µL = 0,01 mL). O teste de contagem de colônias viáveis descrito acima foi realizado em três ocasiões distintas, perfazendo um total de 9 amostras (n=9) para cada material, antes e após o envelhecimento.

4.9 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Foi realizada a avaliação da morfologia das células FGH e dos microrganismos aderidos aos espécimes por meio de MEV. As amostras (n=2) foram submetidas aos seguintes procedimentos:

1. Fixação em glutaraldeído 2,5% (grau analítico) por 24 horas a 4°C;
2. Lavagem (3x) com solução tampão PBS;
3. Desidratação em soluções crescentes de etanol: Álcool 70% (1 hora); Álcool 90% (1 hora); Álcool absoluto (5 lavagens de 30 minutos cada);
4. Dessecamento à vácuo por pelo menos uma semana;
5. Metalização das amostras com ouro e fixação nos stubs;
6. Análise da morfologia celular em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-6610LV, Tokyo, Japão).

4.10 Análise Estatística

Para avaliar se o envelhecimento afetou significativamente a rugosidade, a energia livre de superfície e a molhabilidade pela água, recorreu-se ao teste paramétrico T-test para amostras pareadas (rugosidade) ou para amostras independentes (energia livre de superfície e molhabilidade). Para o teste biológico de metabolismo dos fibroblastos FGH, a influência do processo de envelhecimento também foi avaliada através do T-test para amostras independentes. Com relação ao crescimento de microrganismos, a influência do envelhecimento foi avaliada

através do teste paramétrico de ANOVA one-way com correção de Welch, seguido do teste post-hoc de Games-Howell. Em um segundo momento, os mesmos testes estatísticos citados acima foram utilizados para avaliar a influência do tipo de material (zircônia ou titânio) sobre cada propriedade analisada. Os pressupostos da distribuição normal da variável dependente e da homocedasticidade das variâncias nos diferentes grupos foram avaliados pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Com relação às propriedades de rugosidade, energia livre de superfície, molhabilidade e metabolismo de fibroblastos FGH, obteve-se um $p > 0,05$ para todos os grupos quanto à normalidade e homocedasticidade. Com relação ao número de microrganismos, todos os grupos apresentaram um $p > 0,05$ na normalidade, no entanto, observou-se heterocedasticidade nos grupos, e correções de Welch e o teste Pós-hoc de Games-Howell foram utilizados. Utilizou-se um nível de significância de $\alpha = 0,05$ para todas as análises de inferência. As análises estatísticas descritivas, gráficas e inferenciais foram executadas com o software PAWS Statics (v. 19, SPSS Inc, Chicago, IL, EUA).

Além disso, análise qualitativa das células (fibroblastos FGH e *Candida albicans*), antes e após o envelhecimento, foi realizada por meio de imagens adquiridas por MEV.

5 RESULTADOS

5.1 Propriedades Físicas

5.1.1 Rugosidade superficial média (Ra)

A Tabela 1 mostra os resultados descritivos para o teste de Ra.

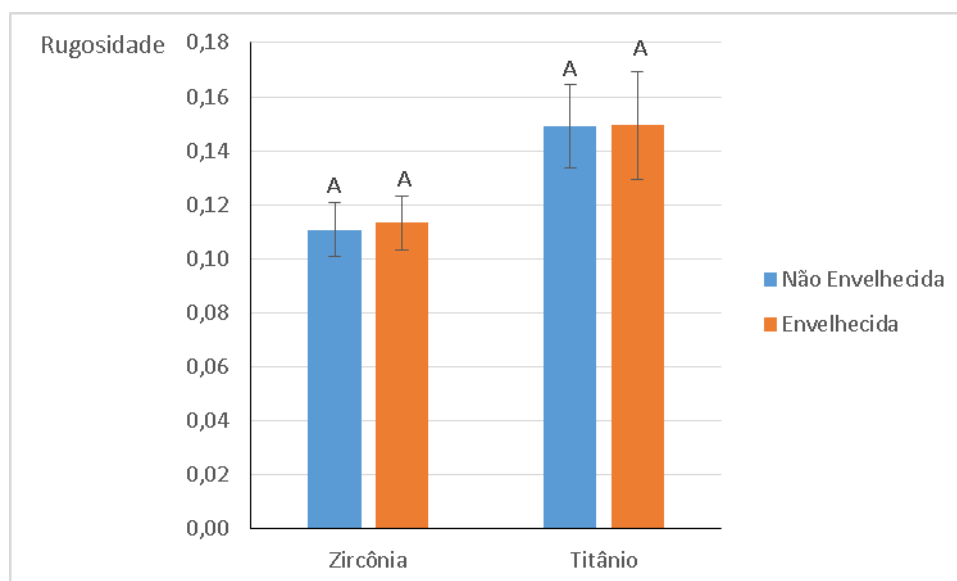
Tabela 1 - Média e desvio padrão para rugosidade média (Ra) de acordo com o tipo de material e envelhecimento

Teste	Tipo de Material	Não Envelhecido	Envelhecido
Rugosidade (μm)	ZrO ₂	0,111 $\pm$ 0,010	0,113 $\pm$ 0,010
	Ti	0,149 $\pm$ 0,015	0,149 $\pm$ 0,019

Fonte: Elaboração própria.

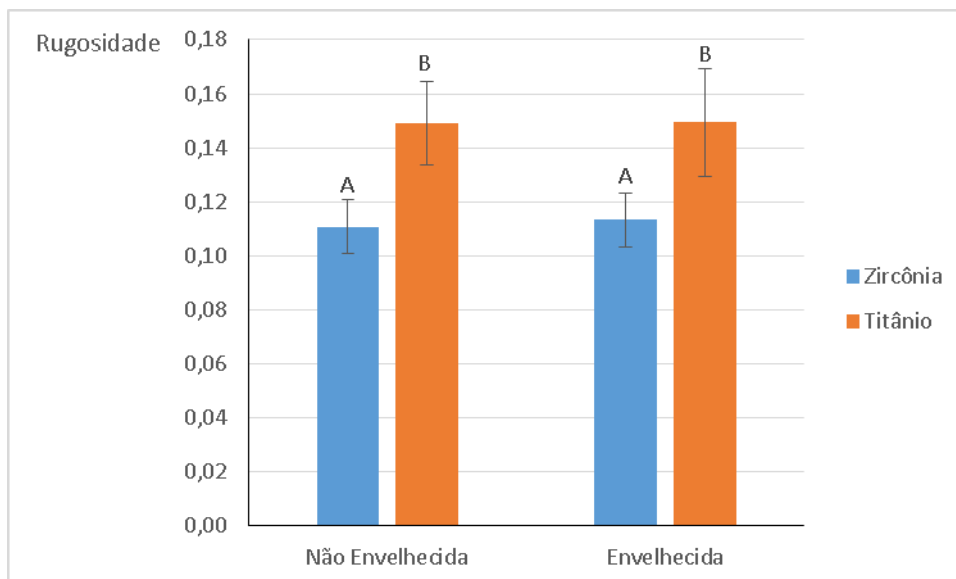
Após análise estatística dos dados de rugosidade é possível afirmar que o envelhecimento não teve efeito estatisticamente significativo para o mesmo tipo de material, zircônia ($p=0,344$) e titânio ($p=0,923$) (Gráfico 1). No entanto, quando os grupos foram comparados em relação ao tipo de material, a zircônia apresentou menor rugosidade em comparação com o titânio para ambas as condições, não envelhecida ($p<0,001$) e envelhecida ($p<0,001$) (Gráfico 2).

Gráfico 1 - Comparação de média e desvio padrão de rugosidade média (Ra), em μm , para o mesmo tipo de material, antes e após o envelhecimento



Fonte: Elaboração própria.

Gráfico 2 - Comparação de média e desvio padrão de rugosidade média (Ra), em μm , de acordo com o tipo de material utilizado



Fonte: Elaboração própria.

5.1.2 Energia livre de superfície (ELS)

A Tabela 2 mostra os resultados descritivos para o teste de ELS, com presença de película salivar sobre os discos.

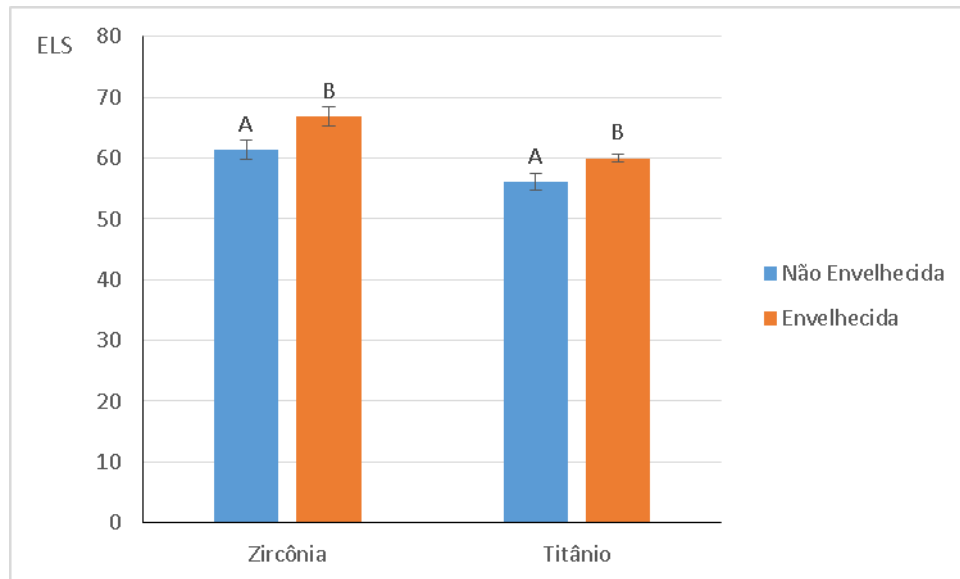
Tabela 2 - Média e desvio padrão para energia livre de superfície (ELS) de acordo com o tipo de material e envelhecimento

Teste	Tipo de Material	Não Envelhecido	Envelhecido
Energia livre de superfície (mN/m)	ZrO ₂	61,33 ± 1,53	66,90 ± 1,63
	Ti	56,14 ± 1,39	60,05 ± 0,54

Fonte: Elaboração própria.

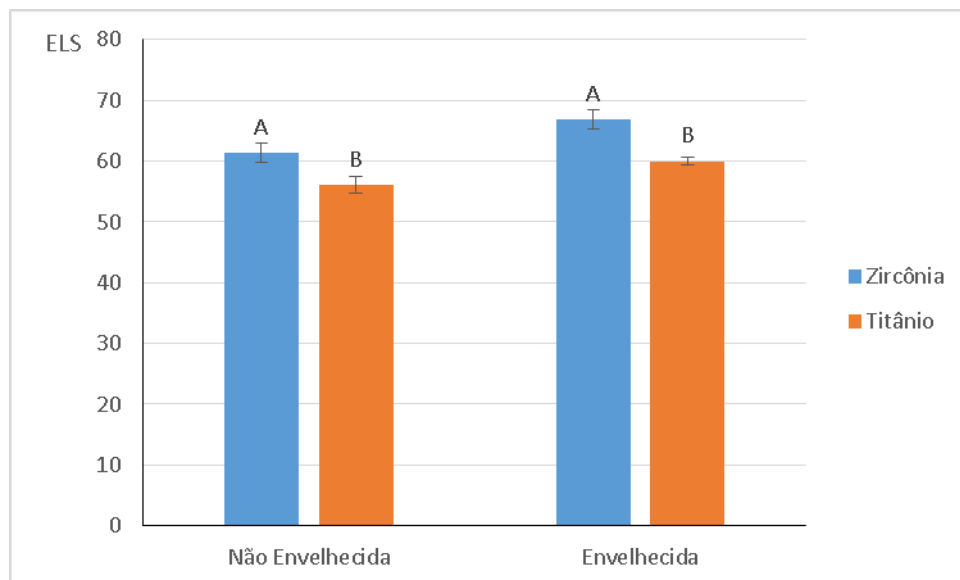
Como pode ser observado no Gráfico 3, elaborado após análise estatística, a energia livre de superfície foi maior após o processo de envelhecimento para ambos os materiais, zircônia ($p=0,003$) e titânio ($p=0,007$). Observou-se também uma diferença significativa quando os materiais foram comparados entre si, com maiores valores de energia livre para a zircônia, em ambas as condições, não envelhecida ($p=0,002$) e envelhecida ($p<0,001$) (Gráfico 4).

Gráfico 3 - Comparação de média e desvio padrão de energia livre de superfície (ELS), em mN/m, para o mesmo tipo de material, antes e após o envelhecimento



Fonte: Elaboração própria.

Gráfico 4 - Comparação de média e desvio padrão de energia livre de superfície (ELS), em mN/m, de acordo com o tipo de material utilizado



Fonte: Elaboração própria.

5.1.3 Molhabilidade

A Tabela 3 mostra os resultados descritivos para o teste de ângulo de contato com a água, com presença de película salivar sobre os discos.

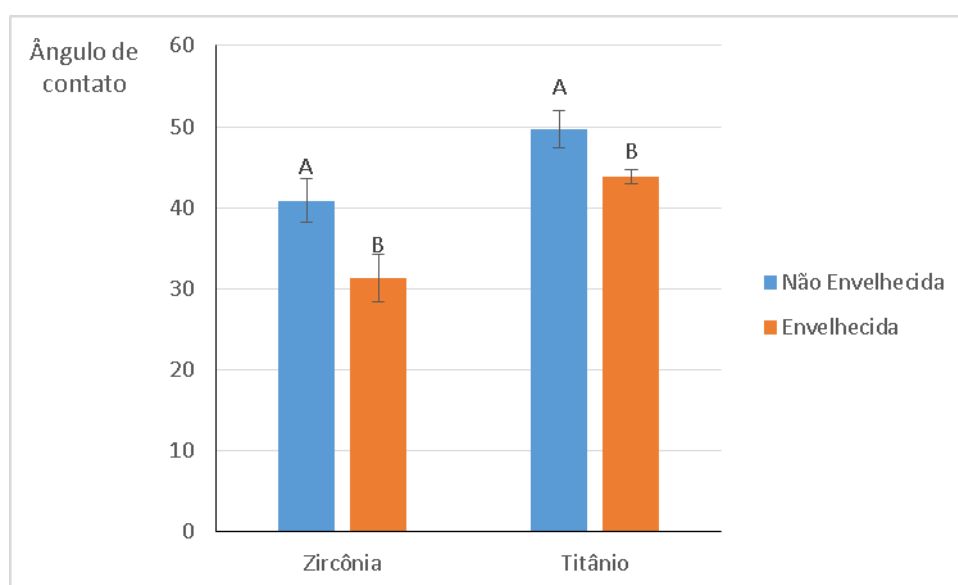
Tabela 3 - Média e desvio padrão para ângulo de contato com a água de acordo com o tipo de material e envelhecimento

Teste	Tipo de Material	Não Envelhecido	Envelhecido
Ângulo de contato com a água (°)	ZrO ₂	40,87 ± 2,64	31,28 ± 2,87
	Ti	49,70 ± 2,30	43,83 ± 0,92

Fonte: Elaboração própria.

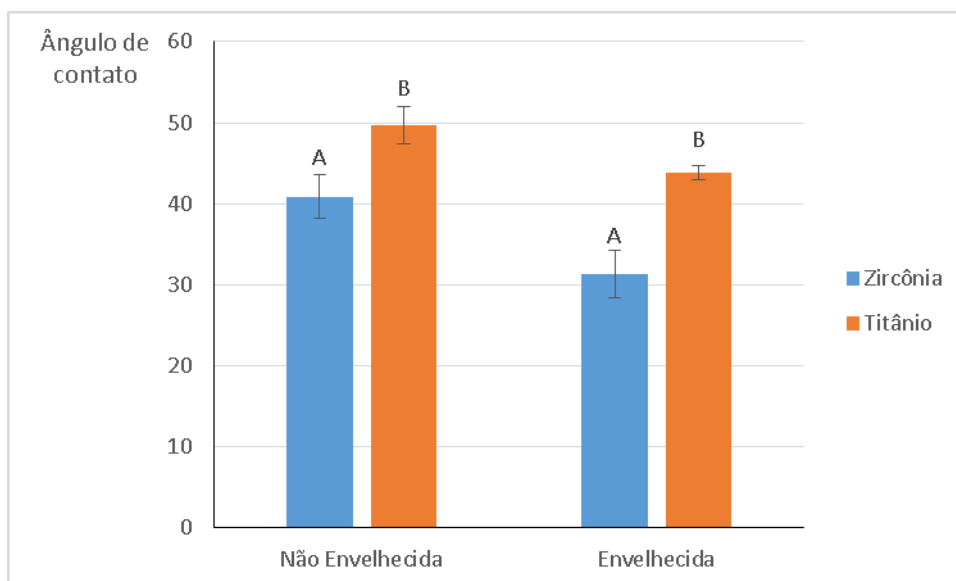
Segundo os resultados de ângulo de contato com a água, após a análise estatística, é possível afirmar que o envelhecimento aumentou o caráter hidrofílico (menores valores de ângulo de contato) de ambos os materiais, zircônia ($p=0,003$) e titânio ($p=0,009$) (Gráfico 5). Além disso, quando os materiais foram comparados entre si, a zircônia se mostrou mais hidrofílica que o titânio, para ambas as condições, não envelhecida ($p=0,002$) e envelhecida ($p<0,001$) (Gráfico 6).

Gráfico 5 - Comparação de média e desvio padrão do ângulo de contato com a água, em graus (°), para o mesmo tipo de material, antes e após o envelhecimento



Fonte: Elaboração própria.

Gráfico 6 - Comparação de média e desvio padrão do ângulo de contato com a água, em graus ($^{\circ}$), de acordo com o tipo de material utilizado



Fonte: Elaboração própria.

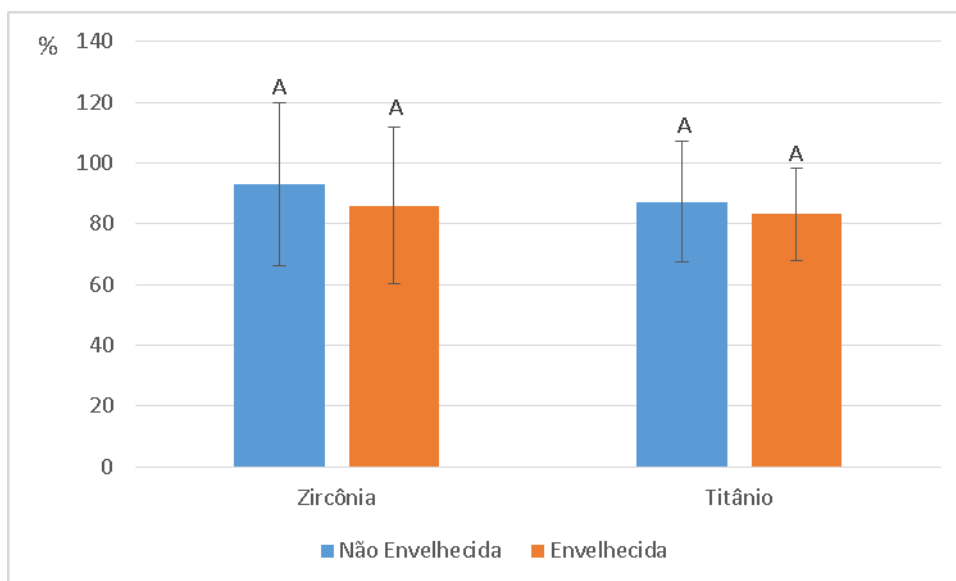
5.2 Propriedades Biológicas

5.2.1 Metabolismo de fibroblastos gengivais cultivados sobre as amostras de Ti e ZrO₂

Os valores de fluorescência, indicando o metabolismo celular dos fibroblastos FGH, foram calculados na forma de porcentagens em relação ao controle de poliestireno (100% de viabilidade). Após o período de 48 horas de crescimento das células sobre os discos, os valores médios foram de 92,94% ($\pm 26,72\%$) para o grupo zircônia não envelhecida (ZNE), 86,04% ($\pm 25,62\%$) para o grupo zircônia envelhecida (ZE), 87,20% ($\pm 19,91\%$) para o grupo titânio não envelhecido (TNE) e 83,19% ($\pm 15,30\%$) para o grupo titânio envelhecido (TE).

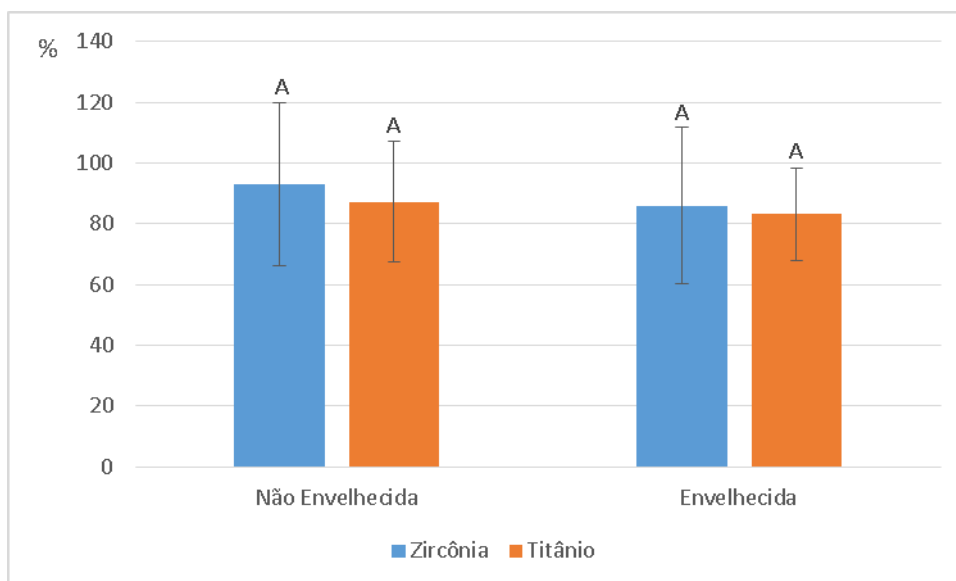
Os Gráficos 7 e 8 mostram os resultados do teste T-test para avaliação dos fatores de estudo. Segundo os resultados, é possível afirmar que o envelhecimento não teve um efeito estatisticamente significativo na fluorescência para os dois tipos de material, zircônia ($p=0,584$) e titânio ($p=0,638$) (Gráfico 7). Quando os materiais foram comparados entre si, também não se encontrou uma diferença significativa, tanto antes do envelhecimento ($p=0,613$), como após o envelhecimento ($p=0,778$) (Gráfico 8).

Gráfico 7 - Comparação de média e desvio padrão de fluorescência (% em relação ao controle) para o mesmo tipo de material, antes e após o envelhecimento



Fonte: Elaboração própria.

Gráfico 8 - Comparação de média e desvio padrão de fluorescência de acordo com o tipo de material



Fonte: Elaboração própria.

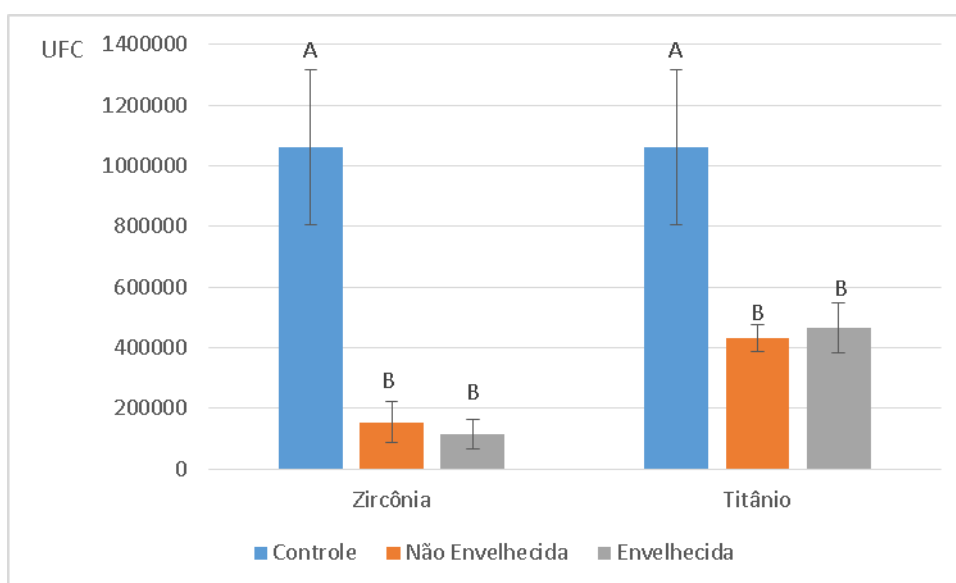
5.2.2 Formação de biofilme de *Candida albicans* sobre as amostras de Ti e ZrO₂

Os valores médios de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) de *Candida albicans* foram de $1,53 \times 10^5$ (± 66.708) para o grupo zircônia não envelhecida (ZNE), $1,14 \times 10^5$ (± 49.651) para o grupo zircônia envelhecida (ZE),

$4,31 \times 10^5$ (± 46.218) para o grupo titânio não envelhecido (TNE), $4,65 \times 10^5$ (± 84.092) para o grupo titânio envelhecido (TE) e $1,06 \times 10^6$ (± 254.678) para o grupo controle.

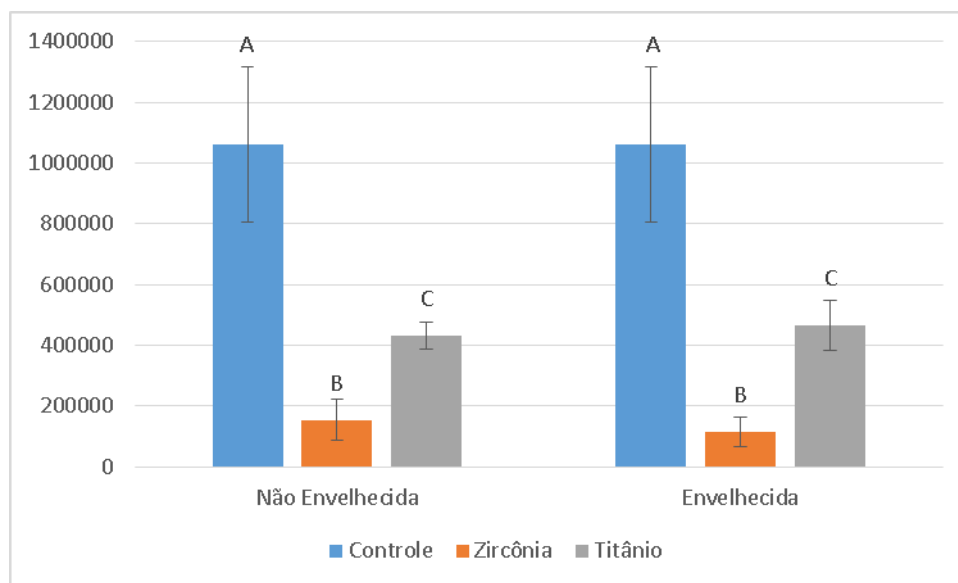
Segundo os resultados do teste de ANOVA one way, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,001$) tanto para o fator “envelhecimento” quanto para o fator “tipo de material”. De acordo com o teste Pós-hoc de Games-Howell, as diferenças estatisticamente significativas ocorrem entre o grupo controle (poliestireno) quando comparado aos demais grupos, para ambos os materiais. Entretanto, pode-se observar no Gráfico 9 que não houve diferença entre os grupos envelhecidos e não envelhecidos, tanto para a zircônia quanto para o titânio. Quando os materiais foram comparados entre si, o grupo controle apresentou os maiores valores de UFC/mL, seguido pelo titânio e pela zircônia, respectivamente (Gráfico 10).

Gráfico 9 - Comparação de média e desvio padrão de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) de acordo com o envelhecimento



Fonte: Elaboração própria.

Gráfico 10 - Comparação de média e desvio padrão de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) de acordo com o tipo de material utilizado



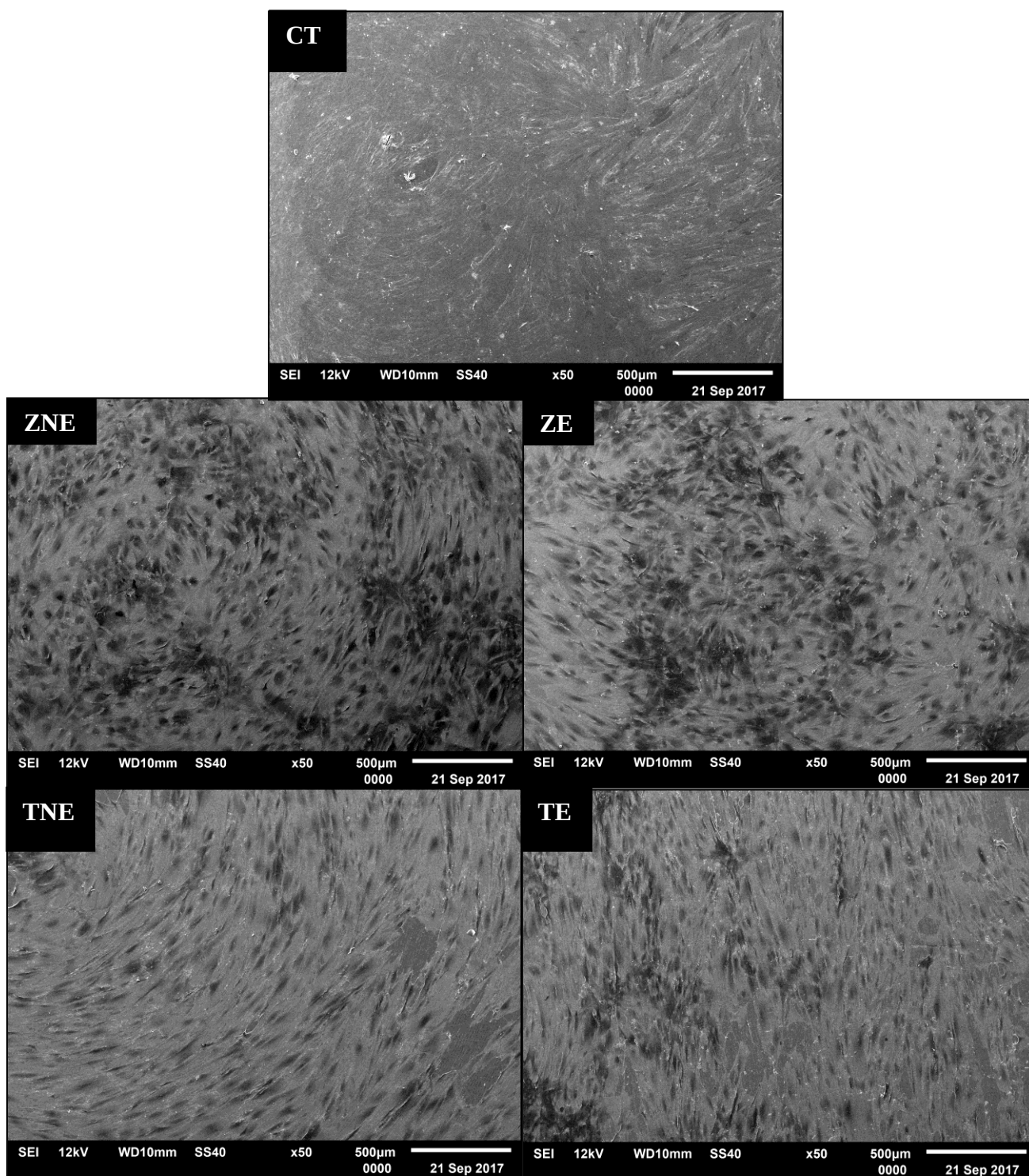
Fonte: Elaboração própria.

5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Figura 1 ilustra a morfologia das células FGH após 48 horas de adesão sobre os discos. Foi possível observar pelas imagens de MEV a morfologia em monocamada em todas as condições experimentais (ZNE, ZE, TNE, TE e CT – controle de poliestireno), independentemente do processo de envelhecimento. Entretanto, as células aderidas na superfície do titânio apresentaram disposição organizada em monocamada e morfologia fusiforme, fenótipo típico de fibroblastos, sendo mais nítida esta diferença no grupo TNE em relação ao controle. Já as células aderidas na superfície da zircônia apresentaram padrão de adesão mais desorganizado e morfologia menos fusiforme.

Após 48 horas de formação de biofilme de *Candida albicans*, foi possível observar pelas imagens de MEV uma formação coesa e robusta de biofilme no controle – CT (poliestireno), assim como nos discos de titânio independentemente do processo de envelhecimento (TNE e TE). Por outro lado, nos discos de zircônia houve pouca formação de biofilme em relação às outras variáveis, também de forma independente do processo de envelhecimento (ZNE e ZE) (Figura 2).

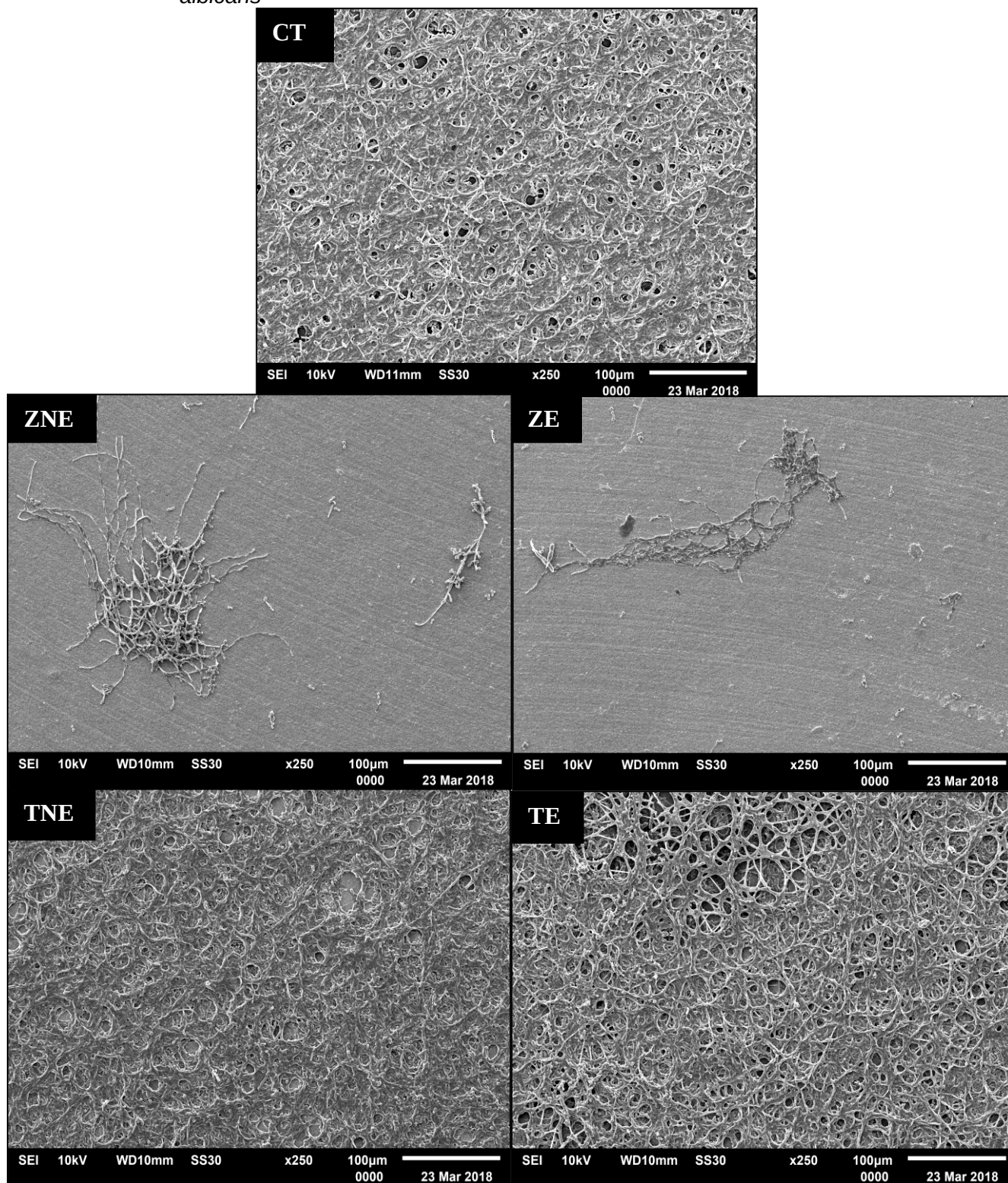
Figura 1 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de células FGH



Fibroblastos da gengiva humana (FGH) sobre os discos após 48 horas de crescimento. Aumento de 50x. CT-control (poliestireno); ZNE - zircônia não envelhecida; ZE - zircônia envelhecida; TNE - titânio não envelhecido; TE - titânio envelhecido.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 2 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de biofilmes de *Candida albicans*



Candida albicans sobre os discos após 48 horas de crescimento. Aumento de 250x. CT- controle (poliestireno); ZNE - zircônia não envelhecida; ZE - zircônia envelhecida; TNE - titânio não envelhecido; TE - titânio envelhecido.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

6 DISCUSSÃO

A adesão e a proliferação de células humanas e microbianas sobre biomateriais podem variar dependendo da topografia superficial^{55,59,65,82,83}. Na cavidade oral, essa topografia tende a sofrer modificações em função da umidade, acidez, temperatura e cargas mecânicas da mastigação³⁶, acarretando no envelhecimento natural dos materiais. As alterações nas propriedades físico-químicas ocorridas em função do envelhecimento dos materiais no meio bucal podem afetar a saúde local e sistêmica de usuários de próteses implanto-suportadas^{60,84}. Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar a influência do envelhecimento de materiais usados como pilares de próteses implanto-suportadas (zircônia e titânio) sobre suas propriedades físicas e biológicas. A hipótese nula foi parcialmente aceita, uma vez que o envelhecimento não alterou a rugosidade dos materiais, assim como o metabolismo, adesão e morfologia dos fibroblastos FGH e a formação de biofilme de *Candida albicans*. Entretanto, as propriedades físicas de energia livre de superfície e molhabilidade foram influenciadas pelo envelhecimento em autoclave.

Os resultados mostraram que o processo de envelhecimento não alterou a rugosidade da zircônia nem do titânio. Esses dados estão de acordo com outros estudos que, após avaliarem a influência de um protocolo de envelhecimento em autoclave idêntico ao realizado no presente estudo (134°C por 20 horas) sobre zircônia, observaram que não houve alteração nas medidas de rugosidade, nem mesmo no padrão micromorfológico do material^{60,85,86}.

Embora não tenha sido nosso foco comparar a quantidade de fases nos discos de ZrO_2 , é previsto um percentual elevado de fase monoclinica após o ciclo de autoclavagem^{87,88}. O processo de transformação de fases pode causar degradação da superfície do material, podendo acarretar no aumento da rugosidade superficial^{89,90}. Diante disso, pode-se considerar como uma limitação deste estudo a técnica usada para medir os valores dos picos e vales de ambos os materiais. Possivelmente, o rugosímetro não foi preciso o suficiente para o cálculo das irregularidades reais criadas após o envelhecimento em autoclave. Por outro lado, do ponto de vista clínico, esta técnica é claramente aceita pela comunidade científica, uma vez que qualquer diferença estatística não revelada certamente não afetaria o sistema biológico.

Em contraste com os valores de rugosidade, o processo de envelhecimento aumentou a energia livre e reduziu o ângulo de contato com a água para ambos os materiais, tornando a superfície mais hidrofílica. Possivelmente, semelhante à irradiação de luz^{83,91}, a temperatura e a pressão durante a autoclavagem podem ter afetado os estados de oxidação do Ti na camada de óxido e induzido a redução de Ti^{4+} (mais estável e menos polar) para Ti^{3+} ⁹². O resultado do aumento da concentração de Ti^{3+} é o aumento da hidrofiliidade superficial. O aumento na hidrofiliidade em superfícies de ZrO_2 também foi observado. Como mencionado anteriormente, as condições orais associadas à umidade e temperatura podem induzir a transformação de fase da ZrO_2 , podendo justificar os resultados^{58,74,88,93}. Dutra et al.⁶⁰ (2017) também verificaram que o envelhecimento em autoclave reduziu o ângulo de contato da zircônia com a água, tornando-a mais hidrofílica.

A literatura tem levado em consideração o efeito do tempo de envelhecimento sobre as propriedades físico-químicas do material, mas pouca informação foi encontrada a respeito do comportamento dessas propriedades em materiais de implantes submetidos ao envelhecimento no biofilme microbiano. De fato, rugosidade, molhabilidade e ELS parecem desempenhar um papel importante no processo de adesão microbiana sobre as superfícies dos materiais^{55,82}. De acordo com Colvin⁹⁴, as superfícies, quando hidrofóbicas, diminuem a quantidade de proteínas aderidas na superfície do material. Como as espécies de *C. albicans* revelam hidrofobicidade em hifas, o que causa maior adesão de *C. albicans* a substratos hidrofóbicos^{95,96}, era esperado uma diferença significativa na formação global de biofilme na superfície das amostras após o envelhecimento. Porém, embora o processo de envelhecimento tenha tornado os materiais mais hidrofílicos, com diminuição do ângulo de contato com a água, ele não alterou o número de colônias viáveis de *Candida albicans* sobre as diferentes superfícies, após o crescimento de biofilme de 48 horas. No estudo realizado por Dutra et al.⁶⁰, avaliando a influência do envelhecimento da zircônia sobre sua susceptibilidade à adesão bacteriana, o teste de contagem de colônias viáveis também mostrou não haver alteração nesse parâmetro após o envelhecimento. Entretanto, mesmo que nossos resultados não tenham mostrado diferenças entre os grupos em relação ao biofilme microbiano, a hipótese não representa um comportamento clínico, pois o experimento foi realizado utilizando apenas uma espécie de fungo patogênico.

Um achado interessante foi que os grupos de zircônia apresentaram menor quantidade de biofilme aderido em relação ao titânio, o que sugere uma maior resistência da zircônia à colonização por *Candida albicans*, estando de acordo com outros estudos. Al-Radha et al.⁴⁷ compararam diferentes superfícies em relação à adesão das espécies bacterianas *Streptococcus mitis* e *Prevotella nigrescens* através de microscopia de fluorescência. Após calcularem a porcentagem da área coberta por bactérias, os autores observaram que a zircônia apresentou menores valores em relação ao titânio. Em outro estudo⁴³, discos de titânio e de zircônia com rugosidades semelhantes foram colados em dispositivos acrílicos e permaneceram na boca de pacientes durante 24 horas. Após esse período, os discos foram avaliados por MEV e foi observado que a superfície coberta por bactérias sobre os discos de zircônia foi significativamente menor que sobre os discos de titânio. Degidi et al.⁴⁴, em um estudo de avaliação histológica de tecidos peri-implantares, encontraram menores níveis de inflamação ao redor da zircônia em comparação ao titânio. Segundo os autores, é provável que esse achado esteja associado a menores níveis bacterianos. Por outro lado, em um estudo in vitro realizado por de Avila et al.⁵⁹, comparando adesão bacteriana e formação de biofilme sobre discos de titânio e zircônia, verificou-se maior número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) sobre a zircônia. Uma possível explicação para esse resultado contraditório pode estar no tipo de microrganismo utilizado. No estudo acima citado, os discos foram expostos a uma comunidade microbiana da saliva com vários tipos bacterianos, enquanto que, no presente estudo, apenas o fungo *Candida albicans* foi utilizado. As imagens microscópicas dos biofilmes também foram coerentes com os resultados obtidos no teste biológico de contagem de colônias viáveis. Elas mostraram que o processo de envelhecimento não alterou a quantidade de microrganismos, independentemente do material.

Algumas relações podem ser estabelecidas entre os resultados encontrados para os testes físicos e biológicos. A diferença encontrada para a adesão de *Candida albicans* entre os materiais (zircônia e titânio) pode estar relacionada à diferença de rugosidade entre eles. A zircônia apresentou valores médios de rugosidade inferiores ao titânio, embora todos os valores estivessem dentro de uma faixa bastante restrita (0,09 µm a 0,20µm) e abaixo do limiar crítico de 200nm, que é citado em alguns estudos como um valor abaixo do qual não se observa influência significativa na composição da microbiota^{97,98}. Al-Marzouk e Al-Azzawi⁴⁵ realizaram

um estudo para avaliar a influência da rugosidade superficial média de porcelanas polidas ou glazeadas sobre a adesão de *Streptococcus mutans*. Apesar dos valores de rugosidade de todas as superfícies testadas terem sido baixos (inferiores a 50 nm), os autores observaram uma correlação positiva entre a rugosidade e a quantidade de adesão de microrganismos. Outra possível explicação para a menor adesão de microrganismos na zircônia pode estar relacionada à menor energia livre de superfície deste material em relação ao titânio.

Uma vez que a barreira dos tecidos moles é crucial para evitar a penetração microbiana^{99,100}, e considerando que alterações nas propriedades de superfície podem ter um impacto significativo na viabilidade e morfologia das células humanas⁶⁵, esse estudo também avaliou a influência do processo de envelhecimento sobre a bioatividade dos materiais de Ti e ZrO₂ em relação a fibroblastos da gengiva humana (FGH). Embora tenham ocorrido alterações na hidrofobicidade e ELS, o processo de envelhecimento em autoclave não alterou o nível de metabolismo dos fibroblastos FGH sobre as superfícies testadas, mesmo após o período de 48 horas de crescimento das células. Em concordância com esses resultados, as imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura também mostraram uma distribuição semelhante de células para todos os grupos. Menor ângulo de contato poderia auxiliar na adesão e disseminação celular durante a fixação e crescimento inicial^{101,102}. Porém, nesse estudo, o ângulo de contato das amostras envelhecidas foi significativamente menor em relação ao ângulo das amostras não envelhecidas, enquanto que a intensidade de fluorescência, representativa do metabolismo celular, foi similar. Outros estudos^{49,51,53} também não encontraram diferenças na proliferação de células FGH sobre diferentes superfícies de titânio e zircônia.

Em relação ao tipo de material, puderam ser observadas diferenças em relação à orientação espacial das células, que se apresentaram alinhadas aos sulcos do titânio, porém sem um padrão uniforme na zircônia. Essa tendência das células se alinharem aos sulcos do titânio também foi observada por um estudo de Moon et al.⁴⁹ no qual fotografias de MEV revelaram que fibroblastos cresceram com forma alongada de acordo com o padrão das ranhuras presentes na superfície do titânio usinado, enquanto que sobre a zircônia, as células apresentaram-se mais planas e curtas. Oakley e Brunette¹⁰³ também observaram que as células se orientam no sentido das microranhuras que são encontradas na superfície do

material. A resposta para essa questão não é comprovada, mas sugere-se que aconteça um fenômeno denominado contato guiado que propõe que haja um contato inicial entre células e substrato através de extensões celulares em escala nanométrica¹⁰⁴.

Em conclusão, os resultados do presente estudo demonstraram que as alterações na hidrofilicidade e ELS em materiais comercialmente usados como pilares de implante induzidas pelo processo de envelhecimento não interferem na formação de biofilme de *C. albicans*. Além disso, esse efeito foi mantido em células humanas, mostrando que o processo de envelhecimento das superfícies de Ti e ZrO₂ não foi tóxico para fibroblastos gengivais humanos, mesmo após longo período de exposição.

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos e considerando as limitações do presente estudo, foi possível concluir que o processo de envelhecimento simulado em autoclave:

1. Não alterou a rugosidade dos materiais avaliados (zircônia e titânio). Porém, a zircônia apresentou menores valores em relação ao titânio;
2. Aumentou a energia livre de superfície e reduziu o ângulo de contato com a água para ambos os materiais. A zircônia apresentou maiores valores de energia livre de superfície e menores valores de ângulo de contato em comparação com o titânio;
3. Não teve efeito sobre o metabolismo de fibroblastos da gengiva humana (FGH). O tipo de material (zircônia ou titânio) também não influenciou esse fator de estudo. Além disso, imagens de microscopia mostraram que a adesão e a morfologia das células não foram alteradas pelo envelhecimento nem pelo tipo de material;
4. Não alterou a quantidade de colônias viáveis de biofilmes de *Candida albicans* sobre zircônia ou titânio. Porém, a zircônia apresentou valores menores de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) em relação ao titânio. As imagens de microscopia também confirmaram esses resultados.

REFERÊNCIAS*

1. Abrahamsson I, Berglundh T, Glantz PO, Lindhe J. The mucosal attachment at different abutments. *J Clin Periodontol*. 1998; 25(9): 721-27.
2. Humphrey S. Implant maintenance. *Dent Clin North Am*. 2006; 50(3): 463-78.
3. Kawahara H, Kawahara D, Mimura Y, Takashima Y, Ong JL. Morphologic studies on the biologic seal of titanium dental implants. Report II. In vivo study on the defending mechanism of epithelial adhesion/attachment against invasive factors. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1998; 13(4): 465-73
4. Koyanagi T, Sakamoto M, Takeuchi Y, Ohkuma M, Izumi Y. Analysis of microbiota associated with peri-implantitis using 16S rRNA gene clone library. *J Oral Microbiol*. 2010; 2(1): 5104.
5. Jakobi ML, Stumpp SN, Stiesch M, Eberhard J, Heuer W. The peri-implant and periodontal microbiota in patients with and without clinical signs of inflammation. *Dent J (Basel)*. 2015; 3(2): 24-42.
6. Rams TE, Degener JE, Winkelhoff AJ. Antibiotic resistance in human peri - implantitis microbiota. *Clin Oral Implants Res*. 2014; 25(1): 82-90.
7. Hultin M, Gustafsson A, Hallström H, Johansson LA, Ekfeldt A, Klinge B. Microbiological findings and host response in patients with peri - implantitis. *Clin Oral Implants Res*. 2002; 13(4): 349-58.
8. Maruyama N, Maruyama F, Takeuchi Y, Aikawa C, Izumi Y, Nakagawa I. Intraindividual variation in core microbiota in periimplantitis and periodontitis. *Sci Rep*. 2014; 4: 6602.
9. Persson GR, Renvert S. Cluster of bacteria associated with peri - implantitis. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2014; 16(6): 783-93.
10. Galassi F, Kaman WE, Anssari Moin D, Van Der Horst J, Wismeijer D, Crielaard W et al. Comparing culture, real - time PCR and fluorescence resonance energy transfer technology for detection of *Porphyromonas gingivalis* in patients with or without peri - implant infections. *J Periodont Res*. 2012; 47(5): 616-25.
11. Shibli JA, Melo L, Ferrari DS, Figueiredo LC, Faveri M, Feres M. Composition of supra - and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clin Oral Implants Res*. 2008; 19(10): 975-82.
12. Charalampakis G, Leonhardt A, Rabe P, Dahlén G. Clinical and microbiological characteristics of peri - implantitis cases a retrospective multicentre study. *Clin Oral Implants Res*. 2012; 23(9): 1045-54.

* De acordo com as normas do termo de qualificação de mestrado da FOAR/UNESP, baseado nas normas Vancouver. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

13. Al-Radha ASD, Pal A, Pettemerides AP, Jenkinson HF. Molecular analysis of microbiota associated with peri-implant diseases. *J Dent*. 2012; 40(11): 989-98.
14. Dabdoub SM, Tsigarida AA, Kumar PS. Patient-specific analysis of periodontal and peri-implant microbiomes. *J Dent Res*. 2013; 92: 168S–75S.
15. Koyanagi T, Sakamoto M, Takeuchi Y, Maruyama N, Ohkuma M, Izumi Y. Comprehensive microbiological findings in periimplantitis and periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2013; 40: 218–26.
16. Leonhardt A, Renvert S, Dahlén G. Microbial findings at failing implants. *Clin Oral Implants Res*. 1999; 10(5): 339-45.
17. Leonhardt A, Bergström C, Lekholm U. Microbiologic diagnostics at titanium implants. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2003; 5(4): 226-32.
18. Shibli JA, Martins MC, Lotufo RFM, Marcantonio Junior E. Microbiologic and radiographic analysis of ligature-induced peri-implantitis with different dental implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003; 18(3): 383-90.
19. Cannon RD, Chaffin WL. Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999; 10(3): 359-83.
20. Bürgers R, Hahnel S, Reichert TE, Rosentritt M, Behr M, Gerlach T et al. Adhesion of *Candida albicans* to various dental implant surfaces and the influence of salivary pellicle proteins. *Acta Biomater*. 2010; 6(6): 2307-13.
21. Li J, Hirota K, Goto T, Yumoto H, Miyake Y, Ichikawa T. Biofilm formation of *Candida albicans* on implant overdenture materials and its removal. *J Dent*. 2012; 40(8): 686-92.
22. Custodio W, Silva WJ, Paes Leme AF, Cury JA, Del Bel Cury AA. Plasma proteins in the acquired denture pellicle enhance substrate surface free energy and *Candida albicans* phospholipase and proteinase activities. *J Investig Clin Dent*. 2015; 6(4): 273-81.
23. Zamperini CA, Machado AL, Vergani CE, Pavarina AC, Giampaolo ET, da Cruz NC. Adherence in vitro of *Candida albicans* to plasma treated acrylic resin. Effect of plasma parameters, surface roughness and salivary pellicle. *Arch Oral Biol*. 2010; 55(10): 763-70.
24. Größner - Schreiber B, Teichmann J, Hannig M, Dörfer C, Wenderoth DF, Ott SJ. Modified implant surfaces show different biofilm compositions under in vivo conditions. *Clin Oral Implants Res*. 2009; 20(8): 817- 26.
25. Katsikogianni M, Missirlis YF. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cell Mater*. 2004; 8(3): 37-57.
26. Quirynen M, Van der Mei HC, Bollen CML, Schotte A, Marechal M, Doornbusch GI et al. An in vivo study of the influence of the surface roughness of implants on the microbiology of supra-and subgingival plaque. *J Dent Res*. 1993; 72(9): 1304-09.

27. Baharloo B, Textor M, Brunette DM. Substratum roughness alters the growth, area, and focal adhesions of epithelial cells, and their proximity to titanium surfaces. *J Biomed Mater Res. Part A*. 2005; 74(1): 12-22.
28. Kloss FR, Steinmüller-Nethl D, Stigler RG, Ennemoser T, Rasse M, Hächl O. In vivo investigation on connective tissue healing to polished surfaces with different surface wettability. *Clin Oral Implants Res*. 2011; 22(7): 699-705.
29. Hormia M, Könönen M, Kivilahti J, Virtanen I. Immunolocalization of proteins specific for adherens junctions in human gingival epithelial cells grown on differently processed titanium surfaces. *J Periodontol Res*. 1991; 26(6): 491-97.
30. Carmine MD, Toto P, Feliciani C, Scarano A, Tulli A, Strocchi R et al. Spreading of epithelial cells on machined and sandblasted titanium surfaces: an in vitro study. *J Periodontol*. 2003; 74(3): 289-95.
31. Roach P, Farrar D, Perry CC. Interpretation of protein adsorption: surface-induced conformational changes. *J Am Chem Soc*. 2005; 127(22): 8168-73.
32. Rompen E, Domken O, Degidi M, Farias Pontes AE, Piattelli A. The effect of material characteristics, of surface topography and of implant components and connections on soft tissue integration: a literature review. *Clin Oral Implants Res*. 2006; 17(S2): 55-67.
33. Dorkhan M, de Paz LEC, Skepö M, Svensäter G, Davies JR. Effects of saliva or serum coating on adherence of *Streptococcus oralis* strains to titanium. *Microbiology*. 2012; 158(2): 390-97.
34. Silva WJ, Leal CM, Viu FC, Gonçalves LM, Barbosa CM, Del Bel Cury AA. Influence of surface free energy of denture base and liner materials on *Candida albicans* biofilms. *J Investig Clin Dent*. 2015; 6(2): 141-46.
35. Ponsonnet L, Reybier K, Jaffrezic N, Comte V, Lagneau C, Lissac M et al. Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour. *Mater Sci Eng C*. 2003; 23(4): 551-60.
36. Luo H, Tang X, Dong Z, Tang H, Nakamura T, Yatani H. The influences of accelerated aging on mechanical properties of veneering ceramics used for zirconia restorations. *Dent Mater J*. 2016; 35(2): 187-93.
37. Kohorst P, Dittmer MP, Borchers L, Stiesch-Scholz M. Influence of cyclic fatigue in water on the load-bearing capacity of dental bridges made of zirconia. *Acta Biomater*. 2008; 4(5): 1440-47.
38. Lohbauer U, Krämer N, Petschelt A, Frankenberger R. Correlation of in vitro fatigue data and in vivo clinical performance of a glassceramic material. *Dent Mater*. 2008; 24(1): 39-44.
39. Wiskott HW, Nicholls JI, Belser UC. Stress fatigue: basic principles and prosthodontic implications. *Int J Prosthodont*. 1995; 8(2): 105-16.

40. Borchers L, Stiesch M, Bach FW, Buhl JC, Hübsch C, Kellner T et al. Influence of hydrothermal and mechanical conditions on the strength of zirconia. *Acta Biomater.* 2010; 6(12): 4547-52.
41. Chevalier J, Gremillard L, Deville S. Low-temperature degradation of zirconia and implications for biomedical implants. *Annu Rev Mater Res.* 2007; 37: 1-32.
42. Lucas TJ, Lawson NC, Janowski GM, Burgess JO. Phase transformation of dental zirconia following artificial aging. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2015; 103(7): 1519-23.
43. Scarano A, Piattelli M, Caputi S, Favero GA, Piattelli A. Bacterial adhesion on commercially pure titanium and zirconium oxide disks: an in vivo human study. *J Periodontol.* 2004; 75(2): 292-6.
44. Degidi M, Artese L, Scarano A, Perrotti V, Gehrke P, Piattelli A. Inflammatory infiltrate, microvessel density, nitric oxide synthase expression, vascular endothelial growth factor expression, and proliferative activity in peri-implant soft tissues around titanium and zirconium oxide healing caps. *J Periodontol.* 2006; 77(1): 73-80.
45. Al-Marzouk MI, Al-Azzawi HJ. The effect of the surface roughness of porcelain on the adhesion of oral *Streptococcus mutans*. *J Contemp Dent Pract.* 2009; 10(6): 17-24.
46. van Brakel R, Cune MS, van Winkelhoff AJ, de Putter C, Verhoeven JW, van der Reijden W. Early bacterial colonization and soft tissue health around zirconia and titanium abutments: an in vivo study in man. *Clin Oral Implants Res.* 2011; 22(6): 571-77.
47. Al-Radha ASD, Dymock D, Younes C, O'Sullivan D. Surface properties of titanium and zirconia dental implant materials and their effect on bacterial adhesion. *J Dent.* 2012; 40(2): 146-53.
48. Al-Ahmad A, Wiedmann-Al-Ahmad M, Fackler A, Follo M, Hellwig E, Bächle M et al. In vivo study of the initial bacterial adhesion on different implant materials. *Arch Oral Biol.* 2013; 58(9): 1139-47.
49. Moon YH, Yoon MK, Moon JS, Kang JH, Kim SH, Yang HS et al. Focal adhesion linker proteins expression of fibroblast related to adhesion in response to different transmucosal abutment surfaces. *J Adv Prosthodont.* 2013; 5(3): 341-50.
50. de Avila ED, de Molon RS, Vergani CE, de Assis Mollo Junior F, Salih V. The relationship between Biofilm and physical-chemical properties of implant abutment materials for successful dental implants. *Materials (Basel).* 2014; 7(5): 3651-62.
51. Kim YS, Shin SY, Moon SK, Yang SM. Surface properties correlated with the human gingival fibroblasts attachment on various materials for implant abutments: a multiple regression analysis. *Acta Odontol Scand.* 2015; 73(1): 38-47.
52. Liu M, Zhou J, Yang Y, Zheng M, Yang J, Tan J. Surface modification of zirconia with polydopamine to enhance fibroblast response and decrease bacterial activity in vitro: a potential technique for soft tissue engineering applications. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2015; 136: 74-83.

53. Rutkunas V, Bukelskiene V, Sabaliauskas V, Balciunas E, Malinauskas M, Baltriukiene D. Assessment of human gingival fibroblast interaction with dental implant abutment materials. *J Mater Sci Mater Med*. 2015; 26(169): 1-9.
54. Brunot-Gohin C, Duval JL, Verbeke S, Belanger K, Pezron I, Kugel G et al. Biocompatibility study of lithium disilicate and zirconium oxide ceramics for esthetic dental abutments. *J Periodontal Implant Sci*. 2016; 46(6): 362-71.
55. de Avila ED, Avila-Campos MJ, Vergani CE, Spolidório DM, de Assis Mollo Junior F. Structural and quantitative analysis of a mature anaerobic biofilm on different implant abutment surfaces. *J Prosthet Dent*. 2016; 115(4): 428-36.
56. Okabe E, Ishihara Y, Kikuchi T, Izawa A, Kobayashi S, Goto H. Adhesion properties of human oral epithelial-derived cells to zirconia. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2016; 18(5): 906-16.
57. Mehl C, Kern M, Schütte AM, Kadem LF, Selhuber-Unkel C. Adhesion of living cells to abutment materials, dentin, and adhesive luting cement with different surface qualities. *Dent Mater*. 2016; 32(12): 1524-35.
58. Pereira GKR, Muller C, Wandscher VF, Rippe MP, Kleverlaan CJ, Valandro LF. Comparison of different low-temperature aging protocols: its effects on the mechanical behavior of Y-TZP ceramics. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2016; 60: 324-30.
59. de Avila ED, Vergani CE, de Assis Mollo Junior F, Junior MJ, Shi W, Lux R. Effect of titanium and zirconia dental implant abutments on a cultivable polymicrobial saliva community. *J Prosthet Dent*. 2017; 118(4): 481-87.
60. Dutra DAM, Pereira GKR, Kantorski KZ, Exterkate RAM, Kleverlaan CJ, Valandro LF et al. Grinding with diamond burs and hydrothermal aging of a y-tzp material: effect on the material surface characteristics and bacterial adhesion. *Oper Dent*. 2017; 42(6): 669-78.
61. Fischer NG, Wong J, Baruth A, Cerutis DR. Effect of clinically relevant CAD/CAM zirconia polishing on gingival fibroblast proliferation and focal adhesions. *Materials (Basel)*. 2017; 10(1358): 1-16.
62. Harlos MM, Bezerra da Silva T, Peruzzo DC, Napimoga MH, Joly In vitro microbiological analysis of bacterial seal in hybrid zirconia abutment tapered connection. *JC, Martinez EF. Implant Dent*. 2017; 26(2): 245-49.
63. Huacho PMM, Nogueira MNM, Basso FG, Jafelicci Junior M, Francisconi RS, Spolidorio DMP. Analyses of biofilm on implant abutment surfaces coating with diamond-like carbon and biocompatibility. *Braz Dent J*. 2017; 28(3): 317-23.
64. Mehl C, Kern M, Zimmermann A, Harder S, Huth S, Selhuber-Unkel C. Impact of cleaning procedures on adhesion of living cells to three abutment materials. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2017; 32(5): 976-84.

65. Rigolin MSM, de Avila ED, Basso FG, Hebling J, de S Costa CA, de Assis Mollo Junior F. Effect of different implant abutment surfaces on OBA-09 epithelial cell adhesion. *Microsc Res Tech*. 2017; 80(12): 1304-09.
66. Dal Piva A, Contreras L, Ribeiro FC, Anami LC, Camargo S, Jorge A et al. Monolithic ceramics: effect of finishing techniques on surface properties, bacterial adhesion and cell viability. *Oper Dent*. 2018; 43(3): 315-25.
67. Gökmenoglu C, Kara NB, Beldüz M, Kamburoğlu A, Tosun I, Sadik E et al. Evaluation of *Candida albicans* biofilm formation on various parts of implant material surfaces. *Niger J Clin Pract*. 2018; 21(1): 33-37.
68. Kihara H, Kim DM, Nagai M, Nojiri T, Nagai S, Chen CY et al. Epithelial cell adhesion efficacy of a novel peptide identified by panning on a smooth titanium surface. *Int J Oral Sci*. 2018; 10(3): 21.
69. Lima EMCX, Koo H, Vacca Smith AM, Rosalen PL, Del Bel Cury AA. Adsorption of salivary and serum proteins, and bacterial adherence on titanium and zirconia ceramic surfaces. *Clin Oral Implants Res*. 2008; 19(8): 780-85.
70. Mustafa K, Wennerberg A, Arvidson K, Messelt EB, Haag P, Karlsson S. Influence of modifying and veneering the surface of ceramic abutments on cellular attachment and proliferation. *Clin Oral Implants Res*. 2008; 19(11): 1178-87.
71. Park JH, Olivares-Navarrete R, Baier RE, Meyer AE, Tannenbaum R, Boyan BD et al. Effect of cleaning and sterilization on titanium implant surface properties and cellular response. *Acta Biomater*. 2012; 8(5): 1966-75.
72. International Organization for Standardization. ISO 13356: implants for surgery: ceramic materials based on yttria-stabilized tetragonal zirconia (Y-TZP). 2nd. ed. Geneva: ISO; 2008.
73. Chevalier J, Cales B, Drouin JM. Low - temperature aging of Y - TZP ceramics. *J Am Ceram Soc*. 1999; 82(8): 2150-54.
74. Pereira GKR, Amaral M, Cesar PF, Bottino MC, Kleverlaan CJ, Valandro LF. Effect of low-temperature aging on the mechanical behavior of ground Y-TZP. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2015; 45: 183-92.
75. de Almeida Basílio M, Cardoso KV, Antonio SG, Rizkalla AS, Santos Junior GC, Arioli Filho JN. Effects of artificial aging conditions on yttria-stabilized zirconia implant abutments. *J Prosthet Dent*. 2016; 116(2): 277-85.
76. Deville S, Gremillard L, Chevalier J, Fantozzi G. A critical comparison of methods for the determination of the aging sensitivity in biomedical grade yttria - stabilized zirconia. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005; 72(2): 239-45.
77. Teng FY, Ko CL, Kuo HN, Hu JJ, Lin JH, Lou CW et al. A comparison of epithelial cells, fibroblasts, and osteoblasts in dental implant titanium topographies. *Bioinorg Chem Appl*. 2012; 2012: 1-9.

78. Janssen D, de Palma R, Verlaak S, Heremans P, Dehaen W. Static solvent contact angle measurements, surface free energy and wettability determination of various self-assembled monolayers on silicon dioxide. *Thin Solid Films*. 2006; 515(4): 1433-38.
79. Owens DK, Wendt RC. Estimation of the surface free energy of polymers. *J Appl Polym Sci*. 1969; 13(8): 1741-47.
80. Panariello B, Alves F, Carmello JC. Padronização de curva de crescimento de *C. albicans* ATCC 90028. In: Paniarello B, Alves F, Carmello JC. Manual de protocolos do laboratório de microbiologia aplicada. Araraquara: Laboratório de Microbiologia Aplicada da Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014. p. 19-20.
81. Zamperini CA, Machado AL, Vergani CE, Pavarina AC, Rangel EC, Cruz NC. Evaluation of fungal adherence to plasma-modified polymethylmethacrylate. *Mycoses*. 2011; 54(5): 344-51.
82. de Avila ED, de Molon RS, Lima BP, Lux R, Shi W, Jafelicci Junior M et al. Impact of physical chemical characteristics of abutment implant surfaces on bacteria adhesion. *J Oral Implantol*. 2016; 42(2): 153-58.
83. de Avila ED, Lima BP, Sekiya T, Torii Y, Ogawa T, Shi W et al. Effect of UV-photofunctionalization on oral bacterial attachment and biofilm formation to titanium implant material. *Biomaterials*. 2015; 67: 84-92.
84. Choi SH, Jeong WS, Cha JY, Lee JH, Lee KJ, Yu HS et al. Overcoming the biological aging of titanium using a wet storage method after ultraviolet treatment. *Sci Rep*. 2017; 7(3833): 1-7.
85. Pereira GKR, Silvestri T, Camargo R, Rippe MP, Amaral M, Kleverlaan CJ et al. Mechanical behavior of a Y-TZP ceramic for monolithic restorations: effect of grinding and low-temperature aging. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016; 63: 70-7.
86. Hao Z, Ma Y, Liu W, Meng Y, Nakamura K, Shen J et al. Influence of low-temperature degradation on the wear characteristics of zirconia against polymer-infiltrated ceramic-network material. *J Prosthet Dent*. 2018.
87. Pereira GKR, Venturini AB, Silvestri T, Dapieve KS, Montagner AF, Soares FZM et al. Low-temperature degradation of Y-TZP ceramics: a systematic review and meta-analysis. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2016; 55: 151-63.
88. Amaral M, Valandro LF, Bottino MA, Souza RO. Low-temperature degradation of a Y-TZP ceramic after surface treatments. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2013; 101(8): 1387-92.
89. Cattani-Lorente M, Durual S, Amez-Droz M, Wiskott HW, Scherrer SS. Hydrothermal degradation of a 3Y-TZP translucent dental ceramic: a comparison of numerical predictions with experimental data after 2 years of aging. *Dent Mater*. 2016; 32(3): 394-402.
90. Lughì V, Sergo V. Low temperature degradation -aging- of zirconia: a critical review of the relevant aspects in dentistry. *Dent Mater*. 2010; 26(8): 807-20.

91. Hori N, Iwasa F, Tsukimura N, Sugita Y, Ueno T, Kojima N et al. Effects of UV photofunctionalization on the nanotopography enhanced initial bioactivity of titanium. *Acta Biomater.* 2011; 7(10): 3679-91.
92. Suzuki T, Hori N, Att W, Kubo K, Iwasa F, Ueno T et al. Ultraviolet treatment overcomes time-related degrading bioactivity of titanium. *Tissue Eng Part A.* 2009; 15(12): 3679-88.
93. Pereira GKR, Silvestri T, Amaral M, Rippe MP, Kleverlaan CJ, Valandro LF. Fatigue limit of polycrystalline zirconium oxide ceramics: effect of grinding and low-temperature aging. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2016; 61: 45-54.
94. Colvin RB. Fibrinogen-fibrin interactions with fibroblasts and macrophages. *Ann N Y Acad Sci.* 1983; 408(1): 621-33.
95. Beaussart A, Alsteens D, El-Kirat-Chatel S, Lipke PN, Kucharikova S, Van Dijck P et al. Single-molecule imaging and functional analysis of Als adhesins and mannans during *Candida albicans* morphogenesis. *ACS nano.* 2012; 6(12): 10950-64.
96. Glee PM, Sundstrom P, Hazen KC. Expression of surface hydrophobic proteins by *Candida albicans* in vivo. *Infect Immun.* 1995; 63(4): 1373-9.
97. Quirynen M, Bollen CM, Papaioannou W, van Eldere J, van Steenberghe D. The influence of titanium abutment surface roughness on plaque accumulation and gingivitis: short-term observations. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1996; 11(2): 169-78.
98. Bollen CM, Papaioanno W, van Eldere J, Schepers E, Quirynen M, van Steenberghe D. The influence of abutment surface roughness on plaque accumulation and peri - implant mucositis. *Clin Oral Implants Res.* 1996; 7(3): 201-11.
99. Atsuta I, Ayukawa Y, Kondo R, Oshiro W, Matsuura Y, Furuhashi A et al. Soft tissue sealing around dental implants based on histological interpretation. *J Prosthodont Res.* 2016; 60(1): 3-11.
100. Sculean A, Gruber R, Bosshardt DD. Soft tissue wound healing around teeth and dental implants. *J Clin Periodontol.* 2014; 41 (Suppl 15): S6-S22.
101. Yamashita D, Machigashira M, Miyamoto M, Takeuchi, H, Noguchi K, Izumi Y et al. Effect of surface roughness on initial responses of osteoblast-like cells on two types of zirconia. *Dent Mater J.* 2009; 28(4): 461–70.
102. Wei J, Yoshinari M, Takemoto S, Hattori M, Kawada E, Liu B et al. Adhesion of mouse fibroblasts on hexamethyldisiloxane surfaces with wide range of wettability. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007; 81(1): 66–75.
103. Oakley C, Brunette DM. Topographic compensation: guidance and directed locomotion of fibroblasts on grooved micromachined substrata in the absence of microtubules. *Cell Motil Cytoskeleton.* 1995; 31(1): 45-58.
104. Meyle J, Gültig K, Brich M, Hämmerle H, Nisch W. Contact guidance of fibroblasts on biomaterial surfaces. *J Mater Sci: Mater Med.* 1994; 5(6–7): 463–66.

ANEXO A – Parecer do CEP

UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA - CAMPUS
ARARAQUARA

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DA EMENDA**

Título da Pesquisa: Efeito do processo de envelhecimento sobre propriedades superficiais e biológicas de biomateriais utilizados como abutments.

Pesquisador: Janaina Habib Jorge

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 68576317.0.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.220.226

Apresentação do Projeto:

O projeto apresentado pela Profa. Dra. Janaina Habib Jorge, propõe um estudo experimental in vitro com vistas a avaliar os efeitos do processo de envelhecimento sobre as propriedades superficiais de abutments confeccionados com titânio (Ti) e zircônia (ZrO₂), e a viabilidade e adesão de fibroblastos orais e de *Candida albicans* a eles.

Para tanto, serão confeccionados corpos de prova titânio e zircônia com 8 mm de diâmetro por 2 mm de espessura que serão submetidos a um processo de envelhecimento acelerado em condições que procuram simular as condições bucais. Isto exige a coleta de saliva de voluntários que serão recrutados nas dependências da FOAr e que manifestarão sua concordância em participar do projeto assinando TCLE. A rugosidade superficial e a energia livre de superfície das amostras serão avaliadas antes e após o processo de envelhecimento. A capacidade de formação do biofilme de *Candida albicans* sobre as amostras de Ti e ZrO₂ será feita por meio dos testes XTT e da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). O metabolismo celular e a capacidade de adesão de fibroblastos sobre as amostras de Ti e ZrO₂ serão avaliados por meio dos testes Alamar Blue. Para ambas as células (fibroblastos e *Candida albicans*), antes e após o envelhecimento, serão realizadas avaliações por meio da microscopia de varredura confocal a laser (marcação de actina do citoesqueleto celular) e

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

CEP: 14.801-903

E-mail: cep@foar.unesp.br



UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA - CAMPUS
ARARAQUARA



Continuação do Parecer: 2.220.226

microscopia eletrônica de varredura.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste estudo será avaliar o efeito do processo de envelhecimento sobre: 1. características superficiais (rugosidade superficial, energia livre de superfície) de amostras de titânio e zircônia; 2. viabilidade e adesão de fibroblastos orais e de *Candida albicans* sobre amostras de titânio e zircônia.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os riscos serão mínimos durante a coleta da saliva. Para minimizar os riscos, a saliva será coletada em ambiente adequado e os pacientes receberão orientações durante o processo da coleta, o qual será realizada em tubo estéril. O pesquisador usará luvas, máscara, gorro e avental para evitar possível contaminação. Durante o exame clínico, todos os procedimentos de biossegurança (rotineiramente usados na FOAr) serão realizados para proteção do pesquisador e paciente.

Benefícios: Devido a capacidade de adesão dos micro-organismos nas superfícies de abutments (GröbnerSchreiber et al. 2009), a barreira formada pelo tecido gengival ao redor dos abutments deve ser efetiva para que não ocorra a perda precoce do implante por deficiência no processo de osseointegração. Além disso, essa barreira deve permanecer com esta efetividade ao longo do tempo mesmo com a renovação celular e envelhecimento dos biomateriais, para que não haja a perda tardia, como resultado de doença peri-implantar. Levando-se em consideração os aspectos descritos anteriormente, é considerado importante avaliar o efeito do processo de envelhecimento sobre as características superficiais (rugosidade superficial, energia livre de superfície) bem como sobre a viabilidade e adesão de fibroblastos orais e de *Candida albicans* sobre amostras de titânio e zircônia. Neste aspecto, até o momento, nenhum estudo com esse propósito foi encontrado na literatura. Assim, a relação entre o processo de envelhecimento, características superficiais de biomateriais para abutments e propriedades biológicas de adesão e viabilidade de células gengivais e fúngicas ainda permanece controversa, justificando a importância do presente estudo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto mostra-se importante ao buscar suprir lacunas de informação sobre as consequências do processo de envelhecimento de materiais biológicos usados na confecção de implantes dentários. Esse

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

CEP: 14.801-903

E-mail: cep@foar.unesp.br



UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA - CAMPUS
ARARAQUARA



Continuação do Parecer: 2.220.226

processo pode alterar a capacidade de adesão de fibroblastos e de *Candida albicans* à sua superfície.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Nesta terceira versão do projeto houve a reapresentação do cronograma visando abranger todo o período de desenvolvimento da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não existem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Emenda APROVADA em reunião de 15 de Agosto de 2017.

O pesquisador deverá encaminhar relatórios parciais a cada 01 (um) ano até o prazo final da pesquisa, quando deverá encaminhar o relatório final.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_949800 E1.pdf	23/06/2017 15:14:23		Aceito
Outros	carta_resposta.pdf	02/06/2017 09:52:07	Janaina Habib Jorge	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracao_aceite_lab.pdf	01/06/2017 09:50:43	Janaina Habib Jorge	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_consentimento.pdf	01/06/2017 09:49:43	Janaina Habib Jorge	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	01/06/2017 09:49:34	Janaina Habib Jorge	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_compromisso.pdf	16/05/2017 11:35:27	Janaina Habib Jorge	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	16/05/2017 11:34:49	Janaina Habib Jorge	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Avaliação da CONEP:

Não

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

UF: SP

Município: ARARAQUARA

CEP: 14.801-903

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br



UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA - CAMPUS
ARARAQUARA



Continuação do Parecer: 2.220.226

ARARAQUARA, 15 de Agosto de 2017

Assinado por:
Ligia Antunes Pereira Pinelli
(Coordenador)

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

UF: SP

Município: ARARAQUARA

CEP: 14.801-903

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br

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

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 10 de setembro de 2018

José Francisco Santos Simões da Rocha