



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



SUELEN ALINE DE LIMA BARROS

**EFEITOS DO RECOBRIMENTO DA ZIRCÔNIA POR UM BIOVIDRO:
CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE E AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES
BIOLÓGICAS**

Araraquara

2017



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



SUELEN ALINE DE LIMA BARROS

**EFEITOS DO RECOBRIMENTO DA ZIRCÔNIA POR UM BIOVIDRO:
CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE E AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES
BIOLÓGICAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral Área de Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para título de Mestre em Reabilitação Oral.

Orientador: Gelson Luís Adabo

Araraquara

2017

Barros, Suelen Aline de Lima

Efeitos do recobrimento da zircônia por um biovidro: caracterização da superfície e avaliação de propriedades biológicas / Suelen Aline de Lima Barros.-- Araraquara: [s.n.], 2017

59 f.; 30 cm.

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

Orientador: Prof. Dr. Gelson Luís Adabo

Co-Orientadora: Profa. Dra. Diana Gabriela de Sousa Soares

1. Propriedades físicas 2. Materiais biocompatíveis 3. Cerâmica
I. Título

SUELEN ALINE DE LIMA BARROS

EFEITOS DO RECOBRIMENTO DA ZIRCÔNIA POR UM
BIOVIDRO: CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE E AVALIAÇÃO DE
PROPRIEDADES BIOLÓGICAS

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Presidente e orientador: Gelson Luís Adabo

2º Examinador: Carlos Alberto de Souza Costa

3º Examinador: Regina Guenka Palma-Dibb

Araraquara, 31 de março de 2017

DADOS CURRICULARES

SUELEN ALINE DE LIMA BARROS

NASCIMENTO: 19/06/1990 – Teresina – Piauí

FILIAÇÃO: Lucivanda Alves de Lima
Edilson Costa Barros

2009 – 2014: Graduação em Odontologia pela Universidade Federal do Piauí.

2014 – 2016: Especialização em prótese dentária pela Associação Paulista de Cirurgiões-Dentistas.

2015 – 2017: Curso de Mestrado em Reabilitação Oral área de Prótese pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

Dedicatória

A Deus:

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por ter tido essa experiência extraordinária, a qual eu tive ao meu lado pessoas tão competentes e tão prestativas. Sinto-me abençoada por ter vivido tudo o que vivi nesse período, tudo que pude aprender e pessoas que tive a chance de conhecer. Agradeço a Deus por todo conhecimento recebido e todo crescimento espiritual e intelectual. Deus, muito obrigada por tudo!

Aos meus pais, Edilson e Lucivanda

Aos meus pais, que são minha fonte de inspiração de vida, agradeço tudo que fizeram e fazem por mim desde sempre. Cada puxão de orelha, cada conversa, cada conselho dado foi essencial para minha formação não só profissionalmente, mas principalmente como ser humano. A pessoa que eu sou hoje é, em grande parte, espelho da criação deles. Sem vocês nada disso seria possível. Amo muito vocês, pai e mãe!

Aos meus amados irmãos Larissa, Carolin e Marcus

Agradeço toda a amizade e todos os momentos que compartilhamos: os bons e os ruins, porque foram desses momentos que nós pudemos fortalecer e estreitar cada vez mais os nossos laços. Na vida, temos pessoas que passam por nós e sempre nos deixam algo e sempre levam algo de nós. Mas os irmãos não. Os irmãos permanecem e sempre estarão conosco por toda a vida. Eu sei que posso contar com vocês e a recíproca sempre será verdadeira. Obrigada por fazerem parte da minha vida e torcerem pelo meu crescimento. Amo vocês demais!

Aos meus amigos

Agradeço aos amigos de infância que tenho o orgulho de dizer que ainda tenho alguns. Agradeço aos amigos de universidade que me estimularam a buscar novos caminhos. Agradeço aos amigos que fiz em Araraquara, em especial à Malu, Cibele, Livia e Guilherme que se tornaram verdadeiros irmãos. Agradeço a todos toda a paciência, a companhia, o carinho e os momentos que dividimos. Obrigada por tudo que vocês já fizeram por mim. Vocês participaram dessa etapa mesmo que indiretamente. Muito obrigada por me darem força para buscar o meu objetivo. Amo vocês!

A Faculdade de Odontologia de Araraquara

Agradeço também a essa instituição que me abriu as portas e acabou se tornando minha segunda casa em Araraquara. Em especial, agradeço ao Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais e toda a equipe Coordenada pelo professor Carlos Alberto de Souza Costa e Josimeri Hebling composta pelas pós doutorandas Diana Gabriela Soares, Fernanda Gonçalves Basso, Débora Schefell e Giovana Anovazzi e as colegas de laboratório Malu, Carla, Ester, Úxua, Taisa, Juliana, Cláudia, Cristiane, que trabalham incansavelmente e constroem ciência de maneira tão ética e admirável.

Aos meus queridos Orientador e Co orientadora

Agradeço imensamente ao professor Gelson e a Diana, que para mim são exemplos de seres humanos e de profissionais. Agradeço os conselhos dados, as conversas, as reuniões, os momentos de descontração, a boa convivência, a confiança depositada e o conhecimento recebido. Esse trabalho não teria sido concretizado sem a orientação de vocês.

Aos queridos pacientes, alunos e professores

Agradeço também aos pacientes que me confiaram seus tratamentos. Agradeço aos alunos com quem puder estar presente nos estágios de docência. O aprendizado quando estamos em ambiente acadêmico sempre é bilateral. Agradeço aos professores que confiaram no meu profissionalismo para auxiliá-los nas clínicas transmitindo o que eu sei aos alunos.

Ao programa de pós graduação

Ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da FOAr-UNESP, representado pela coordenadora Prof^a. Dr^a. Ana Claudia Pavarina e vice-coordenadora Prof^a. Dr^a. Renata Garcia Fonseca, por toda acessibilidade durante este período, muito obrigada!

Aos funcionários da FOAr

Agradeço aos funcionários das portarias, dos laboratórios e de todas as seções que fazem parte dessa instituição. Quem convive sabe que a excelência da Faculdade está em todos os setores que a fazem tão notável.

As agências de fomento à pesquisa

Agradeço à Capes e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pela bolsa de mestrado concedida (processo: 2015/19034-8).

Barros SAL. Efeitos do recobrimento da zircônia por um biovidro: caracterização da superfície e avaliação de propriedades biológicas [Dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

Resumo

A adição de materiais bioativos na superfície dos *abutments* apresenta-se como uma alternativa interessante visando a otimização do selamento marginal na interface mucosa/implante. O presente estudo teve como objetivo promover o recobrimento da zircônia (Zr) com um biovidro Biosilicato® (BS), bem como avaliar as características físicas e químicas desta superfície, e a capacidade de bioestimulação sobre fibroblastos. Inicialmente, os seguintes veículos foram testados para recobrimento com BS sobre a superfície da Zr: álcool/água, álcool/verniz, acetona/verniz, água/verniz, glaze, silano e hipromelose. Espécimes de Zr sinterizada foram tratados com as soluções de BS nos diferentes veículos (60 mg/mL). Foi aplicado 20 µL das soluções sobre os espécimes seguido de aquecimento gradual até 1100°C por 20 minutos. A superfície dos espécimes foi avaliada em MEV para análise do recobrimento com BS e a identificação dos elementos químicos foi realizada em EDX. Após análise do padrão da cobertura, o veículo álcool/água (1:1) foi selecionado para recobrimento do BS nos experimentos subsequentes. A rugosidade de superfície (Ra) foi medida em microscópio óptico confocal, enquanto ângulo de contato e energia livre de superfície (ELS) foram determinados com auxílio de goniômetro. A alteração de cor da Zr foi avaliada em espectrofotômetro UV (Delta E). Todas estas análises foram realizadas nos discos de zircônia inalterados (Zr) ou tratados com BS (Zr+BS). Para as análises biológicas, fibroblastos L929 foram semeados sobre a superfície de poliestireno (PS – controle), bem como sobre os discos de Zr inalterado (controle) ou Zr+BS, sendo a proliferação (Alamar Blue) e morfologia celular (MEV) avaliadas em períodos de 1, 3, 5 e 7 dias pós-plantio. O ensaio de wound healing foi realizado para verificar a capacidade de migração celular nas diferentes superfícies 24h após realização da ferida e a síntese de colágeno (Sirius Red) foi mensurada após 7 dias de cultura sobre os espécimes. Os dados de rugosidade superficial, ângulo de contato e energia livre de superfície foram analisados pelo teste *t* Student independente ($p < 0,05$). Análises descritivas foram feitas através de imagens de MEV para caracterização da superfície e observação da morfologia celular. As análises da proliferação celular e síntese de colágeno foram realizadas através de ANOVA/Tukey, enquanto que o wound healing foi avaliado pelo teste *t* Student ($p < 0,05$). Foi possível detectar a cobertura de um filme de BS na análise em MEV/EDX nos grupos que utilizaram álcool/água, álcool/verniz, acetona/verniz, água/verniz e líquido de glaze como veículo. Nestes espécimes foi detectada a presença de microcristais compostos de Si, Na, O e Ca na superfície da Zr tratada com BS, os quais são componentes do BS. Porém, apenas com álcool/água houve um recobrimento homogêneo dos espécimes, sendo o mesmo selecionado para os demais experimentos. A rugosidade superficial, energia livre de superfície e ângulo de contato para 2 líquidos utilizados mostrou diferença entre os grupos Zr e Zr+BS. A medida da alteração de cor resultou em $\Delta E=1,74$, o que é considerado clinicamente insignificante. O teste do Alamar Blue demonstrou aumento significativo na viabilidade das células semeadas nos discos Zr+BS em relação aos demais grupos a partir de 3 dias de cultivo e demonstrou a capacidade do BS em bioestimular células L929. As imagens em MEV corroboraram com os achados da proliferação. Aumento na capacidade de migração celular e síntese de colágeno também foram observados para as células L929 no grupo Zr+BS em relação aos demais grupos experimentais. O recobrimento do BS sobre a zircônia gerou a formação de uma camada de micro-cristais de BS, a qual promoveu aumento na rugosidade superficial e na energia livre de superfície, sugerindo a formação de uma superfície anfipática, porém sem alterar a cor da zircônia. Esta superfície apresentou elevado potencial bioativo sobre a linhagem de fibroblastos L929.

Palavras-chave: Propriedades físicas. Materiais Biocompatíveis. Cerâmica.

Barros SAL. Effects of zirconia coating with a bioglass: surface characterization and evaluation of biological properties [Dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

Abstract

The addition of bioactive materials to the surface of the abutments is an interesting alternative for the optimization of marginal sealing at the mucosal/implant interface. The aim of the present study was to promote the coating of Biosilicate® (BS) bioglass on the zirconia (Zr) surface, as well as to evaluate the physical and chemical characteristics of this surface, and biostimulation capacity on fibroblasts. Initially, the following vehicles were tested for coating of BS on the surface of Zr: alcohol/water, alcohol/varnish, acetone/varnish, water/varnish, glaze, silane and hypromellose. Sintered Zr specimens were treated with the BS solutions in the different vehicles (60 mg/mL). Was applied 20 µL of the solutions on the specimens followed by gradual heating to 1100°C for 20 minutes to cover the zirconia. The surface of the specimens was evaluated in SEM to analyze the coating of BS and the identification of the chemical elements was performed in EDX. After analysis of the pattern, the alcohol/water vehicle (1: 1) was selected for coating of BS in subsequent experiments. Surface roughness (Ra) was measured in confocal optical microscope, while contact angle and surface free energy (ELS) were determined by goniometer. The color alteration of the Zr was evaluated in a spectrophotometer UV (Delta E). All these analyzes were carried out on unmodified zirconia discs (Zr) or treated with BS (Zr + BS). For the biological analyzes, L929 fibroblasts were seeded on the polystyrene surface (PS - control), as well as the Zr (control) or Zr + BS discs, with proliferation (Alamar Blue) and cell morphology (SEM) evaluated in periods of 1, 3, 5 and 7 days post seeding. The wound healing assay was performed to verify cell migration capacity on the different surfaces 24h after wounding, and collagen synthesis (Sirius Red) was measured after 7 days of culture on the specimens. The surface roughness, contact angle and surface free energy data were analyzed using the independent Student t test ($p < 0,05$). Descriptive analyzes were performed using SEM images for surface characterization and cellular morphology observation. Cell proliferation and collagen synthesis analyzes were performed through ANOVA/Tukey, while the wound healing was evaluated by the Student t test ($p < 0,05$). It was possible to detect the coating of a BS film in the MEV/EDX analysis in the groups where alcohol/water, alcohol/varnish, acetone/varnish, water/varnish and glaze were used. In these specimens the presence of Si, Na, O and Ca microcrystals was detected on the surface of treated Zr discs with BS, which are components of BS. However, only with alcohol/water there was a homogeneous coating of the specimens, being the same selected for the others assays. The surface roughness, free surface energy and contact angle for 2 liquids used showed a difference between the Zr and Zr + BS groups. The delta E data in the Zr and Zr + BS groups showed no significant color alteration before and after the heat treatment. The Alamar Blue test demonstrated significant increase in the viability of the cells seeded on Zr + BS discs from 3 days of culture and therefore, the ability of BS to bioestimate L929 cells in relation to the others groups. SEM images corroborated the findings of proliferation. Increased cell migration ability and collagen synthesis were also observed for L929 cells in the Zr + BS group in relation to the others experimentals groups. The BS coating on the zirconia generated the formation of a layer of BS micro-crystals, which promoted increase in surface roughness and free surface energy, suggesting the formation of an amphipathic surface, but without altering the color of the zirconia. This surface had a high bioactive potential on the L929 fibroblast lineage.

Key-words: Physical properties. Biocompatible Materials. Ceramics

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
3 PROPOSIÇÃO	20
4 MATERIAL E MÉTODO	21
5 RESULTADO	31
6 DISCUSSÃO	46
7 CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

A reabilitação oral por meio de implantes dentários tem se tornado nas últimas décadas um tratamento confiável, duradouro, eficaz e satisfatório (Adell et al.³, 1990; Aguiar et al.⁴, 2007). Com a descoberta da biocompatibilidade e capacidade de osseointegração do titânio por Branemark na década de 1960, houve uma nova percepção de reabilitação oral, a partir de então fixada em osso, proporcionando maior conforto e comodidade ao paciente (Aguiar et al. ⁴, 2007). Sobre os implantes, é conectada a peça protética, a qual pode ser colocada diretamente sobre o implante, ou por meio de *abutments*. O uso dos *abutments* tem a vantagem de promover um distanciamento da conexão protética sobre o implante, prevenindo a ocorrência de falhas diretamente sobre o mesmo (Aguiar et al.⁴, 2007).

Além de conectar implante e prótese, os *abutments* também devem promover selamento marginal adequado com o tecido gengival adjacente ao implante, de forma a impedir a invasão de microrganismos na região peri-implantar, atuando na prevenção de peri-implantite e reabsorção óssea ao redor do implante e que pode culminar com a perda do implante (Dibart et al.²³, 2005). A integridade do tecido peri-implantar é considerada ponto crítico no sucesso da reabilitação com implantes segmentados. O titânio é o material largamente utilizado na fabricação de *abutments*, sendo o mesmo considerado o padrão ouro devido as suas características favoráveis, tais como alta resistência mecânica, biocompatibilidade com tecidos mole e duro e eficácia em longo prazo (Branemark et al.¹⁴, 1977, Mustafa et al.⁶², 2008). No entanto, *abutments* de titânio apresentam como principal desvantagem a deficiência estética, especialmente quando o mesmo é posicionado em região supra-gengival ou em áreas de mucosa gengival delgada (Mustafa et al. ⁶², 2008).

Com o intuito de melhorar a condição estética, cerâmicas de alta resistência tais como a zircônia estão sendo amplamente utilizadas como *abutments* de implantes. Quando ítria (Y_2O_3) é adicionada ao óxido de zircônia (ZrO_2) muitas propriedades favoráveis são conseguidas. O material pulverizado é então estabilizado em seu estado tetragonal à temperatura ambiente sendo comumente referido como zircônia tetragonal policristalina estabilizada por ítria (Y-TZP). Após a sinterização, algumas de suas propriedades mecânicas são semelhantes aquelas do aço inoxidável (Garvie et al.²⁶, 1975, Manicone et al.⁵³, 2007). Associada a essas

propriedades, a elevada estética deste material, torna a zircônia um material ideal para áreas criticamente estéticas (Gomes et al.²⁹, 2008). Outra característica favorável dos *abutments* de zircônia é a sua biocompatibilidade com o tecido gengival. Para garantir uma barreira de tecido mole eficaz, o material que compreende a superfície do *abutment* na área de transmucosa deve ser biocompatível e favorecer a adesão e crescimento dos tecidos circundantes (Abrahamsson et al.¹, 1998). No âmbito biológico, estudos não têm indicado qualquer efeito negativo da zircônia sobre os tecidos mole e duro (Martins et al.⁵⁶, 2010). Além disso, *abutments* de ZrO₂ podem oferecer o benefício adicional de menor potencial de colonização bacteriana (Rimondini et al.⁷¹, 2002; Scarano et al.⁷⁵, 2004). Entretanto, esse material apresenta alta friabilidade e ainda é considerado de elevado custo.

Com o objetivo de melhorar a interação mucosa/*abutment*, gerando um selamento marginal mais resistente e duradouro, modificações nas superfícies dos *abutments* têm sido propostas através de usinagem/microusinagem, jateamento de partículas, corrosão química/eletroquímica e anodização, a fim de promover alterações de superfície e melhorar a interação entre material e tecido vivo (Rompen et al.⁷², 2006). Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a superfície rugosa de *abutments* de implantes influencia tanto a orientação e a proliferação de células do tecido conjuntivo, como evita a migração apical do tecido epitelial (Brunette ¹⁶ 1988; Mustafa et al.⁶¹, 1998).

O estudo de materiais bioativos que promovem o reparo e regeneração tecidual de forma mais rápida está cada vez ganhando mais espaço na literatura (Williams⁸⁴ 2009; Boccaccini et al.¹², 2014). Um vidro bioativo é aquele capaz de induzir uma resposta biológica na interface do material seja ela proliferação celular, expressão gênica e formação de uma conexão entre os tecidos vivos e o material (Montazerian et al.⁵⁹, 2016). Um material desenvolvido pelo Laboratório de Materiais Vítreos da Universidade Federal de São Carlos – Brasil - o Biosilicato®, apresenta elevado potencial como material bioativo em diferentes situações clínicas. A literatura relata que o Biosilicato® promove bioestimulação de células ósseas, levando a um aumento da proliferação celular, diferenciação osteoblástica e deposição de matriz mineralizada *in vitro* e *in vivo* (Roriz et al.⁷³, 2010). Este material também foi considerado biocompatível e capaz de estimular a proliferação de fibroblastos (Kido et al.⁴³, 2013). Outra propriedade que está em estudo sobre o Biosilicato® é a

antimicrobiana. De acordo com Martins et al.⁵⁵, (2011), este material demonstrou notável atividade contra microrganismos anaeróbicos, anaeróbicos facultativos e microaerófilos. Diante das interessantes características biológicas demonstradas, o Biosilicato® apresenta-se como uma potencial alternativa para aumentar a compatibilidade biológica na superfície de zircônia utilizada em *abutments*, visando uma melhora do selamento marginal com o tecido gengival.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A literatura mostra que diferentes materiais, bem como características intrínsecas destes, podem gerar diferentes respostas nos tecidos peri-implantares. Logo, características como rugosidade, porosidade, morfologia, composição química, entre outras podem afetar diretamente a adesão de células nesses substratos (Marchi et al.⁵⁴, 2010; Teng et al.⁸⁰, 2012). Para que haja uma interface adequada entre implante e tecidos circundantes essas características são de fundamental importância (Rompen et al.⁷², 2006).

A utilização de *abutment* de titânio compromete a reabilitação estética, principalmente quando o paciente apresenta uma gengiva pouco queratinizada ou quando o componente é posicionado em região supra-gengival (Mustafa et al.⁶², 2008) provocando alteração de cor do tecido mole peri-implantar (Thoma et al.⁸¹, 2016). Além disso, alguns pacientes podem desenvolver reações alérgicas ao titânio (Lalor et al.⁴⁸, 1991; Hosoki et al.³⁶, 2016), assim como a discutível contribuição deste material no desenvolvimento de peri-implantites (Fretwust et al.²⁵, 2015). Soma-se a essas questões, a possível exposição do *abutment* por meio de processos fisiológicos e/ou patológicos, os quais podem levar a recessão gengival e lesões peri-implantares (Pae et al.⁶⁵, 2009).

Devido à alta demanda por reabilitações estéticas, a pesquisa de materiais nesse campo tem aumentado. Na intenção de aprimorar tal aspecto, cerâmicas de alta resistência tais como alumina e zircônia têm sido propostas para obtenção de *abutments* de implantes. Implantes de alumina não são comumente achados, provavelmente pelo seu alto risco de fratura (Andreiotelli et al.⁸, 2009). A zircônia, por sua vez, sofre fenômeno alotrópico que possibilita como mecanismo de tenacificação por transformação de fases (Garvie et al.²⁶, 1975). A adição de óxidos estabilizadores, na composição da zircônia é feita para que a fase tetragonal da zircônia permaneça em condição metaestável, para que alie resistência mecânica e seja capaz de suportar mecanismos de degradação em baixa temperatura (Hisbergues et al.³⁴, 2009). A zircônia tetragonal policristalina estabilizada por ítria (Y-TZP) tem um destaque entre as cerâmicas dentais devido a algumas características mecânicas superiores às demais como: maior resistência à fratura e flexão, rigidez, baixa condutibilidade térmica e excelente resistência à corrosão (Kelly⁴² 1997; Denry, Kelly²¹, 2008). Além disso, comparada a materiais metálicos,

apresenta coloração mais próxima ao dente natural, tornando-a ideal para áreas de elevada exigência estética (Gomes et al.²⁹, 2008).

Outra característica dos *abutments* de zircônia que deve ser levada em consideração é a sua biocompatibilidade com o tecido gengival. A formação de uma barreira permucosa estável e sadia, que proteja os tecidos de microrganismos do ambiente intra-oral, depende da adesão e proliferação de fibroblastos e células epiteliais sobre a superfície dos *abutments* (Abrahamsson et al.², 2002; Rompen et al.⁷², 2006; Linkevicius, Apse⁵⁰, 2008). Para garantir uma barreira eficaz de tecido mole, a superfície do *abutment*, na área de transmucosa, deve ser biocompatível e favorecer a adesão e crescimento dos tecidos circundantes (Abrahamsson et al.¹, 1998). No âmbito biológico, estudos não têm indicado qualquer efeito negativo da zircônia sobre os tecidos mole e duro, e tem sido considerada tão biocompatível (Denry, Kelly²¹, 2008; Hisbergues et al.³⁴, 2009) quanto o titânio (Martins et al.⁵⁶, 2010). Um estudo realizado em cinco pacientes saudáveis comparou a reação inflamatória ao redor de cicatrizadores de implantes de titânio e de zircônia de mesmo diâmetro e comprimento. Após 6 meses da cirurgia de implante, a biópsia da gengiva circundante aos cicatrizadores demonstrou reação inflamatória de menor intensidade no tecido ao redor de cicatrizadores de zircônia (Degidi et al.²⁰, 2006). Ainda, já foi demonstrado que a zircônia proporciona menor potencial de adesão bacteriana do que a superfície do titânio. Em estudo *in situ*, espécimes de ZrO₂ adaptados em um dispositivo protético foram expostos à cavidade oral por 24 horas, sendo observado que os mesmos proporcionaram menor acúmulo de biofilme do que os espécimes de titânio. Desta forma, *abutments* de ZrO₂ poderiam oferecer o benefício adicional de baixo potencial de colonização bacteriana (Scarano et al.⁷⁵, 2004).

No que concerne a topografia do material, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a superfície de *abutments* de titânio lisa ou rugosa influencia tanto na orientação e a proliferação de células do tecido conjuntivo, bem como inibe a migração epitelial (Brunette¹⁶ 1988; Mustafa et al.⁶¹, 1998). Após a instalação do implante, na fase inicial celular, a adesão e a proliferação celular para os substratos podem variar de acordo com a rugosidade superficial e consequentemente influenciar também nos componentes do citoesqueleto celular. Teng et al.⁸⁰, em 2012 relataram que a morfologia celular pode ser afetada dependendo das condições da superfície de contato. Uma revisão de literatura conduzida por Rompen et al.⁷², em

2006 sobre o efeito das características dos materiais, da topografia de superfície e dos componentes dos implantes e conexões sobre a integração dos tecidos moles corroborou que a criação de uma barreira tecidual inicial efetiva, capaz de proteger biologicamente as estruturas peri-implantares, é de importância primordial e, esta barreira depende das características químicas e físicas dos materiais. O valor de 0,2 μm de rugosidade média mínima é o considerado como limiar necessário para manter o selamento entre células epiteliais e superfície, além da estabilidade do tecido mole em *abutments* de implantes (Bollen et al.¹³, 1996; Mustafa et al.⁶², 2008). Estudo de Baharloo et al.¹¹, (2005) concluíram que superfícies ásperas diminuíam o crescimento e a proliferação das células epiteliais quando comparadas às superfícies polidas em um período de 28 dias. Os autores também salientaram que a força de adesão dessas células é maior em superfícies polidas quando comparadas com superfícies rugosas.

A literatura também mostra que a energia livre de superfície também é um aspecto que pode afetar a adesão celular. Tal aspecto pode ser importante na adsorção de proteínas, além de estar relacionado à adesão e proliferação celular (Jansen et al.⁴⁰, 1999; Rompen et al.⁷², 2006). Segundo Colvin et al.¹⁸, (1983), as superfícies hidrofóbicas tendem a diminuir a quantidade de proteínas capazes de aderir a superfície do substrato. Pesquisas in vivo e in vitro mostram que a rugosidade e textura da superfície pode ter repercussão sobre os eventos iniciais da cicatrização tendo influência na adesão, orientação, proliferação e metabolismo das células epiteliais e do tecido conjuntivo (Könönen et al.⁴⁷, 1992; Di Carmine et al.²², 2003) confirmando que a estrutura física do material também pode ter influência no selamento biológico (Räisänen et al.⁷⁰, 2000; Groessner-Schreiber et al.³⁰, 2003). No intuito de esclarecer a orientação de adesão em variados tipos celulares, Oakley e Brunette⁶⁴ (1995) observaram que as células se orientavam no sentido das microranuras que são encontradas na superfície do material. A resposta para essa questão não é comprovada mas há uma sugestão de que aconteça um fenômeno denominado contato guiado que propõe que haja um contato inicial entre células e substrato através de extensões celulares em escala nanométrica (Meyle et al.⁵⁸, 1994). Matsuzaka et al.⁵⁷, (2003) confirmaram o comportamento por "contato guiado" de células mostrando que as posições das células são aleatórias em uma superfície lisa, diferente do que acontece em uma superfície rugosa, onde vão preferir se alinhar com a direção do sulco.

Posteriormente a adesão inicial, ocorreria um aumento da ligação entre elas que sucedia um espalhamento seguido por migração celular pela superfície do substrato. Portanto, a orientação e a morfologia das células estão diretamente relacionadas à rugosidade superficial do material sendo capaz de aumentar a estabilidade e aderência celular (Jansen et al.⁴⁰, 1999). As mudanças físicas da superfície alteram os sítios ligantes das mesmas que, por sua vez, irão interagir com os receptores celulares. Dessa maneira, as características físicas como energia livre de superfície e rugosidade superficial, bem como as propriedades químicas do material, têm a capacidade de influenciar a adesão de células epiteliais e mesenquimais (Sardin et al.⁷⁴, 2004; Teng et al.⁸⁰, 2012). Outra questão importante sobre a rugosidade da superfície dos *abutments* é a possível invasão bacteriana. Quirynen et al.⁶⁹, (1990) afirmaram que superfícies rugosas facilitam a adesão e formação de biofilme bacteriano. Para galgar esse entrave, Kloss et al.⁴⁴, (2011) sugeriram que a superfície do *abutment* deveria ser polida e assim, favorecer a adesão das células epiteliais gengivais.

Glauser et al.²⁸, (2005) fizeram análise dos tecidos duro e mole peri-implantares com diferentes características de superfície. Foi observado que o epitélio juncional formado estabeleceu a ligação com a superfície do implante, enquanto que as fibras colágenas e fibroblastos da vedação do tecido conjuntivo foram orientados paralelamente ao implante. A inserção epitelial foi menor nas superfícies oxidadas (1,6 mm) e condicionadas (1,4 mm) em comparação com as superfícies polidas (2,9 mm). Uma relação inversa ocorreu com a vedação do tecido conjuntivo, os mini-implantes oxidados (2,2 mm) e condicionados (2,6 mm) exibiram uma maior zona de vedação quando comparados aos usinados (0,7 mm). A fixação epitelial foi maior nas superfícies oxidadas e ácido-tratadas em comparação com as usinadas, demonstrando uma maior zona de vedação do tecido conjuntivo para estas superfícies. Assim, as propriedades da superfície de *abutment*, dentre as quais: a biocompatibilidade com tecidos mole e duro, topografia da superfície do *abutment* e a energia livre de superfície são peças-chave, já que direcionam o crescimento das células do tecido conjuntivo.

Linkevicius e Apse⁵⁰ (2008), por meio de uma revisão, analisaram os estudos disponíveis que discutiam a estabilidade dos tecidos peri-implantares sobre *abutments* de titânio em comparação com *abutments* de zircônia. Essa revisão abrangiu nove artigos: 3 estudos em animais, 2 estudos em humanos e 4 estudos

clínicos. Verificaram que *abutments* de titânio geraram um nível similar de osso quando comparado com *abutments* de zircônia. O comportamento histológico do titânio e zircônia em animais foi semelhante tanto em tecido mole quanto em tecido duro. Porém, em material histológico humano, os *abutments* de zircônia evidenciaram um melhor desempenho em mucosa que o titânio. Nakamura et al.⁶³, em 2010, realizaram uma revisão sistemática e corroboram que a zircônia é mais adequada para fabricação de *abutment* quando comparada ao titânio, já que a altura dos tecidos moles peri-implantares ao redor da zircônia mostraram superioridade quando comparadas ao metal. Estudo recente (Lops et al.⁵², 2015) comparou a profundidade de sondagem de bolsa ao redor de *abutments* de zircônia e titânio e demonstraram não haver diferença significativa entre os materiais. A respeito da perda do nível ósseo marginal muitos estudos concordam em não haver diferença entre o uso de *abutments* de zircônia e titânio (Hosseini et al.³⁷, 2011; Lops et al.⁵², 2015; Payer⁶⁶ 2015).

Na década de 60, Hench et al.³² (1971) desenvolveram o primeiro silicato do sistema quaternário $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ denominado Bioglass 45S5. Tal material apresentava significativa bioatividade, porém suas características mecânicas limitaram o seu emprego em aplicações que exigiam grandes esforços mecânicos (Hench³³ 2006). O biomaterial 45S5 é capaz de induzir a formação de uma camada de hidroxicarbonato apatita biologicamente ativa (HCA) quando justaposto ao osso. Tal camada é similar química e estruturalmente à fase mineral do osso (Kokubo⁴⁶ 1991). O Biosilicato® é um biovidro semelhante ao 45S5, porém apresenta melhores propriedades mecânicas. Sua composição é 23.75Na₂O-23.75CaO-48.5SiO₂-4P₂O₅ (% em peso). Na forma particulada não apresenta arestas cortantes e, na forma monolítica, é mais tenaz e possui melhor usinabilidade (Siqueira, Zanotto⁷⁶ 2011). De acordo com Crovace et al.¹⁹, (2016), o Biosilicato® apresenta a maior bioatividade e módulo de elasticidade de 60 a 80 GPa, cujo valor é o mais próximo do osso cortical humano (~20 GPa) dentre os biovidros disponíveis comercialmente, além de possuir cristalinidade próximo a 100%. Peitl et al.⁶⁷, (2001), mostraram que o valor da resistência a flexão pode alcançar 210 MPa, que é um valor similar ao encontrado no Cerabone (215 MPa) que apresenta o melhor desempenho mecânico do mercado. Além disso, a resistência a fratura também teve aumento cerca de 60%. A maioria dos estudos disponíveis hoje sobre o Biosilicato® salientam a capacidade desse biovidro em formar uma camada de hidroxicarbonato apatita, quando em contato

com tecido ósseo vivo e fluidos corporais (Moura et al.⁶⁰, 2007; Roriz et al.⁷³, 2010). Esta camada promove uma forte união entre biomaterial e tecido e isso acelera o processo de regeneração óssea devido à propriedade osteocondutiva e osteoindutiva do biovidro. Outra característica dos biovidros que é abordada na literatura é a atividade antimicrobiana desses materiais (Stoor et al.⁷⁷, 1998; Allan et al.^{5,6}, 2001 e 2002). Os autores sugerem que essa propriedade está relacionada com condições específicas do biovidro utilizado e de mudanças no meio através da dissolução de íons, como aumento do pH e da pressão osmótica. Martins et al.⁵⁵, (2011) confirmaram a atividade antimicrobiana do Biosilicato® contra uma série de microrganismos orais patogênicos.

Sabe-se que a maior parte das pesquisas na área da implantodontia é voltada para a otimização da osseointegração, sendo as pesquisas direcionadas para o aperfeiçoamento da interface entre tecidos moles e *abutments* relativamente limitadas. Diante do que foi exposto, a presente pesquisa visou recobrir a superfície da zircônia com um biovidro Biosilicato® e caracterizar a superfície dos espécimes avaliando: rugosidade superficial, ângulo de contato, energia livre de superfície, alteração de cor. As propriedades biológicas como proliferação, morfologia, migração e síntese de colágeno por uma linhagem de fibroblastos de gengiva foram avaliadas com o objetivo de verificar a bioatividade da superfície da Zr modificada com BS.

3 Proposição

Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi recobrir a superfície da zircônia com um biovidro Biosilicato®, caracterizar a superfície e avaliar propriedades biológicas.

Objetivos específicos

- 1- Avaliar a efetividade do recobrimento da superfície da zircônia com Biosilicato® analisando possíveis veículos;
- 2- Avaliar a rugosidade superficial, ângulo de contato, energia livre de superfície e alteração de cor dos espécimes de zircônia modificados pelo recobrimento do referido biomaterial;
- 3- Avaliar a proliferação, morfologia migração e síntese de colágeno de fibroblastos de camundongo L929 cultivados sobre os espécimes de zircônia modificados com Biosilicato®.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Fase 1: Avaliação da efetividade do recobrimento da superfície da zircônia com Biosilicato®.

4.1.1 Obtenção dos espécimes de zircônia.

Blocos de zircônia (Vita InCeram for Lab) foram usinados em forma de cilindros e o corte dos espécimes em formato de discos procedeu-se em cortadora de precisão (Isomet 1000). Após o corte, os espécimes foram lixados com lixas d'água de granulação 2000 (3M, Sumaré, São Paulo, Brasil) até a espessura de 2,0 mm. Uma marcação foi feita com ponta diamantada na superfície onde não haveria aplicação do material para melhor identificação da face tratada. O protocolo de limpeza para remoção de detritos foi realizado em 3 ciclos de 5 minutos em ultrassom (Cleaner 1440D, ODONTOBRAS, Ribeirão Preto, Brazil) em água destilada. Após secagem por 24h em estufa a 50°C (Orion 515, FANEM, Guarulhos, Brazil), os espécimes foram submetidos ao processo de sinterização em forno específico (Sirona inFire HTC speed, Bensheim, Germany) respeitando o ciclo de acordo com o fabricante da zircônia.

4.1.2 Seleção do veículo para recobrimento do biovidro Biosilicato® sobre a superfície da zircônia.

Foram testados diferentes veículos na tentativa de recobrir a superfície da zirconia com o pó de Biosilicato® (BS). O tamanho da partícula de BS variava entre 30 a 60µm. Para haver um recobrimento de 100% na superfície da amostra de zircônia e analisar o padrão de cobertura, a proporção inicial estabelecida entre pó e veículo foi de 60 mg/mL. A Tabela 1 exhibe os veículos testados.

Tabela 1 - Grupos para determinação de veículo apropriado para o recobrimento da zircônia com o Biosilicato®.

Grupo	Veículo
Controle	-
G I	Álcool isopropílico e água destilada
G II	Álcool isopropílico e verniz de acetato
G III	Acetona e verniz de acetate
G IV	Água destilada e verniz de acetato
G V	Líquido de glaze
G VI	Primer de silano
G VII	Hipromelose de baixa de viscosidade (60HD3) Sheffcell
G VIII	Hipromelose de alta viscosidade (75HD 100CR) Sheffcell

Fonte: Elaboração própria.

A partir dos resultados obtidos, o veículo selecionado foi álcool isopropílico/água destilada, por apresentar fácil manipulação e promover um recobrimento mais homogêneo da superfície de Zr com microcristais de BS.

4.1.3 Recobrimento do Biosilicato® sobre a superfície da zircônia.

Os espécimes de zircônia apresentavam 7,2 mm de diâmetro e 1,5 mm de espessura após a sinterização. Foi aplicado 20 µL de uma suspensão obtida através do veículo e o pó do BS (partículas de 30 a 60 µm) sobre a superfície dos espécimes. Em seguida, os espécimes foram aquecidos a uma temperatura de 1100°C por 20 minutos, a fim de promover o recobrimento do BS sobre superfície da zircônia. Levando-se em consideração estudos piloto prévios e o estudo do Kido et al.⁴³, (2013), em que foi observado que a concentração de 100% de BS não promoveu diferença na proliferação de fibroblastos L929 e onde as menores concentrações de BS foram mais efetivas para resposta biológica positiva, para as fases subsequentes foi utilizada a proporção de 6 mg/mL que corresponde a 10% do total utilizado para recobrimento total dos espécimes de Zr.

4.1.4 Análise da morfologia superficial e identificação do biomaterial sobre os espécimes.

A morfologia superficial dos espécimes foi avaliada por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV; JEOL JMS-6610V Scanning Microscope, Tóquio, Japão) realizado com resolução de imagem: 512 por 384, voltagem 12kV e aumento

menor de 140x e maior de 4500x (n=2), sendo a presença do BS analisada por meio de Espectrometria de Energia Dispersiva de Raio-X (EDX), para identificação dos elementos químicos presentes na superfície dos espécimes.

4.2 Fase 2: Caracterização da superfície da zircônia contendo Biosilicato®.

4.2.1 Avaliação da rugosidade superficial.

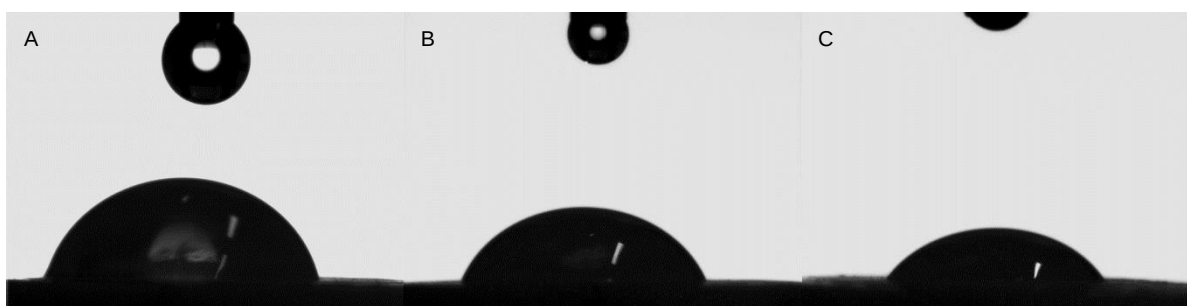
A rugosidade superficial (n = 6) foi analisada através de Microscópio Óptico Confocal (LEXT 3D Measuring Laser Microscope OLS4100, Olympus, Massachusetts, EUA) com precisão de medição $\pm 2\%$, resolução de escala 0,8 nm, movimento de resolução 10 nm, repetibilidade 50x: $n-1=0.012 \mu\text{m}$, precisão $0.2+L/100 \mu\text{m}$. Para isto, 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 caminho de medição. Foram feitas imagens em 2D com 2130x de aumento e 3D com 110x de aumento, aproximadamente. Através da imagem virtual obtida pelo LED do microscópio, foram traçadas 3 linhas perpendiculares em relação as marcas de polimento e uma média foi obtida para cada amostra. Os grupos foram divididos em: Zr e Zr+BS após o recobrimento com o veículo selecionado na Fase 1.

4.2.2. Medida do ângulo de contato e energia livre de superfície (molhabilidade).

A análise do ângulo de contato e energia livre de superfície (n=6) foi verificada no aparelho Goniômetro (Goniômetro Optical Contact Angle Measurements SCA20 - DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt, Baden-Württemberg, Alemanha) do Instituto de Química de Araraquara-UNESP. Os grupos foram divididos em: Zr e Zr+BS após o recobrimento com o veículo selecionado na Fase 1. A energia livre de superfície (ELS) é uma medida obtida a partir de medidas de ângulo de contato utilizando líquidos com polaridades diferentes. No presente estudo foram utilizados: água destilada, etilenoglicol e diiodometano. Os espécimes foram armazenados em estufa (FANEM, São Paulo, Brasil) por 24 horas, para secagem completa e com 1 hora de antecedência das mensurações os espécimes foram acondicionados em placa de 24 poços à temperatura ambiente, devidamente protegida com parafilme para evitar umidade do meio. Todos os espécimes foram limpos antes dos testes

com álcool 70 para remover qualquer resíduo na superfície dos mesmos. Após a secagem com papel absorvente procedeu-se o ensaio. Medidas dos ângulos de contato estáticos usando o método da gota sésil foram registradas e analisadas à temperatura ambiente através do software SCA20. As gotas de cada líquido possuíam o mesmo volume: água destilada 17 μL , etilenoglicol 17 μL e diiodometano 3 μL , que era o valor mínimo suportado pelo equipamento e seringa utilizados. Imediatamente após o contato da gota com a superfície do disco cronometrava-se 30 segundos para estabilização e interação do líquido com a superfície. Três medidas foram obtidas em cada espécime (Figura 1). 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-Young.

Figura 1 – Gota para mensuração do ângulo de contato



Gota para mensuração do ângulo de contato em espécimes após o tratamento com BS. Líquidos utilizados e suas respectivas polaridades: A – Água (52,5); B – Etilenoglicol (19); C – Diiodometano (2,6).

Fonte: Elaboração própria.

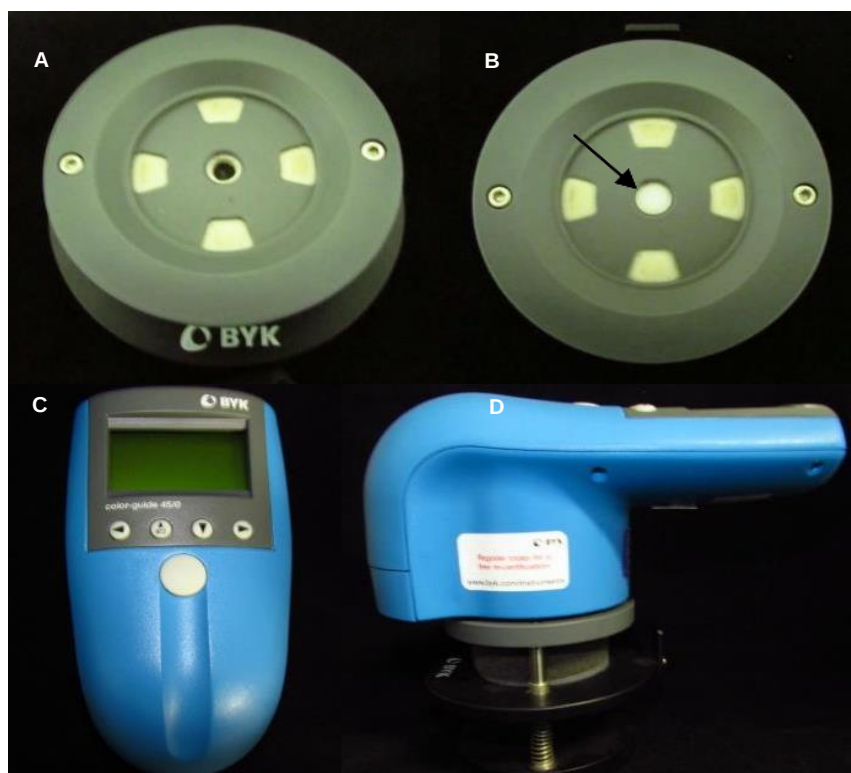
Os valores das três medidas obtidas foram inseridos no software SCA20 para o cálculo da energia livre de superfície por meio do conceito de componentes polares e dispersão com o método de OWRK (Owens–Wendt–Rabel–Kaelble).

4.2.3 Análise da alteração de cor.

A análise da alteração de cor dos espécimes foi realizada segundo o sistema CIE $L^*a^*b^*$ estabelecido pela Comissão Internationale de l'Eclairage – CIE (Comissão Internacional sobre Iluminação). De acordo com esta escala de cor, a variável L^* é a medida do brilho do objeto e é quantificada em uma escala onde o preto apresenta um valor de L^* igual a zero e a luz totalmente refletida um valor de

L* igual a 100. A coordenada a* é a medida da quantidade de vermelho (+a*) e verde (-a*); já a coordenada b* representa a quantidade de amarelo (+ b*) e azul (- b*). Para tanto, foi utilizado um Espectrofotômetro de Reflexão Ultravioleta Visível portátil (Color Guide, BYK Gardner GmbH Geretsried, Alemanha) com comprimento de onda variando de 400 nm a 700 nm, iluminação padrão D65 e ângulo de iluminação/observação 45/0°. Os espécimes foram posicionados de forma padronizada em uma matriz de silicone branca adaptada a um porta-amostra, sendo o espectrofotômetro posicionado sobre o conjunto. Os grupos foram divididos em: Zr e Zr+BS. Foram realizadas 3 leituras em cada espécime antes (baseline) e após o tratamento térmico a 1100°C, obtendo-se uma média. A alteração total de cor foi obtida a partir da seguinte equação: $\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$. Todos os procedimentos empregados para análise da alteração de cor estão descritos na Figura 2.

Figura 2 – Representação da análise da alteração de cor dos espécimes de zircônia.



Representação da análise da alteração de cor dos espécimes de zircônia. A – Matriz de silicone com abertura central adaptada ao porta-amostra. B –Espécime de zircônia (seta) adaptado na matriz de silicone. C – Espectrofotômetro. D – Espectrofotômetro posicionado sobre o espécime para realização da leitura.

Fonte: Elaboração própria.

4.3 Fase 3: Avaliação da bioatividade da superfície de zircônia tratada com Biosilicato® sobre fibroblastos in vitro.

Para esta análise, a forma do recobrimento com Biosilicato® sobre a superfície da zircônia foi realizada da mesma forma descrita na Fase 1. Os grupos experimentais estão descritos na Tabela 2. Para todos os protocolos experimentais, dois experimentos independentes foram realizados.

Tabela 2 – Grupos experimentais a serem analisados na Fase 3.

Grupos	Descrição
PS	Espécimes em formato de discos de poliestireno (controle 1)
Zr	Espécimes em formato de discos de zirconia (controle 2)
Zr+BS	Espécimes em formato de discos de zircônia submetidos ao recobrimento com Biosilicato® através do veículo selecionado na Fase 1

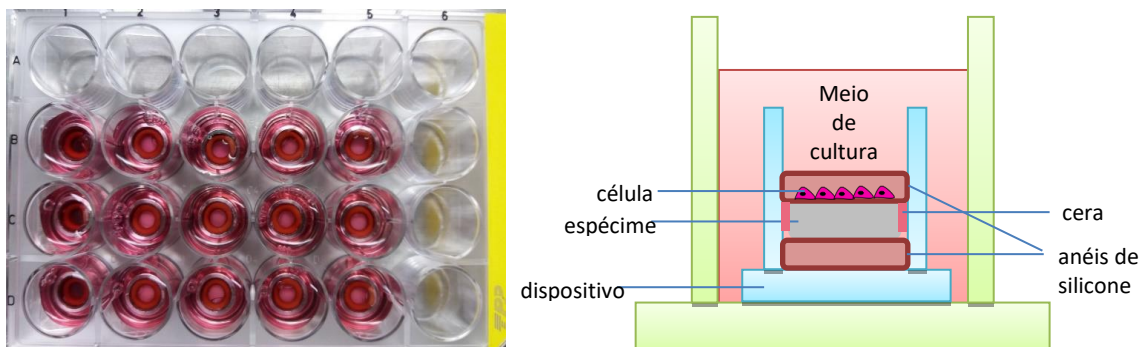
Fonte: Elaboração própria.

Para a realização dessa etapa foram utilizadas células de linhagem fibroblástica L929 (ECACC: European Collection of Authenticated Cell Cultures, General Cell Collection 04102001). As células foram cultivadas em garrafas de cultura celular de 75 cm² contendo meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; suplementado com 100 IU/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 2 mmol/L de glutamina; GIBCO) suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO, Grand Island, NY, EUA). Em seguida, as células foram mantidas em incubadora a 37°C e 5% de CO₂. As células foram sub-cultivadas até que se obtivesse a monocamada com confluência de 80%, atingindo assim o número de células adequado para a execução do estudo.

4.3.1 Protocolo experimental.

Os espécimes de PS, Zr e Zr+BS foram adaptados em uma matriz metálica, entre dois anéis de silicone, sendo realizado um vedamento lateral com cera 7 para permitir o plantio das células de forma padronizada sobre a superfície dos materiais e acondicionados em placas de 24 poços para execução dos protocolos (Figura 3). Para realização da semeadura celular, uma gota de 20 µL da suspensão de células foi aplicada sobre a superfície dos materiais, sendo o conjunto incubado por 30 minutos a 37°C e 5% CO₂ para permitir a adesão inicial das células. Em seguida, os conjuntos foram complementados com 1 mL de meio de cultura, de acordo com cada protocolo experimental.

Figura 3 – Posicionamento dos espécimes na placa de 24 poços e esquema ilustrativo do espécime em um poço.



Fonte: Elaboração própria.

4.3.2 Avaliação da Proliferação Celular.

Para esta análise (n=6), 30.000 células foram semeadas sobre cada material. Decorridos 1, 3, 5 e 7 dias de cultivo em DMEM suplementado com 10% SFB (meio de cultura foi renovado a cada 48 horas), a proliferação celular foi avaliada por meio do teste de Alamar Blue (Life Technologies; Grand Island, NY, EUA). Para tanto, o meio de cultura foi substituído por 900 μ L de DMEM sem SFB, acrescido de 100 μ L de solução de Alamar Blue (10%), sendo o conjunto incubado por 3 horas a 37° C e 5% CO₂. Após este período, o sobrenadante foi transferido para placas de 96 compartimentos e analisado em leitor de fluorescência (540 nm excitação; 590 nm emissão) (Synergy H1, Biotek, Winooski, EUA). O grupo controle negativo foi considerado como 100% de viabilidade celular.

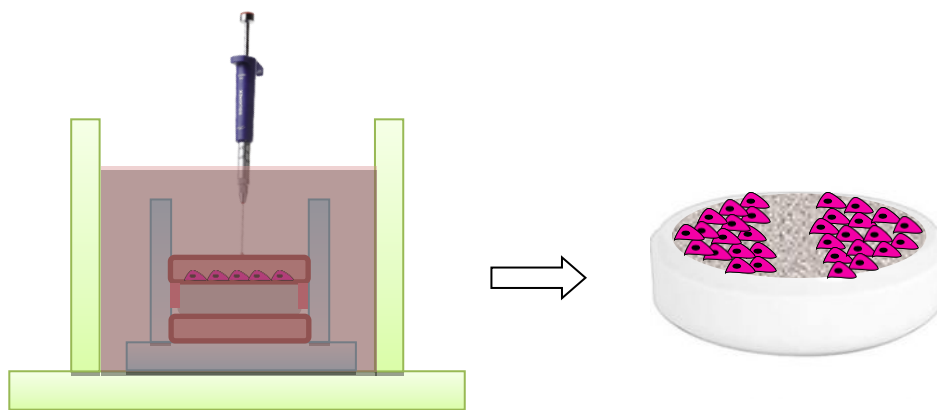
4.3.3 Avaliação da Morfologia Celular.

Esta análise foi realizada em microscópio eletrônico de varredura (MEV), sendo as células semeadas do modo descrito para o teste de proliferação celular. Em cada período de análise (n=2), as células foram fixadas em glutaraldeído tamponado a 2,5% a 25°C por 3h, pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% por 2h, submetidas à desidratação em soluções crescentes de etanol (30%,50%,70% ,90% [2x], 100% [2x]) por meia hora em cada solução e, por fim, à secagem química com HMDS (3 trocas de 20 min) em dessacador à temperatura ambiente. Os discos foram fixados em stubs metálicos e acondicionados em dessecador por 72h. Então, os stubs foram metalizados com ouro e analisados em MEV (JEOL-JMS-6610V Scanning Microscope, Tóquio, Japão).

4.3.4 Avaliação da Migração Celular.

O ensaio de Wound Healing (n=6) foi realizado para análise do padrão de migração das células sobre os materiais. Um total de 50.000 células foram semeadas em um padrão sobre cada material em DMEM com 10% de SFB. Após 24h de cultivo, as células da região central dos discos foram removidas com auxílio de ponteira de 1 mL, formando-se uma “ferida” (Figura 4). O meio de cultura foi substituído por 1 mL de DMEM com 10% de SFB, e o conjunto incubado por 24h, sendo em seguida as células fixadas em álcool 70% por 1h, lavadas com 1 mL de água deionizada e coradas com violeta cristal por 15 min, seguido de lavagem com água destilada. A imagem da região da ferida foi obtida por meio de lupa esterioscópica, sendo a área mensurada por meio do programa Image J. Neste ensaio, apenas os grupos Zr e Zr+BS foram avaliados.

Figura 4 – Ilustração demonstrando a confecção da “ferida” no espécime.



Fonte: Elaboração própria.

4.3.5 Avaliação da Síntese de colágeno.

Para esta análise (n=6), 30.000 células foram semeadas sobre cada material em DMEM sem SFB, sendo este conjunto incubado por 7 dias, sem realização de troca de meio. Passado este período, o meio de cultura foi coletado e armazenado a -20°C para posterior análise. Para tanto, 500 µL do meio de cultura em contato com as células foram transferidos para tubos contendo o mesmo volume da solução de Direct Red em ácido pícrico saturado (0,1%), sendo em seguida incubados por 1 hora sob agitação a 400 rpm em banho seco a 25° C. Os tubos foram então centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado e foram adicionados 300 µL de ácido clorídrico 0,01 M. Os tubos foram centrifugados novamente (12.000 rpm/10 min), o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 250

μL de hidróxido de sódio 0,5 M para solubilizar o material precipitado. Os espécimes foram submetidos à análise de absorvância em espectrofotômetro a 555 nm. A porcentagem de síntese de colágeno para cada amostra foi calculada baseada nos valores médios de absorvância do grupo controle negativo.

4.4 Análise Estatística

Para verificar a reprodutibilidade dos dados, os protocolos biológicos foram realizados em dois momentos independentes. Os dados de o ângulo de contato e a energia livre de superfície e rugosidade superficial tiveram distribuição normal de dados verificado pelo teste de Shapiro-Wilk e o teste estatístico aplicado foi o t-Student ($p < 0,05$) para amostras independentes. A análise da alteração de cor (ΔE) foi avaliada pela média de ΔE de todas as amostras e seria considerada insignificante se apresentasse valor abaixo de 3,7. Análises descritivas foram feitas para as imagens de MEV e identificação do Biosilicato® e elementos químicos presentes na superfície dos espécimes por meio de EDX. As análises da proliferação celular e síntese de colágeno foram feitas através de ANOVA e post hoc Tukey ($p < 0,05$), e a análise do ensaio de wound healing foi realizada pelo teste t-Student ($p < 0,05$).

5 RESULTADO

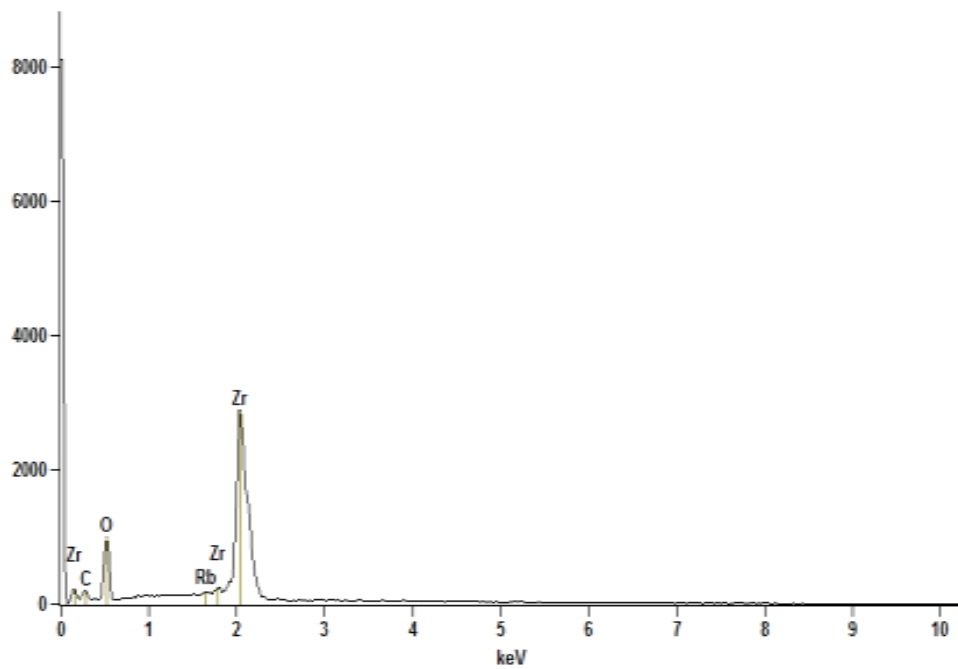
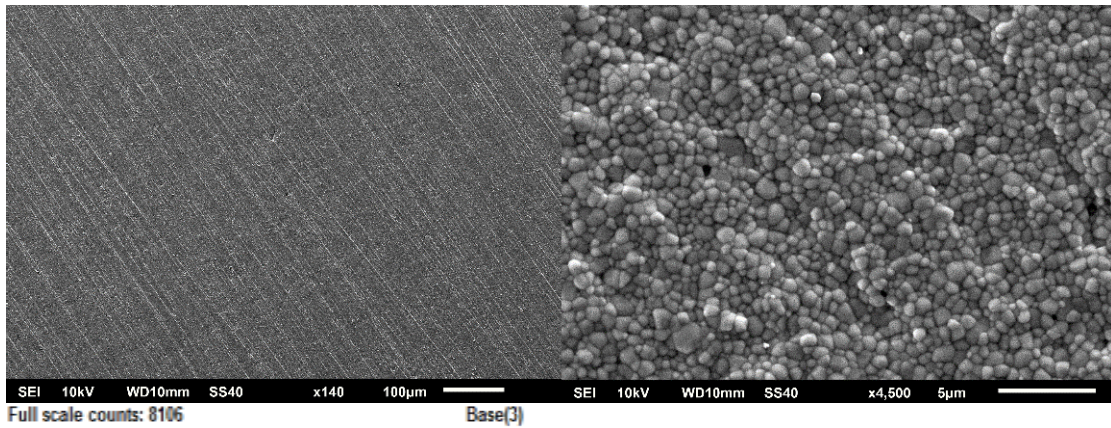
5.1 Fase 1: Avaliação da efetividade do recobrimento da superfície da zircônia com Biosilicato®.

Foram realizados uma série de estudos pilotos na tentativa de conseguir uma camada uniforme e bem distribuída de BS sobre a superfície dos espécimes. Em testes preliminares, os espécimes que tiveram na sua superfície a aplicação de HPMC nas duas viscosidades misturados ao pó do Biosilicato® resultaram ao final do processo térmico (1100°C por 20 min) na formação de uma camada heterogênea visível a olho nu e facilmente destacável. Logo, tais grupos foram excluídos dos demais testes.

Os demais veículos avaliados, resultaram na deposição de uma camada homogênea na superfície da zircônia, sendo os mesmos investigados sob análise minuciosa em MEV/EDX para verificação de elementos químicos na superfície alterada. As Figuras a seguir demonstram os resultados obtidos para a escolha do melhor veículo de acordo com a presença e a distribuição do biomaterial nos espécimes.

Grupo controle: Zircônia sem cobertura

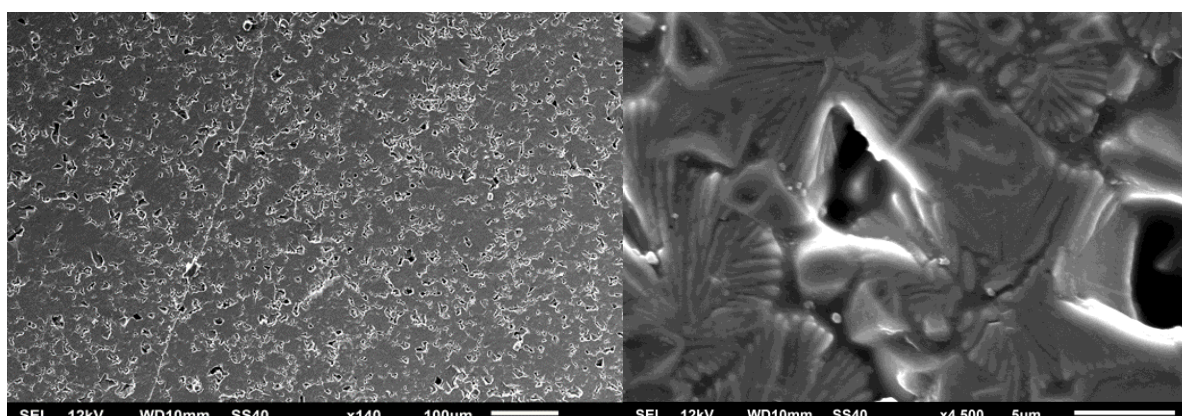
Figura 5 – MEV (140 e 4500x) Zircônia sem cobertura e EDX evidenciando a presença da Zr.



Fonte: Elaboração própria.

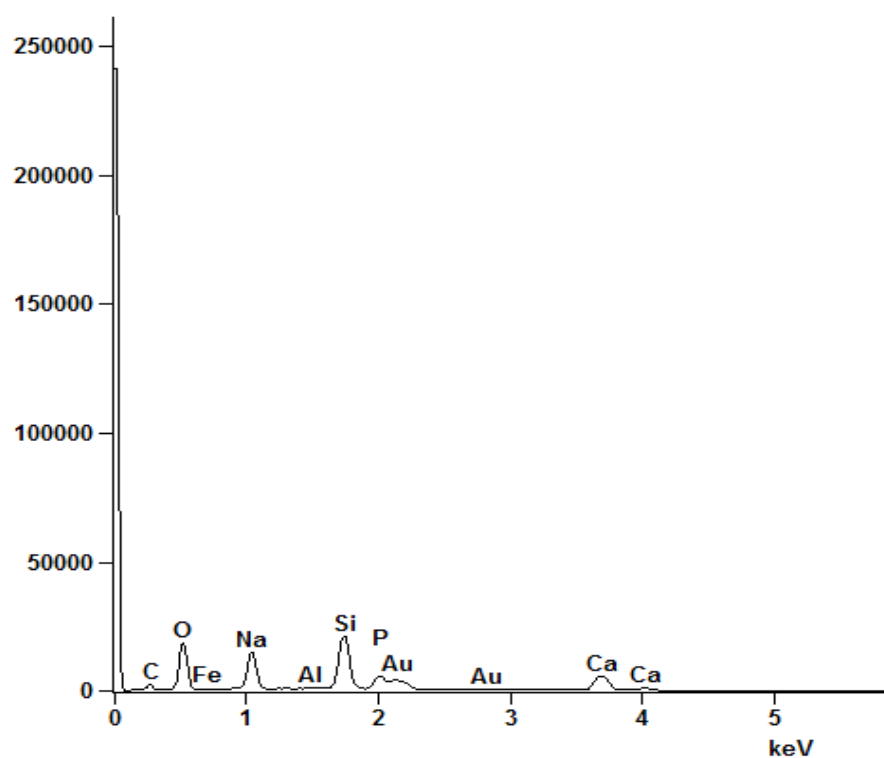
Grupo I: Álcool isopropílico e água destilada

Figura 6 – MEV (140 e 4500x). Álcool isopropílico e água destilada.



Full scale counts: 240910

Base(10)

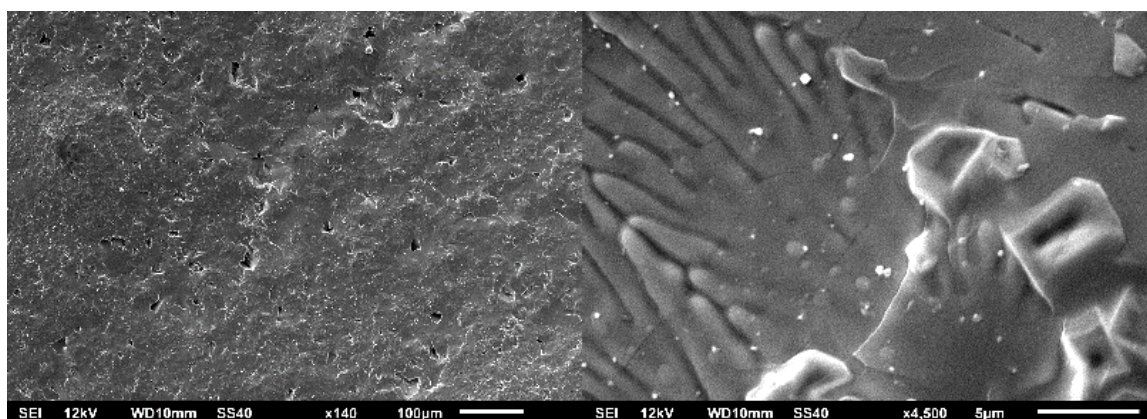


Recobrimento total do espécime e presença de cristais de BS. EDX aponta a presença de O, Na, Si e Ca.

Fonte: Elaboração própria.

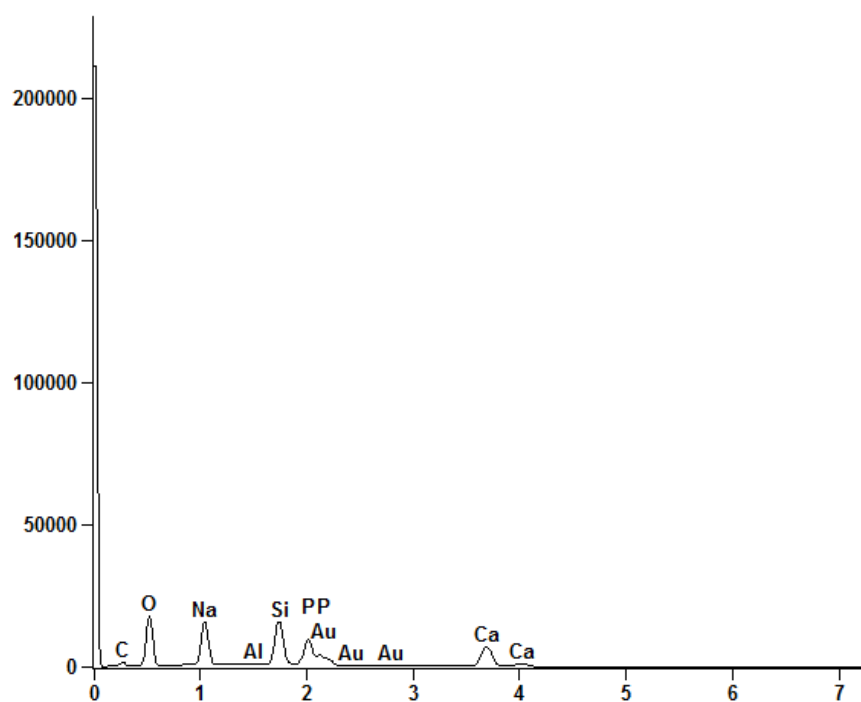
Grupo II: Álcool isopropílico e verniz de acetato

Figura 7 – MEV (140 e 4500x). Álcool isopropílico e verniz de acetato.



Full scale counts: 211039

Base(16)

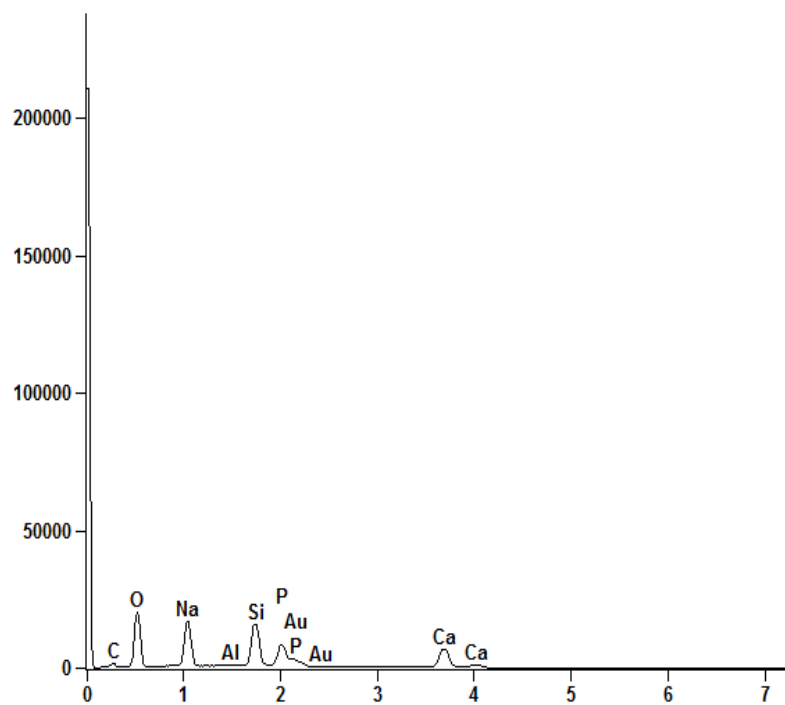
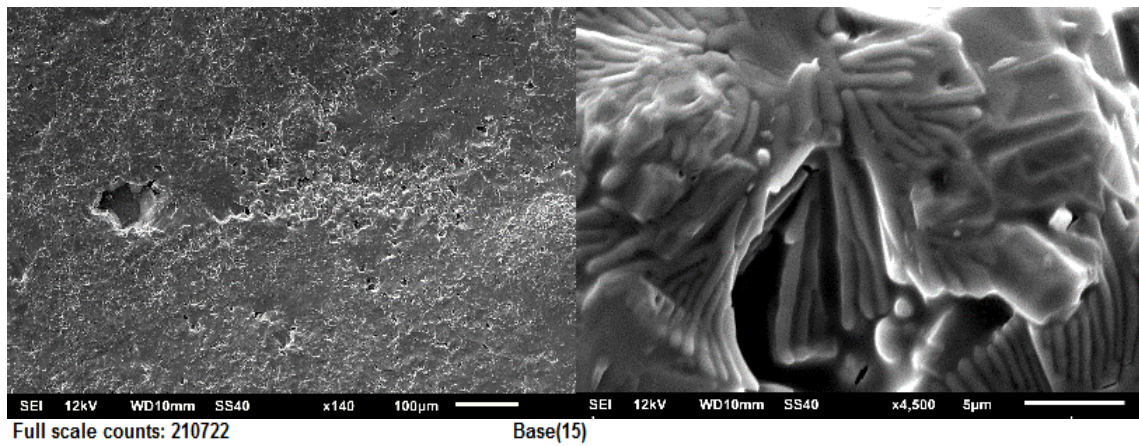


Recobrimento total do espécime e presença de cristais de BS. EDX aponta a presença de O, Na, Si e Ca.

Fonte: Elaboração própria.

Grupo III: Acetona e verniz de acetato

Figura 8 – MEV (140 e 4500x). Acetona e verniz de acetato.

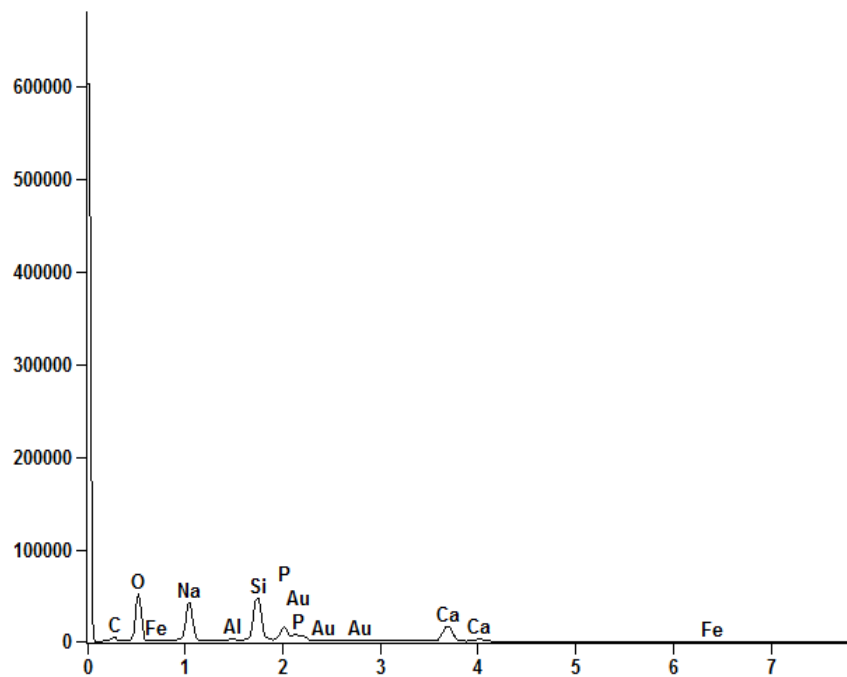
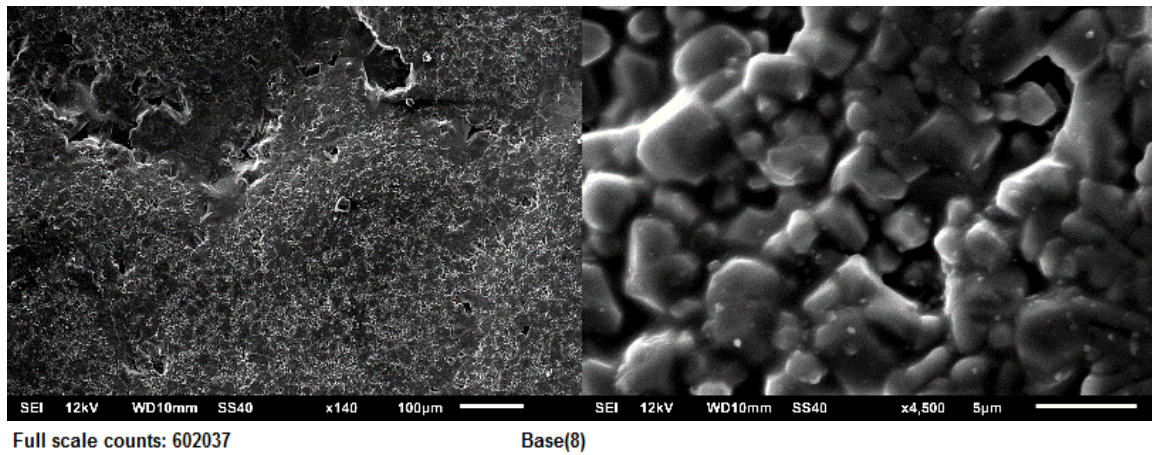


Recobrimento total do espécime e presença de cristais de BS. EDX aponta O, Na, Si e Ca.

Fonte: Elaboração própria.

Grupo IV: Água destilada e verniz de acetato

Figura 9 – MEV (140 e 4500x). Água destilada e verniz de acetato.

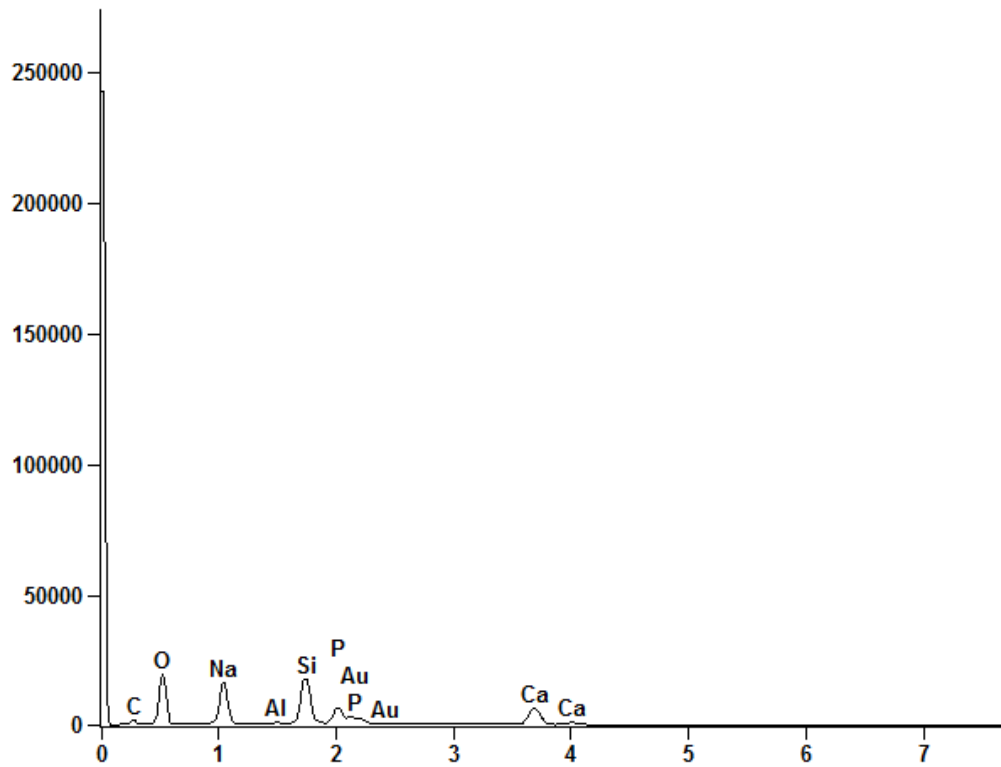
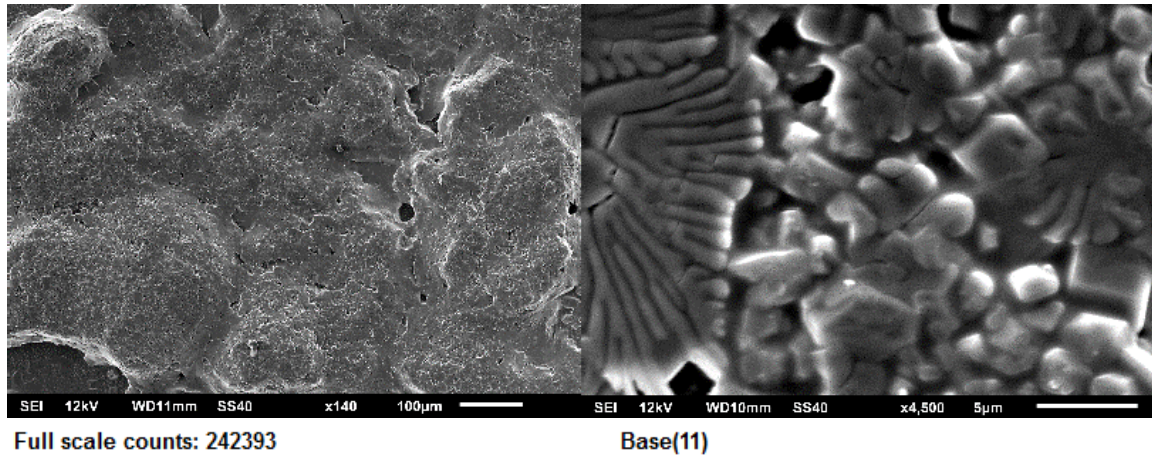


Recobrimento total do espécime e presença de cristais de BS. EDX aponta O, Na, Si e Ca.

Fonte: Elaboração própria.

Grupo V: Líquido de glaze

Figura 10 – MEV (140 e 4500x). Líquido de glaze.

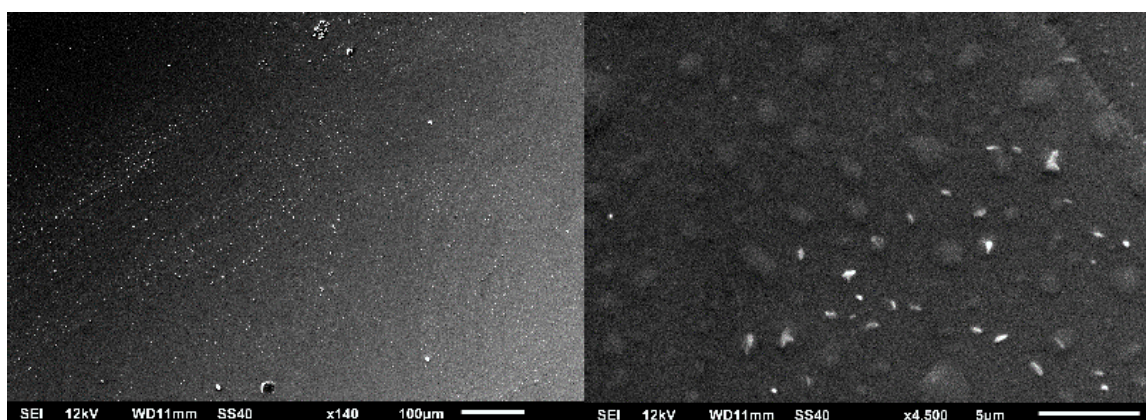


Recobrimento total do espécime e presença de cristais de BS. EDX aponta O, Na, Si e Ca.

Fonte: Elaboração própria.

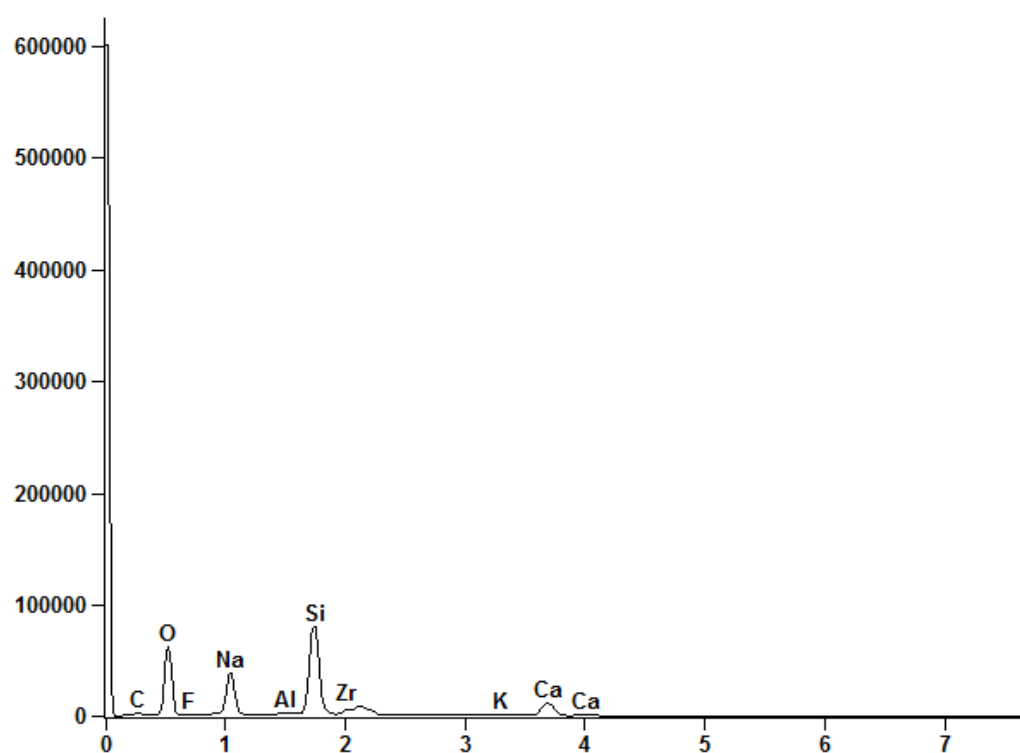
Grupo VI: Primer de silano

Figura 11 – MEV (140 e 4500x). Primer de silano.



Full scale counts: 600749

Base(9)



Ausência de recobrimento do espécime e presença de cristais de BS. EDX aponta O, Na, Si e Ca.

Fonte: Elaboração própria.

À excessão do G VI, em todos os grupos foi observada a presença de uma camada amorfa, similar a microcristais, recobrimdo a superfície de Zr submetida ao recobrimento com BS. A análise por EDX verificou que todos os grupos também apresentaram os elementos químicos que compõem o BS como o Si, Na, O e Ca. A imagem em menor aumento mostra que no grupo I houve um espalhamento mais homogêneo dos microcristais. Nos grupos II a V houve uma cobertura total, porém com falhas nas superfícies evidenciando a formação de aglomerados de BS ou a presença de depressões. Já em VI, foi observada uma superfície pobre de microcristais. De acordo com os resultados obtidos, e levando-se em consideração a facilidade técnica, o custo e a citocompatibilidade avaliada em estudo piloto prévio, no presente estudo optou-se pelo uso de álcool isopropílico + água destilada (G I) como veículo para o recobrimento com BS nos espécimes de zircônia.

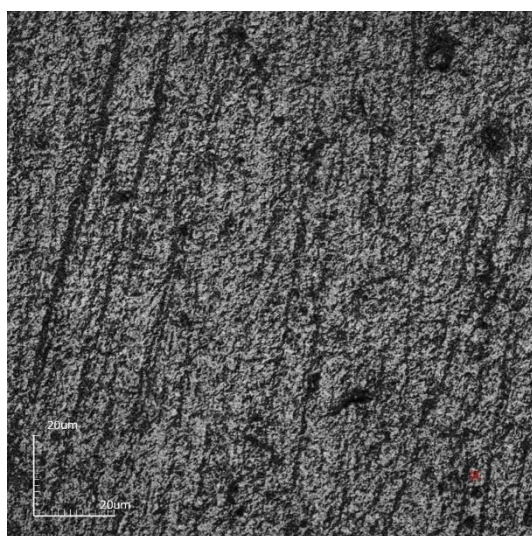
5.2 Fase 2: Caracterização da superfície da zircônia contendo Biosilicato®.

Para a avaliação da rugosidade superficial, ângulo de contato e energia livre de superfície e alteração de cor foram divididos em dois grupos: zircônia e zircônia + BS (n=6).

5.2.1 Rugosidade superficial.

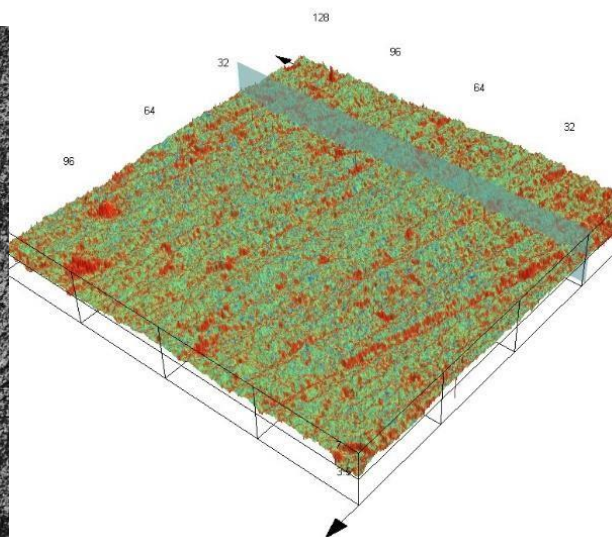
No corrente estudo verificou-se que a rugosidade média (Ra) dos espécimes de zircônia sem o biomaterial foi de 0,26 μm . A variação foi de 0,2 a 0,34 μm . Após a cobertura com o Biosilicato®, a rugosidade média passou a ser 64,79 μm variando entre 60,14 a 68,88 μm . Logo, verificou-se um aumento significativo na rugosidade superficial dos espécimes submetidos à aplicação do BS. Imagens de menor e maior (~110 e ~2130x) aumento obtidas em 3D e 2D evidenciaram o aspecto da superfície dos espécimes de Zr e dos espécimes Zr+BS (Figura 12).

Figura 12 – Imagens representativas da caracterização da superfície dos grupos Zr e Zr+BS

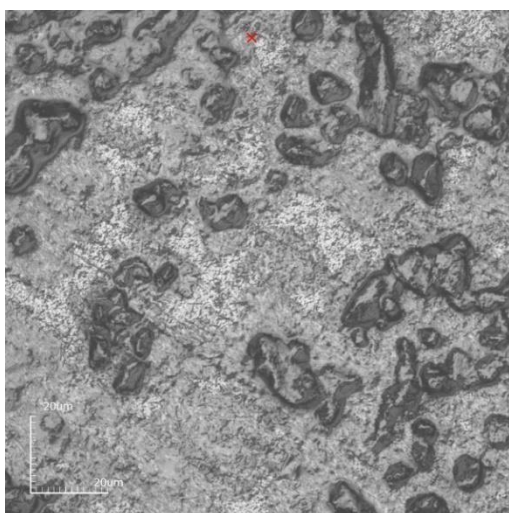


Zr

A

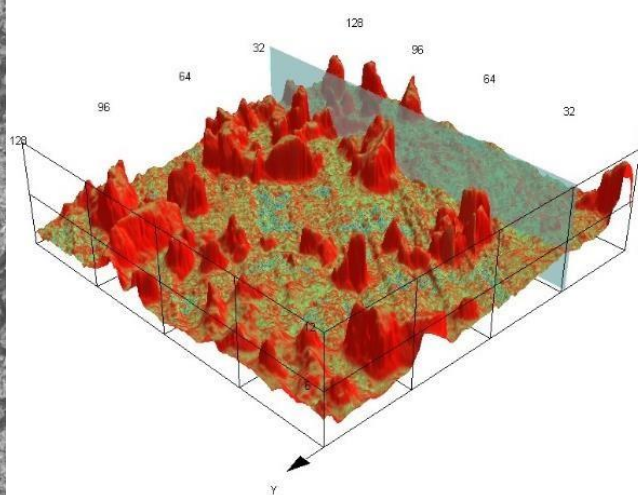


B



Zr + BS

C



D

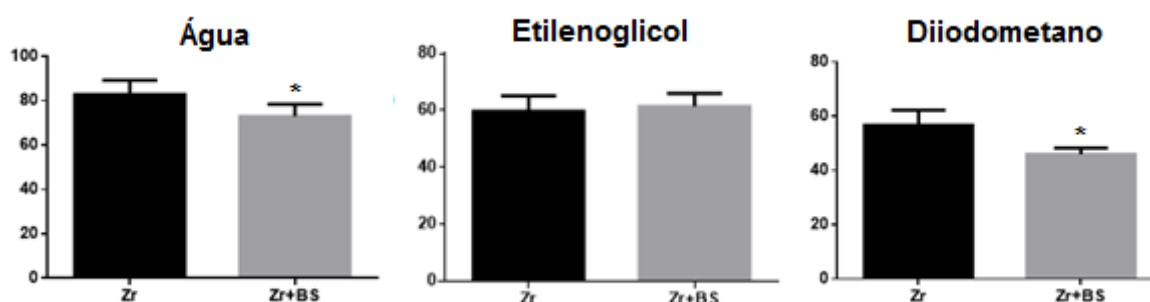
Imagens obtidas em microscópio confocal em 2D (A e C; ~2130x de aumento) e 3D (B e D; ~110x de aumento).

Fonte: Elaboração própria.

5.2.2 Ângulo de contato e energia livre de superfície.

A tensão superficial é determinada pelo cruzamento da reta na direção do eixo y. O valor referente a este cruzamento define o coeficiente linear da reta e portanto, a energia de livre de superfície, ou energia de Gibbs. Quanto maior a tensão superficial, maior será o valor desta energia. No presente estudo, a distribuição normal de dados permitiu a realização do teste *t* e para os líquidos água e diiodometano houve uma diminuição significativa estatisticamente do ângulo de contato. Já para o etilenoglicol houve um aumento do ângulo de contato significativo (Figura 13). Logo, pode-se inferir que para os líquidos água e diiodometano houve um melhor espalhamento após a aplicação do BS. Já para o etilenoglicol não houve diferença no espalhamento após a aplicação do BS.

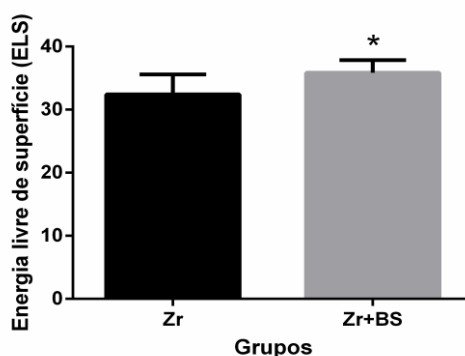
Figura 13 – Média e desvio padrão dos valores de ângulo de contato para cada grupo experimental (n=6, teste *t*, $p < 0,05$). *Indica diferença significativa entre os grupos.



Fonte: Elaboração própria.

A energia livre de superfície também aumentou significativamente dos espécimes de Zr em comparação com os Zr + BS (Figura 14).

Figura 14 – Média e desvio padrão dos valores de energia livre de superfície para cada grupo experimental (n=6, teste *t*, $p < 0,05$). *Indica diferença significativa entre os grupos.



Fonte: Elaboração própria.

A mudança de comportamento entre os líquidos utilizados após a aplicação do BS fez uma compensação na reta da ELS demonstrando que mesmo que o ângulo de contato possa ter mudado entre os líquidos utilizados, a ELS não sofreu alteração.

5.2.3 Alteração de cor (espectrofotômetro).

Os valores médios de L^* , a^* , b^* das amostras controle e com BS recobertos estão na Tabela 3. Os valores de ΔE variaram de 3,11 a 1,18, resultando no valor de $\Delta E_{\text{médio}} = 1,74$, o qual ficou abaixo do valor de 3,7, sendo a alteração de cor considerada clinicamente aceitável (Johnston, Kao⁴¹ 1989; Browning et al.¹⁵, 2009).

Tabela 3 – Os valores médios de L^* , a^* , b^* das amostras controle e com a cobertura do biovidro

	ΔL	Δa	Δb	ΔE
Zr	-0,12	0,06	0,02	1,62
Zr + BS	-0,82	-0,01	0,29	1,74

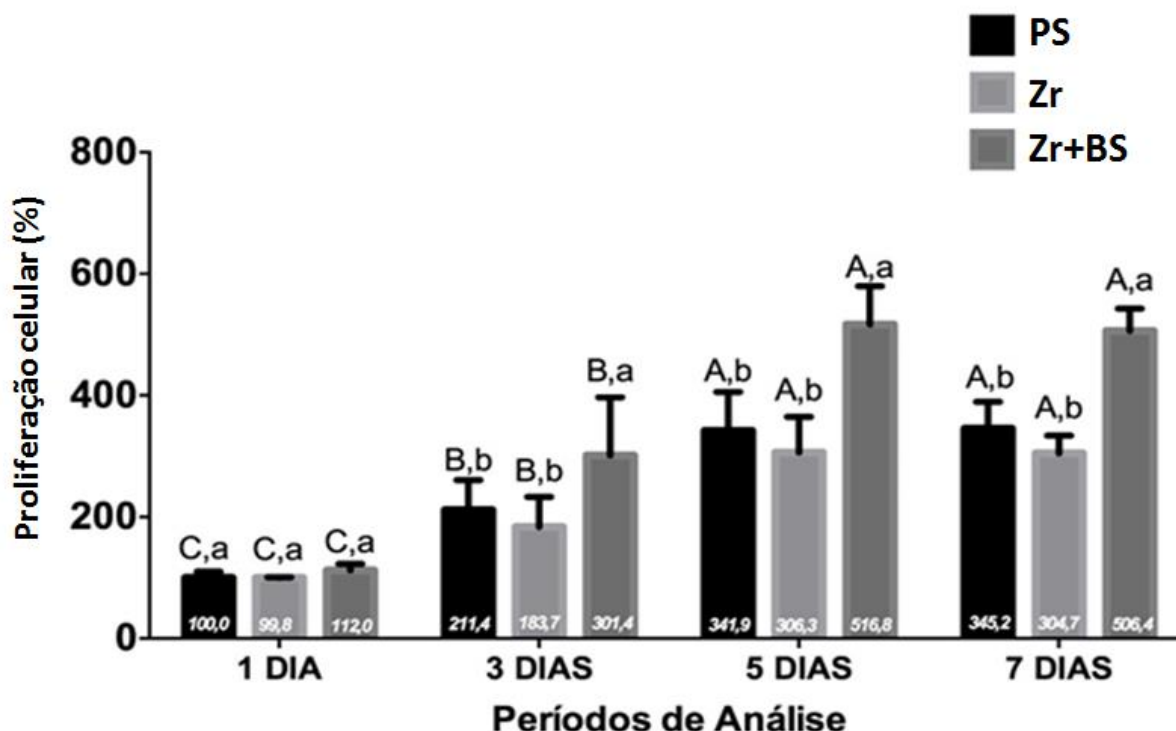
Fonte: Elaboração própria.

5.3 Fase 3: Avaliação da bioatividade da superfície de zircônia tratada com Biosilicato® sobre fibroblastos in vitro.

5.3.1 Proliferação celular.

De acordo com os resultados demonstrados na Figura 15, observou-se aumento significativo na porcentagem de proliferação das células L929 semeadas sobre os discos Zr+BS em comparação com os grupos Zr e PS nos períodos de 3, 5 e 7 dias, demonstrando um aumento da proliferação para o grupo que continha o BS recoberto.

Figura 15 – Média e desvio padrão dos valores de proliferação celular (%) pelo teste de Alamar Blue para cada grupo experimental nos diferentes períodos de análise (n = 6, testes: ANOVA e Tukey, $p < 0,05$). Diferentes letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os períodos de análise para cada grupo experimental. Letras minúsculas demonstram diferença significativa entre os grupos experimentais, dentro de cada período de análise.

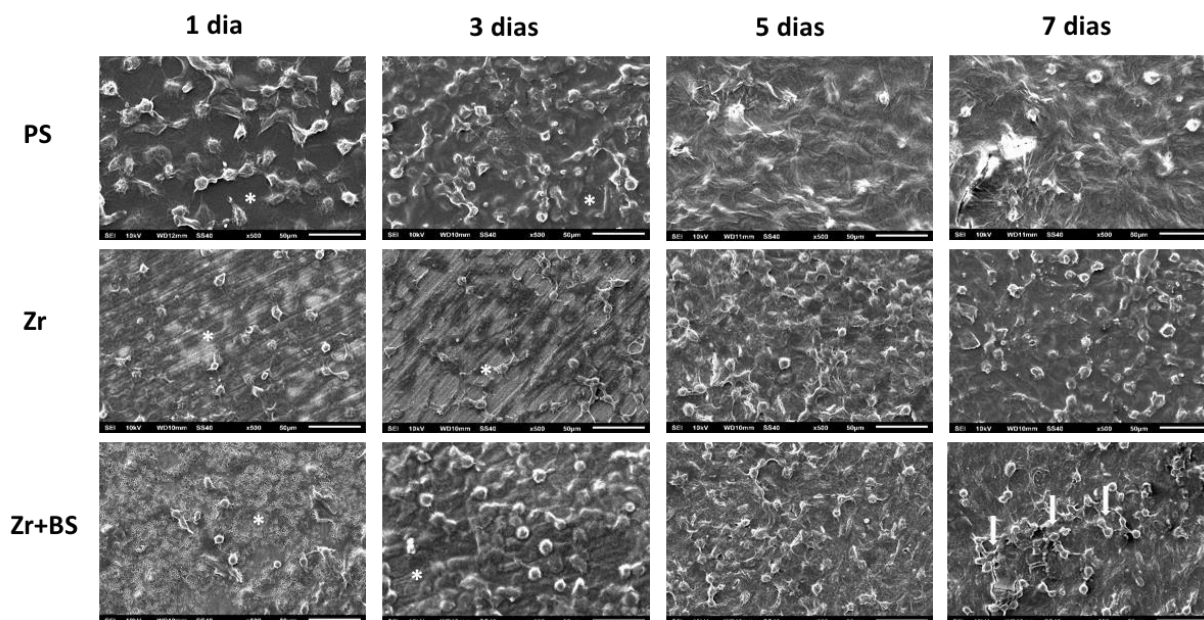


Fonte: Elaboração própria.

5.3.2 Morfologia Celular.

Imagens representativas da análise da morfologia celular em MEV estão demonstradas na Figura 16. Foi possível observar que as células L929 foram capazes de aderir sobre todos os substratos testados e proliferar ao longo do tempo. Um grande número de células recobrendo toda a superfície dos materiais foi observado nos períodos de 5 e 7 dias de cultivo celular, sendo que no período de 7 dias, um grande número de possíveis células em mitose foi observado no grupo Zr+BS em comparação com os demais grupos.

Figura 16 – MEV (500x). (*) Indica substrato sem células. Um grande número de células em possível processo de mitose pode ser detectado no grupo Zr+BS no período de 7 dias (setas).



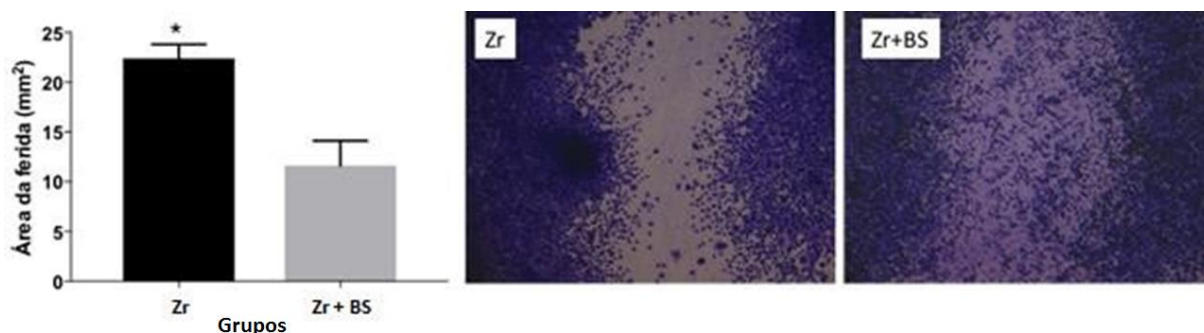
É possível observar células aderidas sobre as superfícies dos materiais em todos os períodos de análise, sendo estas completamente recobertas pelas células a partir do período de 5 dias. Morfologia similar foi observada entre os grupos em todos os períodos de análise.

Fonte: Elaboração própria.

5.3.3 Migração Celular.

Redução significativa na área da ferida foi observada no grupo Zr+BS em relação ao grupo Zr, demonstrando maior capacidade de migração das células L929 em contato com a superfície contendo BS. A Figura 17 demonstra o gráfico com os resultados numéricos, bem como imagens representativas da ferida em ambos os grupos, onde pode-se constatar um grande número de células na região da ferida no grupo Zr+BS em relação ao grupo Zr.

Figura 17 – Gráfico de barras e imagens representativas do ensaio de wound healing obtidas por lupa estereoscópica (50x). *Indica diferença entre os grupos. Teste t- Student ($p < 0,05$). $n=3$.

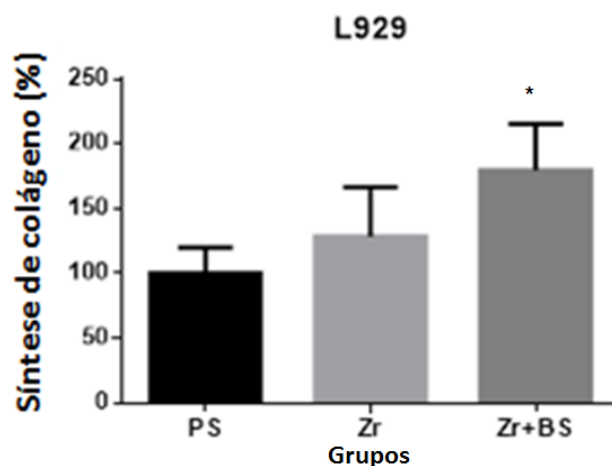


Fonte: Elaboração própria.

5.3.4 Síntese de colágeno.

Aumento significativo na síntese de colágeno foi observada para o grupo que continha o BS recoberto à superfície da zircônia aos 7 dias de cultivo celular em comparação com os demais grupos experimentais, corroborando com o achado da proliferação celular (Figura 18).

Figura 18 – Síntese de colágeno (Sirius Red) L929. *Indica diferença entre os grupos. ANOVA; Tukey ($p < 0,05$). $n=6$



Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

O sucesso de reabilitações orais através de implantes extrapola o processo de osseointegração e tenta aliar simultaneamente conceitos de forma e função. Este tipo de tratamento almeja não somente a integração de osso ao redor do implante, mas também requer tecido mole de qualidade para o selamento na interface mucosa/abutment. O selamento se faz importante para a manutenção da estética, além de impedir a invasão de bactérias na região peri-implantar. Tal selamento é conseguido por meio de uma barreira de proteção, denominada espaço biológico, entre o meio oral e região peri-implantar e ela destina-se a evitar a migração apical do epitélio juncional e prevenir a reabsorção óssea crestal (Welander et al.⁸³, 2008). As células constituintes da barreira podem ou não se aderir a superfície do *abutment* e isso depende de várias características do material, entre elas: a natureza química, rugosidade superficial e energia livre de superfície (Rompen et al.⁷², 2006).

Dentro deste contexto, o presente estudo propôs o recobrimento da zircônia com o Biosilicato®, caracterizando a superfície dos espécimes e avaliando as propriedades biológicas quando em contato com fibroblastos. O corrente estudo rejeitou a hipótese nula de que não houve diferença estatisticamente significativa nos quesitos físicos de rugosidade superficial, energia livre de superfície, ângulo de contato (para dois líquidos utilizados) e aceita para o aspecto de alteração de cor dos espécimes. No que concerne ao comportamento das células L929, em superfícies com e sem a cobertura do biomaterial, a hipótese nula foi rejeitada para todos os ensaios realizados.

A rugosidade superficial de um material é de fundamental importância para os eventos iniciais da cicatrização (fixação, orientação, proliferação e metabolismo). No que concerne a rugosidade superficial e a adesão celular, alguns autores defendem que superfícies lisas aumentam a proliferação celular (Anselme et al.⁹, 2000), já outros autores discordam (Bächle et al.¹⁰, 2004). Este tema é muito controverso na literatura, visto que cada linhagem celular responde de maneira diferente a este estímulo. Os dados atuais mantêm a ideia de que a adesão de fibroblastos a superfícies com valor de Ra menor a 0,1 μm é mais intensa do que nas superfícies com Ra superior a esse valor. Huang et al.³⁸, (2004), estudaram o comportamento de osteoblastos em superfície de titânio com diferentes rugosidades e encontraram que o valor de Ra ideal para esta célula é de 0,15 μm . Para Takamori et al.⁷⁹, (2008), a

rugosidade superficial ideal (Ra) para os fibroblastos é relatada na faixa entre 0,1 μm . Flamant et al.²⁴, (2016), alteraram a superfície da zircônia através de condicionamento ácido e estudaram o fenótipo e morfologia de células-tronco. Os autores relataram que a micro-topografia é necessária para obter o controle ótimo sobre esses aspectos, e possivelmente consegue esclarecer por que em muitas pesquisas a micro-topografia tem relação direta com respostas celulares. Gentile et al.²⁷, (2010) reportaram que superfície recoberta com silício e valor de Ra entre 10-45 nm resultou em adesão e proliferação de 4 diferentes tipos de células. Heinrich et al.³¹, (2008) mostraram que a rugosidade superficial criada por irradiação a laser aumentou a adesão de fibroblastos. Zhu et al.⁸⁵, (2004) afirmaram que mudar a topografia da superfície pode aumentar o espalhamento e a migração celular e diminuir os contatos focais entre as células. O resultado disso é o aumento nos processos de mitose, consequentemente, a proliferação celular e a adesão ao substrato aumentam também.

No corrente estudo, verificou-se que a rugosidade média (Ra) dos espécimes de zircônia sem a cobertura do biomaterial foi de 0,26 μm . A variação foi de 0,2 a 0,34 μm . Após o recobrimento com Biosilicato®, a rugosidade média passou a ser 64,79 μm variando entre 60,14 a 68,88 μm . Também foi verificada uma maior taxa de proliferação celular nos fibroblastos L929 cuja semeadura foi realizada sobre os espécimes de zircônia com a superfície alterada com BS, quando comparados com os grupos controle negativo e positivo. É importante ressaltar que o aumento na rugosidade superficial facilita a formação de biofilme na superfície de implantes e de componentes. Valores de Ra acima de 0,2 μm foram associados à formação de biofilme precoce (Groessner- Schreiber et al.³⁰, 2003, Subramani et al.⁷⁸, 2009). Em contrapartida, o biovidro BS apresenta propriedades antimicrobianas notáveis contra microrganismos da microbiota oral como já foi demonstrado por Martins et al.⁵⁵, em 2011.

Apesar de longos anos de estudos, o papel das características físico-químicas na adesão celular ainda é tema sem consenso na literatura. Anselme et al.⁹, (2000) destacaram a necessidade de levar em consideração não somente a rugosidade, mas também a composição físico-química de superfícies de biomateriais para a interpretação de resultados de citocompatibilidade in vitro. Estudos na literatura mostram que o aumento da rugosidade e morfologia de superfície depois de tratamento superficial apresentavam comportamento mais hidrofóbico, ou seja, característica menos molhante (Burton, Bhushan¹⁷ 2005) contrariando os nossos

resultados para água e diiodometano. Seguindo a lógica de raciocínio, um maior espalhamento de células seria o esperado, uma vez que o ângulo de contato dos líquidos utilizados diminuiu após o tratamento superficial. No presente estudo, de acordo com teste *t* para a água destilada e o diiodometano, houve uma diminuição significativa do ângulo de contato com $p = 0,016$ e $p = 0,01$, respectivamente. Já para o etilenoglicol não houve diferença significativa. Os líquidos que apresentaram diminuição do ângulo de contato apresentam polaridades muito distintas gerando uma sugestão de que a zircônia após o recobrimento com BS pode ter um comportamento anfipático, ou seja, apresentar uma região hidrofílica (solúvel em água) e uma região hidrofóbica (insolúvel em água, porém solúvel em lipídios e solventes orgânicos) devido a presença de diferentes elementos químicos na superfície modificada, além da superfície dos espécimes serem parcialmente recobertos. A análise por EDX evidenciou a presença de partículas do biovidro após a cobertura do mesmo sobre a superfície da zircônia. Alguns autores concordam que a molhabilidade da superfície de um material é capaz de influenciar a conformação das proteínas adsorvidas pelo substrato (Ziats et al.⁸⁶, 1990; Iuliano et al.³⁹, 1993; Jansen et al.⁴⁰, 1999). As proteínas são agregadas em ilhas de acordo com a especificidade delas em relação ao material utilizado. Logo, quanto menor a quantidade de ilhas, menores os sítios de adesão.

Quanto a energia livre de superfície, nosso estudo mostrou diferença estatisticamente significativa nos espécimes com e sem BS, ou seja, o recobrimento com o biomaterial bem como a técnica utilizada geraram alteração nesse aspecto. A ELS de um substrato significa a interação entre este e quaisquer outros materiais seja líquido ou sólido. Quanto maior a quantidade de íons ativados disponíveis no substrato, maior a tensão superficial. O resultado disso é a maior ou menor capacidade da adesão celular que depende da natureza química da célula e do substrato ao qual ela foi exposta. Se forem naturezas com as mesmas características químicas, mais fácil vai ser a interação entre célula e substrato. Altankov et al.⁷, (1996) e Lampin et al.⁴⁹, (1997) afirmaram que o aumento da molhabilidade influencia na adesão de fibroblastos e no espalhamento dos mesmos. Alguns autores corroboram que a ELS é de fundamental importância para a adesão de células epiteliais, pois sugerem que uma alta energia livre da superfície e a conformação das proteínas adsorvidas é considerada uma conformação biologicamente favorável (Jansen et al.⁴⁰, 1999; Rompen et al.⁷², 2006).

No quesito alteração de cor, Pirro⁶⁸ em 1985 afirmou que a cor é uma resposta psico-física a um fenômeno físico de transmissão ou reflexão da luz sobre um determinado objeto. Estudo conduzido por Vieira et al.⁸², (2001) estudaram a influência de diferentes texturas de superfícies de cerâmicas, com ou sem a camada de saliva. Nesse estudo, os autores mostraram que a aplicação do glaze altera significativamente o resultado final da cor e essa mudança é mantida pela saliva. A aplicação de uma camada vítrea apesar de alterar a cor da cerâmica, aumenta o seu brilho e favorece o aspecto estético. No presente estudo, a camada de BS na superfície dos espécimes não alterou o ΔE a ponto de ser percebido a olho nu. Levando-se em consideração a opacidade da zircônia, o recobrimento com uma fase vítrea na superfície desse material pode ter melhorado o brilho do mesmo. Uma revisão sistemática em meta-análise conduzida por Linkevicius e Vaitelis⁵¹ em 2015, demonstrou claramente o melhor desempenho estético da zircônia quando comparada ao titânio. Deve-se levar em conta que a espessura do tecido mole é que vai definir o sucesso do tipo de *abutment* utilizado. Isso será mais evidente quando o paciente tiver o biótipo de gengiva marginal delgada (Linkevicius, Vaitelis⁵¹ 2015).

Nos quesitos biológicos o BS apresentou característica interessante na bioestimulação de fibroblastos L929. Os resultados do Alamar Blue mostraram que houve um aumento da proliferação celular no grupo exposto ao BS a partir do 3º dia e o ensaio de Sirius Red confirmou a maior síntese de colágeno para o mesmo grupo. Linkevicius e Apse⁵⁰ em 2008 avaliaram os materiais utilizados para fabricação de *abutments* na estabilidade dos tecidos peri-implantares e os resultados demonstraram semelhança entre o titânio e a zircônia. Kohal et al.⁴⁵, (2004) fez uma comparação entre implantes de zircônia e titânio em relação a integridade de tecido ósseo e conjuntivo. O achado foi que houve uma formação efetiva de uma mucosa de conexão em ambos os materiais. Könönen et al.⁴⁷, (1992) e Hormia e Könönen³⁵ (1994) observaram que superfície de titânio polidas ou finamente ranhuradas podem ser ótimas na manutenção da adesão e no fenótipo de células epiteliais gengivais e fibroblastos. Os autores também sugeriram que a rugosidade superficial do material pode interferir na expressão de subunidades de integrinas.

No presente estudo, o aumento da rugosidade da superfície da zircônia tratada com BS não apresentou efeito negativo sobre as células L929. Aumento na capacidade proliferativa, na migração celular e síntese de colágeno foram observados, o que pode ser atribuído ao potencial bioativo do BS. Pesquisas in vitro e

in vivo realizadas por Kido et al.⁴³, (2012) avaliaram a genotoxicidade e citotoxicidade de scaffolds contendo BS, por meio da exposição de fibroblastos e osteoblastos a extratos contendo diferentes concentrações do biomaterial. Na análise da citotoxicidade (MTT), os extratos do biomaterial não inibiram a proliferação das células e ainda foram capazes de promover aumento na proliferação celular nas concentrações de 12,5% e 25% após 72 e 120 horas em ambas as linhagens. A análise da genotoxicidade (comet assay) demonstrou que o BS não induziu danos no DNA para ambas as linhagens testadas em todos os períodos. Esses achados corroboram com o presente estudo, visto que neste trabalho a concentração de BS utilizada foi capaz de estimular significativamente a proliferação de fibroblastos L929. Desta forma, o recobrimento da superfície de abutments de zircônia com BS apresenta-se como uma alternativa altamente interessante para promover o estabelecimento de uma inserção conjuntiva ao redor de implantes dentários. No entanto, mais estudos são necessários para avaliar a longevidade deste efeito, bem como o comportamento desta superfície in vivo.

7 CONCLUSÃO

Dentro das limitações deste estudo, pode-se concluir que:

1. À excessão do HPMC, os veículos: Álcool isopropílico e água destilada; Álcool isopropílico e verniz de acetato; Acetona e verniz de acetato; Água destilada e verniz de acetato; e Líquido de glaze permitiram a formação de uma camada de micro-cristais de BS sobre a superfície da Zr;
2. O recobrimento do BS sobre a zircônia promoveu aumento na rugosidade superficial e da energia livre de superfície, sugerindo a formação de uma superfície anfipática, porém sem alterar a cor da Zr;
3. A superfície de zircônia recoberta com BS apresentou potencial bioativo sobre células de linhagem fibroblástica, resultando em aumento na proliferação e migração celular, bem como na expressão de colágeno in vitro.

REFERÊNCIAS*

1. Abrahamsson I, Berglundh T, Lindhe J. Soft tissue response to plaque formation at different implant systems. A comparative study in the dog. *Clin Oral Implants Res.* 1998;9 (2): 73–9.
2. Abrahamsson I, Zitzmann NU, Berglundh T, Linder E, Wennerberg A, Lindhe J. The mucosal attachment to titanium implants with different surface characteristics: an experimental study in dogs. *J Clin Periodontol.* 2002;29(5):448–55.
3. Adell R, Eriksson B, Lekholm U, Brånemark PI, Jemt T. Long-term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1990;5(4):347–59.
4. Aguiar RC, Scherer D, Battisti TC, Gassen HT, Silva Jr AN. Fratura de implante dentário: relato de caso clínico. *Stomatos.* 2007;13(24):37–44.
5. Allan I, Newman H, Wilson M. Antibacterial activity of particulate Bioglass against supra- and subgingival bacteria. *Biomaterials.* 2001;22(12):1683–7.
6. Allan I, Newman H, Wilson M. Particulate Bioglass reduces the viability of bacterial biofilms formed on its surface in an in vitro model. *Clin Oral Implants Res.* 2002;13(1):53–8.
7. Altankov G, Grinnell F, Groth T. Studies on the biocompatibility of materials: Fibroblast reorganization of substratum-bound fibronectin on surfaces varying in wettability. *J Biomed Mater Res.* 1996;30(3):385–91.
8. Andreiotelli M, Wenz HJ, Kohal RJ. Are ceramic implants a viable alternative to titanium implants: A systematic literature review. *Clin Oral Implants Res.* 2009; 20(4): 32–47.
9. Anselme K, Linez P, Bigerelle M, Le Maguer D, Le Maguer A, Hardouin P, et al. The relative influence of the topography and chemistry of TiAl6V4 surfaces on osteoblastic cell behaviour. *Biomaterials.* 2000;21(15):1567–77.
10. Bächle M, Kohal RJ. A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation, differentiation and protein synthesis of osteoblast-like MG63 cells. *Clin Oral Implants Res.* 2004;15(6):683–92.
11. 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.* 2005; 74:12–22.

*De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca:
<http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-marco-2015.pdf>

12. Boccaccini AR, Ma PX. Tissue engineering using ceramics and polymers 2nd.ed. Amsterdam: Elsevier; 2014.
13. 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.
14. Brånemark PI. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from 10 year period. *Scand J Plast Reconst Surg.* 1977;16(1):1–32.
15. Browning WD, Contreras-Bulnes R, Brackett MG, Brackett WW. Color differences: polymerized composite and corresponding Vitapan Classical shade tab. *J Dent.* 2009; 37(1): 34-9.
16. Brunette DM. The effects of implant surface topography on the behavior of cells. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1988;3(4):231–46.
17. Burton Z, Bhushan B. Hydrophobicity, adhesion, and friction properties of nanopatterned polymers and scale dependence for micro- and nanoelectromechanical systems. *Nano Lett.* 2005;5(8):1607–13.
18. Colvin, Robert B. Fibrinogen – Fibrin interactions with fibroblasts and macrophages. *Ann N Y Acad Sci*;1983; 408: 621-3.
19. Crovace MC, Souza MT, Chinaglia CR, Peitl O, Zanotto ED. Biosilicate - A multipurpose, highly bioactive glass-ceramic. in vitro, in vivo and clinical trials. *J Non Cryst Solids.* 2016; 432:90–110.
20. 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.
21. Denry I, Kelly JR. State of the art of zirconia for dental applications. *Dent Mater.* 2008;24(3):299–307.
22. Di Carmine M, 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.
23. Dibart S, Warbington M, Su MF, Skobe Z. In vitro evaluation of the implant-abutment bacterial seal: the locking taper system. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005;20(5):732–7.

24. Flamant Q, Stanciuc AM, Pavailler H, Sprecher CM, Alini M, Peroglio M, et al. Roughness gradients on zirconia for rapid screening of cell-surface interactions: Fabrication, characterization and application. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2016;104(10):2502–14.
25. Fretwurst T, Buzanich G, Nahles S, Woelber JP, Riesemeier H, Nelson K. Metal elements in tissue with dental peri-implantitis: a pilot study. *Clin Oral Implants Res*. 2016;27(9):1178–86.
26. Garvie RC, Hannink RH, Pascoe RT. Ceramic steel. *Nature*. 1975;258(5537):703–14.
27. Gentile F, Tirinato L, Battista E, Causa F, Liberale C, di Fabrizio EM, et al. Cells preferentially grow on rough substrates. *Biomaterials*. 2010;31(28):7205–12.
28. Glauser R, Schüpbach P, Gottlow J, Hämmerle CHF. Periimplant soft tissue barrier at experimental one-piece mini-implants with different surface topography in humans: A light-microscopic overview and histometric analysis. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2005;7 Suppl 1(s1): 44–51.
29. Gomes EA, Assunção WG, Rocha EP, Santos PH. Cerâmicas odontológicas: o estado atual. *Cerâmica*. 2008;54:319–25.
30. Groessner-Schreiber B, Neubert A, Müller W-D, Hopp M, Griepentrog M, Lange K-P. Fibroblast growth on surface-modified dental implants: an in vitro study. *J Biomed Mater Res A*. 2003;64(4):591–9.
31. Heinrich A, Dengler K, Koerner T, Haczek C, Deppe H, Stritzker B. Laser-modified titanium implants for improved cell adhesion. *Lasers Med Sci*. 2008;23(1):55– 8.
32. Hench LL, Splinter RJ, Allen WC, Greenlee TK. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J Biomed Mater Res*. 1971;5(6):117–41.
33. Hench LL. The story of Bioglass®. *J Mater Sci Mater Med*. 2006;17(11):967–78.
34. Hisbergues M, Vendeville S, Vendeville P. Review zirconia: Established facts and perspectives for a biomaterial in dental implantology. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2009;88(2):519–29.
35. Hormia M, Könönen M. Immunolocalization of fibronectin and vitronectin receptors in human gingival fibroblasts spreading on titanium surfaces. *J Periodontal Res*. 1994;29(2):146–52.

36. Hosoki M, Nishigawa K, Miyamoto Y, Ohe G, Matsuka Y. Allergic contact dermatitis caused by titanium screws and dental implants. *J Prosthodont Res.* 2016;60(3):213–9.
37. Hosseini M, Worsaae N, Schiodt M, Gotfredsen K. A 1-year randomised controlled trial comparing zirconia versus metal-ceramic implant supported single-tooth restorations. *Eur J Oral Implantol.* 2011;4(4):347–61.
38. Huang HH, Ho CT, Lee TH, Lee TL, Liao KK, Chen FL. Effect of surface roughness of ground titanium on initial cell adhesion. *Biomol Eng.* 2004; 21(3-5): 93-7.
39. Iuliano DJ, Saavedra SS, Truskey GA. Effect of the conformation and orientation of adsorbed fibronectin on endothelial cell spreading and the strength of adhesion. *J Biomed Mater Res.* 1993;27(8):1103–13.
40. Jansen J a, den Braber ET, Walboomers XF, de Ruijter JE. Soft tissue and epithelial models. *Adv Dent Res.* 1999;13(1): 57–66.
41. Johnston WM, Kao EC. Assessment of appereance match by visual observation and clinical colorimetry. *J Dent Res.* 1989; 68(5):819-22.
42. Kelly J. Ceramics in Restorative and Prosthetic Dentistry 1. *Annu Rev Mater Sci.* 1997;27 (1):443–68.
43. Kido HW, Oliveira P, Parizotto NA, Crovace MC, Zanotto ED, Peitl-Filho O. Histopathological, cytotoxicity and genotoxicity evaluation of Biosilicate® glass-ceramic scaffolds. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2013;101 A(3):667–73.
44. 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.
45. Kohal RJ, Weng D, Bächle M, Strub JR. Loaded custom-made zirconia and titanium implants show similar osseointegration: an animal experiment. *J Periodontol.* 2004;75(9):1262–8.
46. Kokubo T. Bioactive glass ceramics: properties and applications. *Biomaterials.* 1991;12(2):155–63.
47. Könönen M, Hormia M, Kivilahti J, Hautaniemi J, Thesleff I. Effect of surface processing on the attachment, orientation, and proliferation of human gingival fibroblasts on titanium. *J Biomed Mater Res.* 1992;26(10):1325–41.
48. Lalor PA, Revell PA, Gray AB, Wright S, Railton GT, Freeman MA. Sensitivity to titanium. A cause of implant failure. *J Bone Joint Surg Br.* 1991;73(1):25–8.

49. Lampin M, Warocquier-Clérout R, Legris C, Degrange M, Sigot-Luizard MF. Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration. *J Biomed Mater Res*. 1997;36(1):99–108.
50. Linkevicius T, Apse P. Influence of abutment material on stability of peri-implant tissues: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2008;23(3):449–56.
51. Linkevicius T, Vaitelis J. The effect of zirconia or titanium as abutment material on soft peri-implant tissues: a systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Implants Res*. 2015;26 (11):139–47.
52. Lops D, Bressan E, Parpaiola A, Sbricoli L, Cecchinato D, Romeo E. Soft tissues stability of cad-cam and stock abutments in anterior regions: 2-year prospective multicentric cohort study. *Clin Oral Implants Res*. 2015;26(12):1436–42.
53. Manicone PF, Rossi Iommetti P, Raffaelli L, Paolantonio M, Rossi G, Berardi D, et al. Biological considerations on the use of zirconia for dental devices. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2007; 20(1):9–12.
54. Marchi J, Ussui V, Delfino CS, Bressiani AHA, Marques MM. Analysis in vitro of the cytotoxicity of potential implant materials: Zirconia-titania sintered ceramics. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2010;94(2):305–11.
55. Martins CHG, Carvalho TC, Souza MGM, Ravagnani C, Peitl O, Zanotto ED, et al. Assessment of antimicrobial effect of Biosilicate against anaerobic, microaerophilic and facultative anaerobic microorganisms. *J Mater Sci Mater Med*. 2011;22(6):1439–46.
56. Martins LM, Lorenzoni FC, Farias BC, Lopes LDS, Bonfante G, Rubo JH. Comportamento biomecânico das cerâmicas odontológicas: revisão. *Cerâmica*. 2010;56(338):148–55.
57. Matsuzaka K, Walboomers XF, Yoshinari M, Inoue T, Jansen JA. The attachment and growth behavior of osteoblast-like cells on microtextured surfaces. *Biomaterials*. 2003;24(16):2711–9.
58. 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):463–6.
59. Montazerian M, Dutra Zanotto E. History and trends of bioactive glass-ceramics. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2016:1231–49.

60. Moura J, Teixeira LN, Ravagnani C, Peitl O, Zanotto ED, Beloti MM, et al. In vitro osteogenesis on a highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate®). *J Biomed Mater Res - Part A*. 2007;82(3):545–57.
61. Mustafa K, Lopez BS, Hultenby K, Wennenberg A, Arvidson K. Attachment and proliferation of human oral fibroblasts to titanium surfaces blasted with TiO₂ particles. A scanning electron microscopic and histomorphometric analysis. *Clin Oral Implants Res*. 1998; 9 (3): 195–207.
62. 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.
63. Nakamura K, Kanno T, Milleding P, Ortengren U. Zirconia as a dental implant abutment material: a systematic review. *Int J Prosthodont*. 2010;23(4):299–309.
64. Oakley C, Brunette DM. Topographic compensation: guidance and directed locomotion of fibroblasts on grooved micromachined substrata in the absence of microtubules. *Cell Motil Cytoskel*. 1995; 31(1):45-58.
65. Pae A, Lee H, Kim H-S, Kwon Y-D, Woo Y-H. Attachment and growth behaviour of human gingival fibroblasts on titanium and zirconia ceramic surfaces. *Biomed Mater*. 2009;4(2):25005.
66. Payer M, Heschl A, Koller M, Arnetzl G, Lorenzoni M, Jakse N. All-ceramic restoration of zirconia two-piece implants - a randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res*. 2015;26(4):371–6.
67. Peitl O, Dutra Zanotto E, Hench LL. Highly bioactive P₂O₅–Na₂O–CaO– SiO₂ glass-ceramics. *J Non Cryst Solids*. 2001;292(1–3):115–26
68. Pirro J. The psychology of color. *Trends Tech Contemp Den Lab*. 1985;2(3):53-6.
69. Quirynen M, Marechal M, Busscher HJ, Weerkamp AH, Darius PL, Steenberghe D. The influence of surface free energy and surface roughness on early plaque formation. An in vivo study in man. *J Clin Periodontol*. 1990;17(3):138–44.
70. Räisänen L, Könönen M, Juhanoja J, Varpavaara P, Hautaniemi J, Kivilahti J, et al. Expression of cell adhesion complexes in epithelial cells seeded on biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res*. 2000;49(1):79–87.
71. Rimondini L, Cerroni L, Carrassi A, Torricelli P. Bacterial colonization of zirconia ceramic surfaces: an in vitro and in vivo study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2002;17(6):793–8.

72. Rompen E, Domken O, Degidi M, Pontes AEP, 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(2):55–67.
73. Roriz VM, Rosa AL, Peitl O, Zanutto ED, Panzeri H, De Oliveira PT. Efficacy of a bioactive glass-ceramic (Biosilicate®) in the maintenance of alveolar ridges and in osseointegration of titanium implants. *Clin Oral Implants Res.* 2010;21(2):148–55.
74. Sardin S, Morrier J-J, Benay G, Barsotti O. In vitro streptococcal adherence on prosthetic and implant materials. Interactions with physicochemical surface properties. *J Oral Rehabil.* 2004;31(2):140–8.
75. 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.
76. Siqueira RL, Zanutto ED. BIOSILICATO®: Histórico de uma vitrocerâmica brasileira de elevada bioatividade. *Quim Nov.* 2011;34(7):1231–41.
77. Stoor P, Söderling E, Salonen JI. Antibacterial effects of a bioactive glass paste on oral microorganisms. *Acta Odontol Scand.* 1998; 56 (3):161-5.
78. Subramani K, Jung RE, Molenberg A, Hammerle CHF. Biofilm on dental implants: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2009;24(4):616–26.
79. Takamori ER, Cruz R, Fábio Gonçalves F, Zanetti RV, Artemio Zanetti A, Granjeiro JM. Effect of roughness of zirconia and titanium on fibroblast adhesion. *J Artif Organs.* 2008; 32(4): 305–9.
80. 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: 687291.
81. Thoma DS, Ioannidis A, Cathomen E, Hämmerle CH, Hüsler J, Jung RE. Discoloration of the peri-implant mucosa caused by zirconia and titanium implants. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2016;36(1):39–45.
82. Vieira GF, Caroli A, Amorim JC, Matson E. The influence of the surface treatment and saliva on the color of two porcelains. *Dent Mater J.* 2001; 20 (2): 127-34.
83. Welander M, Abrahamsson I, Berglundh T. The mucosal barrier at implant abutments of different materials. *Clin Oral Implants Res.* 2008;19(7):635–41.
84. Williams DF. On the nature of biomaterials. *Biomaterials.* 2009;30:5897-909.

85. Zhu X, Chen J, Scheideler L, Reichl R, Geis-Gerstorfer J. Effects of topography and composition of titanium surface oxides on osteoblast responses. *Biomaterials*. 2004;25(18):4087–103.
86. Ziats NP, Pankowsky DA, Tierney BP, Ratnoff OD, Anderson JM. Adsorption of Hageman factor (factor XII) and other human plasma proteins to biomedical polymers. *J Lab Clin Med*. 1990;116(5):687–96.

Autorizo a reprodução deste trabalho

(Direitos de publicação reservado a autora)

Araraquara, 31 de março de 2017.

SUELEN ALINE DE LIMA BARROS