



FACULDADE DE
MEDICINA DENTÁRIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

ANÁLISE DA SUPERFÍCIE DE IMPLANTES EM ZIRCÓNIA
SUBMETIDOS A DEGRADAÇÃO E INFEÇÃO POR BIOFILME
ORAL - ESTUDO *IN VITRO*

ANALYSIS OF THE SURFACE OF ZIRCONIA IMPLANTS
UNDERGOING DEGRADATION AND ORAL BIOFILM INFECTION
- IN VITRO STUDY

Bruna Isabel da Costa e Silva

Porto, 2022

**ANÁLISE DA SUPERFÍCIE DE IMPLANTES EM ZIRCÓNIA SUBMETIDOS A
DEGRADAÇÃO E INFEÇÃO POR BIOFILME ORAL - ESTUDO *IN VITRO***

***ANALYSIS OF THE SURFACE OF ZIRCONIA IMPLANTS UNDERGOING
DEGRADATION AND ORAL BIOFILM INFECTION - IN VITRO STUDY***

Monografia de candidatura ao grau de Mestre em Medicina Dentária
apresentado à Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

Bruna Isabel da Costa e Silva

Estudante do Mestrado Integrado em Medicina Dentária na Faculdade de
Medicina Dentária da Universidade do Porto

E-mail: bruna.isabel.silva@gmail.com

Contacto telefónico: 915751200

Orientadora

Prof.^a Doutora Paula Cristina dos Santos Vaz

Professora Auxiliar com Agregação da Faculdade de Medicina Dentária da
Universidade do Porto

Coorientador

Prof. Doutor João Carlos Antunes Sampaio Fernandes

Professor Catedrático da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do
Porto

“Alone, we can do so little; together, we can do so much.”

Helen Keller

Agradecimentos

Aos meus pais, pelo apoio incondicional e incansável durante todo o meu percurso.

Ao meu irmão, pelo apoio e pelo exemplo que sempre foi para mim e que, com orgulho, sigo.

Ao João, pelo carinho e compreensão durante estes 5 anos.

Às amigas que encontrei na faculdade, em especial à Sabrina, à Mónica e à minha binómia Beatriz, por serem as melhores companheiras que poderia ter tido nestes fantásticos anos, pelas memórias que construímos juntas e que contruiremos.

À minha orientadora, Professora Doutora Paula Cristina dos Santos Vaz, por me orientar no caminho certo, desde o início deste projeto, pela confiança depositada em mim e motivação transmitida.

Ao meu coorientador, Professor Doutor João Carlos Antunes Sampaio Fernandes, uma inspiração no meu percurso académico. Obrigada pela pronta disponibilidade, por todo o tempo despendido, pela simpatia e pela motivação transmitida.

Ao Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, em particular, à Professora Doutora Mariana Contente Rangel Henriques, fundamental para a concretização deste projeto. Obrigada pela receção afável, pelas rápidas respostas e pela dedicação de todos durante toda a investigação.

À Dental Wave e à COHO Biomedical Technology Co., LTD, por terem fornecido o material necessário à realização desta investigação.

Resumo

INTRODUÇÃO: A reabilitação com implantes dentários é uma modalidade de tratamento cientificamente aceita e bem documentada. Para colmatar as desvantagens do material “*gold standard*”, o titânio, têm sido introduzidos os implantes de zircónia, principalmente pela exigência estética, pela sua tendência reduzida para a adesão de microrganismos e pela sua biocompatibilidade. A adesão de microrganismos, como a *Candida albicans*, e a subsequente formação de biofilmes patogénicos na superfície de implantes dentários resulta em infeções nos tecidos peri-implantares e pode levar à perda do implante, juntamente com outros fatores individuais. O envelhecimento/degradação da superfície do implante pode afetar as suas propriedades físico-químicas e favorecer ou inibir a colonização do biofilme.

OBJETIVOS: Analisar a superfície de implantes de zircónia (Zibone implants®), simultaneamente, após envelhecimento artificial por dois métodos distintos (termociclagem e autoclavagem) e formação de biofilme de 24h composto por *Candida albicans*; avaliar a influência do envelhecimento artificial (autoclavagem e termociclagem) na adesão de biofilme composto por *Candida albicans* numa superfície de implante de zircónia (Zibone implants®).

METODOLOGIA: 6 amostras de zircónia foram sujeitas a degradação em termocicladora (grupo ZiT), simulando 6 meses na cavidade oral e 6 amostras foram sujeitas a degradação em autoclave (grupo ZiA), simulando entre 5 a 20 anos na cavidade oral. O grupo controlo foi composto por 6 amostras de fábrica (não sujeitas a degradação). Todas as amostras foram incubadas *in vitro* a 37°C para formação de biofilmes de 24h de *Candida albicans*. Foram captadas imagens em MEV para análise das superfícies após formação do biofilme de 24h e foram contabilizadas as unidades formadoras de colónias (UFC), comparando estatisticamente cada grupo (ZiT e ZiA) com o controlo (C) e o grupo ZiT com o ZiA.

RESULTADOS: Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas na contagem de UFC entre os grupos ZiT e C, ZiA e C, e entre os grupos ZiT e ZiA.

CONCLUSÕES: Não se verifica aumento estatisticamente significativo na adesão de biofilme de *Candida albicans* com o aumento do tempo de envelhecimento da zircónia, simulado através de termociclagem e autoclavagem.

PALAVRAS-CHAVE: Zircónia, Implantes dentários, Degradação, *Candida albicans*, Peri-implantite

Abstract

INTRODUCTION: The rehabilitation with dental implants is a scientifically accepted and well documented treatment modality. To fill the disadvantages of the "gold standard" material, the titanium, zirconia implants have been introduced, mainly due to aesthetic requirement, their reduced tendency to the adhesion of microorganisms and their biocompatibility. The adhesion of microorganisms, such as *Candida albicans*, and the subsequent formation of pathogenic biofilms on the surface of dental implants results in infections in peri-implant tissues and can lead to implant loss, along with other individual factors. Aging/degradation of the implant surface can affect its physical-chemical properties and favor or inhibit biofilm colonization.

OBJECTIVES: To analyze the surface of zirconia implants (Zibone implants®), simultaneously, after artificial aging by two different methods (thermocycling and autoclaving) and 24-hour biofilm formation composed of *Candida albicans*; evaluate the influence of artificial aging (autoclaving and thermocycling) on the adhesion of biofilm composed of *Candida albicans* on a zirconia implant surface (Zibone implants®).

METHODOLOGY: 6 zirconia samples were subjected to degradation in a thermocycler (ZiT group), simulating 6 months in the oral cavity and 6 samples were subjected to degradation in autoclave (ZiA group), simulating between 5 to 20 years in the oral cavity. The control group consisted of 6 factory samples (not subject to degradation). All samples were incubated *in vitro* at 37°C for 24-hour biofilm formation of *Candida albicans*. SEM images were captured for surface analysis after 24-hour biofilm formation and colony-forming units (CFU) were counted, statistically comparing each group (ZiT and ZiA) with control (C) and ZiT group with ZiA.

RESULTS: There were no statistically significant differences in the count of CFU between the ZiT and C, ZiA and C groups, and between the ZiT and ZiA groups.

CONCLUSIONS: There is no statistically significant increase in adhesion of *Candida albicans* biofilm with the increase of zirconia aging time, simulated by thermocycling and autoclaving.

KEYWORDS: Zirconia, Dental Implants, Degradation, *Candida albicans*, Peri-implantitis

Índice

1. Introdução	1
1.1. Titânio - as desvantagens do “gold standard”	2
1.2. Zircónia – Estado da arte	3
1.3. <i>Candida albicans</i> e Peri-implantite	7
1. Material e métodos	14
1.1. Seleção das amostras de Zircónia (Zibone implants®)	14
1.2. Termociclagem das amostras	15
1.3. Autoclavagem das amostras	17
1.4. Tratamento das amostras	17
1.5. Estirpes e condições de crescimento	17
1.6. Saliva	18
1.7. Formação do biofilme	18
1.8. Quantificação do biofilme	19
1.9. Análise estatística	19
1.10. Avaliação e caracterização da superfície das amostras	19
2. Resultados	20
2.1. Análise das superfícies das amostras do grupo controlo após formação de biofilme de 24h	21
2.2. Análise das superfícies das amostras de zircónia termocicladas após formação de biofilme de 24h	22
2.3. Análise das superfícies das amostras de zircónia autoclavadas após formação de biofilme de 24h	23
2.4. Resultado dos ensaios	23
2.5. Análise estatística	25
3. Discussão	26
4. Conclusões	33
5. Referências bibliográficas	34
Anexos	39

Índice de Figuras

Figura 1. Potenciais mecanismos de perda óssea peri-implantar, incluindo o biofilme microbiano, excesso de cimento, má posição do implante e iões metálicos/libertação de partículas. Fonte: Fretwurst T, et al. (2018) ⁽²⁴⁾ . Sem autorização do autor.....	3
Figura 2. Formação de biofilmes de <i>Candida albicans</i> . a - As 4 fases de formação de biofilme: adesão, iniciação, maturação e dispersão. b - Imagem de microscopia a laser confocal da vista lateral de um biofilme de <i>C. albicans</i> maduro, com as longas hifas claramente visíveis. Retirado de: Lohse, et al. (2018) ⁽³²⁾ . Sem autorização do autor.....	9
Figura 3. Características gerais dos implantes de zircónia Zibone®. Disponível em: product - COHO Biomedical Technology Co., LTD. (zibone.com). Acesso em abril de 2022. Sem autorização do autor.....	14
Figura 4. Fotografia da totalidade das amostras disponíveis para o estudo (18 amostras), ainda sem qualquer tratamento.	15
Figura 5. Fotografia macro de uma das amostras de Zibone implants® (10.4mmx10.4mmx2mm).....	15
Figura 6. Termocicladora Ethiktechnology (Modelo 621-1D, Potência: 3200W, Tensão: 220V 50HZ): Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto.	16
Figura 7. Amostras dispostas no cesto da termocicladora.	16
Figura 8: Autoclave Getinge K-series.....	17
Figura 9. Imagens de MEV referentes à superfície de uma das amostras do grupo controlo (C) após formação de biofilme de <i>Candida albicans</i> de 24h. As 3 imagens superiores (A,B,C) foram captadas com ampliação 400x e representam 3 regiões da amostra. As 3 imagens inferiores (D,E,F) foram captadas com ampliação 2500x e representam as 3 regiões correspondentes às imagens superiores.....	21

Figura 10. Imagem de MEV referente à superfície de uma das amostras do grupo das amostras termocicladas (ZiT) após formação de biofilme de *Candida albicans* de 24h. As 3 imagens superiores (A,B,C) foram captadas com ampliação 400x e representam 3 regiões da amostra amostra. As 3 imagens inferiores (D,E,F) foram captadas com ampliação 2500x e representam as 3 regiões correspondentes às imagens superiores. 22

Figura 11. Figura 11: Imagem de MEV referente à superfície de uma das amostras do grupo de amostras autoclavadas (ZiA) após formação de biofilme de *Candida albicans* de 24h. As 3 imagens superiores (A,B,C) foram captadas com ampliação 400x e representam 3 regiões da amostra. As 3 imagens inferiores (D,E,F) foram captadas com ampliação 2500x e representam as 3 regiões correspondentes às imagens superiores. 23

Índice de Tabelas e Gráficos

Tabela 1. Grupos experimentais e métodos de envelhecimento utilizados. 15

Tabela 2. Composição da saliva artificial (200 mL). 18

Tabela 3. Resultados da contagem de UFC de *Candida albicans* dos ensaios realizados. 24

Gráfico 1. Gráfico representativo do crescimento de biofilme de 24h, em Log (UFC/cm²), de *Candida albicans* SC 5314 (Ci = 1x10⁵, 37°C, 120 rpm) nas amostras de zircónia do grupo controlo (C), amostras de zircónia autoclavadas (ZiA) e amostras de zircónia termocicladas (ZiT). 25

Lista de siglas e abreviaturas

°C – Graus Celsius (centígrado)

µm – Micrómetro (10^{-6} metros)

µL – Microlitro

% – Percentagem

3Y-TZP – Zircónia tetragonal policristalina estabilizada por 3 átomos de ítrio

ADN – Ácido desoxirribonucleico

Bar – Bares

BO – Biofilme oral

C – Grupo controlo

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

CO – Cavidade oral

KCl – Cloreto de potássio

C.albicans – *Candida albicans*

DM – Diabetes *Mellitus*

DMT2 – Diabetes *Mellitus* tipo 2

g – Força G / Força centrífuga relativa

h - horas

H1 – Hipótese 1

H2 – Hipótese 2

IL-1 – Interleucina 1

IL-1β – Interleucina 1 beta

IL-6 – Interleucina 6

MEV – Microscópio eletrónico de varrimento

mm – milímetro

MPa - Mega pascal

NaCl – Cloreto de sódio

PBS – Tampão fosfato-salino

PI – Peri-implantite

Ra – Rugosidade média de superfície

Rpm – Rotação por minuto

SDA – *Sabouraud* Dextrose Agar

SFE – Energia livre de superfície

Ti – Titânio

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

Transformação t-m – Transformação da fase tetragonal para a fase monoclínica

YSZ – Zircónia estabilizada com ítria

Y-TZP – Zircónia tetragonal estabilizada por ítria

ZiA – Amostras de zircónia autoclavadas

ZiT – Amostras de zircónia termocicladas

ZrO₂ – Óxido de zircónio/zircónia

ZrO₂-TZP –Zircónia tetragonal policristalina

1. Introdução

A reabilitação com implantes dentários é uma modalidade de tratamento cientificamente aceita e bem documentada^(1, 2). Um dos fatores chave para o sucesso a longo prazo dos implantes é a manutenção de saúde peri-implantar⁽³⁾.

Em alternativa aos implantes de titânio convencionais, os implantes de zircônia têm sido introduzidos, principalmente pela exigência estética, pela sua tendência reduzida para a adesão de microrganismos⁽⁴⁻⁶⁾, escassez de literatura sobre libertação de partículas de degradação do implante, corrosão e citotoxicidade, dano no ADN celular, portanto pela sua biocompatibilidade⁽⁷⁻⁹⁾.

A adesão de microrganismos e a subsequente formação de biofilmes patogénicos na superfície de implantes dentários resulta em infeções nos tecidos peri-implantares e pode levar à perda do implante^(4, 6, 10), juntamente com outros fatores de risco individuais, como a predisposição genética, o consumo de álcool e tabaco ou condições sistémicas como a Diabetes⁽¹¹⁻¹³⁾.

A cavidade oral incorpora uma comunidade microbiana complexa e altamente diversificada⁽¹⁴⁾. O biofilme subgengival é composto não só por bactérias, mas também por fungos⁽¹⁵⁻¹⁸⁾.

A *Candida albicans* é um microrganismo comensal que coloniza a cavidade oral e é o fungo mais prevalente na mesma^(4, 5, 14, 19). Para além de aderir à superfície da mucosa oral e aos dentes, os fungos conseguem aderir também a superfícies não biológicas como os implantes^(4, 16). A *Candida albicans* tem sido detetada e referida como uma espécie oportunista na peri-implantite^(4, 17).

O envelhecimento/degradação da superfície do implante pode afetar as suas propriedades físico-químicas e favorecer ou inibir a colonização do biofilme⁽²⁰⁾. Fatores como a rugosidade, a molhabilidade e a energia livre de superfície parecem desempenhar um papel importante no processo de adesão microbiana na superfície do implante^(5, 20).

1.1. Titânio - as desvantagens do “gold standard”

Durante as últimas décadas, o titânio e as ligas de titânio têm sido os materiais mais usados no fabrico de implantes e tornaram-se o “gold standard” para a substituição dentária em implantologia⁽¹⁾. No entanto, o titânio tem demonstrado algumas desvantagens, nomeadamente a sua cor acinzentada escura, que muitas vezes é visível através da mucosa peri-implantar, prejudicando os resultados estéticos na presença de um fenótipo de mucosa fina (comumente designado de biótipo fino) e em condições desfavoráveis do tecido mole ou recessão gengival, que podem levar ao comprometimento da estética final da reabilitação oral^(1, 21).

Para além disso, tem sido relatado que os metais são capazes de induzir um efeito não específico de imunomodulação e autoimunidade⁽¹⁾. As partículas de titânio livres podem ativar a resposta de dano do ADN nas células epiteliais, podendo comprometer a barreira epitelial oral⁽⁹⁾. Foi relatada também a possibilidade de existência hipersensibilidade ao titânio⁽²¹⁾. A libertação de elementos metálicos pode causar descoloração dos tecidos moles adjacentes e reações alérgicas (embora raras), como edema oral, estomatite perioral, gengivite e manifestações extra-orais como reações eczematosas e erupções cutâneas em pacientes suscetíveis^(1, 22). Foram descritos efeitos colaterais galvânicos após contacto com saliva e fluoretos, o que leva à dissolução dos componentes do metal ou da liga metálica e destruição óssea causada pelo fluxo de corrente que resulta do acoplamento galvânico^(1, 23).

Outra desvantagem é o envelhecimento biológico do Ti (associado ao processo natural de degradação), que ocorre como consequência da interação do material com os fluidos corporais fisiológicos e a acumulação de hidrocarbonetos no substrato⁽²⁰⁾. Embora a superfície de titânio seja considerada uma das mais quimicamente estáveis, é negativamente afetada pelas proteínas na oxidação⁽²⁰⁾. Além disso, a quantidade de adsorção de hidrocarbonetos na superfície interfere com a fixação de proteínas sanguíneas negativamente carregadas à superfície do implante e reduz o grau de nova formação óssea em torno do implante⁽²⁰⁾.

Fretwurst T. *et al*, 2018, referem que foram detetadas partículas de metal e titânio em tecidos de suporte peri-implantares, sugerindo o potencial impacto dos biomateriais na patogénese da perda óssea peri-implantar^(21, 24). No entanto, não são claros os mecanismos que poderão ser responsáveis pela libertação de partículas e iões e se estes materiais libertados têm um impacto local e/ou sistémico nos tecidos moles e duros peri-implantares^(8, 9, 24).

Embora o titânio apresente bom desempenho em termos de biocompatibilidade e facilidade de manutenção, ainda é suscetível à formação de biofilme, levando, por vezes, a reações inflamatórias⁽²⁵⁾.

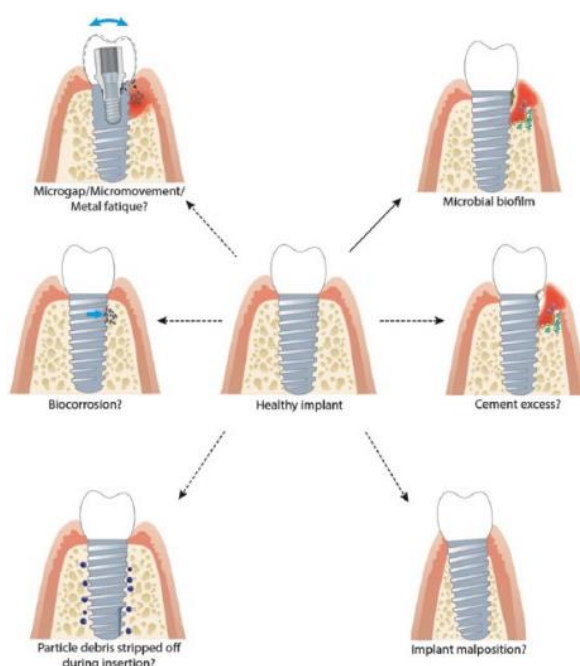


FIGURA 1. POTENCIAIS MECANISMOS DE PERDA ÓSSEA PERI-IMPLANTAR, INCLUINDO O BIOFILME MICROBIANO, EXCESSO DE CIMENTO, MÁ POSIÇÃO DO IMPLANTE E IÕES METÁLICOS/LIBERTAÇÃO DE PARTÍCULAS. FONTE: FRETWURST T, *ET AL.* (2018)⁽²⁴⁾. SEM AUTORIZAÇÃO DO AUTOR.

1.2. Zircónia – Estado da arte

O implante de zircónia é feito a partir de um metal de transição brilhante, cinzento e forte chamado Zirconium (Símbolo Zr). A zircónia é a forma de óxido do Zirconium⁽²⁾. Jons Jakob Berzelius, em 1824 foi o primeiro a isolar a zircónia numa forma impura⁽²⁾. Inicialmente, a zircónia foi usada em vários procedimentos cirúrgicos ortopédicos no fabrico de cabeças femorais para substituições totais da anca, ancas artificiais, implantes acústicos e próteses de dedos⁽²⁾. Mais tarde,

foi introduzida na Medicina Dentária no fabrico de espigões endodônticos, coroas/pontes, restaurações, *brackets* ortodônticos e pilares de implante⁽²⁾.

Apenas em 1968, foi fabricado, na Suíça, o primeiro implante dentário cerâmico, conhecido como Implante Sigma, desenvolvido por Sandhaus⁽²⁾. O implante de Sandhaus era de alumina (Al_2O_3)⁽²¹⁾. Infelizmente, o desempenho clínico dos implantes de alumina estava mal documentado e devido ao elevado risco de fratura foram retirados do mercado⁽²¹⁾.

Recentemente, para colmatar as desvantagens do titânio, facto é que apareceram as cerâmicas de zircónia. Os materiais dentários cerâmicos preenchem os elevados requisitos estéticos da medicina dentária moderna^(2, 5, 20, 26, 27). A estética superior da zircónia é atribuída à sua capacidade de mascarar substratos escuros com boa opacidade no espectro visível e infravermelho e à translucidez controlada⁽²⁾. Em particular, a zircónia, tornou-se um biomaterial de alto interesse, não só por razões estéticas, mas também devido às suas propriedades biológicas (biocompatibilidade e diminuição da capacidade de aderência dos microrganismos à sua superfície) e mecânicas excepcionais (resistência ao desgaste, resistência à corrosão, módulo de elasticidade semelhante ao aço, coeficiente de expansão térmica semelhante ao ferro e elevada resistência à fratura)^(5, 28, 29).

O implante de zircónia também mostrou inibir a adesão de bactérias e formação de biofilme na sua superfície devido à sua hidrofobicidade, propriedades bio-inertes, suavidade ideal, reduzida energia livre de superfície e molhabilidade de superfície⁽²⁾. A adesão bacteriana e a acumulação de biofilme na zircónia já foram estudadas *in vitro* e *in vivo*, principalmente em comparação com o titânio⁽⁶⁾. Há muitos relatos de que a zircónia tem menor adesão bacteriana e menor formação de biofilme do que o titânio⁽⁶⁾.

Além da baixa colonização bacteriana, a zircónia apresenta uma baixa resposta inflamatória em torno do implante que é atribuída a uma maior libertação de vários fatores angiogénicos e citocinas anti-inflamatórias em comparação com o titânio⁽²⁾.

Relativamente à osteointegração, os implantes de zircónia com superfícies modificadas resultam numa osteointegração comparável à dos

implantes de titânio⁽⁶⁾. Vários tratamentos de superfície, tais como aumento de rugosidade, ativação superficial e revestimento de superfície, têm sido desenvolvidos e melhorados⁽⁶⁾.

A zircônia aparentemente não tem efeito citotóxico sobre os fibroblastos; os testes de carcinogenicidade *in vitro* e ensaios de teratogenicidade (alterações cromossômicas celulares patológicas) têm sido negativos; e nos testes de genotoxicidade, foi reportada a ausência de aberrações, relativamente a padrões cromossômicos⁽³⁰⁾.

Num estudo, *in vivo*, realizado em ratos por Obando-Pereda GA. *et al*, 2014, expuseram os animais a partículas de zircônia e titânio demonstrando que mesmo na ausência de qualquer outro fator inflamatório ou estimulante, estas partículas iniciam uma resposta imune mediada pela produção de citocinas e associada a osteólise, hiperalgesia inflamatória e edema⁽⁷⁾. Porém, na zircônia a expressão de genes pró-inflamatórios induzidos por partículas, a produção de citocinas, a osteólise e a hiperalgesia foram inferiores às induzidas pelo titânio⁽⁷⁾.

No entanto, apesar das inúmeras vantagens, a zircônia apresenta uma estabilidade mecânica deficiente ao longo do tempo⁽²⁹⁾. As propriedades mecânicas da zircônia são significativamente comprometidas pela cinética do envelhecimento⁽²⁰⁾.

Para entender este processo de envelhecimento é importante saber que a zircônia pura existe em 3 fases cristalinas: monoclinica, tetragonal e cúbica (dependendo das condições locais)^(2, 6, 27, 28, 31). A fase monoclinica da zircônia existe à temperatura ambiente e é estável até aos 1170°C⁽²⁾. Acima dos 1170°C, a fase monoclinica transforma-se em fase tetragonal com 5% de diminuição do volume⁽²⁾. Aos 2370°C a fase cúbica começa a aparecer (2). A adição de ítria à rede (entre 1,5 e 5% mol) estabiliza a fase tetragonal à temperatura ambiente⁽²⁸⁾.

Durante o tempo de envelhecimento, o aumento das tensões internas, na presença de água, inicia a transformação da fase tetragonal para a fase monoclinica, que provoca um aumento de volume que consoante os autores varia entre 3 a 5%^(6, 27, 28). Esta transformação ocorre a uma temperatura de 100-1070°C⁽²⁾. As condições orais associadas à humidade e à temperatura induzem este fenómeno, conhecido como degradação a baixa temperatura (LTD) que se

origina na superfície, espalhando-se dentro do material, conduzindo a microfraturas e ao aumento da rugosidade superficial^(10, 20, 29). Acredita-se que a acumulação de energia devido ao aumento do volume diminui o stress na ponta da microfratura e impede a propagação da mesma⁽⁶⁾. Ou seja, quando uma fissura neste material se inicia, os grãos de zircónia de fase tetragonal são transformados em fase monoclinica na ponta da fenda⁽²⁷⁾. Neste processo há um aumento do volume dos grãos causado pela transformação da fase induzida pelo stress compressivo dificultando a propagação da fratura⁽²⁷⁾. Este fenómeno chama-se "transformação de fase induzida pelo stress" e é a razão pela qual a zircónia tem uma resistência extremamente elevada, apesar de ser uma cerâmica⁽⁶⁾.

Quando a zircónia é solidamente dissolvida em ítrio (Y), cálcio (Ca), magnésio (Mg), cerium (Ce), ou outros iões com um raio iónico maior do que o do zirconium (Zr), as fases tetragonal e cúbica tornam-se estáveis à temperatura ambiente⁽⁶⁾.

Quando a quantidade de ítria (Y_2O_3) adicionada é superior a 8 mol, a fase cúbica é estável à temperatura ambiente, que é chamada zircónia cúbica estabilizada (CSZ)⁽⁶⁾. Quando a % de ítria é de 3 a 8 mol, as fases tetragonais e cúbicas estão misturadas à temperatura ambiente, e é chamada zircónia parcialmente estabilizada (PSZ)⁽⁶⁾. Quando a % de ítria é de cerca de 3 mol, as fases tetragonais estão próximas de 100% à temperatura ambiente, e é chamada de zircónia tetragonal policristalina (TZP), também designada zircónia endurecida ("*toughened zirconia*")⁽⁶⁾.

A degradação a baixa temperatura da zircónia diminui com o teor de ítrio, ou seja, quanto maior o teor de ítrio mais resistente à degradação é a zircónia, mas a zircónia com 3 átomos de ítrio tem uma durabilidade suficiente em condições orais⁽⁶⁾. No entanto, quanto maior o teor em ítrio a zircónia apresentar, maior é a sua translucidez porque há mais fases cúbicas e diminui a resistência mecânica (resistência de flexão) porque há menos fases tetragonais que contribuem para a resistência⁽⁶⁾.

A zircónia estabilizada com ítrio (YSZ) é uma das cerâmicas mais usadas em implantes dentários devido às suas propriedades mecânicas superiores e à

biocompatibilidade⁽²⁶⁾. A sustentabilidade ambiental é outra das vantagens da utilização da cerâmica YSZ para substituir metais e ligas metálicas⁽²⁶⁾. No entanto, apesar das elevadas taxas de sobrevivência dos implante dentários (mais de 89%), 5-11% dos implantes dentários falham com necessidade de serem removidos⁽²⁶⁾. Uma possível causa de falha do implante está associada à infecção biológica dos tecidos peri-implantares⁽²⁶⁾. A adesão dos microrganismos orais à superfície do material é reconhecida como o primeiro passo da formação de biofilme⁽²⁶⁾. A acumulação da placa microbiana pode levar à inflamação da mucosa adjacente e, posterior reabsorção óssea, aumentando o risco de perda do implante⁽²⁶⁾.

A zircónia tetragonal policristalina estabilizada por ítrio (Y-TZP) já foi usada anteriormente a nível biomédico para substituição de cabeças femorais em implantes ortopédicos da anca^(10, 28, 29). No entanto, o seu envelhecimento produziu fraturas nas cabeças femorais, conduzindo a uma utilização mínima da zircónia para esta aplicação⁽²⁸⁾. Mais concretamente, em 2001, um total de 400 cabeças femorais tiveram de ser removidas pouco tempo depois da sua implantação em resultado do envelhecimento acelerado de dois lotes de implantes fabricados com uma nova tecnologia de forno⁽¹⁰⁾. A fratura das cabeças femorais tem sido relacionada com a microporosidade interligada que permite que a humidade penetre na cerâmica, facilitando o envelhecimento e o subsequente colapso do material⁽²⁸⁾. A explicação deste mecanismo é de particular interesse para aplicações da zircónia em Medicina Dentária⁽²⁸⁾. No entanto, vários estudos clínicos revelaram que a fratura dos implantes dentários de zircónia era rara⁽²⁸⁾. Ainda assim, é de grande importância que a utilização de zircónia em implantes dentários tenha em conta este fenómeno de envelhecimento⁽²⁸⁾.

1.3. *Candida albicans* e Peri-implantite

As espécies de *Candida* oral são fungos orais comensais e são frequentemente isoladas da cavidade oral de pacientes saudáveis^(16, 18, 32).

Candida é um género heterogéneo de fungos composto por mais de 150 espécies⁽¹⁷⁾. Embora algumas espécies de *Candida* coexistam como

microrganismos comensais, podem causar infecções superficiais e sistêmicas em certas circunstâncias⁽¹⁷⁾. A patogenicidade da *Candida* responde a um conjunto de fatores de virulência, incluindo o dimorfismo, a secreção de enzimas hidrolíticas (proteases, lipases e hemolisinas) e a adesão e formação de biofilme no epitélio da mucosa e nos biomateriais⁽¹⁷⁾.

A formação de biofilmes é um processo sequencial complexo que depende do agente invasor e da estrutura em que está hospedado⁽¹⁷⁾. A colonização de leveduras em superfícies bióticas e abióticas é o primeiro passo no desenvolvimento de biofilmes, seguido pela divisão celular e formação de microcolônias que contribuem para a maturação de um biofilme caracterizado pela presença de hifas e leveduras incorporadas numa matriz extracelular e, finalmente, pelo desprendimento de algumas destas células^(17, 32).

A *Candida albicans* é um fungo dimórfico e, por isso, existe em forma de levedura e de hifa^(32, 33). Pseudohifas e hifas são duas morfologias filamentosas diferentes que podem ser observadas na *C. albicans*⁽³³⁾. O fungo *C. albicans* pode formar hifas tanto em culturas planctônicas como durante a fase de maturação da formação de biofilme⁽³²⁾.

Lohse MB. *et al*, 2018, descreveu o processo de formação de biofilme de *Candida albicans* dividindo-o em quatro fases: (a) Adesão de células redondas em forma de levedura a uma superfície; (b) Início da formação de biofilme, durante a qual as células aderem à superfície e formam uma camada basal que contém forma de levedura, pseudohifas e hifas (também conhecida como fase de proliferação); (c) Maturação num biofilme complexo e estruturado, no qual as células estão envolvidas na matriz extracelular; e (d) Dispersão de células em forma de levedura do biofilme para novos locais, reiniciando a formação de novos biofilmes⁽³²⁾.

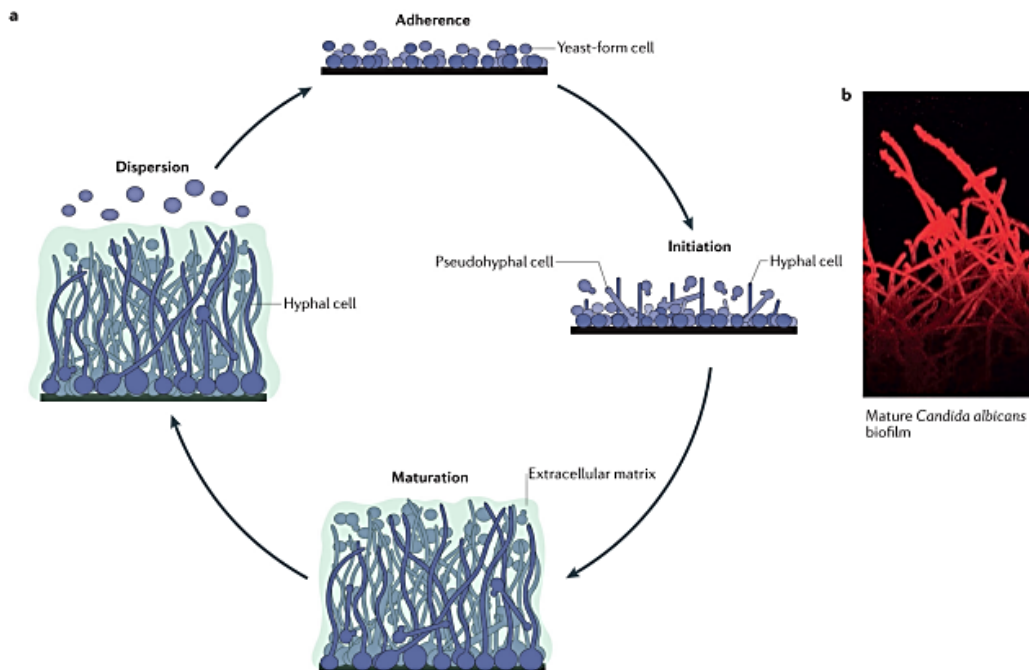


FIGURA 2.FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE *CANDIDA ALBICANS*. A - AS 4 FASES DE FORMAÇÃO DE BIOFILME: ADESÃO, INICIAÇÃO, MATURAÇÃO E DISPERSÃO. B - IMAGEM DE MICROSCOPIA A LASER CONFOCAL DA VISTA LATERAL DE UM BIOFILME DE *C. ALBICANS* MADURO, COM AS LONGAS HIFAS CLARAMENTE VISÍVEIS. RETIRADO DE: LOHSE, *ET AL.* (2018)⁽³²⁾. SEM AUTORIZAÇÃO DO AUTOR.

Os microrganismos orais são capazes de aderir a superfícies hidrofílicas e superfícies hidrofóbicas⁽³³⁾. As espécies de *C. albicans* exibem hidrofobia em hifa, o que provoca uma adesão mais forte da *C. albicans* aos substratos hidrofóbicos⁽²⁰⁾.

A *C.albicans* foi descrita como uma espécie oportunista em lesões periodontais e peri-implantares⁽⁵⁾. Segundo Lafuente-Ibáñez de Mendoza I. *et al*, esta espécie pode participar no início e desenvolvimento da peri-implantite⁽¹⁷⁾.

As doenças peri-implantes que afetam as estruturas circundantes aos implantes dentários incluem a mucosite peri-implantar e a peri-implantite⁽²⁴⁾.

A patogénese da infecção periodontal é complexa e envolve múltiplas interações entre organismos gram-positivos e gram-negativos dentro do biofilme subgingival. A microbiota associada à perda de implantes dentários osteointegrados mostra maiores proporções de anaeróbios gram-negativos^(3, 17, 18, 26). Espécies periopatogénicas, como bactérias gram-positivas e *C. albicans* também foram identificadas em torno de implantes^(18, 26).

Embora a resposta inflamatória seja mais pronunciada nos tecidos que rodeiam os implantes do que nos que rodeiam os dentes, o ambiente microbiológico associado à peri-implantite é semelhante ao observado na doença periodontal convencional, que segundo Lafuente-Ibáñez de Mendoza I. *et al*, inclui bactérias gram-negativas anaeróbias⁽¹⁷⁾.

A reabilitação com implantes dentários é previsível, e a taxa de sucesso é consideravelmente elevada⁽³³⁾. Estudos clínicos mostram que a taxa de sobrevivência de longo prazo dos implantes dentários de terceira geração é de cerca de 90% ao longo de 10-15 anos⁽³³⁾. No entanto, 5 a 11% dos implantes dentários colocados estão sujeitos a problemas graves como a peri-implantite e a mucosite⁽³³⁾.

A mucosite peri-implantar é a infecção que rodeia os tecidos moles do implante. No caso de o osso circundante ao implante estar infectado, denomina-se peri-implantite, ou seja, na peri-implantite a reação inflamatória dos tecidos moles associa-se à perda do osso de suporte marginal em torno do implante⁽³³⁾.

Mombelli A. *et al*, 2011, descreveu os sinais e sintomas típicos da mucosite peri-implantar e da peri-implantite⁽³⁴⁾. Clinicamente, a inflamação dos tecidos moles dá origem ao sangramento após sondagem suave com um instrumento contundente, e pode haver supuração da bolsa periodontal⁽³⁴⁾. Pode ou não haver inchaço, e geralmente não há dor. Se o processo não resulta em mais perda óssea do que o atribuível à remodelação, estamos perante mucosite peri-implantar⁽³⁴⁾. O defeito ósseo típico da peri-implantite é circunferencial em torno do implante, e é bem demarcado⁽³⁴⁾. Como a parte inferior do implante mantém uma osteointegração perfeita, a destruição óssea pode prosseguir sem quaisquer sinais notáveis de mobilidade do implante até a osteointegração estar completamente perdida⁽³⁴⁾.

Mombelli A. *et al*, 2011, demonstrou ainda que a microbiota associada com a doença peri-implantar é (i) uma mistura de microrganismos, (ii) bastante variável, e (iii) na maioria dos casos dominada por diversas bactérias anaeróbias gram-negativas⁽³⁴⁾. Refere também que em alguns estudos a *C. albicans* está presente na microflora subgengival em casos de falha do implante⁽³⁴⁾.

Convencionalmente, a presença de bactérias gram-negativas, tais como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, e *Fusobacterium nucleatum* no BO subgengival é uma das causas da ocorrência de doenças peri-implantares^(15, 16). Uma explicação é que a proliferação bacteriana no biofilme está associada à produção de produtos tóxicos bacterianos e citocinas inflamatórias destrutivas, incluindo IL-1 β , IL-6 e TNF- α que, se não for controlada pode induzir inflamação nos tecidos moles peri-implantes e perda da crista óssea devido a um aumento dos produtos dos osteoclastos^(15, 16). A expressão IL-1 e TNF- α pode ser regulada por vários polimorfismos funcionalmente relevantes, incluindo IL-1 α C-889T, IL-1 β C+3954T e C-511T, e TNF α G-308A⁽³⁵⁾. Verificou-se que os alelos mutantes destes polimorfismos aumentam a transcrição dos genes correspondentes, resultando numa sobre expressão das citocinas pró-inflamatórias⁽³⁵⁾. No entanto, segundo o estudo de Jin Q. *et al*, 2021, apenas os polimorfismos funcionais de IL-1 α (C-889T), IL-1 β (C+3954T, C-511T) e o genótipo composto de IL-1 são potenciais marcadores preditivos para a doença peri-implantar⁽³⁵⁾. Para além disso, segundo Vaz P. *et al*, 2012, os alelos 1 e 2 do gene IL1A e os alelos 1 e 2 do gene IL1B foram estatisticamente associados ao sucesso ou insucesso dos implantes dentários⁽¹¹⁾.

Além das bactérias, a cavidade oral e o BO subgengival também abrigam leveduras, que podem tornar-se agentes patogénicos oportunistas em condições como, por exemplo, a Diabetes *Mellitus* tipo 2 mal controlada (DMT2)⁽¹⁵⁾. Foi demonstrado por Alsahhaf A. *et al*, 2019, *in vitro*, que o aumento dos níveis de glicose salivar em doentes com DMT2 favorece o crescimento das leveduras; e o fraco controlo metabólico em doentes diabéticos do tipo 2 está associado a um aumento do transporte de *Cândida* no BO subgengival ⁽¹⁵⁾.

Além disso, foi demonstrado *in vitro* que a *C. albicans* altera o microbioma aumentando o número de bactérias anaeróbias no biofilme que podem agravar ainda mais a inflamação dos tecidos moles e a perda de osso de suporte em torno dos implantes dentários^(15, 16).

Embora a etiologia primária da doença peri-implantar tenha sido descrita como infecciosa, é uma doença multifatorial e têm sido defendidos fatores de risco individuais como predisponentes para o seu desenvolvimento⁽³⁾. Heitz-Mayfield

L. *et al*, 2008, defende que uma má higiene oral, hábito tabágico, história/presença de periodontite, características genéticas, consumo excessivo de álcool e ausência de gengiva queratinizada estão relacionadas com um risco acrescido de desenvolver a doença peri-implantar⁽¹³⁾. Outros fatores como a superfície e topologia do implante e contaminação bacteriana na junção implante/pilar também são considerados fatores de risco⁽³⁾.

Num estudo feito por Rams TE. *et al*, com 120 amostras de peri-implantite, foi demonstrado que em 71,7 % dos casos existia resistência antibiótica à amoxicilina, à clindamicina, à doxiciclina e ao metronidazol⁽³⁶⁾. Esta é a razão pela qual tem havido um aumento nas tentativas de investigação em implantologia nos últimos anos para desenvolver materiais para implantes inovadores com propriedades antimicrobianas, bem como para investigar as suas interações com vários microrganismos⁽²⁹⁾. Além disso, existe a possibilidade de a utilização de antibióticos no tratamento de doenças peri-implantes poder facilitar a proliferação de leveduras nas regiões oral e subgengival⁽¹⁶⁾.

Os fatores de risco associados a um aumento do transporte oral de *Candida* incluem o tabagismo, o estado de hiperglicemia crónica (como em doentes com pré-diabetes e DM), o edentulismo, o desgaste dentário e a má higiene oral. Além disso, estes fatores de risco também têm demonstrado aumentar o risco de peri-implantite^(12, 15, 16).

Diferentes espécies de *Candida* já foram associadas à manutenção da inflamação periodontal na periodontite⁽¹⁷⁾. A *C.albicans* é a espécie mais isolada na PI, desenvolvendo biofilmes grossos sobre a superfície peri-implantar⁽¹⁷⁾. Dada a sua capacidade de aderir à área do implante em contacto íntimo com o osso, tem-se equacionado que a *Candida* também poderá contribuir para a progressão da PI, mas esta ligação ainda não foi bem elucidada⁽¹⁷⁾.

De acordo com os estudos incluídos na revisão de Lafuente-Ibáñez de Mendoza I. *et al*, os implantes com peri-implantite tiveram uma presença mais elevada de *Candida* do que aqueles sem peri-implantite⁽¹⁷⁾. A *Candida* é, assim, um habitante comum do ambiente microbiano subgengival peri-implante, tanto

em pacientes saudáveis como em pessoas que sofrem de PI. No entanto, a presença de *Candida* é mais comum na peri-implantite^(14, 17).

As interações entre a *Candida* e as bactérias orais são fundamentais para permitir a coexistência destes organismos, o que também pode afetar o desenvolvimento e a gravidade das doenças mediadas por biofilme⁽¹⁴⁾.

As interações cândido-bacterianas também têm sido associadas a periodontite, peri-implantite e infecções endodônticas. As evidências disponíveis sugerem uma interação sinérgica entre *C. albicans* e bactérias orais que potencialmente aumentam a virulência dos biofilmes polimicrobianos⁽¹⁴⁾.

Neste contexto, os objetivos do presente estudo são os seguintes:

- Analisar a superfície de implantes de zircônia (Zibone implants®), simultaneamente, após envelhecimento artificial por 2 métodos distintos (termociclagem e autoclavagem) e formação de biofilme de 24h composto por *Candida albicans*;
- Avaliar a influência do envelhecimento artificial (autoclavagem e termociclagem) na adesão de biofilme composto por *Candida albicans* numa superfície de implante de zircônia (Zibone implants®).

Assim, consideram-se as seguintes hipóteses:

H1 – Verifica-se um aumento estatisticamente significativo na adesão de biofilme de *Candida albicans* com o aumento do tempo de envelhecimento da zircônia.

H2 – Não se verifica um aumento estatisticamente significativo na adesão de biofilme de *Candida albicans* com o aumento do tempo de envelhecimento da zircônia.

1. Material e métodos

1.1. Seleção das amostras de Zircónia (Zibone implants®)

Para este estudo utilizaram-se 18 amostras de implante de Zircónia, ZrO₂-TZP (Zibone implants®), caracterizados na figura 3. As amostras foram fornecidas em forma de placas quadrangulares, com dimensões 10.4mmx10.4mmx2mm, pela COHO Biomedical Technology Co., Ltd., COLINK Material Technology Co., Ltd. 21 DAFENG ST. LUZHU DIST.TAOYUAN CITY 33860 TAIWAN (Figuras 4 e 5).

As amostras foram distribuídas por 3 grupos (Tabela 1). 6 amostras foram termocicladas e 6 foram autoclavadas. O grupo de controlo contou, igualmente, com 6 amostras.

Posteriormente, nas amostras (nas mesmas condições de envelhecimento artificial e no grupo controlo), foram formados biofilmes de uma estirpe de *C. albicans* (*C. albicans* SC 5314).



FIGURA 3. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS IMPLANTES DE ZIRCÓNIA ZIBONE®. DISPONÍVEL EM: PRODUCT - COHO BIOMEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD. (ZIBONE.COM). ACESSO EM ABRIL DE 2022. SEM AUTORIZAÇÃO DO AUTOR.

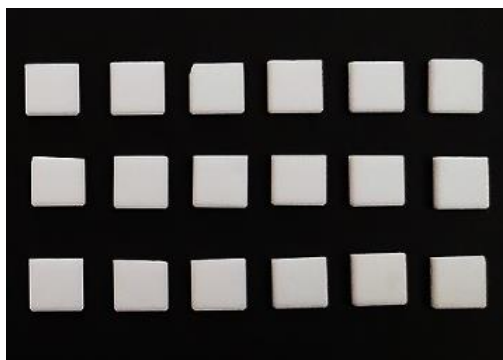


FIGURA 4. FOTOGRAFIA DA TOTALIDADE DAS AMOSTRAS DISPONÍVEIS PARA O ESTUDO (18 AMOSTRAS), AINDA SEM QUALQUER TRATAMENTO.



FIGURA 5. FOTOGRAFIA MACRO DE UMA DAS AMOSTRAS DE ZIBONE IMPLANTS® (10.4MMX10.4MMX2MM).

TABELA 1. GRUPOS EXPERIMENTAIS E MÉTODOS DE ENVELHECIMENTO UTILIZADOS.

Grupo C	Grupo de controlo (amostras de zircónia não sujeitas a envelhecimento artificial)
Grupo ZiT	Grupo das amostras de zircónia termocicladas
Grupo ZiA	Grupo das amostras de zircónia autoclavadas

1.2. Termociclagem das amostras

Como primeiro método de envelhecimento artificial, as 6 amostras do grupo ZiT foram submetidas a termociclagem, com o propósito de beneficiarem das variações de volume provocadas pelas variações de temperatura e do grande poder hidrolítico da água. Para tal, foram introduzidos na termocicladora (ethiktechnology, ethik.com.br), representada na figura 6, e submetidas a 5000 ciclos térmicos em água.

A termocicladora é composta por dois tanques que armazenam água quente e fria (banho 1 e 2, respectivamente). As amostras foram depositadas no cesto que é transferido automaticamente entre os dois banhos (Figura 7), com um tempo de transição de 5 segundos. Foi usada água destilada para encher ambos os tanques. O tanque de água quente (banho 1) foi definido e mantido a 55°C por um termóstato e o de água fria a 5°C (banho 2). Em cada ciclo, as amostras premaneceram 25 segundo em cada banho, totalizando 60 segundos por ciclo.



FIGURA 6. TERMOCICLADORA ETHIKTECHNOLOGY (MODELO 621-1D, POTÊNCIA: 3200W, TENSÃO: 220V 50HZ): FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO.

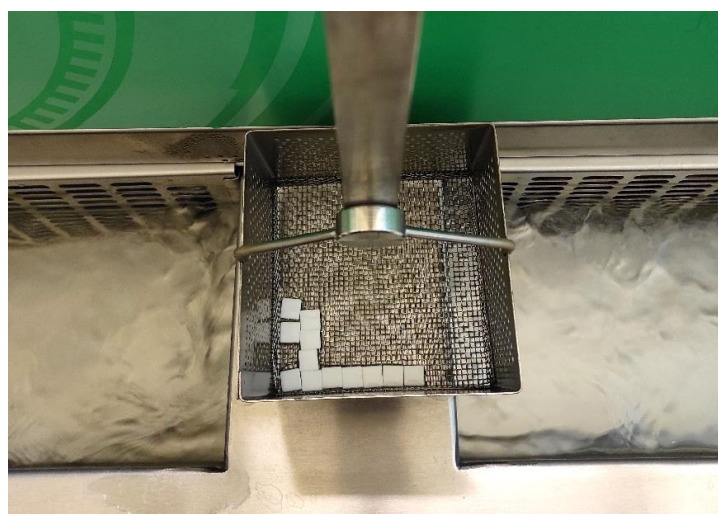


FIGURA 7. AMOSTRAS DISPOSTAS NO CESTO DA TERMOCICLADORA.

1.3. Autoclavagem das amostras

Como segundo método de envelhecimento artificial, 6 amostras foram submetidas a autoclavagem, durante 5 horas a 134°C e a 0.2 MPa/2 bar, de forma a simular entre 15 a 20 anos na cavidade oral, na autoclave representada na figura 8.



FIGURA 8: AUTOCLAVE GETINGE K-SERIES.

Os seguintes procedimentos laboratoriais foram realizados pelo Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho.

1.4. Tratamento das amostras

Para garantir condições assépticas, antes de iniciar o estudo experimental, todas as amostras foram submetidas a radiação ultravioleta durante 15 minutos.

1.5. Estirpes e condições de crescimento

Neste estudo foi utilizada uma estirpe de referência de *Candida albicans* (*C. albicans* SC 5314). Os isolados foram fornecidos pelo Grupo de Biofilme (Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga, Portugal).

A estirpe de referência de *Candida albicans* foi cultivada em *Sabouraud* dextrose agar (SDA; Merck, Darmstadt, Alemanha) a 37°C por 48h. Para cada experiência, as colônias recolhidas a partir das placas SDA foram utilizadas para inocular 40mL de caldo de *Sabouraud* dextrose (SDB; Merck, Darmstadt, Alemanha), que foi incubado a 37°C durante 18h em agitação (120 rpm). A suspensão celular foi centrifugada a 5.000g por 10 minutos a 4°C e as células lavadas duas vezes com 10mL de PBS1x estéril. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* (precipitado) resuspendido em saliva artificial. Para as experiências, a densidade celular foi ajustada para 1×10^5 células/mL utilizando-se um hemocitómetro *Neubauer* (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Alemanha)⁽³⁷⁾.

1.6. Saliva

As diferentes amostras de zircónia foram incubadas em saliva artificial (Tabela 2) durante 2h a 37°C em tubos de plástico esterilizados e, em seguida, enxaguadas suavemente para remover o excesso de saliva.

TABELA 2. COMPOSIÇÃO DA SALIVA ARTIFICIAL (200 mL).

Extrato de fungo	0,4g
Peptona	1g
Glucose	0,4g
NaCl	0,07g
CaCl ₂	0,04g
KCl	0,04g
Mucina	0,2g
Água ultrapura	180mL

NaCl – Cloreto de sódio; CaCl₂ – Cloreto de cálcio; KCl – Cloreto de potássio

*A adição de mucina apenas foi realizada após esterilização da saliva.

1.7. Formação do biofilme

A fim de desenvolver biofilmes de *Candida albicans*, as suspensões celulares preparadas em saliva artificial foram colocadas numa placa de poços, contento as amostras de zircónia, posteriormente incubadas durante 24h a 37°C em agitação (120 rpm). Após a incubação, o meio foi removido e os biofilmes

lavados com 200µL de tampão fosfato-salino (PBS; 0,01M) para remover as células não aderentes⁽³⁷⁾.

1.8. Quantificação do biofilme

O número de células cultivadas no biofilme foi estimado através da contagem de unidades formadoras de colónias (UFC). Os biofilmes desenvolvidos foram raspados dos poços da placa de *microtiter* na presença de PBS1x e as suspensões vigorosamente vórtexizadas durante 2 min para desagregar as células. Foram preparadas diluições em série de 10 vezes das suspensões de biofilme em PBS, depois foram colocadas em placas SDA (10 ml) e incubadas durante 24 h a 37° C. Após a incubação, foi contado o número de UFC nas placas SDA e os resultados apresentados em Log CFU/cm²⁽³⁷⁾.

1.9. Avaliação e caracterização da superfície das amostras

Utilizou-se microscopia eletrónica de varrimento para avaliar e caracterizar as amostras de implante de zircónia (Zibone implants®). As amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol e posteriormente fixadas em base metálica e fotografadas com uma ampliação de 400x e 2500x, após incubação para se caracterizar as superfícies já com os biofilmes aderidos.

As experiências foram realizadas em duplicado em 3 ensaios independentes.

1.10. Análise estatística

A análise estatística foi realizada objetivando-se se se observam diferenças significativas na acumulação de biofilme entre as amostras autoclavadas e o grupo de controlo, entre as amostras termocicladas e o grupo de controlo e entre amostras termocicladas e as autoclavadas. Todos os testes foram realizados com um nível de confiança de 95%. Os dados serão analisados através do Programa SPSS®, utilizando a análise unidirecional de variação (ANOVA).

2. Resultados

De forma a permitir uma leitura e interpretação dos resultados obtidos mais sistematizada, apresentam-se os resultados em 3 tópicos, pela seguinte ordem:

- Análise das superfícies das amostras do grupo controlo das amostras de zircónia termocicladas e das amostras autoclavadas após formação de biofilme de 24h;
- Resultados dos ensaios;
- Análise estatística.

2.1. Análise das superfícies das amostras do grupo controlo após formação de biofilme de 24h

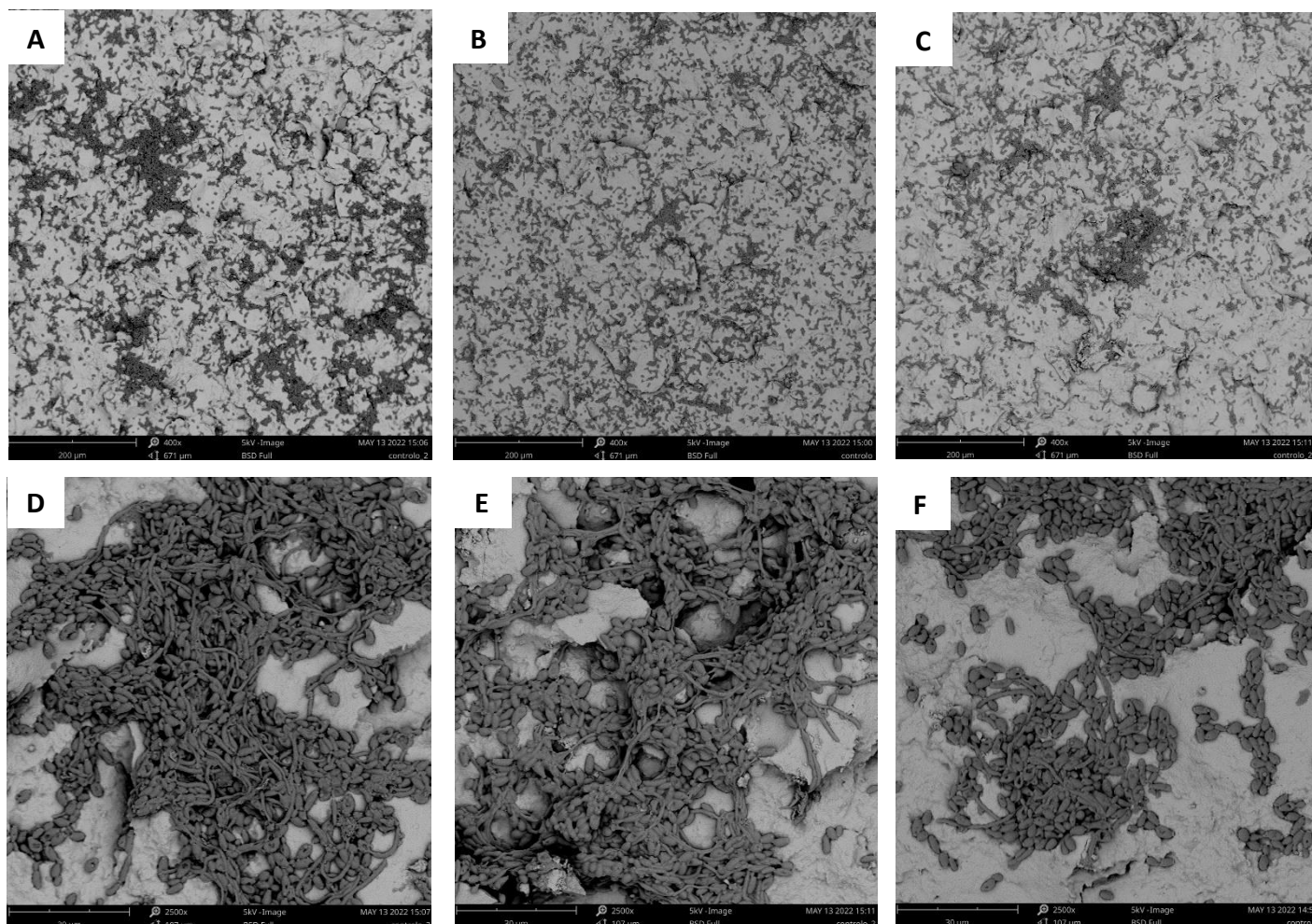


FIGURA 9. IMAGENS DE MEV REFERENTES À SUPERFÍCIE DE UMA DAS AMOSTRAS DO GRUPO CONTROLO (C) APÓS FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *CANDIDA ALBICANS* DE 24H. AS 3 IMAGENS SUPERIORES (A,B,C) FORAM CAPTADAS COM AMPLIAÇÃO 400X E REPRESENTAM 3 REGIÕES DA AMOSTRA. AS 3 IMAGENS INFERIORES (D,E,F) FORAM CAPTADAS COM AMPLIAÇÃO 2500X E REPRESENTAM AS 3 REGIÕES CORRESPONDENTES ÀS IMAGENS SUPERIORES.

Na figura 9, é possível observar na superfície da zircónia, pequenos agregados de *Candida albicans* e células livres que se distribuem de forma homogénea pela mesma. As regiões de maior agregação, visíveis nas imagens de maior ampliação (D, E e F) parecem corresponder a zonas de microfissuras da zircónia. É visível a forma de levedura e de hifa da *Candida albicans* nas imagens D, E e F.

2.2. Análise das superfícies das amostras de zircónia termocicladas após formação de biofilme de 24h

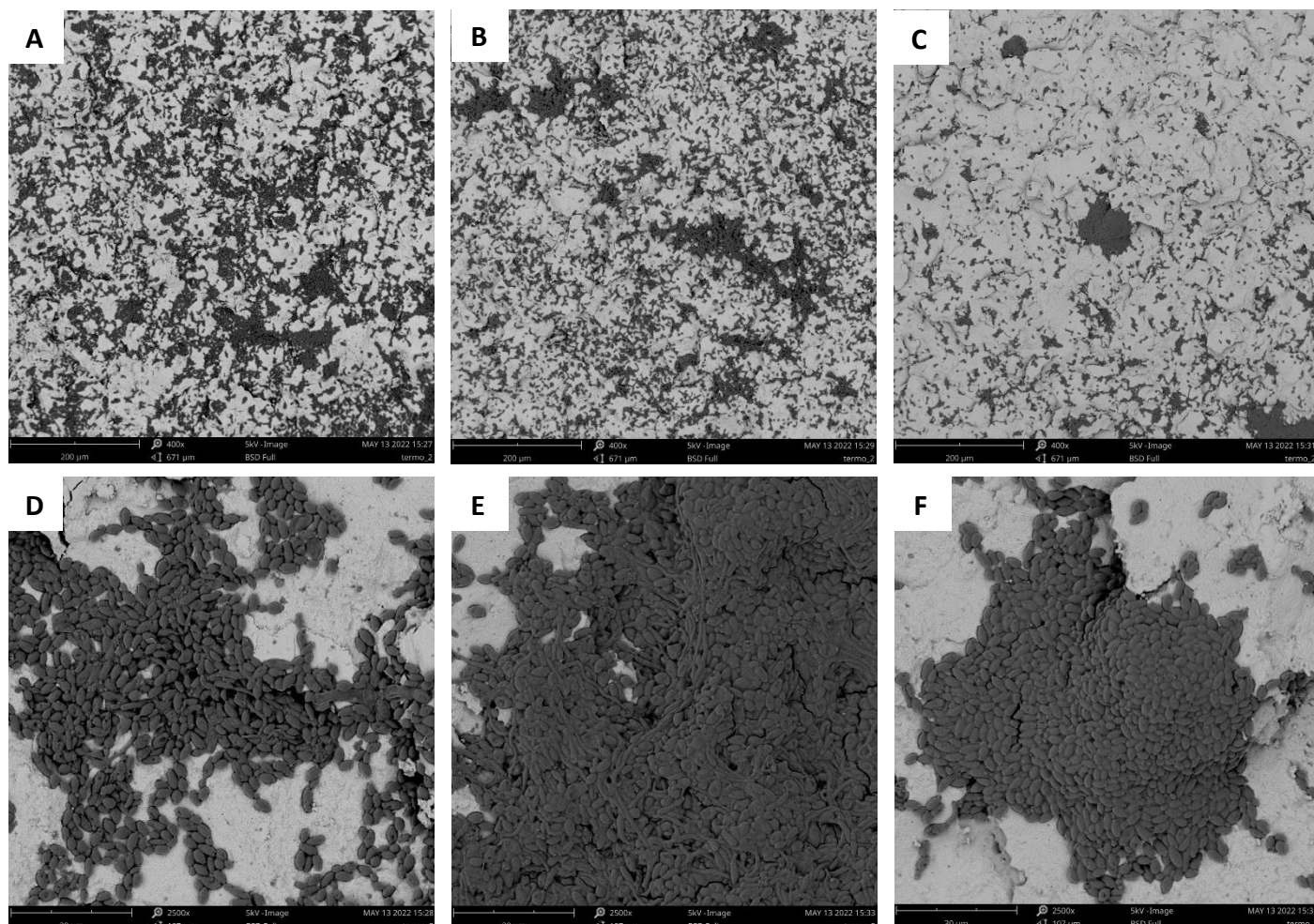


FIGURA 10. IMAGEM DE MEV REFERENTE À SUPERFÍCIE DE UMA DAS AMOSTRAS DO GRUPO DAS AMOSTRAS TERMOCICLADAS (ZIT) APÓS FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *CANDIDA ALBICANS* DE 24H. AS 3 IMAGENS SUPERIORES (A,B,C) FORAM CAPTADAS COM AMPLIAÇÃO 400X E REPRESENTAM 3 REGIÕES DA AMOSTRA AMOSTRA. AS 3 IMAGENS INFERIORES (D,E,F) FORAM CAPTADAS COM AMPLIAÇÃO 2500X E REPRESENTAM AS 3 REGIÕES CORRESPONDENTES ÀS IMAGENS SUPERIORES.

Na figura 10, é possível observar agregações mais “condensadas” de *Candida albicans* na superfície que se distribuem pela superfície. As regiões de maior aglomeração parecem corresponder a zonas de microfissuras da zircónia.

2.3. Análise das superfícies das amostras de zircónia autoclavadas após formação de biofilme de 24h

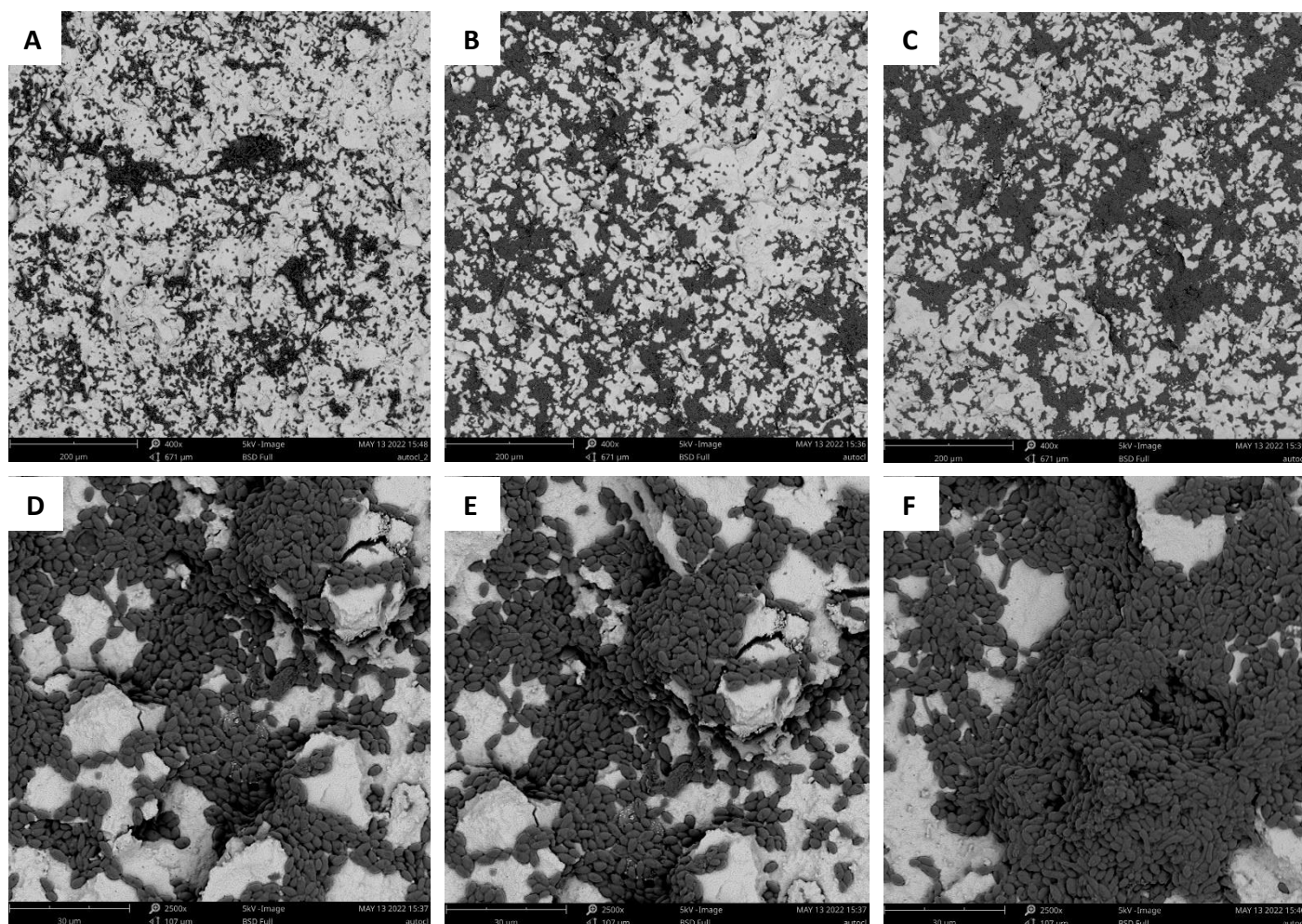


FIGURA 11. FIGURA 11: IMAGEM DE MEV REFERENTE À SUPERFÍCIE DE UMA DAS AMOSTRAS DO GRUPO DE AMOSTRAS AUTOCLAVADAS (ZiA) APÓS FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *CANDIDA ALBICANS* DE 24h. AS 3 IMAGENS SUPERIORES (A,B,C) FORAM CAPTADAS COM AMPLIAÇÃO 400x E REPRESENTAM 3 REGIÕES DA AMOSTRA. AS 3 IMAGENS INFERIORES (D,E,F) FORAM CAPTADAS COM AMPLIAÇÃO 2500x E REPRESENTAM AS 3 REGIÕES CORRESPONDENTES ÀS IMAGENS SUPERIORES.

Na figura 11, verifica-se na superfície da zircónia, um aumento das microfissuras, que parecem ser mais profundas, e os aglomerados de *Candida albicans* parecem também mais “condensados” do que o que é possível observar nas imagens do grupo controlo (Figura 9).

2.4. Resultado dos ensaios

Foram realizados 3 ensaios independentes, em cada um dos quais se utilizaram amostras em duplicado em cada grupo (C, ZiT e ZiA). No entanto, ocorreu contaminação no ensaio 2, não podendo os resultados deste ensaio

serem contabilizados na análise estatística. O ensaio 1 do grupo ZiA não foi realizado por indisponibilidade das amostras aquando do início do trabalho laboratorial.

TABELA 3. RESULTADOS DA CONTAGEM DE UFC DE *CANDIDA ALBICANS* DOS ENSAIOS REALIZADOS.

Grupos	Amostras	Contagem das UFC	
C		Ensaio 1	
		C1	C2
	1	1,42x10 ⁷	5,94x10 ⁷
	2	1,51x10 ⁷	3,53x10 ⁷
		Ensaio 2 - Contaminado	
		C1	C2
	3	ND	ND
	4	ND	ND
		Ensaio 3	
		C1	C2
ZiA			
		Ensaio 1	
		C1	C2
	1	ND	ND
	2	ND	ND
		Ensaio 2 - Contaminado	
		C1	C2
	3	ND	ND
	4	ND	ND
		Ensaio 3	
ZiT			
		Ensaio 1	
		C1	C2
	1	2,83x10 ⁷	1,73x10 ⁷
	2	1,96x10 ⁷	4,13x10 ⁷
		Ensaio 2 - contaminado	
		C1	C2
	3	ND	ND
	4	ND	ND
		Ensaio 3	
		C1	C2
	5	3,88x10 ⁶	4,72x10 ⁶
	6	5,05x10 ⁶	2,92x10 ⁶

ND – não disponível; C1 – contagem 1; C2 – contagem 2; C – grupo controlo; ZiA – grupo das amostras autoclavadas; ZiT – grupo das amostras termocicladas

2.5. Análise estatística

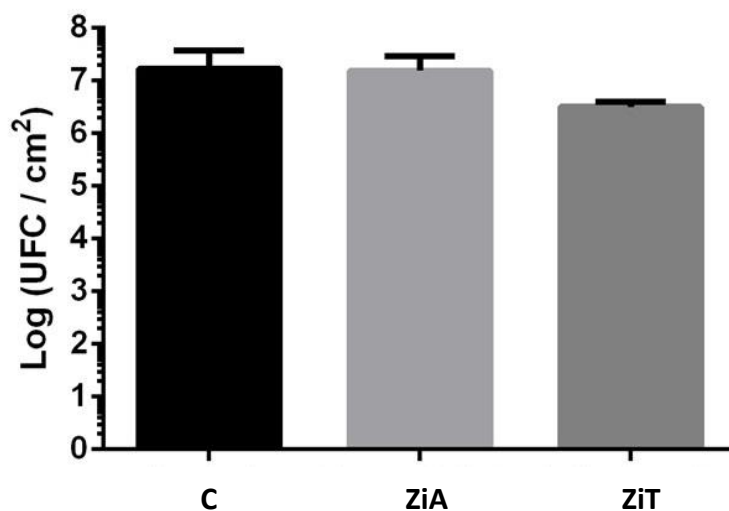


GRÁFICO 1. GRÁFICO REPRESENTATIVO DO CRESCIMENTO DE BIOFILME DE 24H, EM LOG (UFC/cm²), DE *CANDIDA ALBICANS* SC 5314 (Ci = 1x10⁵, 37°C, 120 RPM) NAS AMOSTRAS DE ZIRCÓNIA DO GRUPO CONTROLO (C), AMOSTRAS DE ZIRCÓNIA AUTOCLAVADAS (ZiA) E AMOSTRAS DE ZIRCÓNIA TERMOCICLADAS (ZiT).

Através da análise estatística, concluiu-se que não existem diferenças estatisticamente significativas, para um nível de confiança de 95%, nos valores obtidos em UFC/cm² entre os diferentes grupos.

3. Discussão

No presente estudo a degradação a baixa temperatura foi induzida utilizando dois métodos distintos, a degradação em autoclave e a degradação por termociclagem, simulando, assim, o comportamento dos implantes dentários na CO, num período de tempo de aproximadamente 6 meses (termociclagem) e de 15 a 20 anos (autoclavagem). Esta abordagem está de acordo com estudos anteriores. Gale e Darvel propuseram, em 1999, que 10.000 ciclos representam aproximadamente 1 ano *in vivo*, estimando-se que ocorrem entre 20 a 50 ciclos num dia⁽³⁸⁾. Assim, foi decidido submeter as amostras a 5000 ciclos para simular 6 meses na cavidade oral. Outros estudos defendem que 5 horas de envelhecimento no autoclave a 134°C correspondem entre 15 a 20 anos na CO^(39, 40).

Além das consequências biomecânicas, o envelhecimento geral das superfícies dos materiais pode afetar as suas propriedades físico-químicas e favorecer ou dificultar a colonização do biofilme⁽²⁰⁾.

No estudo de Amin R. *et al*, 2020, amostras de zircónia tetragonal (3Y-TZP) e cúbica (5Y-TZP) foram submetidas a degradação em autoclave programada a 134°C, 2 bars de pressão durante 5 horas equivalente ao protocolo de envelhecimento padrão para simular as condições da CO para 15 anos⁽³⁹⁾. O resultado da rugosidade de superfície revelou que, tanto no que diz respeito à zircónia tetragonal como à cúbica houve um aumento estatisticamente significativo na Ra após o envelhecimento⁽³⁹⁾. Verificaram também uma forte correlação entre a diminuição da dureza superficial e o aumento da fração monoclinica. Isto pode ser devido ao aumento do volume relacionado com a transformação t-m que resulta na formação de micro-fissuras e diminui a densidade atômica local⁽³⁹⁾.

No estudo de da Rocha JFSS. *et al*, 2021, submeteram amostras de implante de zircónia a 20h no autoclave nas mesmas condições (134°C, 0.2MPa/2 bar) para induzir a transformação da fase tetragonal para a fase monoclinica da ZrO₂, no entanto não houve alteração na Ra⁽²⁰⁾.

No presente estudo, o facto de não haver diferença significativa do número de UFC/cm² das amostras dos grupos ZiT e ZiA (submetidos a

degradação) em relação ao grupo de controlo pode indicar que as amostras de implante de zircónia utilizadas neste estudo, não sofreram alterações físico-químicas na superfície significativas, como alterações de rugosidade, da SFE ou do ângulo de contacto (molhabilidade).

Adesão microbiana

As superfícies dos biomateriais, como os implantes, têm um alto risco para a colonização microbiana inicial, para a sua persistência e infeção concomitante⁽²⁹⁾.

Os biofilmes microbianos constituem comunidades multimicrobianas aderentes a superfícies e desempenham um papel dinâmico na etiologia das infeções relacionadas com o implante, como a peri-implantite⁽²⁹⁾. Apesar das condições ambientais adversas (pH, temperatura) presentes na cavidade oral, os microrganismos organizados em biofilme conseguem persistir, levando à falha do tratamento⁽²⁹⁾.

Mombelli A. *et al*, 2011, definiu biofilme como uma comunidade séssil de células que estão irreversivelmente ligadas entre si e a um substrato ou interface, e incorporadas numa matriz extracelular de substâncias poliméricas por si produzida⁽³⁴⁾. Segundo Lohse MB. *et al*, 2018, os biofilmes microbianos são comunidades de células que aderem a superfícies sólidas ou estão presentes em interfaces líquido-ar, e são considerados o estado de crescimento mais comum para muitas espécies microbianas⁽³²⁾.

Sabe-se que a adesão microbiana às superfícies é também resultado de interações moleculares específicas na presença de forças de adesão físico-químicas como as forças eletrostáticas e as forças de Van der Waals⁽¹⁰⁾. Karygianni L. *et al*, 2013, demonstraram que os microrganismos reagem de forma variada a diferentes forças de adesão originárias de materiais de superfície distintos⁽¹⁰⁾. Consideram também que a rugosidade média de superfície (Ra) pode influenciar a taxa inicial de colonização microbiana, bem como a força e as propriedades estruturais dos biofilmes⁽¹⁰⁾.

Tem sido reportado em estudos experimentais e clínicos, uma correlação entre a acumulação de placa e a perda progressiva de osso em torno dos implantes⁽³⁰⁾.

A adesão microbiana inicial correlaciona-se com vários fatores topográficos de superfície que afetam diretamente a resistência da adesão e a arquitetura do biofilme⁽²⁹⁾. Em particular, a Ra é considerada uma referência para a estimativa do potencial de adesão microbiana a várias superfícies de biomateriais⁽²⁹⁾. Na verdade, para vários autores, quanto mais rugosa for a superfície do implante, mais microrganismos se podem acumular e residir em áreas de aderência amplas e irregulares, tais como ranhuras ou poros^(10, 29, 30). Estes últimos protegem as células microbianas das altas forças de cisalhamento e da desorção, maximizando o contacto de interface entre os microrganismos e os substratos durante a fase inicial de adesão^(10, 29). Por outro lado, uma superfície com um baixo valor de Ra inibe fortemente a acumulação e maturação da placa dentro 24 horas⁽³⁰⁾.

Foi definido, por vários autores, um limite de rugosidade de aproximadamente 0,2 μm , acima do qual não ocorrem alterações significativas no que diz respeito à acumulação de biofilme^(5, 10, 20, 33). Todas as amostras utilizadas no presente estudo tinham inicialmente (antes de serem sujeitas a degradação) entre 4 a 6 μm de Ra ($<0,2 \mu\text{m}$).

Outro fator é a energia livre de superfície (SFE), que é um fenómeno físico, originado por interações intermoleculares numa interface que é traduzido para a natureza química do organismo biológico no substrato⁽²⁰⁾. Cada material apresenta uma SFE específica. Já a medição do ângulo de contacto permite avaliar a molhabilidade do material. Um ângulo de contacto inferior a 90 graus significa que “molhar” o material é favorável e que o fluido se espalhará por uma grande área na superfície⁽²⁰⁾.

Vários estudos sugerem que superfícies com SFE mais elevada (hidrofílicas) promovem a ligação de microrganismos orais⁽⁵⁾.

Considera-se também que os agentes patogénicos orais com SFE elevada (a maioria) ligam-se preferencialmente a substratos com SFE elevadas, enquanto os microrganismos de SFE baixa preferem superfícies com SFE baixa,

ou seja, aderem preferencialmente a superfícies com hidrofília comparável à sua^(5, 29, 33).

Segundo da Rocha JFSS. *et al*, a cavidade oral representa um ambiente agressivo devido aos estímulos mecânicos, à ação da saliva, às diferentes condições de temperatura e pH, e aos componentes sanguíneos, que podem favorecer a adesão bacteriana adicional ao material do implante e alterar as características da superfície⁽²⁰⁾.

A superfície dos implantes dentários adquire um biofilme de condicionamento glicoproteico (película salivar) imediatamente após a exposição à cavidade oral, ou seja, a formação da película salivar é considerada o primeiro passo na formação do biofilme⁽⁴⁾.

Em geral, a mucina, a albumina e a α -amilase são relatadas como componentes importantes das películas salivares que modulam o processo de adesão dos agentes patogênicos orais aos biomateriais. Neste contexto, a composição da saliva pode também ser essencial para a adesão dos fungos^(4, 5). A adesão fúngica é mediada por recetores específicos no biofilme condicionado, como por exemplo, as proteínas salivares⁽⁴⁾. A mucina, por exemplo, tem sido assumida como promotora do processo de colonização de *C. albicans* na cavidade oral⁽⁵⁾.

As substâncias antimicrobianas presentes na saliva, por exemplo, a lisozima, a lactoperoxidase e a lactoferrina afetam as propriedades antimicrobianas das superfícies dos implantes⁽²⁹⁾.

Geralmente, a presença de uma película salivar é conhecida por influenciar a quantidade e qualidade de adesão fúngica ao substrato mas continua controverso se o revestimento salivar aumenta a adesão de *C. albicans*⁽⁴⁾. Segundo Li J. *et al*, o revestimento salivar, normalmente, torna as superfícies hidrofílicas, no entanto, reduz a adesão de estirpes hidrofóbicas e permite a adesão de estirpes hidrofílicas⁽¹⁹⁾.

O revestimento de saliva tem um efeito de nivelamento nas diferenças da SFE entre os vários materiais⁽⁴⁾. No entanto, alguns investigadores afirmam que as propriedades da superfície do material original são transferidas mesmo

através da camada de proteínas da película (“efeito de brilho”) e ainda influenciam a adesão microbiana⁽⁴⁾.

As tentativas de minimizar clinicamente a adesão microbiana aos materiais dentários exigem superfícies lisas com uma SFE baixa⁽⁴¹⁾.

Para além dos fatores topográficos acima referidos, a colonização microbiana precoce é também regulada pela estirpe microbiana testada, pela sua concentração e pelo tempo de incubação^(10, 29).

Adesão de *Candida albicans* em zircónia

De acordo com o estudo de Burgers R. *et al*, 2010, a zircónia não mostrou nenhuma tendência para a redução da adesão de *Candida albicans* em comparação com três materiais diferentes de titânio⁽⁴⁾. Outro facto é que a rugosidade de superfície não pareceu ter influência na quantidade de células de *C.albicans* aderidas, o que é contraditório com a maioria de estudos prévios⁽⁴⁾.

No estudo de Li J. *et al*, 2012, verificou-se que o ângulo de contacto superficial dos materiais, o índice de hidrofobicidade, estava correlacionado positivamente com a adesão inicial e a formação de biofilme de *C. albicans*⁽¹⁹⁾. Concluiu, assim, que os materiais hidrofóbicos incentivam a adesão inicial, resultando posteriormente na formação ativa de biofilme⁽¹⁹⁾.

As descobertas de Zupancic CL. *et al*, 2020, não mostraram diferenças significativas na suscetibilidade à adesão de fungos entre dois tipos de discos de zircónia testados (zircónia com *glaze* e zircónia polida), apesar das diferenças evidentes nas suas propriedades físico-químicas de superfície (SFE e Ra, ambas maiores na zircónia com *glaze*)⁽⁵⁾. Isto sugere que o revestimento com sílica influencia as características da superfície da zircónia (hidrofilização da superfície)⁽⁵⁾. Para além disso, este resultado é consistente com os resultados de estudo anteriores que mostraram que a SFE não influencia a formação de biofilme⁽⁵⁾. Estas considerações indicam a complexidade dos padrões de correlação entre as características da superfície e a adesão dos fungos⁽⁵⁾. O revestimento pela película salivar afetou a biomassa de *Candida aderida* e a mucina pareceu ser um bom recetor para o fungo *Candida*⁽⁵⁾.

Para Burguers R. *et al*, 2010, a influência da SLE pareceu ser mais dominante do que a influência da rugosidade de superfície⁽⁴⁾. No entanto, como referido, existem evidências controversas na influência da SFE na adesão fúngica⁽⁴⁾. No mesmo estudo, a incubação em saliva humana resultou numa maior adesão de *C.albicans* em todos os materiais testados⁽⁴⁾. O revestimento de albumina não aumentou a formação de biofilme em nenhum dos materiais de implante testados⁽⁴⁾. No entanto, cada substrato de implante testado mostrou intensidades de luminescência significativamente mais elevadas após a incubação com mucina do que após a incubação com albumina e PBS⁽⁴⁾.

Li J. *et al*, 2012, encontraram uma relação fracamente positiva entre a absorção de mucina e a formação de biofilme em superfícies revestidas com saliva, bem como uma relação fracamente negativa entre a absorção da mucina e a hidrofília do biofilme⁽¹⁹⁾.

Entre os componentes salivares, a mucina tem sido relatada como um recetor para a adesão de *Candida* e subsequente formação e acumulação de biofilme⁽¹⁹⁾. Os resultados de Li J. *et al*, 2012, também mostraram que a mucina desempenha um papel importante na rigidez do biofilme⁽¹⁹⁾.

No estudo de Schienle S. *et al*, 2016, as superfícies de 3Y-TZP revestidas com a-C:H:N (*nitrogen-doped hydrogenated amorphous carbon (a-C:H:N coatings)*) tendiam a albergar menos microrganismos na adesão inicial e interferiam seletivamente com a sua vitalidade⁽²⁹⁾.

Villard N. *et al*, 2015, avaliaram o efeito da silanização e concluiu que os *primers* de silano aumentam a SFE em superfícies de zircónia assim como aconteceu com o revestimento de sílica no estudo de Zupancic CL. *et al*^(5, 33). O aumento dos valores de SFE significa menor hidrofobicidade e melhor molhabilidade das superfícies⁽⁵⁾.

A silanização das superfícies dos diferentes materiais não afetou significativamente a Ra. Nas superfícies de zircónia, os primers de silano parecem ser os responsáveis por aumentar a SFE⁽³³⁾. A superfície com a maior SFE teve menor adesão de *C.albicans*⁽³³⁾.

Villard N. *et al*, julgam que o revestimentos com silano pode não mudar a morfologia superficial na escala dos mm ou µm, mas que pode mudar a forma

como os átomos se aglomeram na superfície, as propriedades das camadas atômicas e influenciar a ligação de *C. albicans* ou bactérias⁽³³⁾.

Da rocha JFSS. *et al.*, 2021, examinaram as propriedades superficiais de Ti e ZrO₂ após o processo de envelhecimento induzido pela autoclavagem para determinar qualquer influência na formação de biofilmes de *C. albicans*⁽²⁰⁾. Imagens com ampliações mais elevadas de MEV revelaram que a colonização da superfície de titânio por *Candida albicans* foi menor do que na zircónia (ZrO₂)⁽²⁰⁾. A rugosidade não foi afetada pelo processo de envelhecimento, o que não era esperado na zircónia⁽²⁰⁾. No entanto, a degradação a baixa temperatura reduziu o ângulo de contacto entre a água e o material, e a superfície tornou-se mais hidrofílica⁽²⁰⁾. Este último facto pode explicar a diminuição das UFC/cm² nos grupos das amostras sujeitas a degradação no presente estudo, visto que a *C.albicans* parece ter maior adesão em superfícies com menor hidrofília.

4. Conclusões

Os resultados do presente estudo estão em concordância com a hipótese 2 (H2) e refutam a hipótese 1 (H1), concluindo que:

- Não se verifica aumento estatisticamente significativo na adesão de biofilme de *Candida albicans* com o aumento do tempo de envelhecimento da zircónia, simulado através de termociclagem e autoclavagem.

Pelo contrário, observou-se uma ligeira diminuição na contagem de UFC (Log/cm²) do grupo controlo (C) para o grupo das amostras autoclavadas (ZiA) e uma maior diminuição do grupo controlo (C) para o grupo das amostras termocicladas (ZiT). No entanto, estas diminuições não se verificaram estatisticamente significativas.

Os resultados sugerem que podem não ter ocorrido alterações significativas na superfície das amostras de implante (Zibone implants®) testadas.

No entanto, as limitações deste estudo devem-se ao número reduzido de amostras e à contaminação de algumas amostras. Numa perspetiva de se obter resultados mais significativos e mais representativos das condições da cavidade oral, poderiam ter sido obtidos outros resultados se o estudo se desenvolvesse *in vivo* ou se tivesse sido utilizada saliva humana *in vitro*, se o biofilme fosse composto por mais do que uma estirpe, se o método de envelhecimento artificial não fosse apenas térmico, mas também mecânico, simulando a mastigação. Seria também interessante avaliar outros parâmetros como por exemplo, a rugosidade de superfície, o ângulo de contacto e a energia livre de superfície.

Apesar de existirem alguns estudos sobre acumulação de biofilme bacteriano em implantes de zircónia, ainda é reduzido o número de publicações científicas que incluem fungos, como a *Candida*, no biofilme. O papel da *Candida* no desenvolvimento da peri-implantite, deve continuar a ser motivo de estudo, visto que, o grande desafio da implantologia é a diminuição das taxas de complicações biológicas tardias associadas à reabilitação com implantes.

5. Referências bibliográficas

1. Özkurt Z, Kazazoğlu E. Zirconia dental implants: a literature review. *J Oral Implantol*. 2011;37(3):367-76.
2. Sivaraman K, Chopra A, Narayan AI, Balakrishnan D. Is zirconia a viable alternative to titanium for oral implant? A critical review. *J Prosthodont Res*. 2018;62(2):121-33.
3. Canullo L, Peñarrocha-Oltra D, Covani U, Rossetti PH. Microbiologic and Clinical Findings of Implants in Healthy Condition and with Peri-Implantitis. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2015;30(4):834-42.
4. Bürgers R, Hahnel S, Reichert TE, Rosentritt M, Behr M, Gerlach T, et al. Adhesion of *Candida albicans* to various dental implant surfaces and the influence of salivary pellicle proteins. *Acta Biomater*. 2010;6(6):2307-13.
5. Zupancic Cepic L, Dvorak G, Piehslinger E, Georgopoulos A. In vitro adherence of *Candida albicans* to zirconia surfaces. *Oral Dis*. 2020;26(5):1072-80.
6. Ban S. Classification and Properties of Dental Zirconia as Implant Fixtures and Superstructures. *Materials (Basel)*. 2021;14(17).
7. Obando-Pereda GA, Fischer L, Stach-Machado DR. Titanium and zirconia particle-induced pro-inflammatory gene expression in cultured macrophages and osteolysis, inflammatory hyperalgesia and edema in vivo. *Life Sci*. 2014;97(2):96-106.
8. Suárez-López Del Amo F, Garaicoa-Pazmiño C, Fretwurst T, Castilho RM, Squarize CH. Dental implants-associated release of titanium particles: A systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2018;29(11):1085-100.
9. Suárez-López Del Amo F, Rudek I, Wagner VP, Martins MD, O'Valle F, Galindo-Moreno P, et al. Titanium Activates the DNA Damage Response Pathway in Oral Epithelial Cells: A Pilot Study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2017;32(6):1413-20.
10. Karygianni L, Jahnig A, Schienle S, Bernsmann F, Adolfsson E, Kohal RJ, et al. Initial Bacterial Adhesion on Different Yttria-Stabilized Tetragonal Zirconia Implant Surfaces in Vitro. *Materials (Basel)*. 2013;6(12):5659-74.

11. Vaz P, Gallas MM, Braga AC, Sampaio-Fernandes JC, Felino A, Tavares P. IL1 gene polymorphisms and unsuccessful dental implants. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23(12):1404-13.
12. Galindo-Moreno P, Fauri M, Avila-Ortiz G, Fernández-Barbero JE, Cabrera-León A, Sánchez-Fernández E. Influence of alcohol and tobacco habits on peri-implant marginal bone loss: a prospective study. *Clin Oral Implants Res.* 2005;16(5):579-86.
13. Heitz-Mayfield LJ. Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators. *J Clin Periodontol.* 2008;35(8 Suppl):292-304.
14. Negrini TC, Koo H, Arthur RA. Candida-Bacterial Biofilms and Host-Microbe Interactions in Oral Diseases. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1197:119-41.
15. Alsahhaf A, Al-Aali KA, Alshagroud RS, Alshiddi IF, Alrahlah A, Abduljabbar T, et al. Comparison of yeast species in the subgingival oral biofilm of individuals with type 2 diabetes and peri-implantitis and individuals with peri-implantitis without diabetes. *J Periodontol.* 2019;90(12):1383-9.
16. Alrabiah M, Alshagroud RS, Alsahhaf A, Almojaly SA, Abduljabbar T, Javed F. Presence of Candida species in the subgingival oral biofilm of patients with peri-implantitis. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2019;21(4):781-5.
17. Lafuente-Ibáñez de Mendoza I, Cayero-Garay A, Quindós-Andrés G, Aguirre-Urizar JM. A systematic review on the implication of Candida in peri-implantitis. *Int J Implant Dent.* 2021;7(1):73.
18. Schwarz F, Becker K, Rahn S, Hegewald A, Pfeffer K, Henrich B. Real-time PCR analysis of fungal organisms and bacterial species at peri-implantitis sites. *Int J Implant Dent.* 2015;1(1):9.
19. Li J, Hirota K, Goto T, Yumoto H, Miyake Y, Ichikawa T. Biofilm formation of Candida albicans on implant overdenture materials and its removal. *J Dent.* 2012;40(8):686-92.
20. da Rocha J, de Avila ED, Rigolin MSM, Barbugli PA, Marin DOM, Mollo Junior FA, et al. Biological and physicochemical implications of the aging process on titanium and zirconia implant material surfaces. *J Prosthet Dent.* 2021;125(1):165-74.
21. Pieralli S, Kohal RJ, Jung RE, Vach K, Spies BC. Clinical Outcomes of Zirconia Dental Implants: A Systematic Review. *J Dent Res.* 2017;96(1):38-46.

22. Chaturvedi TP. An overview of the corrosion aspect of dental implants (titanium and its alloys). *Indian J Dent Res.* 2009;20(1):91-8.
23. Mellado-Valero A, Munoz AI, Pina VG, Sola-Ruiz MF. Electrochemical Behaviour and Galvanic Effects of Titanium Implants Coupled to Metallic Suprastructures in Artificial Saliva. *Materials (Basel).* 2018;11(1).
24. Fretwurst T, Nelson K, Tarnow DP, Wang HL, Giannobile WV. Is Metal Particle Release Associated with Peri-implant Bone Destruction? An Emerging Concept. *J Dent Res.* 2018;97(3):259-65.
25. Jia P, Yang J, Yue Z, Liu J, Liu Q, Liu Z, et al. Comparison of peri-implant submucosal microbiota in arches with zirconia or titanium implant-supported fixed complete dental prostheses: a study protocol for a randomized controlled trial. *Trials.* 2020;21(1):979.
26. Xu K, Liu Y, Liu S, Liu A, Liu P, Liu L, et al. Microorganism adhesion inhibited by silver doped Ytria-stabilized zirconia ceramics. *Ceramics International.* 2011;37(7):2109-15.
27. Cotes C, Arata A, Melo RM, Bottino MA, Machado JP, Souza RO. Effects of aging procedures on the topographic surface, structural stability, and mechanical strength of a ZrO₂-based dental ceramic. *Dent Mater.* 2014;30(12):e396-404.
28. Gil J, Delgado-García-Menocal JA, Velasco-Ortega E, Bosch B, Delgado L, Pérez-Antoñanzas R, et al. Comparison of zirconia degradation in dental implants and femoral balls: an X-ray diffraction and nanoindentation study. *Int J Implant Dent.* 2021;7(1):103.
29. Schienle S, Al-Ahmad A, Kohal RJ, Bernsmann F, Adolfsson E, Montanaro L, et al. Microbial adhesion on novel yttria-stabilized tetragonal zirconia (Y-TZP) implant surfaces with nitrogen-doped hydrogenated amorphous carbon (a-C:H:N) coatings. *Clin Oral Investig.* 2016;20(7):1719-32.
30. 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.
31. Lucas TJ, Lawson NC, Janowski GM, Burgess JO. Phase transformation of dental zirconia following artificial aging. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2015;103(7):1519-23.

32. Lohse MB, Gulati M, Johnson AD, Nobile CJ. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(1):19-31.
33. Villard N, Seneviratne C, Tsoi JK, Heinonen M, Matinlinna J. *Candida albicans* aspects of novel silane system-coated titanium and zirconia implant surfaces. *Clin Oral Implants Res*. 2015;26(3):332-41.
34. Mombelli A, Décaillot F. The characteristics of biofilms in peri-implant disease. *J Clin Periodontol*. 2011;38 Suppl 11:203-13.
35. Jin Q, Teng F, Cheng Z. Association between common polymorphisms in IL-1 and TNF α and risk of peri-implant disease: A meta-analysis. *PLoS One*. 2021;16(10):e0258138.
36. Rams TE, Degener JE, van Winkelhoff AJ. Antibiotic resistance in human peri-implantitis microbiota. *Clin Oral Implants Res*. 2014;25(1):82-90.
37. Gonçalves B, Fernandes L, Henriques M, Silva S. Environmental pH modulates biofilm formation and matrix composition in *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Biofouling*. 2020;36(5):621-30.
38. Gale MS, Darvell BW. Thermal cycling procedures for laboratory testing of dental restorations. *J Dent*. 1999;27(2):89-99.
39. Amin R, El-Etreby A. Effect of Artificial Aging on Hardness and Surface Roughness of Two Types of Zirconia. 2020;6.
40. Cattani-Lorente M, Scherrer SS, Ammann P, Jobin M, Wiskott HW. Low temperature degradation of a Y-TZP dental ceramic. *Acta Biomater*. 2011;7(2):858-65.
41. Schubert A, Wassmann T, Holtappels M, Kurbad O, Krohn S, Bürgers R. Predictability of microbial adhesion to dental materials by roughness parameters. *Coatings*. 2019;9(7).

Anexos

DECLARAÇÃO
Mestrado Integrado em Medicina Dentária

Monografia/Relatório de Estágio

Identificação do autor

Nome completo Bruma Isabel da Costa e Silva
N.º de identificação civil 14685431 N.º de estudante 201803398
Email institucional up201803398@up.pt
Email alternativo bruma.isabel.silva@gmail.com Tlf/Tlm 915751200
Faculdade/Instituto Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

Identificação da publicação

Dissertação de Mestrado Integrado (Monografia) ☒

Relatório de Estágio ☐

Títulocompleto

Análise da superfície de implantes em zircônia submetidos a degradação e infeção por biofilme oral - Estudo in vitro

Orientador Paula Cristina dos Santos Vaz

Coorientador João Carlos Antunes Sampaio Fernandes

Palavras-chave Zircônia; ^{Implantes} dentários; Degradação; ^{Candida} albicans; Peri-implantite

Autorizo a disponibilização imediata do texto integral no Repositório da U.Porto: _____ (x)

Não Autorizo a disponibilização imediata do texto integral no Repositório da U.Porto : X (x)

Autorizo a disponibilização do texto integral no Repositório da U.Porto, com período de embargo, no prazo de:

6 Meses: X; 12 Meses: _____; 18 Meses: _____; 24 Meses: _____; 36 Meses: _____; 120 Meses: _____.

Justificação para a não autorização imediata Aguarda publicação científica

Data 23 / 05 / 2022

Assinatura Bruma Silva

DECLARAÇÃO

Monografia/Relatório de Estágio

Declaro que o presente trabalho, no âmbito da Monografia/Relatório de Estágio, integrado no MIMD, da FMDUP, é da minha autoria e todas as fontes foram devidamente referenciadas.

23 / 05 / 2022

Bruna Silva
O / A Estudante

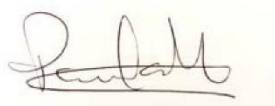
Parecer da Orientadora para entrega definitiva do trabalho apresentado

Declaro que o Trabalho de Monografia desenvolvido pela estudante Bruna Isabel da Costa e Silva, do 5ºano do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da FMDUP, subordinado ao tema: “Análise da superfície de implantes em zircónia submetidos a degradação e infeção por biofilme oral - estudo *in vitro*/Analysis of the surface of zirconia implants undergoing degradation and oral biofilm infection - in vitro study”, se encontra de encontro com as regras estabelecidas pela Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto.

Mais informo que o referido trabalho, foi por mim conferido e se encontra em condições de ser apresentado em provas públicas.

Porto, 23 de Maio de 2022

A Orientadora



(Paula Cristina dos Santos Vaz)

Parecer do Coorientador para entrega definitiva do trabalho apresentado

Declaro que o Trabalho de Monografia desenvolvido pelo estudante Bruna Isabel da Costa e Silva, do 5ºano do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da FMDUP, subordinado ao tema: “Análise da superfície de implantes em zircónia submetidos a degradação e infeção por biofilme oral - estudo *in vitro*/Analysis of the surface of zirconia implants undergoing degradation and oral biofilm infection - *in vitro study*”, se encontra de encontro com as regras estabelecidas pela Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto.

Mais informo que o referido trabalho, foi por mim conferido e se encontra em condições de ser apresentado em provas públicas.

Porto, 23 de Maio de 2022

O Coorientador

(João Carlos Antunes Sampaio Fernandes)