

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CLÍNICA ODONTOLÓGICA
CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA BUCO-MAXILO-FACIAIS

VIVIANE NEVES PACHECO

**EFEITOS IN VITRO DA FOTOFUNCCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DO
TITÂNIO USANDO LUZ UVC**

LINHA DE PESQUISA
BIOMATERIAIS E TÉCNICAS TERAPÊUTICAS EM ODONTOLOGIA

Porto Alegre

2017

VIVIANE NEVES PACHECO

**EFEITOS IN VITRO DA FOTOFUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DO
TITÂNIO USANDO LUZ UVC**

**LINHA DE PESQUISA
BIOMATERIAIS E TÉCNICAS TERAPÊUTICAS EM ODONTOLOGIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Odontologia, na Área de Concentração Clínica Odontológica / Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-faciais.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Deise Ponzoni

Porto Alegre

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Pacheco, Viviane Neves
EFEITOS IN VITRO DA FOTOFUNCIONALIZAÇÃO DA
SUPERFÍCIE DO TITÂNIO USANDO LUZ UVC / Viviane Neves
Pacheco. -- 2017.
56 f.
Orientadora: Deise Ponzoni.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de
Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS,
2017.

1. Osseointegração. 2. Implante dental. 3.
Superfície de titânio. 4. Fotofuncionalização. 5. Luz
UVC. I. Ponzoni, Deise, orient. II. Título.

VIVIANE NEVES PACHECO

**EFEITOS IN VITRO DA FOTOFUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DO TITÂNIO
USANDO LUZ UVC**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Deise Ponzoni (UFRGS)

Profa. Dra. Ana Maria Spohr - PUCRS

Prof. Dr. Tiago Fiorini – UFRGS

Profa. Dr. Angelo Luiz Freddo - UFRGS

Dr. Mauro Gomes Trein Leite

Dedico este trabalho ao meu esposo Josué e ao
meu filho Noah, razões do meu viver...

AGRADECIMENTOS

Ao meu esposo Josué, idealizador desse trabalho, incansável na busca de enriquecimento pessoal e profissional. Por toda a sua paciência, ajuda e amor. Amo você!

Ao meu filho Noah que já é meu amor maior.

À minha família pelo incentivo e torcida na minha formação profissional, por estarem ao meu lado e entenderem os momentos de ausência.

À minha orientadora Profa. Dra. Deise Ponzoni pela responsabilidade e dedicação empregada na trajetória de minha formação profissional, pelos ensinamentos compartilhados durante minha formação acadêmica. Por sua amizade e preocupação, meu muito obrigada!

Ao Dr. Felipe Kessler pelas informações valiosas que auxiliaram no desenvolvimento inicial desse trabalho.

Ao Engenheiro Elétrico Leanderson Morato pela ajuda no desenvolvimento da câmara de luz UVC que tornou esse trabalho possível.

A Engenheira Química Carolina Nick pelo auxílio no preparo das amostras, por sua amizade e alegria contagiante!

Ao Engenheiro Paulo Roberto S. Sanches Chefe do Serviço de Pesquisa e Desenvolvimento em Engenharia Biomédica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo auxílio dispensado durante as fases de teste do dispositivo.

A Profa. Fernanda Visioli por toda sua dedicação, paciência e tranquilidade transmitidas. Por sempre procurar soluções e incentivar os alunos a buscar seu melhor, meu muito obrigada por todo auxílio no desenvolvimento dessa tese.

Ao Prof. Alexandre Silva pelo auxílio nas análises estatísticas desse trabalho.

À aluna de pós-graduação Gabriela de Souza Balbinot por toda ajuda dedicada a manutenção da cultura celular realizada nesse estudo, pelo incentivo e amizade.

Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do HCPA, pelo financiamento deste trabalho.

Ao Núcleo de Pesquisa Básica em Odontologia (NPBO) pela disponibilização dos recursos físicos para cultura celular realizada nessa pesquisa.

Ao Laboratório de Materiais Dentários (LAMAD) da UFRGS pela disponibilização dos recursos para análise de molhabilidade nesse trabalho.

Ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNEPEM- Campinas), laboratório de Nanotecnologia pela disponibilização dos recursos para as análises XPS desse trabalho.

Ao Centro de Microscopia e Microanálise (CMM) da UFRGS pela execução das análises de microscopia eletrônica de varredura.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01: Equação OWRK/Fowkes	46
FIGURA 02: Eletromicroscopia de varredura das amostras de titânio (x9,000).....	46
FIGURA 03: Ângulo de contato com a água variação de acordo com o tempo de exposição à luz.....	46
FIGURA 04: Avaliação do Carbono	47
FIGURA 05: MEV de amostras com cultivo celular.....	47
FIGURA 06: MEV em maior amplitude (x2,700).....	47
FIGURA 07: Adesão celular inicial e Viabilidade	48

LISTA DE TABELAS

TABELA 01: Média de concentração atômica (%) dos elementos detectados por XPS.....**48**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Al₂O₃ - Óxido De Alumínio
BIC - Contato Osso-Implante
BMPs - Proteínas Morfogenéticas Ósseas
CaP - Fosfato De Cálcio
DP - Desvio Padrão
EDTA - Ethylenediamine Tetraacetic Acid
H₂SO₄ - Ácido Sulfúrico
HA – Hidroxiapatita
HCl - Ácido Clorídrico
HF - Ácido Hidrofluorídrico
HNO₃ - Ácido Nítrico
IGF – Fator de Crescimento Semelhante a Insulina
MEV - Microscopia Eletrônica De Varredura
mW - Megawatt
NaCl - Cloreto de sódio
nm - Nanômetro
OH- Hidroxilas
PDGF - Fatores De Crescimento Derivados De Plaquetas
pH - Potencial Hidrogeniônico
RA - Rugosidade Média
SiO₂ - Óxido De Silício
SPSS - Statistical Package for Social Sciences®
SRB - Sulforrodamina B
TiO₂ - Dióxido de Titânio
TGF-β – Fator de Crescimento Transformador Beta
UV - Ultravioleta
UVA - Radiação Ultra Violeta A
UVC - Radiação Ultra Violeta C
VEGF - Fator de Crescimento Vascular Endotelial
IUPAC - União Internacional da Química Pura

RESUMO

A união estrutural entre o tecido ósseo e a superfície do implante é definida como osseointegração. O sucesso deste processo depende tanto de fatores relacionados à característica física do implante, bem como de fatores sistêmicos e biológicos responsáveis pela formação e manutenção do tecido perimplantar. O processo de osseointegração pode ser comprometido por inúmeros fatores de risco: fumo, baixa qualidade e quantidade de tecido ósseo e morbidades sistêmicas, como o diabetes. Contudo, mesmo em condições excelentes, por vezes, não há a formação de tecido ósseo em plenitude ao redor da superfície implantar. A falha na osseointegração pode ocorrer precoce ou tardiamente ocasionando a perda do implante. A fotofuncionalização por irradiação de luz ultravioleta (UV) tem sido reportada recentemente como um método capaz de modificar a superfície do titânio e aumentar sua capacidade osteocondutora. A irradiação com luz ultravioleta (UV) tem sido proposta como método para reverter o processo de envelhecimento do titânio. Contudo a intensidade, tempo de exposição e comprimento de onda que proporcionam os melhores resultados ainda não foram esclarecidos. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da fotocatalise por luz UVC sobre o envelhecimento do titânio e analisar alterações de estrutura e de capacidade biológica *in vitro* do titânio irradiado em diferentes tempos de exposição. **Metodologia:** Foi desenvolvida uma câmara para fotofuncionalização de titânio com características distintas das apresentadas no mercado. A amostra foi composta por discos de titânio irradiados em diferentes tempos de exposição à luz ultravioleta (0, 15, 30, 60 minutos). Os discos foram testados quanto à molhabilidade de superfície (ângulo de contato com água), a topografia (microscopia eletrônica de varredura- MEV) e composição química (espectroscopia de fotoelétrons excitados por raio-x – XPS), adesão celular (cultura celular e MEV) e viabilidade por SRB. **Resultados:** O tratamento por luz UVC promoveu alterações nas características de superfície do titânio, como aumento da molhabilidade e remoção de hidrocarbonetos da superfície após 15 minutos de exposição na câmara desenvolvida. As características biológicas do material também parecem ter sofrido alterações, com melhora na capacidade de adesão e viabilidade. **Conclusões:** A fotofuncionalização do titânio provou ser eficaz para o tratamento de superfícies envelhecidas neste estudo, com significativas modificações na estrutura química superficial e na capacidade biológica do material.

Palavras-chave: Superfície de titânio; Osseointegração; Fotofuncionalização; Fotocatalise; Luz UVC; Implante dental; Hidrocarbonetos

ABSTRACT

The structural union between the bone tissue and the implant surface is defined as osseointegration. The success of this process depends both on factors related to the physical characteristics of the implant, as well as the systemic and biological factors responsible for the formation and maintenance of perimplant tissue. The process of osseointegration can be compromised by numerous risk factors: smoking, poor quality and quantity of bone tissue and systemic morbidities, such as diabetes. However, even in excellent conditions, sometimes there is no formation of bone tissue in fullness around the implant surface. Failure to osseointegration may occur early or late leading to implant loss. Photofunctionalisation by ultraviolet (UV) light irradiation has recently been reported as a method capable of modifying the titanium surface and increasing its osteoconductive capacity. Ultraviolet (UV) irradiation has been proposed as a method to reverse the aging process of titanium. However the intensity, time of exposure and wavelength that provide the best results have not yet been clarified. **The Aim:** of this study was to evaluate the effects of photocatalysis by UVC light on aging of titanium and to analyze changes in structure and *in vitro* biological capacity of irradiated titanium at different exposure times. **Methodology:** A titanium photofunctioning chamber has been developed with characteristics different from those presented in the market. The sample was composed of titanium disks irradiated in different times of exposure to ultraviolet light (0, 15, 30, 60 minutes). The discs were tested for surface wettability (water contact angle), topography (SEM-scanning electron microscopy) and chemical composition (x-ray excitation photoelectron spectroscopy), cell adhesion (cell culture and SEM) and viability by SRB. **Results:** UVC treatment promoted changes in titanium surface characteristics, such as increased wettability and removal of hydrocarbons from the surface after 15 minutes of exposure in the developed chamber. The biological characteristics of the material also appear to have changed, with improved adhesion and viability. **Conclusions:** Photofunctional titanium has proved to be effective for the treatment of surfaces aged in this study, with significant modifications in the surface chemical structure and biological capacity of the material.

Keywords: Titanium surface; Osseointegration; Photofunctionalization; Photocatalysis; UVC light; Dental implants; Hydrocarbons

SUMÁRIO

ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS	12
A OSSEOINTEGRAÇÃO	12
TIPOS DE TRATAMENTOS DE SUPERFÍCIE.....	15
Spray de Plasma	15
Jateamento e Ataque Ácido	16
Nitretação Iônica	16
Anodização	17
Superfície Biomimétrica	17
Superfícies Revestidas Polímeros e Biopolímeros	18
PROCESSO DE ENVELHECIMENTO DO IMPLANTE	18
FOTOFUNCIONALIZAÇÃO DO TITÂNIO	20
OBJETIVO GERAL	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
ARTIGO CIENTÍFICO	25
CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
REFERÊNCIAS	42
ANEXO A – Figuras e Tabelas	46
ANEXO B – Normas para publicação de trabalhos na Revista “Revista Saúde e Desenvolvimento Humano”.....	49

ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS

A OSSEOINTEGRAÇÃO

Durante a década de 1950, Brånemark investigou a microcirculação sanguínea em tíbias de coelho com ajuda de uma câmara de observação em titânio, quando percebeu que o metal e o osso se integravam perfeitamente, sem haver rejeição. Ou seja, o osso vivo tornou-se tão fundido com a camada de óxido de titânio do implante que os dois não poderiam ser separados sem fratura. Brånemark introduziu o termo "osseointegração" para descrever esta modalidade para fixação estável de titânio ao tecido ósseo. A partir dessa descoberta a osseointegração tornou-se um fenômeno importante na odontologia, ciências ortopédicas e de reabilitação (Brånemark *et al.*, 1998).

A definição de osseointegração diz respeito à ancoragem direta de um implante pela formação de tecido ósseo ao redor, sem crescimento de tecido fibroso, na interface osso-implante (Saunders, 1994).

Uma definição mais completa foi sugerida por Brånemark *et al.* (1997), onde o termo osseointegração pode ser definido considerando vários pontos de vista: científicos e sob o olhar do paciente. Um implante está osseointegrado se oferecer um suporte estável e aparentemente imóvel de uma prótese sob cargas funcionais, sem dor, inflamação ou afrouxamento. Do ponto de vista da biologia macroscópica e microscópica e medicina, a osseointegração de um implante no osso é definida como a aposição íntima de osso neoformado, incluindo irregularidades de superfície, de forma que, à análise por microscopia óptica, não haja interposição de tecido conjuntivo ou fibroso e seja estabelecida uma conexão estrutural e funcional direta, capaz de suportar cargas fisiológicas normais sem deformação excessiva e sem iniciar um mecanismo de rejeição. Do ponto de vista biomecânico macroscópico, um implante está osseointegrado se não

houver aumento da mobilidade entre implante e o osso vivo e medula circundantes sob níveis e tipos de carga funcionais por toda a vida do paciente. Também é necessário que as deformações sejam da mesma ordem de magnitude que quando as mesmas cargas são aplicadas diretamente no osso. Do ponto de vista biofísico microscópico: a osseointegração implica que, na microscopia óptica e eletrônica, os componentes identificáveis do tecido em uma fina zona ao redor da superfície do implante sejam identificados como componentes ósseos e medulares normais, que continuamente constituem uma estrutura óssea normal ao redor da fixação. Isto implica que o tecido mineralizado deve estar em contato a nanômetros, de forma que não exista material significativo interposto funcionalmente na interface (Brånemark et al., 1997).

A osseointegração distingue-se de outros processos do osso, tais como a cicatrização e a remodelação e graças a esse fenômeno o titânio e outros materiais de implante são usados rotineiramente para tratamentos reconstrutivos na Odontologia e Ortopedia (Lee e Ogawa, 2012; LeGeros e Craig, 1993).

O comportamento celular durante o processo de osseointegração pode ser dividido em fases de adesão e colonização, proliferação e diferenciação (Lee e Ogawa, 2012). Após a fresagem do leito cirúrgico os vasos danificados irão resultar em sangramento e formação de coágulo. As proteínas como a fibronectina e albumina, presentes no sangue, se depositarão na superfície do implante promovendo a adesão de osteoblastos. A velocidade e capacidade de adsorção de proteínas é um componente crítico para determinar o nível de biocompatibilidade de materiais implantáveis. Baseado em estudos a nível molecular, a interação do implante com os osteoblastos pode ser caracterizada como específica, mediada por proteínas, dinâmica em eventos geradores de sinalização (Olivares-Navarrete *et al.*, 2010). O tempo para a superfície de um biomaterial atrair proteínas é de 24 horas, sob condições fisiológicas (Suzuki *et al.*, 2009). A quantidade e qualidade de células que estão presentes durante a fase de adesão será determinante

no decorrer do processo, podendo afetar o volume de formação óssea peri-implantar (Lee e Ogawa, 2012).

A proliferação celular pode ser afetada por inúmeros aspectos, como: fatores de crescimento, hormônios, força biomecânica e condições da superfície do implante. A proliferação lenta resulta em atraso no processo e atrapalha a atividade intercelular necessária para diferenciação celular (Cooper *et al.*, 1998; Kacena *et al.*, 2006).

A maturação e proliferação dos osteoblastos ocorrerão nessa superfície com a produção de uma matriz mineralizada realizando a integração do titânio com o osso (Lee e Ogawa, 2012). O tempo prolongado de cicatrização, com o estabelecimento rápido e consistente de uma integração osso-implante, prévio à realização da prótese têm sido um desafio para diminuição da morbidade dos pacientes (LeGeros e Craig, 1993).

O sucesso para ancoragem de implante é dependente da quantidade óssea depositada ao redor do titânio sem interferência de tecido mole. Estudos prévios mostram que o contato osso-implante (BIC) mantém-se em média entre 45% a 75% (Ogawa, 2014; Ogawa e Nishimura, 2003; Wennerberg *et al.*, 1998). Biologicamente não há um completo entendimento da razão pela qual não ocorre uma formação completa de osso na superfície do implante. No entanto apesar de ser uma questão de extrema importância parece ter sido negligenciada nos últimos anos e aceita como um fato inevitável. Grande parte dos implantes falham por uma integração incompleta, bem como a diminuição de osso marginal causa problemas na estética e pode estar associada a alterações na saúde dos tecidos moles peri-implantares, comprometendo o prognóstico dos implantes. Comumente os fatores mais associados a baixas taxas de BIC encontradas ficam associadas a questões específicas do leito receptor (qualidade e quantidade óssea), infecções, perfil sistêmico do paciente (diabetes) entre outros. Pouco tem se relacionado os baixos índices de formação óssea periimplantar com características particulares das superfícies dos implantes (Att *et al.*, 2009, Pyo, 2013).

TIPOS DE TRATAMENTOS DE SUPERFÍCIE

Os primeiros implantes dentários a surgirem possuíam sua superfície maquinada, sem nenhum tipo de tratamento em suas roscas. Com o objetivo de acelerar o processo de osseointegração e garantir um melhor contato entre o osso e o implante, iniciaram-se as modificações das superfícies dos implantes ou tratamento de superfície (Wennerberg *et al.*, 1996). As técnicas que alteram a superfície do titânio podem ser classificadas como aditivas (eletroquímico, plasma de titânio e hidroxiapatita) ou subtrativas (ataque ácido, jateamento abrasivo, laser) e associação das técnicas. (Maluf *et al.*, 2007) Essas alterações buscam modificar as características do material alterando sua energia de superfície e molhabilidade, com o objetivo de criar uma superfície peri-implantar com maior potencial osteogênico e conseqüentemente proporcionar aumento da estabilidade óssea e diminuição do tempo de cicatrização (Att *et al.*, 2009; Lee e Ogawa, 2012).

Spray de Plasma

A deposição de titânio ou hidroxiapatita por spray de plasma é o tipo de tratamento mais comum. Esta técnica consiste em injetar pó de titânio ou hidroxiapatita (HA) dentro de um sistema de plasma em alta temperatura onde as partículas são lançadas em grandes velocidades contra o corpo do implante. Após o contato, essas partículas resfriam e se solidificam. A rugosidade média (Ra) de superfícies titânio e HA, modificadas por spray de plasma, atingem valores de aproximadamente 70 e 10 μ m, consideradas como processo de macrotexturização (Galli *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2014).

Jateamento e Ataque Ácido

A técnica de modificação de superfície por jateamento consiste em bombardear partículas abrasivas micrométricas de aproximadamente 250 μm , como óxido de alumínio (Al_2O_3), óxido de silício (SiO_2) ou óxido de titânio (TiO_2) sobre a superfície do implante. Após o jateamento, frequentemente a superfície passa por um ataque ácido: ácido clorídrico (HCl); ácido hidrofluorídrico (HF); ácido nítrico (HNO_3) e o ácido sulfúrico (H_2SO_4), este tipo de superfície jateada e imersa em substâncias ácidas, é conhecida comercialmente como SLA e pode atingir valores de rugosidade média (R_a) entre 1,1 a 2,7 μm .

Os implantes que são tratados por jateamento e de ataque ácido, sendo processados sob atmosfera de nitrogênio e armazenados em NaCl (cloreto de sódio) isotônico possuem uma melhora da adsorção de proteínas e estabilidade do implante (Rupp *et al.*, 2014).

Nitretação Iônica

A nitretação iônica consiste na deposição de nitretos nas superfícies de titânio quando inseridos em plasma de nitrogênio, pode ser considerada outra técnica aditiva para modificação da superfície. Esse processo consiste em uma descarga elétrica em um gás contendo nitrogênio a baixa pressão, promovendo o bombardeio de íons e de espécies neutras sobre uma superfície metálica. Considerada uma técnica limpa algumas de suas vantagens consistem em baixa temperatura de tratamento, melhor controle da espessura da camada, tempo de tratamento inferior, uniformidade na espessura da camada, entre outras (Silva *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2014).

Anodização

O processo de anodização é um método eletroquímico que induz a oxidação da superfície do titânio, criando um filme de óxido por meio da colocação do titânio como um ânodo em um circuito elétrico no qual é aplicado uma tensão. Esse processo permite a formação de nanotúbulos organizados e alinhados aumentando a superfície de contato. Béltran-Partida *et al.* (2017) buscaram investigar os efeitos de angiogênese *in vitro* em TiO₂ anodizado e na liga de Ti6Al4V sintetizada e desinfetada usando água superoxidada. Avaliaram ainda, o papel da rugosidade superficial e composição química da superfície. Seus resultados mostraram que a anodização gerou a formação de nanotúbulos com diâmetros bem definidos e mais regulares e promoveu a atividade endotelial *in vitro*, podendo melhorar a angiogênese *in vivo*, o que suporta um processo de osseointegração clínica mais rápida (Beltrán-Partida, 2017; Silva *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2014).

Superfície Biomimética

Como conceito, a alteração por método biomimético diz respeito a utilização de estratégias e soluções baseadas nos princípios da Natureza, No tratamento de superfície biomimética há a precipitação heterogênea de fosfato de cálcio (CaP) sob condições fisiológicas de temperatura e pH. Estudos têm revelado que os revestimentos biomiméticos com fosfatos de cálcio são rapidamente solubilizados e absorvidos por osteoclastos em comparação aos revestimentos a plasma. García-Gareta e colaboradores, funcionalizaram superfícies metálicas (liga de titânio e tântalo) com depósitos de CaP biomiméticos (composto de nanopartículas) mostrando aumento da adesão inicial, proliferação e diferenciação osteogênica (García-Gareta, 2017; Silva *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2014).

Superfícies revestidas polímeros e biopolímeros

Recentemente a ideia de adicionar materiais poliméricos à superfície do titânio ganhou espaço na literatura. O objetivo é incorporar ao titânio elementos como os antimicrobianos, fatores de crescimento (TGF- β), proteínas morfogenéticas do osso (BMPs), TGF- β 1, fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) e à base de insulina (IGF-1 e 2). Schliephake *et al.*, (2015) avaliou implantes com adição de VEGF (Fator de crescimento vascular endotelial ancorado por ODN-DNA oligonucleotideo), quanto a melhorara no nível de formação óssea periimplantar. O estudo concluiu que o uso do VEGF vinculado a um sistema de adesão por ODN pode melhorar o contato entre o osso e a superfície do implante de maneira limitada em 04 semanas (Schliephake *et al.*, 2015)

PROCESSO DE ENVELHECIMENTO DO IMPLANTE

O envelhecimento natural da superfície do implante tem sido discutido como um dos fatores de impedimento para uma adequada junção entre tecido ósseo e superfície do titânio. A superfície do implante constantemente absorve impurezas como policarbonetos e hidrocarbonetos da atmosfera, água e soluções de limpeza. O progressivo acúmulo de moléculas orgânicas é considerado inevitável sobre as condições ambientes. De fato, as superfícies de implantes utilizadas, tanto na clínica como em experimentos estão contaminadas por hidrocarbonetos (Att *et al.*, 2009; Lee e Ogawa, 2012; Ogawa, 2014).

Att *et al.* (2009) testaram a hipótese de que a bioatividade da superfície do titânio modifica-se ao longo do tempo. Foram realizadas análises *in vitro* e *in vivo* de modo a investigar se alguma das etapas até a osseointegração é afetada devido ao envelhecimento do titânio. A

amostra era composta por discos de titânio de 0h (imediatamente após condicionamento ácido), 3 dias, 2 semanas e 4 semanas. A capacidade de adsorção de proteínas, migração, adesão, proliferação e mineralização de osteoblasto diminuiu substancialmente e de maneira dependente conforme a idade do titânio. Na comparação dos implantes colocados em fêmures de ratos a força biomecânica da integração osso-titânio, nas fases iniciais de cicatrização, foi a menos de metade para o de 4 semanas do que para recém-processados. Nos implantes novos, mais de 90% da superfície do implante estava coberta por osso neoformado em comparação com 58% para os implantes de 4 semanas de idade (Lee e Ogawa, 2012).

O processo de envelhecimento dos implantes pelo acúmulo de hidrocarbonetos modifica sua propriedade hidrofílica. Após o ataque ácido sobre a superfície de titânio os implantes adquirem característica hidrofílica por pelo menos uma semana. A proporção de átomo de carbono, que é menor que 20% na primeira semana passa a ser de aproximadamente 60% na quarta semana após exposição na atmosfera, tornando a superfície hidrofóbica (Att *et al.*, 2009).

Em grande parte, os implantes ainda são armazenados a seco em contato com o ar atmosférico o que proporciona o envelhecimento da superfície dos implantes. Alguns fabricantes já realizam a produção dos implantes em condição de isolamento gasoso e armazenagem em meio aquoso, visando assim a manutenção das características super-hidrofílicas e o *status* eletrostático positivo. Essas características mudam positivamente a cicatrização óssea sobre os implantes, tornando-a mais rápida e uniforme (Souza *et al.*, 2014).

Hoje, a validade do implante está ligada a esterilidade da embalagem. Contudo, se a bioatividade do implante varia dependendo do tempo de seu processamento, informações mais concretas sobre sua data de produção e tempo indicado para uso deveriam estar contidas na embalagem (Att *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2010).

FOTOFUNCIONALIZAÇÃO DO TITÂNIO

A palavra funcionalização surgiu no meio científico ligada ao ato de funcionalizar um material, agregando a este propriedade ativas. A irradiação do titânio ou implante de titânio com luz ultravioleta e seus efeitos físico-químico e biológicos é denominado fotofuncionalização. Um dos efeitos mais perceptíveis é a alteração de sua superfície de hidrofóbica para hidrofílica. A avaliação do status de hidroflicidade de diferentes superfícies é realizada através da mensuração do ângulo de contato de gotas de água com o material (teste de molhabilidade), sendo superhidrofílico ângulos menores 5° (Lee e Ogawa, 2012).

O mecanismo que produz a superhidrofilicidade ainda é discutido. Uma das propostas para explicar esse efeito é a conversão de Ti^{4+} em Ti^{3+} , o que favorece a dissociação de água e adsorção para grupos de formas básicas $Ti-OH$. A outra proposta é a de eliminação de hidrocarbonetos da superfície de TiO_2 . A dispersão de energia de luz UV maior que $3.2eV$ pode induzir a fotocatalise do TiO_2 , correspondendo a um comprimento de onda de $360nm$ para UVA e $250nm$ para UVC (Att *et al.*, 2009).

A União Internacional da Química Pura (IUPAC) define o termo fotocatalise como uma reação catalítica que envolve absorção da luz por um catalisador ou um substrato. Nesse caso, o catalisador envolvido é definido como uma substância que pode produzir, por absorção de um quantum de luz, as transformações químicas dos participantes da reação. A fotocatalise é uma mudança na taxa de reações químicas gerada sob a ação da luz na presença de substâncias (fotocatalisadores) que absorvem um quantum de luz e são envolvidos nas transformações químicas dos participantes da reação, entram repetidamente com eles em interações intermediárias e regeneram sua composição química depois de cada ciclo de tais interações (Almeida, 2011).

Comparando a efetividade da luz UVC e UVA sobre a fotofuncionalização de superfície de titânio tratada, observou-se maior efetividade da luz UVC em promover adsorção de proteínas, adesão e proliferação celular em comparação a luz UVA. Acredita-se que a luz UVA mediando a fotocatalise da reação possa remover hidrocarbonetos da estrutura, enquanto a luz UVC diretamente decompõe hidrocarbonetos, sendo que a presença de mais grupos de Ti-OH possa ser a razão da superioridade da luz UVC (Aita *et al.*, 2009; Att *et al.*, 2009; Almeida, 2011).

O titânio é considerado um material implantável bioinerte, por sua boa propriedade anticorrosiva. Não parece haver interação direta do titânio com proteínas ou células devido a essa natureza. Sabe-se que superfície de TiO² é eletronegativa, sendo necessário a ajuda de cátions divalentes para atrair proteínas que irão auxiliar na adesão celular. No entanto, estudos recentes mostram que a superfície do titânio tratada com UV atrai proteínas e células necessárias para osseointegração em razão da mudança do perfil eletrostático, ou seja, a mudança da superfície carregada positivamente atrai diretamente células sem a ajuda de cátions. Sugerindo a redefinição de bioinerte para bioativo (Aita *et al.* 2009; Ogawa 2014; Pyo *et al.* 2013).

Outra notável modificação diz respeito à alteração da composição química da superfície. Após expostas à atmosfera, a superfície de titânio (dióxido de titânio) torna-se coberta por partículas contaminantes de carbono. O tratamento de luz UV tem mostrado reduzir consideravelmente esse percentual de carbono (Aita *et al.* 2009; Pyo *et al.* 2013).

O percentual de carbono de pode aumentar em 55% ou mais dependendo da idade do implante, após a irradiação de luz UV esse percentual cai para pelo menos 20%, com isso a adesão de células osteoblásticas aumenta exponencialmente conforme a progressiva remoção de carbono (Aita *et al.* 2009; Att *et al.* 2009; Ogawa 2014; Pyo *et al.* 2013; Suzuki *et al.* 2009).

Experimentos *in vivo* mostram que após o processo de fotofuncionalização ocorre o aumento da chegada, adesão e proliferação de células osteogênicas ao redor do implante. A

osseointegração com implantes de superfície tratada por ataque ácido e tratados por luz UV mostrou 3 vezes mais estabilidade na segunda semana em comparação a implantes não tratados (Aita *et al.* 2009).

Aita *et al.* (2009), realizaram um grande ensaio sobre a fotofuncionalização sobre o titânio. Seu estudo observou aspectos *in vitro* de migração celular, expressão genética entre outros e *in vivo* aspectos histológicos da formação óssea ao redor do implante e fixação do implante. Seus resultados mostraram que o tratamento realizado por luz UV aumenta consideravelmente a capacidade osseocondutora.

Shen *et al.* (2016) realizaram um estudo para investigar o envelhecimento do titânio mesmo armazenado em solução líquida e avaliou a combinação da formação espontânea de nanoestruturas e irradiação UV nas características de superfície e osseointegração. O trabalho demonstrou inevitável formação de hidrocarbonetos mesmo nos grupos estocados em meio aquoso. A irradiação UV eliminou hidrocarbonetos e foi efetiva em aprimorar a osseointegração (Shen *et al.*, 2016).

A grande maioria dos trabalhos que realizam fotofuncionalização sobre implantes utilizaram um forno comercializado de luz UV com mistura de espectros de intensidade de cerca de 0,05 mW/cm² ($\lambda = 360$ nm) e 2 mW/cm² ($\lambda = 250$ nm) com variações do tempo de irradiação de luz UV entre 12 a 15 minutos (Att e Ogawa 2012; Hirota *et al.*, 2017; Ogawa, 2014; Pyo *et al.*, 2013; Roy *et al.*, 2016; Suzuki *et al.*, 2013). Outros trabalhos utilizaram uma lâmpada bactericida de 15W de potencia e intensidade de 0.1mW/cm² e 2mW/cm², com tempos diferentes tempos de exposição até 48h (Aita, 2009; Shen *et al.*, 2016).

Atualmente existe no mercado apenas um aparelho desenvolvido para fotofuncionalização de implantes dentários e este não é comercializado no Brasil. Visto que a fotofuncionalização pode ser um método eficaz para o aumento das taxas de sucesso de osteointegração, o presente estudo teve o propósito desenvolver um protótipo com modificações

em relação a intensidade e comprimento de onda utilizados em relação ao comercializado, visando melhorias no processo de fotocatalise.

OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi reproduzir um aparelho para irradiação de luz ultravioleta sobre implantes dentários, passível de adaptação para uso em consultórios odontológicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar *in vitro* as modificações do titânio irradiado por luz UVC em diferentes tempos de exposição quando a:

- Quantificação da estrutura química de superfície por Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raio-x (XPS);
- Análise topográfica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);
- Análise de molhabilidade de superfície;
- Teste de capacidade biológica através dos testes de toxicidade (SRB) e viabilidade após cultivo celular.

EFEITOS IN VITRO DA FOTOFUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DO TITÂNIO USANDO LUZ UVC

Viviane Neves Pacheco¹

Josué Nolde²

Alexandre Silva de Quevedo³

Fernanda Visioli⁴

Deise Ponzoni⁵

¹Mestre e Doutoranda em Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-faciais do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da UFRGS. Porto Alegre, RS, Brasil.

²Cirurgião-Dentista graduado pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

³Professor associado do departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Odontologia da UFRGS. Porto Alegre, RS, Brasil.

⁴Professora associada do departamento de Odontologia Conservadora da Faculdade de Odontologia da UFRGS Porto Alegre, RS, Brasil.

⁵Professora associada do departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Odontologia da UFRGS e chefe da Unidade de Cirurgia Buco-maxilo-facial/Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Porto Alegre, RS, Brasil.

Correspondência: Viviane Neves Pacheco, Ramiro Barcelos, 2492, 90035-003 – Porto Alegre, RS, Brasil. vivi.npacheco@hotmail.com; Telefone: / +55-51-98401.4819

RESUMO

A irradiação com luz ultravioleta (UV) tem sido proposta como método para reverter o processo de envelhecimento do titânio. Contudo a intensidade, tempo de exposição e comprimento de onda que proporcionam os melhores resultados ainda não foram esclarecidos. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da fotocatalise por luz UVC sobre o envelhecimento do titânio e analisar alterações de estrutura e de capacidade biológica *in vitro* do titânio irradiado em diferentes tempos de exposição. **Metodologia:** Foi desenvolvida uma câmara para fotofuncionalização de titânio com características distintas das apresentadas no mercado. A amostra foi composta por discos de titânio irradiados em diferentes tempos de exposição à luz ultravioleta (0, 15, 30, 60 minutos). Os discos foram testados quanto à molhabilidade de superfície (ângulo de contato com água), a topografia (microscopia eletrônica de varredura- MEV) e composição química (espectroscopia de fotoelétrons excitados por raio-x – XPS), adesão celular (cultura celular e MEV) e viabilidade por SRB. **Resultados:** O tratamento por luz UVC promoveu alterações nas características de superfície do titânio, como aumento da molhabilidade e remoção de hidrocarbonetos da superfície após 15 minutos de exposição na câmara desenvolvida. As características biológicas do material também parecem ter sofrido alterações, com melhora na capacidade de adesão e viabilidade. **Conclusões:** A fotofuncionalização do titânio provou ser eficaz para o tratamento de superfícies envelhecidas neste estudo, com significativas modificações na estrutura química superficial e na capacidade biológica do material.

Palavras-chave: Superfície de titânio; Osseointegração; Fotofuncionalização; Fotocatalise; Luz UVC; Implante dental; Hidrocarbonetos

1. INTRODUÇÃO

Amplamente utilizado na implantodontia e ortopedia, o titânio possui excelentes propriedades físicas como alta resistência a corrosão, baixo módulo de elasticidade e considerável resistência à fadiga em comparação a outras ligas metálicas (Brånemark *et al.*, 1997). Ao longo das últimas décadas, modificações na superfície do titânio têm sido investigadas buscando acelerar e melhorar o processo de osseointegração. Alterações de ordem topográfica e química por meio de nanotecnologia têm mostrado sucesso nos parâmetros osteogênicos (Beltrán-Partida *et al.*, 2017; Grischke *et al.*, 2016; Saghiri *et al.*, 2016; Schliephake *et al.*, 2015). Recentemente passou-se a considerar o processo natural de envelhecimento da capacidade biológica do titânio. A superfície do implante absorve constantemente impurezas como policarbonetos e hidrocarbonetos da atmosfera após sua fresagem. A proporção de carbono, que é menor que 20% na primeira semana alcança valores de aproximadamente 60% na quarta semana após exposição na atmosfera, ocasionando modificação do padrão da superfície. O padrão de hidrofiliabilidade, capacidade de adsorção de proteínas, adesão e proliferação celular são algumas das propriedades que sofrem alteração devido ao progressivo acúmulo de moléculas orgânicas, sendo considerado no processo de envelhecimento dos implantes (Att *et al.* 2009; Lee e Ogawa, 2012; Ogawa 2014; Roy *et al.*, 2016).

Aplicação de luz ultravioleta, conhecida como fotofuncionalização, tem se mostrado promissor na decomposição de hidrocarbonetos da superfície do titânio. Alterações químicas promovidas pelo uso da luz na superfície do titânio têm sugerido alteração do perfil hidrofóbico e nos padrões de osteogênese, que suportariam um processo de osteointegração mais rápido e eficaz (Aita *et al.*, 2009; Henningsen *et al.*, 2017; Ogawa, 2014; Ueno *et al.*, 2010). Os estudos realizados na área utilizam diferentes intensidades de energia e espectro

eletromagnético da luz ultravioleta (UVA ou UVC) para o processo de fotofuncionalização. O mais descrito é o uso de um forno comercializado de luz UV com mistura de espectros na intensidade de cerca de $0,05 \text{ mW/cm}^2$ ($\lambda = 360 \text{ nm}$) e 2 mW/cm^2 ($\lambda = 250 \text{ nm}$) por 12 min (Att e Ogawa 2012; Henningsen *et al.*, 2017; Ogawa, 2014; Ueno *et al.*, 2010). Outros trabalhos como o de Aita (2009) utilizou uma lâmpada bactericida de 15W de potencia e intensidade $0,1 \text{ mW/cm}^2$ ($\lambda = 360 \text{ nm}$) e 2 mW/cm^2 ($\lambda = 250 \text{ nm}$) com tempos diferentes tempos de exposição até 48h. Tais trabalhos obtiveram resultados promissores nos parâmetros observados, contudo a dose e o tempo de exposição ideal para o aproveitamento máximo do tratamento ainda não estão claros.

Visto que a fotofuncionalização parece ser um método eficaz para o aumento das taxas de sucesso de osteointegração, o objetivo deste estudo é avaliar os efeitos da exposição em maior intensidade de luz UVC sobre o titânio quanto a alterações químicas de superfície e capacidade biológica.

2. MATERIAIS

2.1. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra foi composta por discos de titânio comercial puro (grau 2 com 15mm de diâmetro e 1,5mm de espessura). Os discos de titânio receberam tratamento de superfície por ataque ácido (ácido sulfúrico - H_2SO_4) 67% por 75 segundos a 120°C (Aita *et al.*, 2009; Att *et al.*, 2009) e foram esterilizados e estocados por 04 semanas ou mais em um ambiente escuro com temperatura e umidade controlada.

Os discos funcionalizados foram submetidos a tempos variados de exposição a luz UVC (0, 15, 30 e 60 minutos), em uma câmara, utilizando seis lâmpadas de 9W (Osram,

Munique, Alemanha). A câmara, onde os discos foram acondicionados, foi confeccionada com compensado OSB, material resistente à radiação e tendo suas paredes internas recobertas com alumínio polido, capaz de refletir a luz, maximizando o aproveitamento da radiação, totalizando uma intensidade de energia de cerca de 3.5mW/cm^2 ($\lambda = 250\text{ nm}$).

2.2. CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DO MATERIAL

2.2.1. Eletromicroscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia da superfície das amostras de titânio foram examinadas por meio de microscopia eletrônica de varredura utilizando o microscópio eletrônico JSM 6060 (JEOL, Japan), sob vácuo com uma aceleração de voltagem de 10.0kV , as imagens foram obtidas com magnificação de 9,000 e 10,000.

2.2.2. Ângulo de contato com a água

O grau de molhabilidade foi analisado pelo ângulo de contato com água antes e depois do tratamento por fotofuncionalização. O tamanho da gota na queda, a taxa de queda, a taxa de deslocamento e a dispersão de velocidade da água foram: $3,0\ \mu\text{L}$, $2,0\ \mu\text{L/s}$, $20,0\ \mu\text{L/s}$ e $50\ \text{mm/min}$, respectivamente. O período de teste foi realizado durante 20s e o ângulo de contato médio (θ) entre a gota e a superfície sólida foi registrado após 10s. O cálculo de energia livre da superfície (mN/m) foi realizado seguindo a equação OWRK/Fowkes* (Figura 1) com o software OneAttension (Biolin Scientific, Estocolmo, Suécia) conforme descrito anteriormente (Teixeira, 2015).

2.2.3. Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raio-x (XPS)

Para análise de alterações de composição química as amostras foram submetidas à espectroscopia de fotoelétrons excitados por raio-x (XPS). O espectro foi coletado em três pontos diferentes da superfície dos discos, utilizando um spot do raio-x de 300 µm de diâmetro. A análise foi conduzida sob vácuo, usando uma fonte de excitação com irradiação monocromática AlK α (1486.7 eV). Análise de pesquisa dos espectros totais foi realizada nos principais picos (Ti2p, O 1s, C 1s, N 1s, e Ca2p). A energia de ligação foi calibrada para ligações de C1s (hidrocarbonetos C-C e C-H) a 284.8 eV. O percentual dos elementos atômicos presentes na superfície do titânio foi calculado usando o software Advantage (Thermo Scientific™).

2.2.4. Cultura celular

A cultura celular foi realizada com células da linhagem MC3T3-E1 (subclone 14), células pré-osteoblásticas de camundongos, procedentes do Banco de Células do Rio de Janeiro, cultivadas em suplemento alfa-MEM com 10% de soro fetal bovino (FBS) a 37°C e 5% CO². O meio de cultura foi renovado a cada três dias. Com cerca de 80% de confluência, as células foram destacadas usando 0,25% de tripsina-1mM EDTA- 4Na e utilizadas nos diferentes ensaios.

2.2.5. Caracterização da cultura celular por MEV

Para avaliar modificações na morfologia e adesão celular foi realizado MEV sobre as amostras cultivadas com MC3T3. Após 48 horas de cultivo, as amostras foram lavadas duplamente com PBS e fixadas com solução com 5% de gluteraldeído (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) por 3 dias. Após a fixação, as células foram lavada 3 vezes com PBS (por 10 minutos cada). Então, as células foram desidratadas em diferentes concentrações de etanol sequencialmente (30, 50, 70, 90 e 100%) por 30 minutos cada. Finalmente as amostras foram revestidas com ouro (uma camada de 10nm) por 8s e observadas por microscopia eletrônica de varredura (JSM 6060, JEOL, Japan) a uma velocidade de 10kV com magnificação de x40, x300, x500, x2,700, x3,000 e x3,500.

2.2.6. Viabilidade celular e adesão inicial

A viabilidade foi mensurada pelo método de coloração de proteínas pelo corante SRB (Sulforhodamine B colorimetric) conforme protocolo (Vichai *et al.*, 2006). As células foram semeadas sobre uma placa de 96 poços com uma densidade de 5×10^3 células/cm² contendo 100µL de alfa-MEM Adicionou-se meio como controle negativo e eluato dos diferentes grupos. Utilizou-se um leitor de microplacas a 560nm.

Para avaliação de adesão inicial as células foram semeadas sobre os discos de titânio com uma densidade de 4×10^4 células/cm² e incubadas por 24 h. Após, foi realizada uma dupla lavagem com PBS e as células aderidas às superfícies dos discos foram, liberadas pela adição de 1ml de solução contendo EDTA 1mM e 0,25% tripsina. Alíquotas de 100µl desta solução homogeneizada em alfa-MEM foram transferidas para tubos de eppendorf contendo o mesmo volume de azul de trypan 1%. Células viáveis foram contadas utilizando o hemocitômetro.

3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com SPSS v20.0 (IBM® SPSS Statistics, New York, USA). A normalidade da distribuição dos dados foi testada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para as variáveis molhabilidade, adesão celular e SRB as diferenças entre grupos foi realizada utilizando a análise de variância (ANOVA) de uma via seguida de teste post hoc LSD de Fisher. Para a comparação intra-grupo dos diferentes tempos de tratamento, as variáveis elementos químicos por XPS e os principais compostos de carbono foi realizada através da ANOVA de medidas repetidas seguidas de teste post hoc LSD de Fisher. Os dados paramétricos foram expressos pela média \pm desvio padrão. O nível de significância estabelecido foi de 5% ($p < 0.05$)

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização da superfície das amostras de titânio

A característica topográfica da superfície de titânio foi observada por microscopia eletrônica de varredura conforme ilustrada na figura 02. Na imagem (figura 2b) pode se observar a formação de um padrão estrutural mais ordenado e uniforme no grupo irradiado por luz UVC quando comparado ao grupo controle (figura 2a) que apresentou superfície irregular com poros de diferentes diâmetros. O grupo submetido ao tratamento por 60 minutos apresentou poros mais alinhados e bem direcionados.

Com o objetivo de avaliar o padrão de hidrofobicidade da amostra, o grau de molhabilidade foi aferido por meio do ângulo de contato da água com a superfície dos

diferentes grupos. O gráfico (figura 3a) ilustra a eficácia do tratamento na modificação do perfil hidrofóbico das superfícies testadas para um perfil hidrofílico, com uma tendência a maior redução conforme o tempo de exposição. A amostra controle obteve média de ângulo em $69,2 (\pm 20,1)$, após a exposição à luz UVC as médias foram reduzidas para $21,3 (\pm 13,6)$ em 15 minutos com baixa progressiva após 30 minutos (média de $14,2 \pm 8,2$) e 60 minutos (média $11,1 \pm 4,4$) ($p < 0,01$). A figura 3b ilustra uma amostra do grupo controle com formação de maior ângulo de contato, enquanto após 30 minutos de exposição o ângulo cai para próximo de 0° .

A média da composição atômica dos elementos químicos presentes na superfície das amostras de titânio obtidas por XPS está descrita na Tabela 1. A análise detectou a presença de O1s, C1s, Ti2p, N1s e Ca2p na superfície do material. Os níveis de contaminação por carbono presentes na amostra envelhecida foram de 54% ($\pm 2,2$) e decresceram visivelmente após o tratamento com luz UVC atingindo valores 30% ($\pm 6,6$) ($p < 0,01$) em 15 minutos, 19% ($\pm 2,4$) ($p < 0,01$) após 30 minutos de exposição e 17% ($\pm 0,3$) ($p < 0,01$) após 60 minutos. O aumento nos índices de oxigênio também pode ser comprovado, passando de 29% ($\pm 2,1$) no grupo sem tratamento para até 60% ($\pm 0,2$) ($p < 0,01$) após exposição prolongada de 60 minutos.

Para análise do espectro C1s, quatro picos de energia foram encontrados de acordo com o descrito na literatura (Gao *et al.*, 2013). Pico 288.9eV, 288.0eV, 286.4eV representando respectivamente as ligações iônicas, O-C=O, C=O e C-O. O pico 284.8eV predominantemente encontrado, refere-se à presença de hidrocarbonetos (C-C e C-H). Os resultados encontrados estão descritos na figura 4a, no qual os grupos fotofuncionalizados apresentaram queda significativa dos níveis de hidrocarbonetos da superfície do material em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$). A distribuição dos demais picos esta relatada na

figura 4b, na qual pode se observar no grupo UV-60 um deslocamento do pico de 284.8 para 286.4 devido à queda expressiva nos índices de hidrocarbonetos.

4.2. Caracterização da cultura celular

As superfícies que receberam tratamento por luz UVC apresentaram aumento na adesão celular após 24 horas do cultivo quando comparadas ao grupo controle, pode se notar a presença de maior número de ilhas de agrupamentos celulares (figura 5a-5d). As superfícies fotofuncionalizadas, exibiram corpos celulares alongados e bem definidos (figura 5e-5h) onde na imagem em aumento de 500x, observa-se maior espalhamento do corpo celular nos grupos teste em relação ao controle, sugerindo maior ancoragem a superfície do material. A figura 6a ilustra em maior aumento (x2,700) um prolongamento celular pertencente ao grupo teste com 60 minutos de exposição ao tratamento, o qual apresenta um alto grau de contato com a superfície além de conexões com outros filamentos sugerindo uma formação de rede. Por outro lado, na figura 6b nota-se o filamento pertencente ao grupo controle (em mesma ampliação) menos robusto, mais translúcido e com menor grau de contato com a superfície.

Após 24 horas de cultura sobre a superfície do titânio, as células pré-osteoblásticas foram contabilizadas. Como ilustrado na figura 7a, o número de células presente no grupo controle (3.7 ± 1.2) foi significativamente menor quando em comparação aos grupos UV-30 (12.5 ± 2.7) ($p < 0,01$) e UV-60 (10 ± 3.6) ($p < 0,05$), indicando uma melhor adesão inicial nos grupos irradiados a partir de 30 minutos.

A análise de viabilidade realizada com SRB está elucidada na figura 7b quando comparadas ao grupo controle, os tratamentos UV-30 e UV-60 não obtiveram diferenças no percentual de crescimento celular. No entanto, o grupo irradiado por 15 minutos obteve

diferença significativa comparado ao grupo controle, indicando diminuição da viabilidade celular ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

O titânio e suas ligas são os principais materiais de eleição para fabricação de implantes dentários. Muito tem se discutido sobre os processos e melhorias nas modificações de sua superfície como uma opção para estimular e garantir os processos de osseointegração (Att *et al.* 2009; Lee e Ogawa 2012). Contudo, pesquisas recentes investigando o processo de envelhecimento dos implantes tornaram-se um contraponto a ser considerado quando o assunto é osseointegração. De acordo com a literatura, a formação de hidrocarbonetos em sua superfície é inevitável e ocorre após alguns segundos da fresagem, aparentemente, mesmo diante de estocagem em água a formação de camada contaminada parece inerente (Decco, 2017; Shen 2016). As alterações procedentes da formação dessa camada influenciam na capacidade biológica do material. Trabalhos anteriores mostram que após 4 semanas do preparo do titânio a adsorção de proteínas, migração, adesão, proliferação e mineralização de osteoblasto diminuem substancialmente (Att *et al.*, 2009; Lee e Ogawa 2012; Ogawa 2014). Análises *in vivo* evidenciam que a formação de tecido ósseo ao redor do implante, quando este se apresentava recém processado, foi efetivamente melhor quando comparada a implantes envelhecidos (Lee e Ogawa 2012). De modo a mimetizar os efeitos desse processo de envelhecimento, nesse estudo utilizaram-se amostras estocadas por 4 semanas ou mais para analisar os efeitos da irradiação de luz UVC em diferentes tempos de exposição. Até o momento, não se tem conhecimento sobre quais consequências um maior tempo de estocagem resultaria na estrutura. Tal fato deve ser considerado uma vez que nesse

experimento a padronização foi apenas para um mínimo de tempo já comprovado pela literatura que desencadeia alterações significativas, no entanto alterações mais pronunciadas podem advir de maiores tempos de armazenagem.

Com a comprovação do envelhecimento do implante e suas consequências sobre a superfície do material, alternativas como uso da luz UVC no tratamento dos implantes vem sendo discutidas (Att *et al.* 2009; Lee e Ogawa 2012; Ogawa 2014). A alteração da composição química da superfície após a fotofuncionalização foi observada em estudos prévios por meio da análise por XPS para avaliação dos elementos químicos presentes nas camadas mais superficiais da amostra. A literatura descreve que o acúmulo de componentes de carbono em uma superfície envelhecida pode atingir cerca de até 75% do total de componentes atômicos e após a irradiação por luz UVC os índices podem chegar a menos de 20% (Aita *et al.* 2009; Pyo *et al.* 2013; Ogawa 2014; Shen *et al.*, 2016; Suzuki *et al.* 2009). Os dados encontrados neste trabalho estão de acordo com o já observado na literatura e mostram eficácia do modelo proposto, pois se observou um acúmulo médio de 54% e redução para cerca de 17% após 60 minutos de exposição. No que diz respeito às ligações de carbono, os dados obtidos mostraram que houve um deslocamento do pico de 284.8eV, que corresponde a moléculas contaminantes de carbono (hidrocarbonetos), para o pico de 288.0eV que corresponde a carbonilas, após a exposição por 30 e 60 minutos, sendo então eficaz para diminuição dos índices de hidrocarbonetos. Maior concentração dos átomos de O e Ti nos grupos teste foi observada neste trabalho corroborando com Roy *et al.*, que em seu trabalho sugeriu a ocorrência de uma ionização facilitada desses elementos em superfície menos contaminadas (Roy, 2016).

A literatura tem discutido os mecanismos que levam a essa modificação da composição química superficial. Uma das explicações pode estar no fato da fotocatalise exercida pela luz UVC resultando na excitação do elétron da banda de valência para a banda

de condução, conversão de Ti^{4+} para Ti^{3+} e o desenvolvimento de vacância no oxigênio OH- que estaria propensa a reação com a água. Esses grupos de hidroxilas OH- podem explicar os efeitos da superhidrofilicidade adquirida após irradiação (Castellote e Bengtsson, 2011; Roy, 2016). Este estudo comprovou a eficácia na alteração de molhabilidade da superfície do material modificando seu perfil de hidrofilicidade. Como visto na literatura, um perfil hidrofóbico pode ser considerado com um ângulo de contato maior que 65 e hidrofílico menor do que 65 (Rupp *et al.*, 2014). O aumento da molhabilidade indica maior afinidade entre o sangue e o titânio por consequência, melhor interação com fluidos e células.

O processo de alteração eletrolítica ocasionado pela fotocatalise tem sido descrito como não capaz de causar alterações na estrutura física do material. Contudo observou-se nesse estudo diferenças na topografia após irradiação por luz UVC. A análise por MEV mostrou uma formação mais regular e alinhada no grupo irradiado em comparação ao grupo controle. Shen *et al.* (2016), observaram em seu estudo formação espontânea de nanopartículas na superfície de suas amostras armazenadas em meio aquoso discordando da literatura prévia. Uma hipótese sugerida pelos autores foi que o crescimento de nanoestruturas estaria ligada à combinação de ataque ácido e armazenamento em água. Diferentemente, neste trabalho não foi utilizado o armazenamento em água sugerindo que a alteração possa estar mais associada às modificações ocasionadas pela luz UVC do que o sugerido.

Os diferentes tempos de exposição avaliados nestes estudos tiveram por objetivo analisar as alterações diante de uma exposição somente de luz UVC na intensidade de $3.5mW/cm^2$ ($\lambda = 250$ nm). Até o momento não há consenso na literatura sobre qual seria a melhor intensidade, tempo de exposição e comprimento de onda a ser utilizados. Estudos anteriores utilizaram tempos de exposição oscilando de 12 minutos a 48 horas com variação de intensidade e associação de luz UVC e UVA (Aita *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2016). Os

tempos de exposição utilizados neste trabalho tiveram por fim assemelhar-se a rotina clínica que requer maior agilidade. Além disso, optou-se pelo uso exclusivo da luz UVC, pois segundo o estudo de Gao et al., 2013 a luz UVC mostra-se superior em termos de bioatividade quando comparado exclusivamente a luz UVA (Gao et al., 2013). Os resultados desse trabalho mostram que a partir de 15 minutos de exposição alterações na molhabilidade de superfície e remoção de hidrocarbonetos já podem ser consideradas, contudo as maiores alterações referentes à análise biológica celular foram significantes somente aos 30 minutos de exposição.

O aumento da adesão celular é uma importante alteração associada à fotofuncionalização. No teste de adesão inicial de 24 horas, este estudo mostrou que o titânio irradiado por mais de 30 minutos foi capaz de aumentar em até 3 vezes o número de células. A remoção de hidrocarbonetos e exposição do Ti^{4+} favorece a adesão de cargas negativas de proteínas e células, o que favorece o aumento da atividade osteoblástica (Gao et al., 2013). A análise de viabilidade celular foi realizada utilizando o método de SRB de modo a avaliar os efeitos ocasionados pelos discos de titânio tratados pelos diferentes tempos no crescimento celular. As células que receberam o meio de cultura que continha o disco tratado por 15 minutos parecem ter um prejuízo no crescimento celular se comparadas ao controle, já nos tempos de 30 a 60 minutos as médias equipararam-se ao controle.

6. CONCLUSÕES

A fotofuncionalização do titânio exclusivamente por luz UVC provou ser um método eficaz para o tratamento de superfícies envelhecidas *in vitro* com mais de 4 semanas de preparo em maior intensidade e menor tempo de exposição. Os resultados apontam que em 15 minutos de exposição na câmara desenvolvida, a uma intensidade de $3.5mW/cm^2$ ($\lambda = 250$ nm), as modificações da estrutura são perceptíveis. A modificação do perfil hidrofóbico para

um perfil hidrofílico pode ser notada e as reduções nos níveis de compostos de carbono da superfície confirmam a eficiência do tratamento para remoção de hidrocarbonetos. Os efeitos biológicos puderam ser observados a partir de 30 minutos de exposição, com o aumento na adesão celular de MC3T3, assim como a qualidade celular (corpo e filamentos) foram perceptíveis ao MEV. Sugere-se a continuidade dos experimentos para aprimorar o desenvolvimento do completo potencial de tratamento do titânio por luz UV.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente, tem se investigado mais sobre as propriedades físico-químicas das superfícies dos materiais de implante, como rugosidade, molhabilidade, química e morfologia da superfície. Alterações descritas como o processo de envelhecimento dos implantes ganham maior visibilidade e podem ser a origem de dificuldades na osseointegração.

Esse trabalho propôs-se a desenvolver um método de reversão para o processo de envelhecimento, baseado na fotocatalise por luz UVC e buscando com a utilização de uma maior intensidade de luz uma diminuição no tempo de exposição *in vitro*.

Os resultados mostraram sucesso no tratamento. As características biológicas foram aprimoradas com aumento de adesão celular (MC3T3) sobre os discos funcionalizados, manutenção da viabilidade celular, espalhamento e interconexões de filamentos celulares sobre os discos, vistos em MEV. No que diz respeito a remoção de hidrocarbonetos, este pode ser considerada eficaz após 30 minutos de exposição com diminuição expressiva dos compostos pertencentes a faixa de 285eV.

A modificação do perfil hidrofiliidade também pode ser observada com alteração significativa do ângulo de contato com água após apenas 15 minutos e evoluindo após 30 e 60 minutos de exposição.

A metodologia utilizada neste trabalho apresentou algumas falhas no que diz respeito à padronização do tempo de preparo das amostras. Consideramos como envelhecidos discos com mais de 04 semanas de fresagem, porem não se sabe ao certo a influência de maior tempo de armazenagem sobre as amostras.

Sugere-se para futuras pesquisas a investigação de efeitos adjacentes à estrutura do titânio com maior tempo de armazenagem, comparando com o prazo de validade hoje

determinado ao material. Assim como investigações *in vivo* que validem o tratamento, considerando aspectos como tempo, quantidade e qualidade óssea após osseointegração.

Outro fator que pode ser investigado é a associação de comprimentos de onda UVC e UVA, como o utilizado pelo aparelho *Superosseo* (Ushio) comparado exclusivamente ao uso de luz UVC, que aparentemente, apresenta melhores resultados biológicos comparados ao uso de luz UVA.

REFERÊNCIAS

- Aita H, Hori N, Takeuchi M, Suzuki T, Yamada M, Anpo M, Ogawa T. 2009. The effect of ultraviolet functionalization of titanium on integration with bone. *Biomaterials*. 30(6):1015-1025.
- Almeida MK. 2011. Fotocatálise heterogênea aplicada na degradação do corante rodamina-b utilizando nanopartículas de dióxido de titânio. Mestrado, iniversidade de santa cruz do sul (unisc).
- Att W, Hori N, Takeuchi M, Ouyang J, Yang Y, Anpo M, Ogawa T. 2009. Time-dependent degradation of titanium osteoconductivity: an implication of biological aging of implant materials. *Biomaterials*. 30(29):5352-5363.
- Att W, Ogawa T. 2012. Biological aging of implant surfaces and their restoration with ultraviolet light treatment: a novel understanding of osseointegration. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 27(4):753-761.
- Beltrán-Partida E, Valdéz-Salas B, Moreno-Ulloa A, Escamilla A, Curiel MA, Rosales-Ibáñez R, Villarreal F, Bastidas DM, Bastidas JM. 2017. Improved in vitro angiogenic behavior on anodized titanium dioxide nanotubes. *J Nanobiotechnology*. 31;15(1):10. doi: 10.1186/s12951-017-0247-8
- Brånemark P-I, Rydevik BL, Skalak R, editors. 1997. Osseointegration in skeletal reconstruction and joint replacement. Carol Stream, IL: Quintessence Publishing Co. p. 25-44.
- Brånemark R, Skalak R. 1998. An in-vivo method for biomechanical characterization of bone-anchored implants. *Med Eng Phys*. 20(3):216-9. PubMed PMID: 9690492.
- Castellote M, Bengtsson N. 2011. Principles of TiO₂ Photocatalysis. In: Ohama Y, Van Gemert D, editors. *Applications of Titanium Dioxide Photocatalysis to Construction Materials*: Springer Netherlands. p. 5–10
- Cooper LF, Masuda T, Yliheikkilä PK, Felton DA. 1998. Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part II. In vitro studies. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 13(2):163-174.
- Decco O, Zuchuat J, Farkas N. 2017. Improvement of Cr-Co-Mo Membrane Surface Used as Barrier for Bone Regeneration through UV Photofunctionalization: An In Vitro Study. *Materials*, 10(7):825, 2017.
- Gao Y, Liu Y, Zhou L, Guo Z, Rong M, Liu X, Lai C, Ding X. 2013. The Effects of Different Wavelength UV Photofunctionalization on Micro-Arc Oxidized Titanium. *PLoS ONE*. 8(7): e68086. doi:10.1371/journal.pone.0068086
- Galli S, Jimbo R, Andersson M, Bryington M, Albrektsson T. 2013. Surface characterization and clinical review of two commercially available implants. *Implant Dent*. 22(5):507-18.

García-Gareta E, Hua J, Orera A, Kohli N, Knowles JC, Blunn GW. 2017. Biomimetic surface functionalization of clinically relevant metals used as orthopaedic and dental implants. *Biomed Mater*. doi:10.1088/1748-605X/aa87e6.

Grischke J, Eberhard J, Stiesch M. 2016. Antimicrobial dental implant functionalization strategies -A systematic review. *Dent Mater J*. 35(4):545-58. doi:10.4012/dmj.2015-314. PubMed PMID: 27477219.

Henningsen A, Smeets R, Hartjen P, Heinrich O, Heuberger R, Heiland M, Precht C, Cacaci C. 2017. Photofunctionalization and non-thermal plasma activation of titanium surfaces. *Clin Oral Investig*. doi: 10.1007/s00784-017-2186-z. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 28730456.

Hirota M, Ikeda T, Tabuchi M, Ozawa T, Tohnai I, Ogawa T. 2017. Effects of Ultraviolet Photofunctionalization on Bone Augmentation and Integration Capabilities of Titanium Mesh and Implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 32(1):52-62. doi: 10.11607/jomi.4891

Kacena MA, Gundberg CM, Horowitz MC. 2006. A reciprocal regulatory interaction between megakaryocytes, bone cells, and hematopoietic stem cells. *Bone*. 39(5): 978-984.

Lee JH, Ogawa T. 2012. The biological aging of titanium implants. *Implant Dent*. 21(5): 415-421.

LeGeros RZ, Craig RG. 1993. Strategies to affect bone remodeling: osteointegration. *J Bone Miner Res* 8 Suppl. 2: S583-596.

Maluf PSZ, Marotti J, Komatsu C, Arcangelli P. 2007. Vantagens do tratamento de superfície a laser em implantes dentais osseointegráveis; Advantages of laser surface treatment in osseointegrated dental implants. *ImplantNews*. 4(06): 643-646.

Ogawa T, Nishimura I. 2003. Different bone integration profiles of turned and acid-etched implants associated with modulated expression of extracellular matrix genes. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 18(2): 200-210.

Ogawa T. 2014. Ultraviolet photofunctionalization of titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*; 29(1): e95-102.

Olivares-Navarrete R., Hyzy SL, Hutton DL, Erdman CP, Wieland M, Boyan BD, Schwartz Z. 2010. Direct and indirect effects of microstructured titanium substrates on the induction of mesenchymal stem cell differentiation towards the osteoblast lineage. *Biomaterials*. 31(10): 2728-2735.

Pyo SW, Park YB, Moon HS, Lee JH, Ogawa T. 2013. Photofunctionalization enhances bone-implant contact, dynamics of interfacial osteogenesis, marginal bone seal, and removal torque value of implants: a dog jawbone study. *Implant Dent*. 22(6):666-675.

Roy M, Pompella A, Kubacki J, Szade J, Roy RA, Hedzelek W. 2016. Photofunctionalization of Titanium: An Alternative Explanation of Its Chemical-Physical Mechanism. *PLoS One*. 16;11(6):e0157481. doi:10.1371/journal.pone.0157481

Rupp F, Gittens RA, Scheideler L, Marmur A, Boyan BD, Schwartz Z, Geis-Gerstorfer J. 2014. A review on the wettability of dental implant surfaces I: theoretical and experimental aspects. *Acta Biomater.* 10(7):2894-906.

Saghiri MA, Asatourian A, Garcia-Godoy F, Sheibani N. 2016. The role of angiogenesis in implant dentistry part I: Review of titanium alloys, surface characteristics and treatments. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 21(4):e514-525. PubMed PMID: 27031073; PubMed Central PMCID: PMC4920467.

Saunders WB. 1994. *Dicionário Médico Ilustrado de Dorland*, 28ª. edição.

Schliephake H, Rublack J, Förster A, Schwenzer B, Reichert J, Scharnweber D. 2015. Functionalization of titanium implants using a modular system for binding and release of VEGF enhances bone-implant contact in a rodent model. *J Clin Periodontol.* 42: 302–310. doi: 10.1111/jcpe.12370.

Shen J, Liu J, Chen X, Wang X, He F, Wang H. 2016. The In Vivo Bone Response of Ultraviolet-Irradiated Titanium Implants Modified with Spontaneously Formed Nanostructures: An Experimental Study in Rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 31(4):776-84. doi: 10.11607/jomi.4309

Shen JW, Chen Y, Yang GL, Wang XX, He FM, Wang HM. 2016. Effects of storage medium and UV photofunctionalization on time-related changes of titanium surface characteristics and biocompatibility. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 104(5):932-40. doi: 10.1002/jbm.b.33437. Epub 2015 May 13

Silva FL, Rodrigues F, Pamato S, Pereira JR. 2016. Tratamento de superfície em implantes dentários: uma revisão de literatura. *RFO UPF*, v. 21, n. 1, p. 136-142.

Souza JCM, Silva JSP, Oliveira Fg, Rocha LA. 2014 *Superfícies de implantes dentários. Série Abeno.* p 103-112.

Suzuki T, Hori N, Att X, Kubo K, Iwasa F, Ueno T, Maeda H, Ogawa T. 2009. Ultraviolet treatment overcomes time-related degrading bioactivity of titanium. *Tissue Eng Part A.* 15(12): 3679-3688.

Suzuki T, Kubo K, Hori N, Yamada M, Kojima N, Sugita Y, Maeda H, Ogawa T. 2010. Nonvolatile buffer coating of titanium to prevent its biological aging and for drug delivery. *Biomaterials.* 31(18): 4818-4828.

Suzuki S, Kobayashi H, Ogawa T. 2013. Implant stability change and osseointegration speed of immediately loaded photofunctionalized implants. *Implant Dent.* 22(5):481-90. doi: 10.1097/ID.0b013e31829deb62.

Teixeira HS, Coelho PG, Duarte S, Janal MN, Silva N, Thompson VP. 2015. Influence of atmospheric pressure plasma treatment on mechanical properties of enamel and sealant bond strength. *J. Biomed. Mater. Res. B.* 103:1082-1091

Ueno T, Yamada M, Suzuki T, Minamikawa H, Sato N, Hori N, Takeuchi K, Hattori M, Ogawa T. 2010. Enhancement of bone-titanium integration profile with UV-photofunctionalized titanium in a gap healing model. *Biomaterials*. 31(7):1546-1557.

Vichai V, Kirtikara K. 2006. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*. 1(3).

Wennerberg A, Albrektsson T, Lausamaa J. 1996. Torque and histomorphometric evaluation of c.p. titanium screws blasted with 25 and 75 um sized particle of AL₂O₃. *J. Biomedical Mat. Res*, 30:251-260.

Wennerberg A, Hallgren C, Johansson C, Danelli S. 1998. A histomorphometric evaluation of screw-shaped implants each prepared with two surface roughnesses. *Clin Oral Implants Res*. 9(1):11-19.

ANEXO A - Figuras E Tabelas

$$*\gamma_{ls} = \sigma_l + \sigma_s - 2 \left(\sqrt{\sigma_l^D \cdot \sigma_s^D} + \sqrt{\sigma_l^P \cdot \sigma_s^P} \right)$$

Figura 1: Equação OWRK/Fowkes.

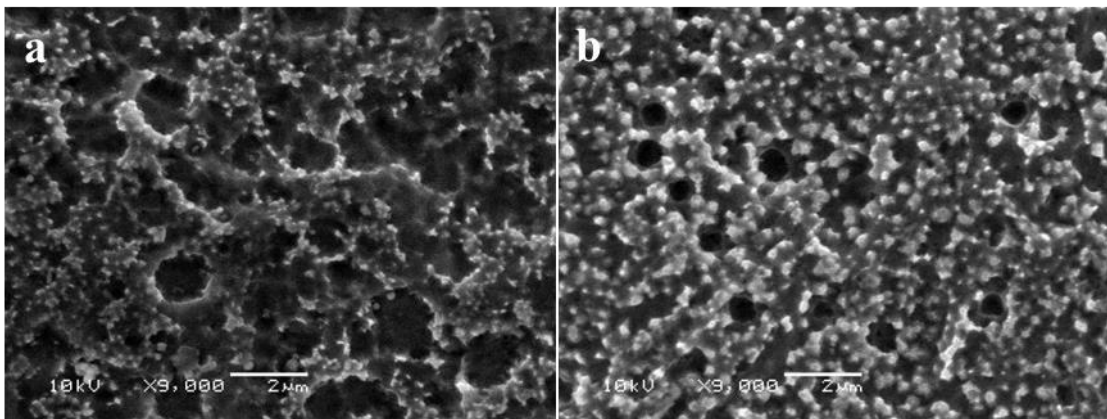


Figura 2: Eletromicroscopia de varredura das amostras de titânio (x9,000). (A) Amostra do grupo controle com estrutura porosa irregular. (B) Amostra do grupo com tratamento por luz UVC (por 60 minutos) com padrão regular e ordenado.

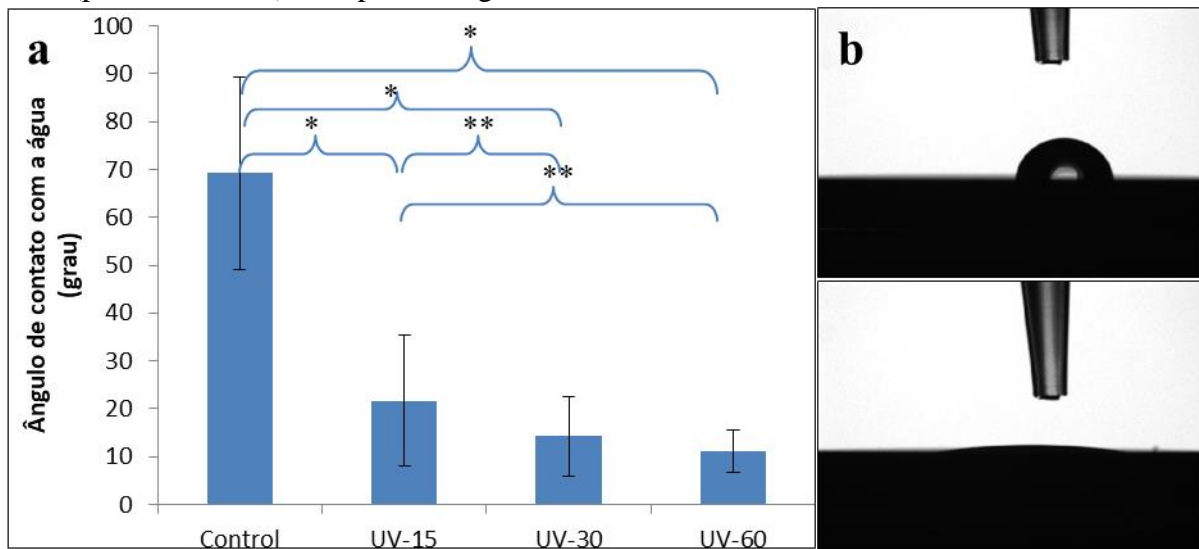


Figura 3: Ângulo de contato com a água variação de acordo com o tempo de exposição à luz. (a) Gráfico mostrando as diferenças nos grupos analisados. Dados média \pm DP (n=10) (*p<0,01; **p<0,05) (b) As imagens obtidas do software OneAttention, ilustrando acima uma amostra do grupo controle e abaixo uma imagem do grupo UV-30.

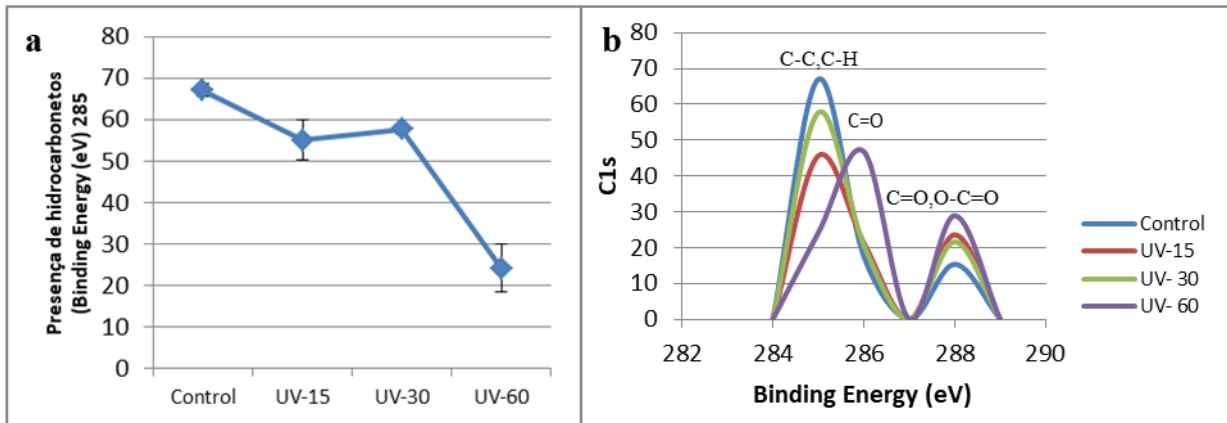


Figura 4: Avaliação do Carbono. (a) Gráfico mostrando a média e desvio padrão de hidrocarbonetos (pico 285eV) presentes em cada grupo detectada por XPS. (b) Espectro C1s por XPS análise.

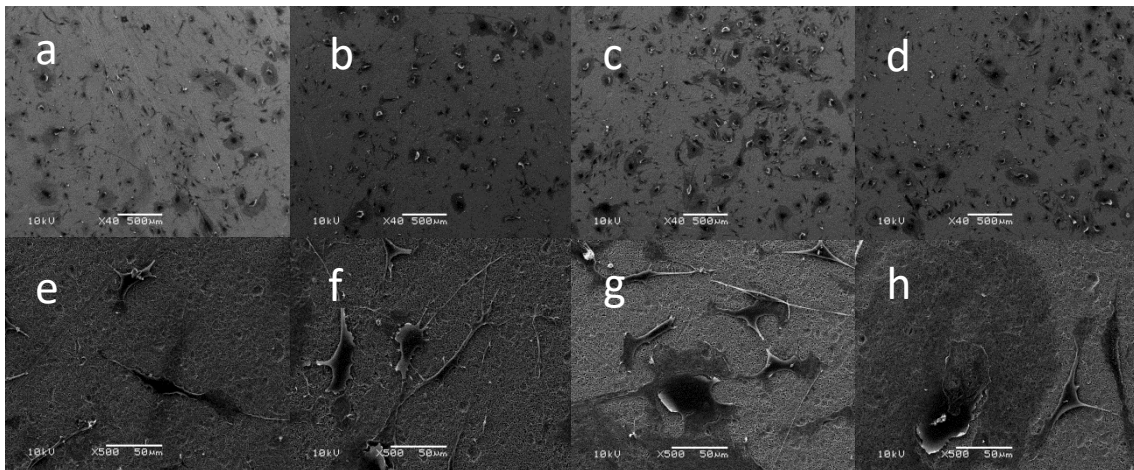


Figura 5: MEV de amostras com cultivo celular. Imagens acima realizadas em 40X ilustrando os agrupamentos celulares. Imagens abaixo em 500x ilustrando adesão dos corpos celulares a superfície do titânio. (a,e) Grupo controle; (b,f) Uv-15; (c, g) Uv-30; (d,h); Uv-60.

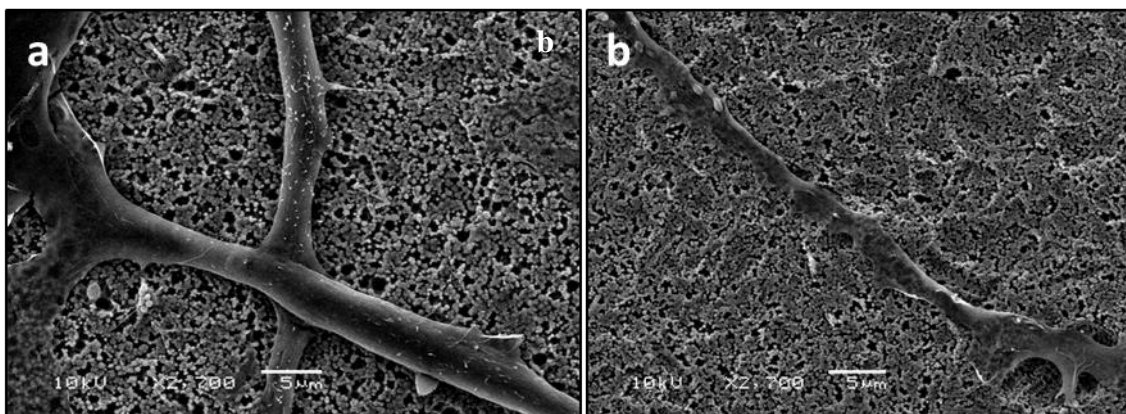


Figura 6: MEV em maior amplitude (x2,700); (a) imagem pertencente ao grupo com UV-60, com prolongamentos celulares robustos e bem aderidos a superfície do titânio; (b) imagem do grupo controle ilustrando filamento translúcido e pouco definido

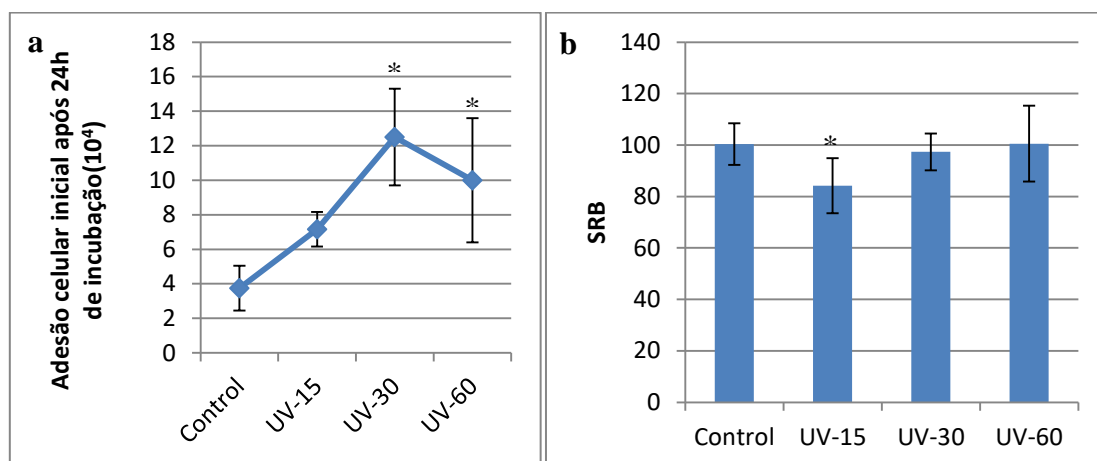


Figura 7: Adesão celular inicial e Viabilidade. (a) Gráfico da adesão celular de MC3T3 nas superfícies do titânio expostas ao tratamento por luz UVC. Dados mostram as médias e DP (n=3). (b) Viabilidade por SRB com MC3T3. Dados mostram as médias e DP (n=6) *p<0,05 quando comparados ao grupo controle.

Tabela 1: Média de concentração atômica (%) dos elementos detectados por XPS

	Control	UV-Treated 15	UV-Treated 30	UV-Treated 60
O1s%	29,8 (±2,1) ^a	45,4 (±4) ^b	55,4 (±2,2) ^c	60,1 (±0,2) ^c
C1s %	54,8 (±2,2) ^a	30,7(±6,6) ^b	19(±3,5) ^c	17(±0,3) ^c
Ti2p%	4,6(±0,9) ^a	16(±3,4) ^b	19 (±2,4) ^b	13(±1,4) ^c
N1s%	7,3 (±1,4) ^a	5,3 (±0,7) ^b	3,5(±0,4) ^c	1,3(±0,2) ^d
Ca2p%	3,5(±0) ^a	2,5(±0,5) ^a	2,8(±0,8) ^a	8,5(±1,3) ^b

Média dos valores (desvio padrão) (a;b;c;d indicam diferenças entre os grupos)

ANEXO B – Normas para publicação de trabalhos na revista “Biotechnology and Bioengineering”

Author Guidelines

Types of Manuscripts

Articles should not exceed 15 double-spaced pages of text (not including references) and should contain no more than 10 figures and/or tables.

Communications to the Editor should not exceed 8 double-spaced pages of text (not including references) and should contain no more than 20 references and 4 figures and/or tables.

Regarding serial or companion papers, which must be reviewed together, no more than two manuscripts may be submitted at the same time.

Reviews and Mini-Reviews should be concise and critical assessments of the recent literature on a fast-moving area of contemporary interest. Reviews should not exceed 22 double-spaced pages of text (not including references) and should contain no more than 15 figures and/or tables. Mini-Reviews should not exceed 8 double-spaced pages of text, and should not contain more than 20 references and 4 figures and/or tables. Authors must contact the Board of Review Editors at biotechbioeng@wiley.com on the suitability of a subject and the qualifications of the authors before submitting a Review or Mini-Review.

Exceptions to the lengths of the various types of manuscripts will be considered on an individual basis upon request by the authors. The authors must explain clearly, upon manuscript submission, the reasons for the longer manuscript.

Commentaries provide a forum for communication of opinion, insight, and interpretation on a recently published B&B paper and are submitted at the request of our editors.

Perspectives are submitted at the request of the Editor-in-Chief.

Manuscript Submission

The journal to which you are submitting your manuscript employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published works.

Biotechnology and Bioengineering is a member of, and subscribes to the principles of, the Committee on Publication Ethics (COPE) (www.publicationethics.org).

All manuscripts must be submitted online at mc.manuscriptcentral.com/bit. Specific requirements for manuscript submission are detailed at the ScholarOne Manuscripts website on the “Submit a Manuscript” page. The following items are also required as part of the manuscript submission process:

- A cover letter containing a brief statement regarding the important contributions of the submitted paper and the reason(s) it should be published in Biotechnology and Bioengineering
- The subject category best suited for the manuscript content
- The names, addresses, phone numbers and e-mail addresses of four or five potential independent reviewers
- Image and text for graphical Table of Contents

The suggested reviewers should not be affiliated with the institution of the authors. Please note that the list of reviewers should not include the Editor-in-Chief or any of the Associate Editors of Biotechnology and Bioengineering . The authors may request that certain reviewers be excluded from reviewing their paper if they feel that these reviewers may be unfavorably biased.

Biotechnology and Bioengineering is initiating publication of a graphical Table of Contents. Please supply an image and text for this purpose that adheres to the following guidelines:

Image: Colorful, mostly square images are optimal. Please make sure images are of high enough quality for online publication.

Text: Descriptive text (2-3 sentences; 80 word maximum) which should capture the most compelling aspects of the work, aimed at a broad readership.

Conflict of Interest Disclosure: Biotechnology and Bioengineering requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise, that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or indirectly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include but are not limited to patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal.

If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission. It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and to collectively list in the cover letter to the Editor-in-Chief, in the manuscript (in the Acknowledgments section), and in the online submission system ALL pertinent commercial and other relationships.

Questions regarding manuscript submission should be directed to the Editorial Office at biotechbioeng@wiley.com or (201) 748-6232.

Manuscript Preparation

Prepare your text in Word, Post Script or Rich Text Format, using American spelling and grammar. We also accept manuscripts created with LaTeX.

Do not embed figures or tables in the document. The text and references should be double-spaced with one inch margins. Use Times New Roman size 12 font or equivalent.

All manuscripts should have a separate title page with the title of the paper, the names and affiliations of all authors, the name, address, phone number and e-mail address (and FAX number if available) of the corresponding author, and a short running title of no more than 45 characters.

Articles should contain an Abstract, Introduction, Materials and Methods (including Computational Methods), Modeling or Theoretical Aspects (optional), Results, Discussion (can be combined with Results), Conclusions (optional), Acknowledgments (optional), Nomenclature (optional), and References.

Communications to the Editor should not be divided into sections except for Materials and Methods (including Computational Methods). A short Abstract (preferably less than 200 words), a brief introduction (not divided into its own section), Acknowledgments (optional), and References should be included. Communications to the Editor are subjected to the same review process as Articles, and they should not constitute preliminary investigations.

Reviews and Mini-Reviews should contain an Abstract, a brief Introduction, appropriate subsections for various topics, Acknowledgments, and References.

All types of manuscripts begin with a title page consisting of the title of the manuscript, author affiliation, and the corresponding author information. Page 2 of the manuscript should consist of an Abstract followed by Keywords (3–6 key words or phrases). The body of the manuscript should begin on page 3. For all types of manuscripts, the list of References should be followed by the Tables, the List of Figures with their legends (separate from the images), and finally the numbered copies of the Figures. Acknowledgments of personal or financial assistance should be made in a separate paragraph following the Discussion or Conclusions sections.

Supplementary Online Material: Authors are invited to submit supplementary material for their articles. Supplementary material may include (but is not limited to) video clips, analytical and spectral characterization data, crystallographic information files, large sections of tabular data, derivations, program code, or graphical files that are not suitable for print media. Supplementary material for published articles will be made available via a link in the online version of the article.

The title should be specific, informative and as short as possible. For Articles, the main text of the paper should be reasonably divided into subsections as necessary by inserting appropriate headings. Please refer to any issue of B&B for examples. Do not use footnotes in the text. The Erratum section allows authors to correct inadvertent (e.g. typographical) errors in published papers. Changes or additions to the manuscript and its data are not permitted. Errata should be submitted directly to the publisher.

References

The list of References should include all relevant and necessary published work, and all listed references must be cited in the text. The reference list should be arranged in alphabetical

order by first author. Do not use numbers. In the text, references should be cited by the author's surname with year of publication in parentheses. For more than two authors, e.g., Briggs, Porter, and King (1993), the reference citation in the text would be Briggs et al. (1993). If there is more than one citation in the same place, put the different citations in parentheses, in alphabetical order, and separated by a semicolon, e.g., (Adam, 1995; Dorow and O'Neal, 1974). Journal titles should be abbreviated according to the Chemical Abstracts Service Source Index.

The listed references should include only published journal papers, books, book chapters, and Ph.D. theses and dissertations. Manuscripts in preparation or submitted, abstracts, meeting presentations, editorials, patents, M.S. theses, letters to the editor, published science briefings, and in general all other published material that has not been edited or refereed should not be listed in the References. Such material can be mentioned parenthetically in the text. If an "in press" publication is included in the list of References, a copy must be submitted with the manuscript as Supplementary Material so that this reference can become available to the reviewers. For reference citations, follow the styles of the examples below:

Journal article

King VM, Armstrong DM, Apps R, Trott JR. 1998. Numerical aspects of pontine, lateral reticular, and inferior olivary projections to two paravermal cortical zones of the cat cerebellum. *J Comp Neurol* 390:537-551.

Book

Voet D, Voet JG. 1990. *Biochemistry*. New York: John Wiley & Sons. 1223 p.

Book chapter

Gilmor ML, Rouse ST, Heilman CJ, Nash NR, Levey AI. 1998. Receptor fusion proteins and analysis. In: Ariano MA, editor. *Receptor localization*. New York: Wiley-Liss. p 75-90.

Tables

Tables should be numbered with capital Roman numerals in the order they appear in the text. All table columns should have an explanatory heading. Duplication of information contained in tables and figures should be avoided as much as possible. Long tables containing a large amount of information can be avoided by showing only typical or the most important results.

Prepare your tables in Word, Post Script or Rich Text Format. Do not embed tables in the text portion of the manuscript.

Figures and Illustrations

Number figures sequentially using Arabic numbers. All figures must be accompanied by a figure legend. The list of figure legends should follow the Tables section.

To ensure the highest print quality, your figures must be submitted in .TIF format according to the following minimum resolutions:

- 300 dpi (dots per inch) for black and white line art (simple bar graphs, charts, etc.)
- 300 dpi for halftones (black and white photographs)
- 300 dpi for combination halftones (photographs that also contain line art such as labeling or thin lines)

Vector-based figures (e.g. figures created in Adobe Illustrator) should be submitted in .EPS format. Color figures must be submitted in a CMYK colorspace. Do not submit color figures as RGB.

For best reproduction, bright, clear colors should be used. Dark colors against a dark background do not reproduce well; please place your color images against a white background wherever possible. Please contact the production editor (bitprod@wiley.com) for further information.

Symbols and Nomenclature

The nomenclature sponsored by the International Union of Pure and Applied Chemistry is requested for chemical compounds. All necessary quantities should be defined with units compatible with the SI system. If many symbols are used in the text and in equations it is advisable to assemble the definitions and units of all symbols in a Nomenclature section just before the list of References. Symbols should be assembled alphabetically.

Copyright/Licensing

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement:

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen:

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

Editorial Policy

All authors take public responsibility for the accuracy, reproducibility and veracity of the content of their submitted work. Manuscript submission implies all authors meet the criteria described below and that no authors meeting the criteria have been omitted. Authorship is defined by the journal as making a substantial contribution to the manuscript with respect to:

- Substantive intellectual contributions in conception, design or implementation of the work
- Interpretation and analysis of information or data
- Manuscript preparation including writing, critical revision and/or ultimate approval of the drafted manuscript for submission

Manuscripts submitted to B&B must represent original research or original review on subjects within the scope of the journal as outlined in the Aims and Scope section (which appears under the Overview link above). All authors must agree to its submission to B&B and to the implications of this submission as described below. All authors are responsible for the complete contents of their manuscript. By its submission to B&B, all the authors guarantee that the manuscript, in its present or a substantially similar form, has not been published or is not being considered for publication elsewhere. Publication in any reasonably retrievable source constitutes prior publication. Meeting abstracts do not constitute prior publication.

The number of authors on a single manuscript should not exceed 12. Manuscripts that contain more than 12 authors will be returned to the authors without review. Other contributors who do not meet the requirements of authorship may be listed in the Acknowledgments.

It is the authors' responsibility to obtain permissions for reproduction of figures, tables, or text from published work. The publisher of a journal or book is the copyright owner from whom the written permission must be obtained. Permission from authors is also encouraged as a professional courtesy.

Although Biotechnology and Bioengineering encourages international submissions, we require that authors employ American spelling and grammar. Authors who are not fluent in English are strongly encouraged to seek outside assistance with manuscript preparation. Manuscripts can be rejected or returned to the authors solely on the basis of substandard English.

Revised manuscripts must be returned within 6 weeks upon receiving notification with the reviews by an editor. Otherwise, they will be considered withdrawn and treated as new manuscripts upon resubmission.

Proofs will be sent to the corresponding author who must be identified on the title page. Page charges will not be made. Reprints may be ordered at <https://caesar.sheridan.com/reprints/redirect.php?pub=10089&acro=BIT>. All color figures will be reproduced in full color in the online edition of the journal at no cost to authors. Authors are requested to pay the cost of reproducing color figures in print; the fee is \$500 per figure.

Authors are encouraged to submit color illustrations that convey or clarify essential scientific information.

Cover Illustrations: If you would like to send suggestions for artwork related to your manuscript to be considered to appear on the journal cover, please follow these general guidelines.

Submission of Protein Structures: Authors are expected to deposit the coordinates for new protein structures in the Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>) and include the assigned identification codes in the manuscript.

Submission of Sequence Data: The Editors encourage the use of widely accessible genetics databases as repositories for newly determined nucleotide and/or amino acid sequence data. Authors should always include the appropriate database (e.g. GenBank) accession number(s) in the Materials and Methods section of the manuscript.

Deposition of Cultures: Authors are encouraged to deposit important strains in publicly accessible culture collections and include the collection and strains designations in the text of the manuscript.



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

COMISSÃO CIENTÍFICA

A Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto:

Projeto: 160148

Data da Versão do Projeto: 28/03/2016

Pesquisadores:

DEISE PONZONI

VIVIANE NEVES PACHECO

Título: Desenvolvimento e validação de aparelho para fotofuncionalização do titânio

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Porto Alegre, 26 de setembro de 2016.


Prof. José Roberto Goldim
Coordenador CEP/HCPA