

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Ciências de Saúde
Programa de Pós-Graduação em Odontologia



Tese de Doutorado

**ANÁLISE DO TRATAMENTO DA SUPERFÍCIE DO TITÂNIO COM OZÔNIO SOBRE AS
PROPRIEDADES OSTEOCONDUTORAS: REVISÃO SISTEMÁTICA E *ESTUDO IN VITRO***

José Henrique Gomes dos Santos Filho

Brasília, 19 de novembro de 2025

**ANÁLISE DO TRATAMENTO DA SUPERFÍCIE DO TITÂNIO COM OZÔNIO SOBRE AS
PROPRIEDADES OSTEOCONDUTORAS: REVISÃO SISTEMÁTICA E *ESTUDO IN VITRO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Bruzadelli Macedo

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Loise Pedrosa Salles

Brasília, 19 de novembro de 2025

**ANÁLISE DO TRATAMENTO DA SUPERFÍCIE DO TITÂNIO COM OZÔNIO SOBRE AS
PROPRIEDADES OSTEOCONDUTORAS: REVISÃO SISTEMÁTICA E *ESTUDO IN VITRO***

Tese aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília - UnB.

Data da defesa: 19 de novembro de 2025

Banca examinadora:

Prof. Dr Sérgio Bruzadelli Macedo (Orientador)

Prof. Dr. Daniel Rey de Carvalho

Prof^a. Dra. Fernanda Cristina Pimentel Garcia

Prof. Dr. Ricardo Fabris Paulin

Prof^a. Dra. Flaviana Soares Rocha (suplente)

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela minha vida, pela minha saúde, por me dar sabedoria e perseverança para superar as dificuldades em meu caminho e buscar soluções. Este processo me fez crescer e me tornar quem sou hoje.

Aos meus **pais**, por todos os exemplos de vida, apoio, presença constante, mesmo à distância. Por todos os esforços ao longo de todos esses anos. Por tudo que sacrificaram e abriram mão em função de nossa família.

Pai, o senhor me ensinou a não desistir nunca. Que nenhum sonho ou objetivo possa estar tão longe a ponto de não ser alcançado. Que o trabalho, o conhecimento e os bons princípios são as melhores ferramentas que um homem pode ter e que a família é nosso bem mais precioso.

Mãe, obrigado por sua dedicação integral e seu amor. Sempre com uma palavra amiga, um abraço acolhedor, um olhar carinhoso, enfim... mãe. O que mais dizer? Gratidão eterna a vocês.

Aos meus filhos **Lara, Isabella e Pedro**. Minhas inspirações e maior motivação para sempre seguir em frente. Obrigado pelo carinho, pela compreensão, por entenderem minhas ausências e por tornarem minha vida tão especial. Tudo que faço, faço por vocês!

À Leda, esposa amada e presença constante. Quantas vezes você me levantou. Quantas vezes você concordou sem questionar. Quantas vezes você foi a força que me faltou! Juntos vamos mais longe. Juntos vencemos qualquer adversidade. Obrigado por estar ao meu lado em todas as situações e por me fazer enxergar sempre algo bom.

Ao meu orientador **Sérgio Bruzadelli Macedo**, que hoje posso chamar de amigo, por ter me apresentado o mundo da ozonioterapia e de todas as aplicações possíveis. Por ter me dado a oportunidade de realizar o mestrado e me mostrado uma maneira especial de fazer pesquisa. Obrigado por todo o suporte, disponibilidade, paciência e sabedoria com que conduziu todo esse processo que estamos concluindo. Você me deu autonomia e confiança para buscar fazer mais e ir mais longe. Sua dedicação e exemplo foram e sempre serão fonte de inspiração.

AGRADECIMENTOS

À professora Loise por ter me acolhido como orientado com tão pouco tempo disponível. Sempre focada, extremamente científica e profissional. Sem sua ajuda este estudo não seria possível. Seu comprometimento e objetividade foram fundamentais para que conseguíssemos realizar todas as etapas em tão pouco tempo. Obrigado pela paciência, por todas as dúvidas sanadas e por todos os ensinamentos. Você me incentivou a fazer muito mais do que eu tinha planejado. Aprendi inúmeras técnicas e experimentos que pareciam extremamente complexas e você, com toda simplicidade e competência, fez tudo de forma leve e natural. Foram incontáveis horas no laboratório, cuidando das células (que não gostam de ficar sozinhas), executando os experimentos, pipetando os primers do PCR, enfim, depois de tudo, nem parece que foi tão trabalhoso. Depois veio o estágio no Forsyth, sem sua ajuda não teria sido possível. Mesmo depois de tanto tempo, seu prestígio conquistado por lá continua abrindo portas. Certamente seus exemplos me mostraram o que realmente é ser professor. Não se trata apenas de conhecimento técnico, mas sim de uma filosofia de vida. Dedicação, comprometimento e amor pelo que se faz. Continue sendo sempre fonte de inspiração aos seus alunos como foi para mim.

Ao **Danilo**, amigo de uma vida, irmão escolhido. Obrigado pela motivação a retomar os estudos após tantos anos. Obrigado por entender minhas ausências em função do curso, obrigado por todos os anos de muito trabalho, parceria, realizações, superações, confiança e amizade. Vamos em frente!

Às minhas irmãs **Juliana e Ana Luisa**, obrigado por estarem sempre comigo em todos os momentos, bons e ruins. Obrigado pela amizade e companheirismo. Sempre juntos!

À **Beth**, obrigado por tantos anos de dedicação, confiança, competência e amizade. Você torna nossa vida mais fácil e sempre cuida de tudo. Essa conquista também é sua.

Ao **Roberto Macoto**, eterno mestre. Gratidão por todos os ensinamentos, pelos bons exemplos, pela filosofia de trabalho que me ensinou, pelas oportunidades que me deu e, principalmente, pela amizade de tantos anos.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Reinaldo Mazotini, *in memoriam*, pelos seus exemplos como pessoa, homem de família, professor e cirurgião. A cirurgia ortognática só é praticada no Brasil porque o senhor se dispôs a aprender a técnica e a nos ensinar. Cirurgião nato, com mãos abençoadas pela precisão da técnica e a maestria da cura. Obrigado por nos ensinar a honrar e a defender as conquistas dos cirurgiões bucomaxilofacias. Obrigado por nos mostrar que nenhum caso é impossível e que todos merecem ser cuidados. Ter sido seu aluno foi uma honra, um privilégio e uma alegria. Seu legado permanece vivo!

Ao Dr. Elcio Marcantonio, *in memoriam*, Cirurgião brilhante, professor por vocação. Seus ensinamentos elevaram muito minha técnica cirúrgica, me abriram os horizontes da implantodontia e complementaram minha formação. Seu carinho e amizade estarão sempre comigo. Obrigado, Dr. Elcio! Saudades do senhor.

Ao Rafael, técnico do laboratório, por toda ajuda e participação efetiva em todo o processo. Sua presença foi essencial para a conclusão deste estudo.

À Professora Luana Wonk, por toda ajuda, na realização dos meus experimentos com microscopia, sem sua participação, eu não teria conseguido.

Ao técnico Marcos da Universidade Federal do Paraná, sem sua disponibilidade para realizarmos o MEV e EDS, algumas vezes nos seus horários de almoço, eu não conseguiria finalizar tudo a tempo. Gratidão.

À equipe do Forcyth, Boston, MA, pelo acolhimento, ajuda, orientação e transmissão de conhecimento. Agradeço em especial o Dr. **Alpdogan Kantarci**, PI e responsável pelo laboratório, por me aceitar como visitante e me receber com tanta cordialidade. Agradeço à **Natcha**, por me orientar nos experimentos de cultura celular, à **Fatima**, por me orientar nos experimentos de western blot, à **Gülçin**, por me orientar nos experimentos de análise de proteínas, à **Zeliha**, nos experimentos de PCR, à **Phrao**, por me ceder uma bancada no laboratório e nunca deixar faltar nenhum insumo, à **Maja Sabalic**, pela amizade, por me indicar artigos excelentes, me orientar tecnicamente e por corrigir meu artigo e a todo o restante da equipe que, de alguma forma, me ajudou durante o período que estive lá.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade de Brasília**, na pessoa da reitora Profa. Dra. Rozana Reigota Naves.

Ao **programa de pós-graduação em Odontologia da UnB**, na pessoa da professora coordenadora Dra. Fernanda Cristina Pimentel Garcia.

À equipe da **Unesp Araçatuba**, na pessoa do Professor Idelmo Rangel Garcia Júnior e dos doutorandos Lara e Martin. Agradeço por toda ajuda, gentileza e disponibilidade. Nosso trabalho foi adiado, mas chegamos no final.

À equipe da Geologia - Unb, por me ajudarem nos experimentos com imagem.

À Prof^o. Dr. Fernando do laboratório de BIOMOL, por permitir que eu realizasse grande parte dos experimentos no seu laboratório.

À Prof^a. Dra. Sônia Bauer e à técnica Ingrid, por cederem o laboratório e ajudarem no preparo de todas as minhas amostras para o MEV e EDS.

Ao professor César do laboratório de fisiologia respiratória, pela amizade, incentivo, paciência e gentileza durante nosso tempo no laboratório. “Tese boa é tese defendida”.

Aos amigos da equipe de jiu-jitsu “Cerrado Combat”, em especial ao mestre João Lima, pelos ensinamentos sobre autocontrole, trabalho da mente sobre corpo e uso do jiu-jitsu como ferramenta de construção pessoal e ajuda na organização de tarefas, solução de problemas sob pressão e manutenção da calma e equilíbrio em situações de stress. Funcionou!

AGRADECIMENTOS

A todos os amigos que fiz durante esse período do curso. Colegas de profissão, pacientes, professores, funcionários, alunos, enfim, todos que de alguma forma contribuíram em minha jornada.

*“Conheça todas as teorias, domine
todas as técnicas, mas ao tocar uma alma
humana seja apenas outra alma humana.”*

Carl Gustav Jung

RESUMO

O titânio e suas ligas, especialmente o titânio grau 5 (Ti-6Al-4V), constituem os biomateriais metálicos mais utilizados em odontologia e ortopedia devido à sua excelente biocompatibilidade, resistência mecânica e estabilidade química. Entretanto, falhas de osseointegração ainda representam um desafio clínico, principalmente em pacientes com condições sistêmicas adversas ou em protocolos de carga imediata. Diante disso, modificações de superfície têm sido amplamente estudadas para otimizar a resposta celular e promover melhor integração entre o implante e o tecido ósseo. O tratamento com gás ozônio destaca-se por sua simplicidade, baixo custo e capacidade de alterar as propriedades físico-químicas do titânio, aumentando sua hidrofilia e energia superficial, o que favorece a adesão e diferenciação osteoblástica. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do tratamento com gás ozônio sobre as propriedades físico-químicas e osteocondutoras da superfície do titânio grau 5. O estudo foi dividido em duas etapas experimentais. Na primeira, analisaram-se as propriedades de molhabilidade, topografia e composição química superficial, por meio de medidas de ângulo de contato, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia por dispersão de energia (EDS), comparando discos apenas usinados (D-Ti) e tratados com ozônio (D-TiOz). O tratamento promoveu redução significativa do ângulo de contato (de $56^\circ \pm 4,2$ para $6^\circ \pm 1,1$; $p < 0,0001$), formação de nanoestruturas na superfície e aumento estatisticamente significativo do teor de oxigênio ($p < 0,01$), acompanhado de redução do carbono superficial ($p < 0,01$), confirmando o efeito oxidativo e descontaminante do ozônio. Na segunda etapa, realizaram-se experimentos *in vitro* com células osteoblásticas Saos-2 para avaliar os efeitos biológicos do tratamento. Foram conduzidos ensaios de viabilidade (MTT), migração celular (scratch test), mineralização (Alizarina Vermelha S), atividade da fosfatase alcalina (ALP), expressão gênica (qPCR) e análise morfológica por MEV. Os resultados demonstraram que o grupo D-TiOz apresentou maior viabilidade e proliferação celular quando comparado ao D-Ti (aumento de aproximadamente 28%; $p < 0,01$), maior taxa de migração no ensaio de scratch (redução da área não cicatrizada em ~35%; $p < 0,05$), maior deposição mineral (incremento de 42%; $p < 0,01$) e aumento significativo na expressão de marcadores osteogênicos, incluindo TCF-1 (3,2 vezes; $p < 0,001$) e ALP (2,7 vezes; $p < 0,01$), além de morfologia celular compatível com um fenótipo de adesão ativa. Conclui-se que o tratamento com gás ozônio melhora significativamente as propriedades osteocondutoras do titânio, promovendo adesão, proliferação e diferenciação osteoblástica. O método apresenta potencial translacional para aplicação clínica na implantodontia, ortopedia e cirurgia bucomaxilofacial, podendo restaurar a bioatividade de implantes armazenados e otimizar a integração óssea de próteses metálicas. Recomenda-se a realização de estudos complementares *in vivo* e clínicos para validação da eficácia e segurança do tratamento.

Palavras-chave: Titânio; Ozônio; Biomateriais; Osseointegração; Osteoblastos; composição química; hidrofilia; rugosidade.

ABSTRACT

Titanium and its alloys, especially Grade 5 titanium (Ti-6Al-4V), are the most widely used metallic biomaterials in dentistry and orthopedics due to their excellent biocompatibility, mechanical strength, and chemical stability. However, failures in osseointegration still represent a clinical challenge, particularly in patients with adverse systemic conditions or in immediate-loading protocols. Therefore, surface modification strategies have been widely investigated to optimize cellular responses and enhance the integration between implants and bone tissue. Ozone gas treatment stands out for its simplicity, low cost, and ability to alter the physicochemical properties of titanium, increasing its hydrophilicity and surface energy, which favor osteoblastic adhesion and differentiation. This study aimed to evaluate the effects of ozone gas treatment on the physicochemical and osteoconductive properties of Grade 5 titanium. The investigation was divided into two experimental phases. In the first phase, surface wettability, topography, and chemical composition were assessed using contact angle measurements, scanning electron microscopy (SEM), and energy-dispersive spectroscopy (EDS), comparing machined disks (D-Ti) with ozone-treated disks (D-TiOz). The treatment promoted a statistically significant reduction in the contact angle (from $56^{\circ} \pm 4.2$ to $6^{\circ} \pm 1.1$; $p < 0.0001$), the formation of surface nanostructures, and a significant increase in oxygen content ($p < 0.01$), along with a reduction in surface carbon ($p < 0.01$), confirming the oxidative and decontaminating effects of ozone. In the second phase, *in vitro* assays with Saos-2 osteoblastic cells were performed to evaluate the biological effects of the treatment. Viability (MTT), cell migration (scratch test), mineralization (Alizarin Red S), alkaline phosphatase activity (ALP), gene expression (qPCR), and SEM morphological analyses were conducted. The results showed that the D-TiOz group exhibited higher cell viability and proliferation compared with D-Ti (approximately 28% increase; $p < 0.01$), greater migration rates in the scratch assay ($\approx 35\%$ reduction in the non-healed area; $p < 0.05$), increased mineral deposition (42% increase; $p < 0.01$), and significantly upregulated osteogenic markers, including TCF-1 (3.2-fold; $p < 0.001$) and ALP (2.7-fold; $p < 0.01$), in addition to exhibiting a morphology consistent with an active adhesion phenotype. In conclusion, ozone gas treatment markedly enhances the osteoconductive properties of titanium by promoting osteoblastic adhesion, proliferation, and differentiation. This method shows promising translational potential for clinical applications in implant dentistry, orthopedics, and maxillofacial surgery, with the ability to restore the bioactivity of stored implants and improve bone integration of metallic prosthetic components. Further *in vivo* and clinical studies are recommended to validate the efficacy and safety of this treatment.

Keywords: Titanium; Ozone; Biomaterials; Osseointegration; Osteoblasts; chemical composition; hydrophilicity; roughness. (checked in Mesh terms)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 2 – EFEITOS DO OZÔNIO NAS PROPRIEDADES OSTEOCONDUTORAS DA SUPERFÍCIE DO TITÂNIO: REVISÃO SISTEMÁTICA..... 46

Figura 1.....53

CAPÍTULO 3: CARACTERÍSTICAS FÍSICO – QUÍMICAS DA SUPERFÍCIE DO TITÂNIO GRAU 5 APÓS TRATAMENTO COM GÁS OZÔNIO..... 69

Figura 1.....73

Figura 2.....74

Figura 3.....74

Figura 4.....79

Figura 5a.....80

Figura 5b.....81

Figura 6.....82

Figura 7.....83

Figura 8.....83

Figura 9.....84

Figura 10.....85

Figura 11.....85

CAPÍTULO 4 - EFEITOS DO TRATAMENTO DA SUPERFÍCIE DO TITÂNIO GRAU 5 SOBRE AS PROPRIEDADES OSTEOCONTUTORAS DE OSTEOBLASTOS: ESTUDO *IN VITRO* 101

Figura 1.....107

Figura 2.....109

Figura 3.....117

Figura 4a.....120

Figura 4b.....120

Figura 5a.....123

Figura 5b.....123

Figura 6.....125

Figura 7.....127

Figura 8.....130

Figura 9.....130

Figura 10.....131

Figura 11.....131

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO, REVISÃO DA LITERATURA E OBJETIVOS 19

Tabela 1	22
Tabela 2	22
Tabela 3	33

CAPÍTULO 2 – EFEITOS DO OZÔNIO NAS PROPRIEDADES OSTEOCONDUTORAS DA SUPERFÍCIE DO TITÂNIO: REVISÃO SISTEMÁTICA..... 46

Tabela 1	54
Tabela 2	55
Tabela 3	56
Tabela 4	57

CAPÍTULO 3: CARACTERÍSTICAS FÍSICO – QUÍMICAS DA SUPERFÍCIE DO TITÂNIO GRAU 5 APÓS TRATAMENTO COM GÁS OZÔNIO..... 69

Tabela 1	78
Tabela 2	86
Tabela 3	86

CAPÍTULO 4 - EFEITOS DO TRATAMENTO DA SUPERFÍCIE DO TITÂNIO GRAU 5 SOBRE AS PROPRIEDADES OSTEOCONDUTORAS DE OSTEOBLASTOS: ESTUDO *IN VITRO* 101

Tabela 1	107
Tabela 2	112
Tabela 3	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ALP** – Alkaline Phosphatase (Fosfatase Alcalina)
- ANGPT1** – Angiopoietin-1 (Angiopietina 1)
- ARS** – Alizarin Red Staining (Coloração por Alizarina Vermelha)
- ATCC** – American Type Culture Collection
- BA** – Bone Area (Área Óssea)
- BGLAP** – Bone Gamma-Carboxyglutamate Protein (Osteocalcina)
- BIC** – Bone Implant Contact (Contato Osso-Implante)
- BMP-2** – Bone Morphogenetic Protein 2 (Proteína Morfogenética Óssea 2)
- BSP** – Bone Sialoprotein (Sialoproteína Óssea)
- CT** – Controle (Grupo sem exposição ao titânio)
- CTM** – Células-Tronco Mesenquimais
- D-Ti** – Disco de Titânio Usinado
- D-TiOz** – Disco de Titânio Tratado com Ozônio
- DNA** – Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)
- EDS** – Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy (Espectroscopia por Dispersão de Energia de Raios X)
- FAK** – Focal Adhesion Kinase (Quinase de Adesão Focal)
- HA** – Hydroxyapatite (Hidroxiapatita)
- IL** – Interleukin (Interleucina)
- IL-1 β** – Interleukin 1 Beta (Interleucina 1 Beta)
- IL-6** – Interleukin 6 (Interleucina 6)
- ITGB1** – Integrin Beta 1 (Integrina Beta 1)
- MEV** – Microscopia Eletrônica de Varredura (Scanning Electron Microscopy – SEM)
- MMP** – Matrix Metalloproteinase (Metaloproteinase de Matriz)
- mRNA** – Messenger Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico Mensageiro)
- MTT** – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Ensaio de Viabilidade Celular)
- OD** – Optical Density (Densidade Óptica)
- OPG** – Osteoprotegerina (TNFRSF11B)
- PBS** – Phosphate-Buffered Saline (Solução Salina Tamponada com Fosfato)
- PCR** – Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
- PVD** – Physical Vapour Deposition (Deposição Física de Vapor)
- qPCR** – Quantitative Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa)
- RANKL** – Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand (Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa-B)

RNA – Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico)

RUNX2 – Runt-Related Transcription Factor 2 (Fator de Transcrição Relacionado a Runt 2)

Saos-2 – Sarcoma Osteogênico (Linhagem de Células Osteoblásticas Humanas)

SEM – Scanning Electron Microscopy (Microscopia Eletrônica de Varredura)

SP – Signaling Pathway (Via de Sinalização)

SP7 – Osterix (Fator de Transcrição Downstream de RUNX2)

TCF-1 – T-cell Factor 1 (Fator de Células T 1, também conhecido como TCF7)

Ti – Titanium (Titânio)

TiO₂ – Titanium Dioxide (Dióxido de Titânio)

TNF-α – Tumor Necrosis Factor Alpha (Fator de Necrose Tumoral Alfa)

TPS – Titanium Plasma Spray (Spray de Plasma de Titânio)

UVO – Ultraviolet Ozone (Ozônio Ultravioleta)

UV – Ultraviolet (Ultravioleta)

Usinagem CVC - Usinagem com Controle de Velocidade Constante (Constant Velocity Cutting)

VEGFA – Vascular Endothelial Growth Factor A (Fator de Crescimento Endotelial Vascular A)

SUMÁRIO

ESTA TESE ESTÁ ESCRITA NO FORMATO DE CAPÍTULOS SENDO OS CAPÍTULOS 2, 3 E 4 REFERENTES AOS ARTIGOS PRODUZIDOS COM O ESTUDO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL DA TESE (INTRODUÇÃO, REVISÃO DA LITERATURA E OBJETIVOS) 19

Introdução	19
Revisão de Literatura	21
Objetivos e Hipóteses	35
Objetivo Geral	35
Objetivos Específicos	35
Hipótese Alternativa	36
Hipóteses Nulas	36
Referências Bibliográficas	37

CAPÍTULO 2 – EFEITOS DO OZÔNIO NAS PROPRIEDADES OSTEOCONDUTORAS DA SUPERFÍCIE DO TITÂNIO: REVISÃO SISTEMÁTICA..... 46

Resumo	46
Introdução.....	48
Materiais e Métodos.....	49
Resultados.....	52
Discussão	58
Conclusões.....	60
Referências.....	62

CAPÍTULO 3: CARACTERÍSTICAS FÍSICO – QUÍMICAS DA SUPERFÍCIE DO TITÂNIO GRAU 5 APÓS TRATAMENTO COM GÁS OZÔNIO..... 69

Resumo	69
Introdução.....	69
Materiais e Métodos.....	72
Preparo das Amostras	72
Ensaio de Molhabilidade	73
Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	75
Espectroscopia por Dispersão de Energia de Raios X (EDS)	75
Análise Estatística	78
Resultados.....	78
Discussão	87
Conclusões.....	91
Referências.....	92

CAPÍTULO 4 - EFEITOS DO TRATAMENTO DA SUPERFÍCIE DO TITÂNIO GRAU 5 SOBRE AS PROPRIEDADES OSTEOCONTUTORAS DE OSTEOBLASTOS: ESTUDO *IN VITRO* 101

Resumo	101
Introdução.....	103
Materiais e Métodos.....	106
Preparo das Amostras	106
Cultura Celular	107
Ensaio de Viabilidade Celular (MTT)	108
Ensaio de Migração Celular (Wound Healing / Scratch Test)	108
Ensaio de Mineralização da Matriz (Alizarin Red Stain - ARS)	109
Atividade de Fosfatase Alcalina (ALP)	111
Quantificação de Expressão Gênica (qPCR)	112
Morfologia Celular em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	113
Análise Estatística	114
Resultados.....	116
Discussão	132
Conclusões.....	139
Referências.....	140

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES GERAIS DA TESE 148

Discussão Geral	148
Conclusões Finais	148

CAPÍTULO 6 – PRESS RELEASE 162

APÊNDICE I – Artigo Publicado 163

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL DA TESE (INTRODUÇÃO, REVISÃO DA LITERATURA E OBJETIVOS)

1.1 INTRODUÇÃO

Biomateriais metálicos têm sido utilizados na prática clínica médica e odontológica há muitos anos, são representados pelas placas e parafusos utilizados para fixação de fraturas ósseas, implantes odontológicos, próteses de articulações, entre outros. Muitos destes metais, após maior casuística, maiores períodos de acompanhamento em função pós instalação e conhecimento mais detalhados sobre seu comportamento em relação aos tecidos vivos, foram excluídos por não apresentarem estabilidade e biocompatibilidade a médio e longo prazo resultando em falha no tratamento com reação inflamatória de corpo estranho, oxidação com liberação de resíduos e perda de estabilidade na união com o osso [1,2]. Assim, dentre todos os compostos metálicos, o titânio e suas ligas estão, atualmente, entre aqueles com melhores resultados, principalmente por apresentarem biocompatibilidade a longo prazo e um eficiente mecanismo de união com o osso chamado de osseointegração [3]. Após a implantação, a superfície do titânio e o osso justaposto ao dispositivo reagem, a partir daí o processo de reparo se inicia culminando na fixação do implante [4,9,10].

Com o sucesso biológico e mecânico do titânio, muitos estudos foram realizados com o objetivo de identificar quais características e em quais condições o processo de osseointegração poderia ser favorecido [12,13,14]. Com a evolução das pesquisas científicas e produção de conhecimento mais específico sabe-se, atualmente, que durante o processo de reparo, a estabilidade inicial e as características de superfície dos implantes de titânio são fatores determinantes para o sucesso da osseointegração [61]. Tais características são: composição química, topografia, rugosidade e hidrofília (molhabilidade) [3,4,5]. Quando alteradas pelos tratamentos de superfície podem favorecer a osteogênese. Dessa forma, torna-se necessária uma técnica bem definida para melhorar as características de superfície do titânio de acordo com o leito receptor, com a capacidade de atingir de maneira uniforme toda a superfície dos implantes em suas mais variadas formas, favorecendo suas propriedades osteocondutoras [7,8,9,10].

A partir dessa premissa, ou seja, buscar tratamentos efetivos para superfície do titânio, diversos métodos têm sido testados. Processos físicos como usinagem, jateamento com óxidos e foto-tratamento com luz Ultravioleta (UV), nos quais não há reação química entre a superfície tratada e o agente do tratamento, são bastante utilizados. [6,15]

Processos químicos, como ataque ácido simples, com o ácido hidrofúorídrico e duplo, com os ácidos clorídrico (HCl) e sulfúrico (H₂SO₄), nos quais o agente do tratamento reage com a superfície do implante alterando os compostos presentes na mesma, também são frequentemente utilizados. [4,26,31]

Outro processo pesquisado tem sido o gás ozônio, que pode ser classificado como agente de tratamento físico e químico. Este gás é um potente oxidante que reage com substâncias orgânicas e inorgânicas e possui um excelente potencial para ser utilizado em qualquer formato de próteses ou implante metálicos por ser capaz de agir, uniformemente, em toda superfície em questão [11]. Além disso, tem baixo custo, manipulação relativamente simples e segura, além de já ser utilizado amplamente no processo industrial como auxiliar à produção de estruturas metálicas, na área da saúde e na purificação de poluentes [16]. Sunarso *et al*, 2016 [62] descrevem melhora significativa da molhabilidade e da produção de fosfatase alcalina (ALP) após tratamento da superfície do titânio na forma de gás em alta concentração por até 24 horas. Além disso, observaram diminuição dos átomos de carbono e aumento de O₂. Este mesmo estudo avaliou a resposta de células de medula óssea de rato expostas à superfície do titânio tratado e relata aumento na diferenciação celular em osteoblastos. Seguindo a mesma linha de pesquisa do grupo anterior, Yuanyuan Yang *et al*, 2021 [63] trataram a superfície de discos de titânio com ozônio obtido por exposição à luz UV por 12 minutos. Após o tratamento caracterizaram a superfície e analisaram viabilidade celular após cultura com macrófagos e células mesenquimais indiferenciadas de medula óssea de rato. Por fim, com as mesmas células cultivadas realizaram testes de PCR em tempo real para analisarem a expressão de genes relacionados à inflamação. Como resultado, em comparação com o titânio sem tratamento, relatam melhora na viabilidade celular, aumento da molhabilidade com a diminuição do ângulo de contato entre um líquido e a superfície tratada e menor expressão de genes relacionados à inflamação como o TNF- α e IL-6.

Apesar de apresentarem resultados positivos, promissores e equivalentes, esses estudos apresentam uma heterogeneidade muito grande e uma variação importante entre forma de obtenção do ozônio, dosagem (concentração) e tempo de tratamento, o que dificulta a comparação e a definição de um protocolo. Entretanto, ainda não há consenso sobre o protocolo ideal para um tratamento de superfície capaz de maximizar a resposta celular sem comprometer as propriedades mecânicas do titânio.

Assim, o objetivo deste trabalho é analisar os efeitos do ozônio como tratamento da superfície do titânio, confirmar o resultado positivo desse tratamento nas propriedades osteocondutoras deste metal e definir um protocolo de uso. Para isso foram realizados experimentos para caracterização da superfície do titânio com e sem tratamento, cultura

celular *in vitro* de células osteoblásticas Saos-2 (ATCC® HTB-85), experimentos para análise do comportamento dessas células em contato com o titânio tratado ou não e testes de PCR para analisar a expressão e/ou supressão de determinados genes relacionados à diferenciação celular, à formação óssea e à biocompatibilidade.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

Os biomateriais metálicos são amplamente utilizados na medicina e odontologia, desempenhando um papel essencial na substituição ou suporte de tecidos biológicos, especialmente na forma de próteses, implantes, placas e parafusos para fixação de fraturas ósseas [1-3]. Sua principal função é assegurar a integridade estrutural e biomecânica dos sistemas biológicos afetados [1-3]. Contudo, nem todos os metais são adequados para tais aplicações. Muitos destes, após acompanhamentos funcionais pós-instalação nos pacientes por períodos mais longos e maior conhecimento sobre seu comportamento em relação aos tecidos vivos, foram gradativamente descartados devido a falhas clínicas decorrentes de processos corrosivos, liberação de íons tóxicos e reações inflamatórias indesejadas, comprometendo a estabilidade, a biocompatibilidade e resultando em falhas terapêuticas a médio e longo prazo [1-4, 17].

Entre os diversos metais utilizados como ferro, aço, cobre, níquel, cromo, entre outros, o titânio (Ti) e suas ligas surgiram como os mais eficazes para aplicações biomédicas, devido à sua excepcional biocompatibilidade, resistência mecânica e resistência à oxidação com liberação de resíduos [5,6]. A característica mais notável do titânio é sua capacidade de estabelecer uma ligação direta e estável com o osso, fenômeno conhecido como osseointegração [1,2,7, 14, 18]. Como características principais deste metal temos:

- **Tipos de Titânio [92-97]**

I. Titânio Comercialmente Puro - CP (Grades 1 a 4)

O titânio comercialmente puro é constituído praticamente apenas por titânio, com pequenas variações de oxigênio, ferro e nitrogênio. A dureza e a resistência mecânica aumentam do Grade 1 ao Grade 4 devido ao maior teor de oxigênio.

i. Características gerais do Ti CP

Altíssima biocompatibilidade, excelente resistência à corrosão, boa soldabilidade

e conformabilidade, propriedades mecânicas moderadas, indicado para componentes que não exigem altíssima resistência (ex.: algumas próteses, implantes específicos, placas leves).

Tabela 1. Comparação entre os Grades do Titânio Comercialmente Puro - CP

Grade	Resistência	Ductilidade	Aplicações
1	mais baixa	mais alta	placas finas, estruturas leves
2	intermediária	alta	implantes, equipamentos médicos
3	média	moderada	componentes estruturais
4	mais alta	menor	implantes que exigem resistência maior

II. Ligas de Titânio (Grade 5 e 23)

As ligas são formadas pela adição de elementos como alumínio (Al) e vanádio (V), que modificam profundamente as propriedades mecânicas e microestruturais.

Ligas mais utilizadas comercialmente:

- Ti-6Al-4V (Grade 5) – a mais comum em medicina e indústria
- Ti-6Al-4V ELI (Grade 23) – versão com menor teor de impurezas (“Extra Low Interstitials”)
- Outras ligas: Ti-6Al-7Nb, Ti-13Nb-13Zr, beta-Ti (como Ti-15Mo), etc.

Como características gerais das ligas de Ti (especialmente Ti-6Al-4V) temos: resistência mecânica muito maior que o Ti CP, maior dureza, ótima relação resistência/peso, boa resistência à fadiga, biocompatibilidade muito alta, excelente para estruturas que exigem suporte de carga

Tabela 2. Diferenças essenciais: CP vs. Ligas

Propriedade	Ti comercialmente puro	Ligas de titânio (ex.: ti-6al-4v)
Composição	Quase 100% Ti	Ti + Al + V (ou outros elementos)
Força mecânica	Baixa a moderada	Alta
Dureza	Menor	Maior
Ductilidade	Alta	Menor
Resistência à fadiga	Boa	Excelente
Biocompatibilidade	Excelente	Excelente

Uso típico	Implantes leves, placas pequenas	Implantes de carga, próteses, placas de trauma, parafusos
-------------------	----------------------------------	---

- **As Propriedades Físico-Químicas do Titânio**

O titânio possui propriedades únicas que o tornam ideal para aplicações biomédicas: alta resistência mecânica, baixa densidade, excelente resistência à corrosão e capacidade de formação espontânea de uma camada passiva de óxido (TiO_2) na sua superfície [8]. Esta camada de óxido, com espessura variando de 1 a 10 nm, confere ao material notável resistência à corrosão e biocompatibilidade, evitando a liberação de íons metálicos prejudiciais aos tecidos biológicos [9].

Além disso, o titânio é caracterizado por sua baixa condutividade térmica e elétrica, e módulo de elasticidade relativamente próximo ao do osso humano (110 GPa contra 20 GPa do osso cortical), o que reduz o risco de osteólise induzida por estresse [10]. Essa afinidade mecânica diminui a diferença de rigidez entre implante e osso, favorecendo a transferência de cargas e estimulando a remodelação óssea [11].

- **A Biocompatibilidade e a Resposta Biológica ao Titânio**

A biocompatibilidade do titânio se dá, principalmente, pela sua superfície bioinerte, que evita reações imunológicas adversas [12]. A camada de TiO_2 é hidrofílica, favorecendo a adsorção de proteínas plasmáticas, as quais modulam a adesão e diferenciação celular, iniciando o processo de osseointegração [13].

Após a implantação, o osso interage com a superfície do titânio e ocorre a fixação [3,4]. Imediatamente após a implantação, ocorre a formação de uma camada de proteínas sobre a superfície do titânio, seguida pela adesão de plaquetas e células inflamatórias, resultando na formação de um coágulo sanguíneo [14]. Esse coágulo age como matriz provisória para a migração de células mesenquimais e osteoprogenitoras, que, sob estímulo bioquímico, se diferenciam em osteoblastos e iniciam a neoformação óssea [15].

- **Processo de Osseointegração**

O conceito de osseointegração foi introduzido por Brånemark nos anos 1960, após experimentos com câmaras ópticas de titânio implantadas em tíbias de coelhos, observando a formação direta de osso sobre a superfície metálica sem interposição de tecido fibroso [16]. Esse achado foi revolucionário, sendo a base do desenvolvimento dos implantes dentários e ortopédicos modernos [16].

O processo de osseointegração ocorre em quatro etapas principais:

- I. Resposta hemostática: formação do coágulo sanguíneo.
- II. Inflamação e quimiotaxia celular: atração de células inflamatórias e de reparo.
- III. Proliferação celular e síntese de matriz extracelular.
- IV. Remodelação e maturação óssea.

Com a evolução das pesquisas e produção de conhecimento mais específico, sabe-se atualmente que, durante o processo de reparo, a estabilidade primária e as características de superfície dos implantes de titânio, como composição química, rugosidade e hidrofilia (molhabilidade), são fatores determinantes para o sucesso da osseointegração [8,14,17,18].

Modificações na topografia, energia da superfície e molhabilidade dos implantes podem favorecer a resposta osteoblástica, aumentar o número de células adsorvidas na superfície, atividade da fosfatase alcalina e osteocalcina, acelerando a osteogênese e, conseqüentemente, a osseointegração e estabilidade secundária [10,19,21,22].

Essas características podem ainda favorecer as propriedades osteocondutoras quando as alterações nas superfícies resultam no aumento da polaridade desses dispositivos, ou seja, aumentam a quebra de moléculas com a separação de um número maior de átomos com cargas positivas e negativas [21].

Como principal característica topográfica, tem-se a rugosidade, originalmente descrita de forma clássica por Thomas (1981) [23] como a média entre a altura de picos e a profundidade de vales presentes em uma superfície. Nas décadas seguintes, estudos modernos expandiram esse conceito, introduzindo parâmetros tridimensionais mais robustos (S_a , S_q , S_{dr}) e relacionando diretamente micro e nano-rugosidade com adesão celular e formação óssea (Le Guéhennec et al., 2007; Wennerberg & Albrektsson, 2009) [98,26]. A superioridade das superfícies rugosas em relação às lisas também foi confirmada por estudos mais recentes, mostrando aumento do contato ósseo direto, maior resistência mecânica ao torque de remoção e melhor desempenho sob condições de carga precoce (Cochran et al., 2013; Albrektsson & Wennerberg, 2019; Buser et al., 2017) [100,101, 99]. Esses achados contemporâneos reforçam as observações iniciais de Thomas e os resultados histológicos de estudos pioneiros como os de Schroeder (1981) [24] e Maniopoulos (1986) [25], agora amplamente corroborados por evidências modernas de biologia óssea e engenharia de superfície.”

Os primeiros implantes de titânio utilizados como substitutos de dentes perdidos não apresentavam tratamento e modificações em sua superfície, que eram apenas usinadas [14]. Mesmo assim, não eram totalmente lisos, pois possuíam ranhuras na sua superfície decorrentes do processo de usinagem, o que pode justificar seu alto índice de sucesso. Alguns estudos mostram, inclusive, que um implante apenas usinado pode ser mais rugoso do que implantes que possuam tratamento de superfície [26,27].

As características químicas das superfícies também estão relacionadas à energia de superfície e carga eletrostática produzida pelos íons presentes. Uma alta energia de superfície representa melhor molhabilidade e maior afinidade por adsorção, determinando se o biomaterial é hidrofílico ou hidrofóbico [14]. A molhabilidade é o resultado das forças de adesão do líquido sobre a superfície sólida, o que possibilita ao líquido testado um maior ou menor espalhamento de uma gota do mesmo quando depositada na superfície [53,54], ou seja, biologicamente, implantes com alta energia de superfície, alta molhabilidade e menor ângulo de contato entre a superfície e o líquido apresentam melhores propriedades osteocondutoras e osseointegração [24].

Este fenômeno é devido à melhor adsorção das proteínas [12,28] e melhor interação com fluidos biológicos e células [29]. Como consequência, ocorre melhor desempenho no recrutamento de células e proteínas da matriz extracelular, assim como nas modificações estruturais subsequentes [30,31].

- **Tratamentos de Superfície do Titânio**

A partir destes novos dados observados nos estudos, visando acelerar o processo de osteocondução e de osseointegração dos implantes de Ti e de se conseguir um melhor contato entre o osso e o implante, foram sugeridas modificações em suas superfícies, denominadas tratamentos de superfície [32]. Estes processos são classificados em tratamentos por adição/químico (eletroquímico, plasma de titânio e hidroxiapatita) ou subtração/físico (ataque ácido, jateamento abrasivo, laser, luz UV) e/ou associações entre as técnicas [33].

Como objetivos principais destes tratamentos estão incluídos: fornecer configuração da superfície que permita a retenção do coágulo, acelerar o crescimento e a maturação óssea, obter crescimento ósseo diretamente na superfície do implante impedindo interposição de camadas proteicas amorfas, obter maior área de osseointegração e atrair células presentes na neoformação óssea, além de reduzir o tempo de carregamento após a cirurgia [34-37].

A técnica de texturização de superfície por adição mais comum é o spray de plasma, realizado com partículas de titânio (Spray de plasma de titânio - TPS) [24,38] ou fosfato de cálcio (Spray de plasma de hidroxiapatita - HA) [39]. Por outro lado, o método de texturização por subtração mais frequente é por ataque ácido. Os ácidos mais comumente utilizados são: clorídrico (HCl), fluorídrico (HF), nítrico (HNO₃), sulfúrico (H₂SO₄) ou a combinação deles [40]. O tratamento também pode ser feito após o jateamento de partículas, associando os dois métodos [14].

- **Aplicação do Ozônio no Tratamento de Superfícies de Titânio**

Atualmente, o ozônio tem sido estudado como tratamento de superfície do titânio. Este gás é um composto triatômico do oxigênio encontrado naturalmente na estratosfera com a função de absorver a radiação UV [41]. Por suas propriedades químicas, tem sido utilizado como oxidante em reações com substâncias orgânicas e inorgânicas [11].

Como modificador das propriedades da superfície do titânio, o ozônio age por meio da subtração de átomos de carbono que diminuem a energia de superfície do metal e aumenta a quantidade de óxidos do titânio. Como resultado deste efeito, aumenta a energia de superfície e molhabilidade, além de promover uma maior rugosidade. Por apresentar-se na forma de gás, água e óleo, tem um excelente potencial para ser utilizado em qualquer formato de implante, por ser capaz de agir uniformemente em toda sua superfície [16].

Na forma gasosa, o ozônio é instável e não pode ser armazenado devido à sua curta meia-vida, que é de aproximadamente 40 minutos a 20°C [11]. Portanto, deve ser utilizado com o auxílio de aparelho gerador, que produz ozônio por meio da clivagem da molécula de oxigênio, podendo ser regulado seu fluxo e concentração, dependendo do objetivo desejado. Outra maneira eficaz de se obter ozônio na sua forma de gás é a luz ultravioleta [9]. Com o auxílio de uma câmara fechada com um fluxo contínuo de oxigênio e uma fonte externa de luz UV, o oxigênio é clivado e é produzido o chamado ozônio ultravioleta (UVO). A literatura descreve uma faixa de comprimentos de onda associando UVA e UVB, além de tempos variados de exposição. No entanto, as concentrações alcançadas com o UVO são significativamente menores do que as concentrações produzidas pelo efeito corona, outra forma de geração deste gás que utiliza geradores específicos [43].

Outra forma de apresentação do ozônio é a água ozonizada. Existem diferentes tipos de água que podem ser utilizadas para a produção da água ozonizada, que variam de acordo com seu processo de filtração e pureza. Quanto mais pura a água, melhor será para o processo de ozonização. Preferencialmente, a água de osmose reversa é a de escolha e, em seguida, a bidestilada (ou de injeção) por apresentarem maior pureza [56]. Existem diferentes parâmetros que influenciam no processo de ozonização da água, tais como temperatura, pureza, pH, além de outros fatores inerentes ao equipamento utilizado. O gerador de ozônio é acoplado a uma coluna de vidro, contendo água em seu interior, com uma altura adequada para que as bolhas produzidas possam percorrer essa coluna de água, enriquecendo-a com o gás, permitindo sua ozonização [44-46].

Após a saturação da água com ozônio, as concentrações finais são cerca de 20% da concentração do gás gerado. Desta forma, se o gerador estiver produzindo 40 microgramas, a concentração final do gás na água será de 8 µg/ml. Esta concentração do ozônio na água apresenta ações regenerativas e bioestimulantes sendo, inclusive, tolerada pelos tecidos vivos [41,42,45,56].

Por fim, tem-se o ozônio na forma de óleo ozonizado, que é gerado de forma semelhante aos anteriores. Um fluxo de oxigênio medicinal conectado a um gerador de ozônio industrial produz as moléculas de ozônio que atuarão sobre as duplas ligações entre as moléculas de carbono da cadeia química do óleo. Em meio oleoso, o ozônio apresenta-se mais estável, no formato de ozonídeos, podendo ser conservado por períodos maiores. O óleo ozonizado, em função de sua baixa hidrofília, é capaz de permanecer sobre o tecido por mais tempo, possibilitando agir terapeuticamente no aspecto bioestimulatório; por outro lado, sua hidrofobia torna-se um fator negativo para melhora das propriedades osteocondutoras da superfície. A concentração de ozônio no óleo, apesar de maior que na água, também é considerada baixa, tornando seu efeito oxidante e bactericida limitado em comparação ao gás. Diferentes veículos podem ser utilizados, sendo o mais comum o óleo de oliva, devido ao seu pH e baixo índice de peroxidase, o que mantém o ozônio ativo por mais tempo [47,48].

Portanto, apesar das propriedades regenerativas obtidas com o ozônio na forma da água e óleo, para tratamento de superfície, o ozônio na forma de gás tem sido a opção de escolha devido às altas concentrações obtidas, que possuem maior ação oxidativa e, por consequência, maior capacidade de modificar a topografia e energia de superfície quando em contato com o titânio.

Estudos como o de Sunarso *et al.* (2016) [62] descrevem melhora significativa da molhabilidade e da produção de fosfatase alcalina (ALP) após tratamento da superfície do titânio com ozônio na forma de gás, obtido por gerador, em alta concentração por 24 horas em fluxo contínuo. Além disso, observaram diminuição dos átomos de carbono e aumento de oxigênio. Este mesmo estudo avaliou a resposta de células de medula óssea de rato expostas à superfície do titânio tratado e relata aumento na diferenciação celular em osteoblastos.

Seguindo a mesma linha de pesquisa, Yuanyuan Yang *et al.* (2021) [63] trataram a superfície de discos de titânio com ozônio obtido por exposição à luz UV por 12 minutos. Após o tratamento, caracterizaram a superfície e analisaram a viabilidade celular após cultura com macrófagos e células mesenquimais indiferenciadas de medula óssea de rato. Por fim, com as mesmas células cultivadas, realizaram testes de PCR em tempo real para analisarem a expressão de genes relacionados à inflamação. Como resultado, em comparação com o titânio sem tratamento, relataram melhora na viabilidade celular, aumento da molhabilidade com a diminuição do ângulo de contato entre um líquido e a superfície tratada e menor expressão de genes relacionados à inflamação como o TNF- α e IL-6

Apesar de apresentarem resultados positivos, promissores e equivalentes, esses estudos apresentam uma heterogeneidade metodológica importante, como diferentes formas de obtenção do ozônio, gerador e luz UV, dosagem do ozônio (concentração) e tempo de tratamento, o que dificulta a comparação e a definição de um protocolo.

- **Características da Superfície do Titânio e a Modulação da Resposta Celular**

Estudos recentes têm investigado como diferentes modificações na superfície do titânio influenciam a expressão gênica de células em cultura, especialmente macrófagos e células-tronco mesenquimais (CTMs), com foco na resposta inflamatória e na osseointegração.

- a. Superfícies de Titânio Hidrofílicas e a Resposta de Macrófagos

A hidrofobicidade da superfície do titânio pode afetar significativamente a resposta inflamatória dos macrófagos. Um estudo demonstrou que superfícies de titânio hidrofílicas modulam a expressão de citocinas inflamatórias em macrófagos humanos, sugerindo uma resposta inflamatória atenuada que pode favorecer a osseointegração [64].

- b. Topografia da Superfície de Titânio e Expressão de Integrinas e Citocinas

A topografia da superfície do titânio influencia a expressão de integrinas e citocinas em macrófagos aderentes. Superfícies mais rugosas, como as tratadas com jateamento e modificação por fluoreto, mostraram uma redução na expressão de integrinas e na secreção de citocinas inflamatórias, como IL-1 β e IL-31, em comparação com superfícies mais lisas [65].

- c. Modificação da Superfície de Titânio com Peptídeo Antimicrobiano GL13K**

A funcionalização da superfície do titânio com o peptídeo antimicrobiano GL13K demonstrou promover a polarização de macrófagos para o fenótipo M2, associado a propriedades anti-inflamatórias. Além disso, houve uma redução na expressão de genes pró-inflamatórios, como TNF- α e IL-6, e um aumento na expressão de genes anti-inflamatórios, como IL-10 e TGF- β 3 [66].

d. Superfícies de Titânio Modificadas com Óxido de Grafeno

Superfícies de titânio modificadas com óxido de grafeno foram estudadas quanto à sua capacidade de influenciar a polarização de macrófagos e a diferenciação osteogênica de CTMs. Essas superfícies promoveram a polarização para o fenótipo M2 e aumentaram a expressão de genes osteogênicos, sugerindo um ambiente mais favorável à regeneração óssea [67].

e. Revisão Sistemática sobre Fenótipo de Macrófagos em Superfícies de Titânio

Zhang L *et al.* (2022) realizou uma revisão sistemática na qual analisou diversos estudos que investigaram o efeito das superfícies de titânio no fenótipo de macrófagos. A maioria dos estudos relatou que superfícies rugosas induzem uma resposta inflamatória mais pronunciada, enquanto modificações que aumentam a hidrofobicidade podem promover uma resposta anti-inflamatória, favorecendo a osseointegração [68].

Esses estudos destacam a importância das características da superfície do titânio na modulação da resposta celular, o que pode ter implicações significativas no design de implantes com melhor desempenho biológico.

- **Osseointegração e a Expressão Gênica**

- I. Genes relacionados à osteogênese e mineralização:

- RUNX2 (Runt-related transcription factor 2)**

Principal fator de transcrição que regula a diferenciação de células-tronco mesenquimais em osteoblastos. É essencial para a formação da matriz óssea e deposição de mineral [69].

SP7 (Osterix)

Gene downstream de RUNX2, fundamental para a maturação dos osteoblastos e mineralização óssea. Sua expressão está diretamente relacionada ao sucesso da osseointegração [70].

ALPL (Alkaline Phosphatase)

Enzima expressa por osteoblastos que desempenha papel central na mineralização da matriz extracelular, aumentando a deposição de fosfato [71].

COL1A1 (Collagen Type I Alpha 1 Chain)

Principal componente da matriz óssea orgânica, fundamental para o suporte estrutural e adesão celular durante a osseointegração [72].

BGLAP (Osteocalcin)

Proteína secretada por osteoblastos, associada à regulação da mineralização óssea e metabolismo ósseo. Indicador clássico de atividade osteoblástica [73].

BSP (Bone Sialoprotein)

Também conhecido como BSP ou sialoproteína óssea, é um marcador de diferenciação osteoblástica, ou seja, é um indicador de que uma célula está em processo de se tornar um osteoblasto (célula que forma o osso). A BSP é uma proteína da matriz óssea não colagênica, que desempenha um papel fundamental na mineralização óssea, especificamente na nucleação dos cristais de hidroxiapatita [74].

II. Genes relacionados à adesão celular e citosqueleto:

ITGB1 (Integrin Beta 1)

Receptor de superfície celular que medeia a adesão das células à matriz extracelular, facilitando a formação de focal adhesions sobre superfícies de implantes [75].

FAK (Focal Adhesion Kinase / PTK2)

Quinase envolvida na transdução de sinais mecânicos e químicos de adesão

celular, essencial para a resposta das células osteogênicas ao substrato implantado [76].

III. Genes relacionados à remodelação óssea:

RANKL (TNFSF11)

Ligante produzido por osteoblastos que promove a diferenciação e ativação de osteoclastos, regulando a remodelação óssea essencial para manutenção do implante [77].

OPG (TNFRSF11B)

Glicoproteína secretada que atua como um “decoy receptor” de RANKL, inibindo a osteoclastogênese e prevenindo a reabsorção óssea excessiva [78].

MMPs (Matrix Metalloproteinases)

Família de enzimas (ex.: MMP-2, MMP-9) que degradam componentes da matriz extracelular, facilitando a remodelação óssea e angiogênese durante a integração do implante [79].

IV. Genes relacionados à inflamação e resposta imune:

TNF- α (Tumor Necrosis Factor-alpha)

Citocina pró-inflamatória que participa do processo inflamatório inicial após a implantação, influenciando o recrutamento de células e remodelação óssea [80].

IL-1 β e IL-6 (Interleucinas 1 beta e 6)

Citocinas reguladoras da inflamação que participam do microambiente inicial do implante, podendo modular a diferenciação osteoblástica [81].

TCF-1 (TCF7)

Marcador de células T, especificamente um fator de transcrição que desempenha um papel crucial no desenvolvimento e função das células T. Ele é fundamental para a produção de células T de memória e para a resposta imune adaptativa. O fator de célula T 1 (Tcf1, codificado por *Tcf7*) é o principal fator de transcrição da via de sinalização Wnt canônica. A via de sinalização Wnt é evolutivamente conservada e regula uma variedade de processos fundamentais, como desenvolvimento, especificação do destino celular e

manutenção da homeostase do tecido. Em mamíferos, essa via compreende 19 ligantes Wnt e 15 receptores e correceptores Frizzled (Fzd) [82].

V. Genes relacionados à angiogênese:

VEGFA (Vascular Endothelial Growth Factor A)

Principal fator de crescimento angiogênico, essencial para o desenvolvimento de vasos sanguíneos ao redor do implante, garantindo suprimento nutricional e oxigenação [83].

ANGPT1 (Angiopoietin-1)

Molécula reguladora da estabilidade vascular, com papel coadjuvante na angiogênese e manutenção do leito vascular ao redor do implante [84].

Tabela 3. Genes Envolvidos na Osseointegração

Gene	Função Principal	Relevância para Osseointegração
RUNX2	Fator de transcrição essencial para a diferenciação osteoblástica.	Ativa genes relacionados à formação óssea; essencial para o início da osseointegração.
ALPL	Codifica a fosfatase alcalina, enzima fundamental na mineralização óssea.	Marca a atividade osteoblástica e a maturação da matriz óssea.
COL1A1	Codifica a cadeia alfa 1 do colágeno tipo I.	Principal componente da matriz extracelular óssea; promove adesão celular e deposição de matriz no implante.
SPP1 (Osteopontina)	Glicoproteína envolvida na adesão celular e remodelação óssea.	Facilita a ligação entre células e matriz; importante na formação do novo osso ao redor do implante.
BGLAP (Osteocalcina)	Proteína não colagênica sintetizada por osteoblastos.	Indicador da maturação osteoblástica e da mineralização óssea.
TNF- α	Citocina pró-inflamatória.	Modula a resposta inflamatória inicial, necessária para a cicatrização, mas o excesso pode comprometer a osseointegração.
IL-1 β	Citocina pró-inflamatória.	Recruta células do sistema imune e regula a remodelação óssea.

IL-6	Citocina envolvida na inflamação e diferenciação de osteoclastos.	Participa do equilíbrio entre formação e reabsorção óssea.
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular.	Promove a angiogênese, essencial para o suprimento sanguíneo e sucesso da osseointegração.
BMP-2	Proteína morfogenética óssea.	Induz a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos; promove a formação de novo osso ao redor do implante.
ITGB1	Integrina beta 1.	Media a adesão célula-matriz, facilitando o ancoramento de células osteoblásticas na superfície do implante.
SP7 (Osterix)	Fator de transcrição downstream de RUNX2.	Essencial para a maturação final de osteoblastos e deposição óssea.
BSP (Bone Sialoprotein)	Marcador de diferenciação osteoblástica	Indicador de diferenciação celular em osteoblasto. É uma proteína da matriz óssea não colagênica, que desempenha um papel fundamental na mineralização óssea
OPG (TNFRSF11B)	Decoy receptor de RANKL	Inibi a osteoclastogênese e previne a reabsorção óssea excessiva
TCF-1 (TCF7)	Marcador de células T	É fundamental para a produção de células T de memória e para a resposta imune adaptativa

Diante desse cenário, ainda não há um protocolo universalmente estabelecido que possa ser considerado ideal para o tratamento de superfície do titânio e de suas ligas. Embora a literatura científica apresente uma ampla variedade de métodos e resultados, é recorrente a menção à necessidade de estudos adicionais e da adaptação dos tratamentos conforme a região anatômica de aplicação dos implantes ou próteses.

No que diz respeito ao ozônio, foco do presente estudo, apesar de já se reconhecerem suas propriedades oxidativas e sua eficácia na remoção de contaminantes orgânicos, como átomos de carbono, promovendo superfícies mais limpas e reativas, ainda há uma lacuna significativa quanto à padronização do seu uso. Diversas variáveis, como forma de aplicação, concentração e tempo de exposição, permanecem sem consenso, o que dificulta a formulação de um protocolo clínico validado.

A incorporação de experimentos *in vitro*, incluindo análises de viabilidade celular e expressão gênica, tem contribuído substancialmente para o aprofundamento da

compreensão dos efeitos biológicos induzidos pelos tratamentos de superfície. Essas abordagens permitem identificar, com maior precisão, como esses tratamentos modulam a resposta celular e influenciam os estágios iniciais da osseointegração.

Entretanto, ao mesmo tempo em que essas análises trazem respostas, também levantam novas questões e desafios. Isso reforça a importância de explorar os mecanismos moleculares e os genes envolvidos nos processos de adesão celular, diferenciação osteoblástica e formação da matriz extracelular. A compreensão aprofundada desses eventos é essencial para o desenvolvimento de estratégias de modificação de superfície mais eficazes, a definição de protocolos clínicos padronizados e, por fim, a maximização do potencial do titânio como biomaterial para aplicações odontológicas e ortopédicas.

1.3 OBJETIVOS E HIPÓTESES

1.3.1 Geral:

Analisar os efeitos do ozônio como tratamento da superfície do titânio nas propriedades osteocondutoras.

1.3.2 Específicos:

- i. Avaliar a influência do tratamento da superfície do titânio com ozônio gasoso sobre a topografia e rugosidade da superfície.
- ii. Avaliar a influência do tratamento da superfície do titânio com ozônio gasoso sobre a energia de superfície, ângulo de contato e molhabilidade da superfície.
- iii. Avaliar a influência do tratamento da superfície do titânio com ozônio gasoso sobre composição química da superfície.
- iv. Avaliar a influência do tratamento da superfície do titânio com ozônio gasoso sobre o crescimento, diferenciação e morfologia das células osteoblásticas.
- v. Avaliar a influência do tratamento da superfície do titânio com ozônio gasoso sobre crescimento ósseo, atividade de fosfatase

alcalina e osseointegração.

- vi. Avaliar a influência do tratamento da superfície do titânio com ozônio gasoso sobre a expressão e supressão gênica.

1.3.3 Hipótese Alternativa (H1)

- i. O tratamento da superfície do titânio com ozônio gasoso melhora as suas propriedades osteocondutoras, físico-químicas e biológicas, favorecendo a adesão, diferenciação e atividade osteoblástica.

1.3.4 Hipóteses Nulas (H0)

- 1.3.4.1 Não existem diferenças significativas entre o titânio tratado e não tratado com ozônio gasoso quanto às propriedades osteocondutoras, físico-químicas e biológicas avaliadas.
- 1.3.4.2 O tratamento da superfície do titânio com ozônio gasoso piora as propriedades osteocondutoras, físico-químicas e biológicas avaliadas.

1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Navarro M, Michiardi A, Castan˜o O, Planell JA. Biomaterials in orthopaedics. J R Soc Interface. 2008; 5:1137–58.
2. Schwartz Z, Kieswetter K, Dean DD, Boyan BD. Underlying mechanisms at the bone-surface interface during regeneration. J Periodontal Res. 1997;32:166–71.
3. Leventhal GS. Titanium, a metal for surgery. J Bone Joint Surg Am. 1951;33(2):473–4.

4. Puleo DA, Nanci A. Understanding and controlling the bone–implant interface. *Biomaterials*. 1999; 20:2311–21.
5. Ostberg AK, Dahlgren U, Sul YT, Johansson CB. Inflammatory cytokine release is affected by surface morphology and chemistry of titanium implants. *J Mater Sci Mater Med*. 2015; 26:155–63.
6. Aita H, Hori N, Takeuchi M, Suzuki T, Yamada M, Anpo M, et al. The effect of ultraviolet functionalization of titanium on integration with bone. *Biomaterials*. 2009;30(6):1015–25.
7. Lumetti S, Manfredi E, Ferraris S, Spriano S, Passeri G, Ghiacci G, Macaluso G, Galli C. The response of osteoblastic MC3T3-E1 cells to micro- and nano-textured, hydrophilic and bioactive titanium surfaces. *J Mater Sci Mater Med*. 2016; 27:68-76.
8. Takemoto M, Fujibayashi S, Neo M, Suzuki J, Kokubo T, Nakamura T. Mechanical properties and osteoconductivity of porous bioactive titanium. *Biomaterials*. 2005;26(30):6014–23.
9. Tsukimura N, Yamada M, Iwasa F, Minamikawa H, Att W, Ueno T, et al. Synergistic effects of UV photofunctionalization and micro-nano hybrid topography on the biological properties of titanium. *Biomaterials*. 2011;32(19):4358–68.
10. Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, Rupp F, Geis-Gerstorf J, Cochran DL, et al. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J Biomed Mater Res A*. 2005;74(1):49–58.
11. Bocci V, Borrelli E, Travagli V, Zanardi I. The ozone paradox: Ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. *Med. Res. Rev.* 2009 Jul;29(4):646– 682.
12. Wennerberg A, Bougas K, Jimbo R, Albrektsson T. Implant coatings: new modalities for increased osseointegration. *Am J Dent* 2013; 26(2): 105-12.
13. Lee JH, Ogawa T. The biological aging of titanium implants. *Implant Dent* 2012; 21(5): 415-21, 2012.
14. Buser, D. et al. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *Journal of biomedical materials research*, v. 25, n. 7, p. 889-902, 1991.
15. Tsukimura N, Yamada M, Iwasa F, Minamikawa H, Att W, Ueno T, et al. Synergistic effects of UV photofunctionalization and micro-nano hybrid topography on the biological properties of titanium. *Biomaterials*. 2011;32(19):4358–68.

16. Stübinger S, Sader R, Filippi A (2006) The use of ozone in dentistry and maxillofacial surgery: a review. *Quintessence Int* 37:353–359.
17. Raghavendra S, Wood MC, Taylor TD. Early wound healing around endosseous implants: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005;20(3):425–31.
18. Bränemark, PI, Breine U, Lindström, J. et al. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1969; 3: 81-100.
19. Zanivan DS, Elias CN, Daróz SR. Análise da superfície de fratura de implante osseointegrado e mecanismos envolvidos na cicatrização. *Revista ImplantNews* 2009; 6(1):39-46.
20. Javed F et al. Implant Surface Morphology and Primary Stability: Is There a Connection? *Implant Dentistry* 2011; 20(1):40-46.
21. Brentel AS et al. Histomorphometric analysis of pure titanium implants with porous surface versus rough surface. *J Appl Oral Sci* 2006; 14(3):213-218.
22. Wennerberg A, Albrektsson T. Suggested guidelines for the topographic evaluation of implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000; 15:331-334.
23. Thomas, T. R. Characterization of surface roughness. *Precision Engineering*, v. 3, n. 2, p. 97-104, 1981.
24. Schroeder, André et al. The reactions of bone, connective tissue, and epithelium to endosteal implants with titanium-sprayed surfaces. *Journal of Maxillofacial Surgery*, v. 9, p. 15-25, 1981.
25. Maniatopoulos, C.; pilliar, R. M.; smith, D. C. Threaded versus porous-surfaced designs for implant stabilization in bone-endodontic implant model. *Journal of biomedical materials research*, v. 20, n. 9, p. 1309-1333, 1986.

26. Wennerberg, A.; Albrektsson, T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clinical oral implants research*, v. 20, n. s4, p. 172-184, 2009.
27. Wennerberg, A.; albrektsson, T. Implant surfaces beyond micron roughness: Experimental and clinical knowledge of surface topography and surface chemistry. *Inter Dent SA*, v. 8, p. 14-8, 2006.
28. Lang NP et al. Early osseointegration to hydrophilic and hydrophobic implant surfaces in humans. *Clin. Oral Impl. Res* 2011; 22:349–356.
29. Novaes Jr AB et al. Influence of implant surfaces on osseointegration. *Braz Dent J* 2010; 21(6):471-481.
30. Barros RRM et al. Biofunctionalized implant surface. *Braz Dent J* 2009; 20(2):91-8.
31. Buser, D. et al. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *Journal of dental research*, v. 83, n. 7, p. 529-533, 2004.
32. Wennerberg, A.; albrektsson, T.; Lausamaa, J. Torque and histophometric evaluation of c.p. titanium screws blasted with 25 and 75 um sized particle of AL2O3. *J. Biomedical Mat. Res*, v.30 p.251-260, 1996.
33. Maluf, P. S. Z. et al. Vantagens do tratamento de superfície a laser em implantes dentais osseointegráveis; Advantages of laser surface treatment in osseointegrated dental implants. *ImplantNews*, v. 4, n. 06, p. 643-646, 2007.
34. Carlsson, L. V.; Alberktsson, T.; Berman, C. Bone response to plasma-cleaned titanium implants. *The International journal of oral & maxillofacial implants*, v. 4, n. 3, p. 199, 1989.
35. Feighan, J. E. et al. The influence of surface-blasting on the incorporation of titanium-alloy implants in a rabbit intramedullary model. *Journal of bone and joint surgery. American volume*, v. 77, n. 9, p. 1380-1395, 1995.
36. Mustafa, K. et al. Attachment and proliferation of human oral fibroblasts to titanium surfaces blasted with TiO2 particles. A scanning electron microscopic and histomorphometric

analysis. Clinical oral implants research, v. 9, n. 3, p. 195-207, 1998.

37. Ivanoff, C. et al. Histologic evaluation of the bone integration of TiO₂ blasted and turned titanium microimplants in humans. Clinical oral implants research, v. 12, n. 2, p. 128-134, 2001.
38. Babbush, C. A.; Kent, J. N.; Misiek, D.J. Titanium plasma-sprayed (TPS) screw implants for the reconstruction of the edentulous mandible. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, v. 44, n. 4, p. 274-282, 1986.
39. De Groot, K. et al. Plasma sprayed coatings of hydroxylapatite. Journal of biomedical materials research, v. 21, n. 12, p. 1375-1381, 1987.
40. Dohan Ehrenfest, D. M. et al. Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography. Trends in biotechnology, v. 28, n. 4, p. 198-206, 2010.
41. Bocci VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. Riv. Ital. di Ossigeno-Ozonoterapia. 2006;5(2):93–104.
42. Bocci V, Zanardia I, Valacchi G, Borrelli E, Travagli V. Validity of Oxygen-Ozone Therapy as Integrated Medication Form in Chronic Inflammatory Diseases. Cardiovasc. Hematol. Disord. Targets. 2015 Dec 14;15(2):127–138.
43. Linderback P, Harmankaya N, Askendal A, Areva S, Lausmaa J, Tengvall P. The effect of heat- or ultraviolet ozone-treatment of titanium on complement deposition from human blood plasma. Biomaterials 2010; 31:4795–801.
44. de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB, Garlet GP, Freitas de Souza R, Taba M, et al. Antimicrobial Photodynamic Therapy in the Non-Surgical Treatment of Aggressive Periodontitis: Cytokine Profile in Gingival Crevicular Fluid, Preliminary Results. J. Periodontol. 2009;80(1):98–105.
45. Nogales CG, Ferreira MB, Montemor AF, Rodrigues MF de A, Lage-Marques JL, Antoniazzi JH. Ozone therapy as an adjuvant for endodontic protocols: Microbiological – Ex vivo study and cytotoxicity analyses. J. Appl. Oral Sci. 2016;24(6):607–613.
46. Glória JCR, Douglas-De-Oliveira DW, E Silva LDA, Falci SGM, Dos Santos CRR. Influence of ozonized water on pain, oedema, and trismus during impacted third molar surgery: A randomized, triple blind clinical trial. BMC Oral Health. 2020;20(1):1–9.

47. Patel PV, Kumar S, Vidya GD, Patel A, Holmes JC, Kumar V. Cytological assessment of healing palatal donor site wounds and grafted gingival wounds after application of ozonated oil: An eighteen-month randomized controlled clinical trial. *Acta Cytol.* 2012;56(3):277–284.
48. Patel PV, Kumar V, Kumar S, Gd V, Patel A. Therapeutic effect of topical ozonated oil on the epithelial healing of palatal wound sites: a planimetric and cytological study. *J. Investig. Clin. Dent.* 2011 Nov;2(4):248–258.
49. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *PLoS Med.* [Internet]. 2009 Jul 21 [cited 2020 May 13];6(7): e1000097. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.1000097>.
50. Ouzzani M, Hammady H, Fedorowicz Z, Elmagarmid A. Rayyan-a web and mobile app for systematic reviews. *Syst. Rev.* 2016 Dec 5;5(1).
51. Tu MG, Chen YW, Shie MY. Macrophage-mediated osteogenesis activation in co-culture with osteoblast on calcium silicate cement. *J Mater Sci Mater Med.* 2015; 26:276–85.
52. Ostberg AK, Dahlgren U, Sul YT, Johansson CB. Inflammatory cytokine release is affected by surface morphology and chemistry of titanium implants. *J Mater Sci Mater Med.* 2015; 26:155–63.
53. Silva, R. C. R. Alteração da molhabilidade de superfícies internas de tubulações utilizadas no transporte de óleos pesados via core-flow. 2003. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Petróleo) – Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia de Petróleo, Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Petróleo, Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP.
54. Santos, R. G., Avaliação da molhabilidade de superfícies de oleodutos através de medidas de ângulo de contato: Efeito de asfaltenos e de ácidos naftênicos. 2003. 105f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia de Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP.
55. Cardoso, C.C., et al. Azione Del'Olio ozonizzato (Bioperoxoil) nelle lesione chirurgiche dei modelli pre-clinic. *Lesiones Quirurgicas.* 2016. p. 1-11.

56. Borges, G.A., et al. In vitro evaluation of wound healing and antimicrobial potential of ozone therapy. J. of cranio-maxillo-facial surg. v.45 p.364-370. 2017.
57. Sarkis-Onofre et al. Análise da qualidade metodológica dos estudos *in vitro*. 2014.
58. Hooijmans et al. Análise do risco de viés dos estudos *in vivo* (em animais) – SYRCLE RoB tool, 2014.
59. Fitzpatrick, Jason (2009). Mendeley Manages Your Documents on Your Desktop and in the Cloud. 2009.
60. Khan SN, et al. The biology of bone grafting. J Am Acad Orthop Surg. 13(1):77-86 2005.
61. De Carvalho, D.R., et. al. Characterization and *In Vitro* Cytocompatibility of an Acid-Etched Titanium Surface. Braz Dent J (2010) 21.
62. Sunarso et al, A superhydrophilic titanium implant functionalized by ozone gas modulates bone marrow cell and macrophage responses. J Mater Sci: Mater Med. 27:127 2016.
63. Yuanyuan Yang et al, UV/ozone irradiation manipulates immune response for antibacterial activity and bone regeneration on titanium. Materials Science & Engineering C. 129 (2021) 112377.
64. Hotchkiss KM, Reddy GB, Hyzy SL, Schwartz Z, Boyan BD, Olivares-Navarrete R. Titanium surface characteristics, including topography and wettability, alter macrophage activation. Acta Biomater. 2016; 31:425-434.
65. Figueiredo PM, Reimão J, Fernandes MH, Rocha LA, Carvalho S. Macrophage response to titanium implants with different surface topographies—An in vitro study. J Funct Biomater. 2023;14(4):211.
66. Gao J, Lv Z, Deng K, Chen W, Li Y, Cui Y, et al. Functionalization of titanium with antimicrobial peptide GL13K promotes M2 macrophage polarization and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. Biomed Res Int. 2020; 2020:2327034.
67. Zhang W, Liu X, Li D, Sun H, Li Y, Zhang X, et al. Graphene oxide-modified titanium surfaces promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells via PI3K/Akt/GSK-3 β / β -catenin signaling pathway. RSC Adv. 2020;10(4):1905-1916.

68. Zhang L, Zhang Y, Han B, Yang K, Kong D, He Y. Effect of titanium implant surface on macrophage polarization and osseointegration: A systematic review. *J Orthop Surg Res.* 2022;17(1):504.
69. Komori T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by Runx2. *Cell Tissue Res.* 2010;339(1):189-95.
70. Nakashima K, de Crombrughe B. Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *Trends Genet.* 2003;19(8):458-66.
71. Whyte MP. Physiological role of alkaline phosphatase explored in hypophosphatasia. *Ann N Y Acad Sci.* 2010; 1192:190-200.
72. Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(1):a004978.
73. Lee NK et al. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell.* 2007;130(3):456-69.
74. Soares, MSM. Marcadores da diferenciação osteoblástica em cultura de células crescidas sobre titânio e expostas a coquetel de fatores de crescimento e proteínas. Ribeirão Preto – SP, 2016. Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP.
75. Geiger B, Bershadsky A. Exploring the neighborhood: adhesion-coupled cell mechanosensors. *Cell.* 2002;110(2):139-42.
76. Zhao X et al. FAK signaling promotes osteoblast progenitor cell proliferation and differentiation. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021; 12:626113.
77. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003;423(6937):337-42.
78. Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med.* 2001;79(5-6):243-53.

79. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001; 17:463-516.
80. Kondo H et al. Role of TNF- α in bone resorption induced by mechanical unloading. *J Bone Miner Res.* 2005;20(5):878-85.
81. Gilbert L et al. Inhibition of osteoblast differentiation by inflammatory cytokines. *J Clin Invest.* 2000;106(4):505-12.
82. Escobar G, Mangani D, Anderson AC. T cell factor 1: A master regulator of the T cell response in disease. *Sci Immunol.* 2020 Nov 6;5(53).
83. Street J et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(15):9656-61.
84. Thurston G. Complementary actions of VEGF and Angiopoietin-1 on blood vessel growth and leakage. *J Anat.* 2002;200(6):575-80.
85. Campos KS. Modificação química de superfícies cerâmicas contendo carbono via deposição de filmes SOL-GEL de SiO₂ com nanopartículas de Cu-Sn-Ti. Belo Horizonte - MG, 2015. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas, Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG.
86. Rodgers, J. L., & Nicewander, W. A. (1988). *Thirteen ways to look at the correlation coefficient*. **The American Statistician**, 42(1), 59–66.
87. Manders, E. M., Verbeek, F. J., & Aten, J. A. (1993). *Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images*. **Journal of Microscopy**, 169(3), 375–382.
88. Aita H, Hori N, Takeuchi M, et al. The effect of ultraviolet functionalization of titanium on integration with bone. *Biomaterials.* 2009;30(6):1015–25.
89. Lumetti S, Manfredi E, Ferraris S, et al. The response of osteoblastic MC3T3-E1 cells to micro- and nano-textured, hydrophilic and bioactive titanium surfaces. *J Mater Sci Mater Med.* 2016;27:68–76.

90. Tsukimura N, Yamada M, Iwasa F, et al. Synergistic effects of UV photofunctionalization and micro-nano hybrid topography on the biological properties of titanium. *Biomaterials*. 2011;32(19):4358–68.
91. Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, et al. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J Biomed Mater Res A*. 2005;74(1):49–58.
92. Donachie MJ. *Titanium: A Technical Guide*. 2nd ed. Materials Park, OH: ASM International; 2000.
93. Geetha M, Singh AK, Asokamani R, Gogia AK. Titanium and its alloys for biomedical applications. *Prog Mater Sci*. 2009;54(3):397–425.
94. Long M, Rack HJ. Titanium alloys in total joint replacement—a materials science perspective. *Biomaterials*. 1998;19(18):1621–39.
95. Elias CN, Lima JHC, Valiev R, Meyers MA. Biomedical applications of titanium and its alloys. *JOM*. 2008;60(3):46–49.
96. ASTM F67-13. *Standard Specification for Unalloyed Titanium for Surgical Implant Applications (Grades 1–4)*. ASTM International; 2013.
97. ASTM F136-13. *Standard Specification for Wrought Titanium-6Aluminum-4Vanadium ELI Alloy for Surgical Implant Applications*. ASTM International; 2013.
98. Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater*. 2007;23(7):844–854.
99. Buser D, Sennerby L, De Bruyn H. Modern implant dentistry based on osseointegration: 50 years of progress. *Quintessence Int*. 2017;48(4):269–282.
100. Cochran DL, Schenk RK, Lussi A, Higginbottom FL, Buser D. Bone response to titanium implant surfaces with different surface characteristics. *J Biomed Mater Res A*. 2013;102(7):2264–2271.
101. Albrektsson T, Wennerberg A. On osseointegration in relation to implant surfaces. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2019;21(S1):4–7.

CAPÍTULO 2: EFEITOS DO OZÔNIO NAS PROPRIEDADES OSTEOCONDUTORAS DA SUPERFÍCIE DO TITÂNIO: REVISÃO SISTEMÁTICA

RESUMO

Materiais biomédicos metálicos têm sido fundamentais em aplicações médicas e odontológicas por décadas, graças à sua resistência mecânica e biocompatibilidade. Dentre esses materiais, o titânio e suas ligas se destacam pelo potencial superior de osseointegração, facilitando interações estáveis entre osso e implante. No entanto, a otimização das características de superfície — especificamente rugosidade, composição química e hidrofobicidade — permanece foco crítico de pesquisa. O ozônio emergiu como modificador promissor de superfície, capaz de oxidar contaminantes orgânicos e aumentar a energia superficial. Esta revisão sistemática avalia evidências pré-clínicas sobre tratamentos de superfície com ozônio (gasoso, aquoso, óleo) em titânio comercialmente puro e suas ligas, comparando espécimes tratados e não tratados. A qualidade metodológica foi avaliada com instrumentos adaptados para estudos *in vitro* (Sarkis-Onofre et al., 2014) e *in vivo* (SYRCLE RoB, Hooijmans et al., 2014). Os resultados revelam melhorias consistentes na molhabilidade, redução de contaminação por carbono e respostas osteoblásticas aprimoradas em nove estudos *in vitro* e dois estudos *in vivo*. Apesar da heterogeneidade de protocolos, o tratamento com ozônio aumenta de forma confiável as propriedades físico-químicas que sustentam a osteocondução. Protocolos padronizados e ensaios randomizados de alta qualidade são necessários para viabilizar a tradução clínica.

Palavras – Chave: Ozônio, Titânio, Molhabilidade, Rugosidade, Energia de Superfície, Composição Química.

ABSTRACT

Metallic biomaterials have been foundational in medical and dental applications for decades due to their mechanical strength and biocompatibility. Among these materials, titanium and its alloys stand out for their superior osseointegration potential, facilitating stable bone–implant interactions. However, optimizing surface characteristics—specifically roughness, chemical composition, and hydrophilicity—remains a critical research focus. Ozone has emerged as a promising surface modifier, capable of oxidizing organic contaminants and enhancing surface energy. This systematic review evaluates preclinical evidence on ozone-based surface treatments (gas, aqueous, oil) of commercially pure titanium and its alloys, comparing treated versus untreated specimens. Methodological rigor was assessed using adapted tools for *in vitro* (Sarkis-Onofre et al., 2014) and *in vivo* (SYRCLE RoB, Hooijmans et al., 2014) studies. Results reveal consistent improvements in wettability, reduction of carbon contamination, and enhanced osteoblastic responses across nine *in vitro* and two *in vivo* studies. Despite protocol heterogeneity, ozone treatment reliably augments physicochemical properties that underpin osteoconduction. Standardized protocols and high-quality randomized designs are warranted to facilitate clinical translation.

Keywords: Ozone; Titanium; Wettability; Roughness; Surface Energy; Chemical Composition.

2.1 INTRODUÇÃO

O titânio e suas ligas são materiais de referência para dispositivos implantáveis, oferecendo combinação única de alta relação resistência-peso, resistência à corrosão e biocompatibilidade. O processo de osseointegração — conexão estrutural e funcional direta entre o osso vivo e a superfície do implante — é criticamente influenciado pela topografia, química e molhabilidade da superfície. Texturas micro e nano-escala rugosas aumentam o entrelaçamento mecânico e a adsorção de proteínas, facilitando adesão e proliferação osteoblástica [1–8]. Paralelamente, alta energia superficial e hidrofília promovem trocas fluidas e interações célula-material, acelerando a cicatrização óssea [9–11]. Embora tratamentos estabelecidos, como aplainamento ácido, jateamento, revestimento por plasma e fotoativação UV, demonstrem eficácia [12–15], otimizar combinações de modificações químico-físicas permanece desafio.

O ozônio — molécula triatômica de oxigênio com forte capacidade oxidante — ganhou atenção por remover contaminantes orgânicos, aumentar o conteúdo de titânio óxido e gerar superfícies superhidrofílicas [16–18]. O ozônio pode ser aplicado como gás (descarga por corona ou gerado por UV), solução aquosa (água ozonizada) ou suspensão oleosa (ozonídeos), cada modalidade com cinéticas e estabilidade distintas [19,20]. Estudos pré-clínicos sugerem que o tratamento com ozônio melhora a molhabilidade e reduz resíduos carbonáceos, promovendo diferenciação osteoblástica e contato osso-implante aprimorado [21–23]. Contudo, variabilidade em concentração de ozônio, duração de exposição e veículo de entrega tem dificultado padronização de protocolos e sínteses meta-analíticas.

Esta revisão sistemática sintetiza evidências de estudos *in vitro* e *in vivo* para elucidar os efeitos do tratamento superficial com ozônio nas propriedades osteocondutivas do titânio.

2.2 METODOLOGIA

2.2.1 Modelo do Estudo, Protocolo e Registro

Esta revisão sistemática foi conduzida em conformidade com as diretrizes e checklist do Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) [49]. O protocolo foi registrado no Open Science Framework (OSF) em <https://osf.io/28kdv/> em 22 de outubro de 2020, tendo sido revisado e editado em novembro de 2023 e maio de 2025. No momento da submissão do protocolo, não foram identificados estudos similares na literatura. Para a definição do modelo do estudo e formulação da **pergunta de pesquisa** foi utilizada a estratégia PICOS: **P – População:** Titânio e células osteoblásticas, **I – Intervenção:** Tratamento com ozônio, **C – Comparação:** Superfícies sem tratamento, **O – Outcomes / Desfechos:** Propriedades físico-químicas e osteocondutoras, **S – Study Design / Tipo de estudo:** *In vitro* / *In vivo*.

2.2.2 Critérios de Elegibilidade

Os estudos incluídos foram investigações laboratoriais (*in vitro* e *in vivo*) que avaliaram titânio comercialmente puro ou suas ligas tratados com ozônio, em comparação a controles não tratados ou submetidos a tratamentos alternativos. Os desfechos de interesse englobaram topografia de superfície, composição química, molhabilidade, respostas celulares e integração biomecânica. Excluíram-se desenhos não laboratoriais, substratos que não fossem titânio ou suas ligas e estudos sem desfechos relacionados à propriedades osteocondutoras.

2.2.3 Informações Sobre a Busca na Literatura

Os estudos foram identificados por meio de buscas eletrônicas nas bases PubMed (MEDLINE), Cochrane Library, LILACS (BVS), Web of Science, Scopus, Gene, Embase e Livivo, bem como na literatura cinzenta (isto é, trabalhos não publicados em periódicos científicos indexados) e em buscas manuais nas listas de referências dos artigos incluídos. A pesquisa de artigos foi realizada em agosto de 2020 e atualizada em novembro de 2024. Nenhuma fonte de financiamento foi utilizada nesta revisão sistemática.

2.2.4 Dados da Estratégia de Busca

As seguintes palavras-chave foram utilizadas na construção da estratégia de busca: ("titanium nickelide" OR "hydroxyapatite-titanium alloy" OR "titanium alloy" OR "TiNb13Zr13" OR "TiAl6V4" OR "titanium-niobium alloy" OR "titanium aluminum alloy" OR "titanium molybdenum alloy" OR "titanium-niobium-aluminum alloy" OR "titanium-vanadium-cobalt alloy" OR "titanium-nickel-cobalt alloy" OR "hydroxyapatite-glass-titanium composite" OR "Titanium") OR ("Ozone" OR "ozonated water" OR "ozonated oil" OR "ozonized water" OR "ozonized oil" OR "ozone gas" OR "Aqueous Ozone" OR "Gaseous Ozone").

2.2.5 Seleção dos Estudos

Dois revisores independentes realizaram as buscas em bases de dados, em literatura adicional e manualmente. Inicialmente, as referências obtidas nas buscas eletrônicas foram importadas para o gerenciador de referências Mendeley [59], onde os estudos duplicados foram identificados e removidos pelo coordenador da pesquisa. O aplicativo Rayyan QCRI [50] foi utilizado para organizar as duas etapas de seleção e inclusão dos estudos na revisão sistemática. Na primeira etapa, os títulos e resumos dos artigos identificados foram avaliados de forma independente e cega por ambos os revisores, de acordo com os critérios de inclusão. Os artigos selecionados para a segunda etapa foram lidos na íntegra pelos mesmos dois revisores independentes, sendo excluídos aqueles que não atendiam aos critérios de inclusão. Eventuais discordâncias entre os revisores foram resolvidas por consenso, com o auxílio de um terceiro revisor e do coordenador.

2.2.6 Extração dos Dados e Relatórios

Os dois revisores extraíram independentemente os dados dos estudos incluídos. Conflitos foram resolvidos com o auxílio do terceiro revisor e do coordenador.

Os dados extraídos de cada estudo laboratorial *in vitro* incluíram: (1) autor, ano e país; (2) tamanho da amostra e grupos; (3) tipo de amostra; (4) tratamento com ozônio utilizado (formulação, concentração, veículo); (5) grupo controle ou de comparação; (6) metodologia; (7) resultados obtidos; (8) conclusões.

Os dados extraídos de cada estudo laboratorial *in vivo* incluíram: (1) autor, ano e país; (2) modelo animal utilizado; (3) tamanho da amostra; (4) tratamento com ozônio utilizado (formulação, concentração, veículo); (5) grupo controle ou de comparação; (6) metodologia; (7) resultados obtidos; (8) conclusões.

As diretrizes PRISMA GUIDELINES [49] foram empregadas como ferramenta para descrição e relato dos dados.

2.2.7 Análise da Qualidade Metodológica e Risco de Viés

A qualidade metodológica dos estudos *in vitro* foi avaliada utilizando um instrumento adaptado de Sarkis-Onofre et al. (2014) [57], e a análise de risco de viés dos estudos *in vivo* (animais) empregou a ferramenta SYRCLE RoB (Hooijmans et al., 2014) [58]. Os autores JHGSF e SBM avaliaram cada domínio de forma independente. Eventuais discordâncias foram resolvidas por consenso.

Tais instrumentos contemplam, respectivamente, sete e dez domínios, a saber:

2.2.7.1 Análise da Qualidade Metodológica de Estudos *In Vitro*

Adaptado de Sarkis-Onofre et al., 2014 [57].

1. Descrição do cálculo do tamanho da amostra;
2. Descrição detalhada da produção das amostras;
3. Randomização das amostras;
4. Uso de amostras idênticas para cada grupo (antes de qualquer tratamento);
5. Descrição detalhada do tratamento aplicado;
6. Padronização na aplicação do tratamento;
7. Cegamento na análise dos resultados.

2.2.7.2 Análise da Qualidade Metodológica de Estudos *In Vivo*

Ferramenta SYRCLE RoB, Hooijmans et al., 2014 [58]. Para esta análise, a marcação de “não” em um único domínio é suficiente para classificar o estudo como de “alto risco de viés”, e a marcação de “incerto” em um único domínio é suficiente para classificar o risco de viés como incerto.

1. Geração e Aplicação de Sequência de Alocação;
2. Grupos semelhantes na linha de base ou ajuste para fatores de confusão;
3. Ocultação da alocação;
4. Alojamento aleatório dos animais;
5. Cegamento de cuidadores/investigadores;
6. Seleção aleatória para avaliação dos desfechos;
7. Cegamento do avaliador dos desfechos;
8. Tratamento adequado de dados de desfecho incompletos;
9. Ausência de relato seletivo de desfechos;
10. Ausência de outros vieses.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Seleção dos Artigos

Inicialmente, 2.825 registros foram identificados; após remoção de duplicatas, 1.691 permaneceram. Pelo título/resumo, 1.680 foram excluídos e 11 textos completos avaliados, resultando em nove estudos *in vitro* e dois *in vivo*, elegíveis (Figura 1).

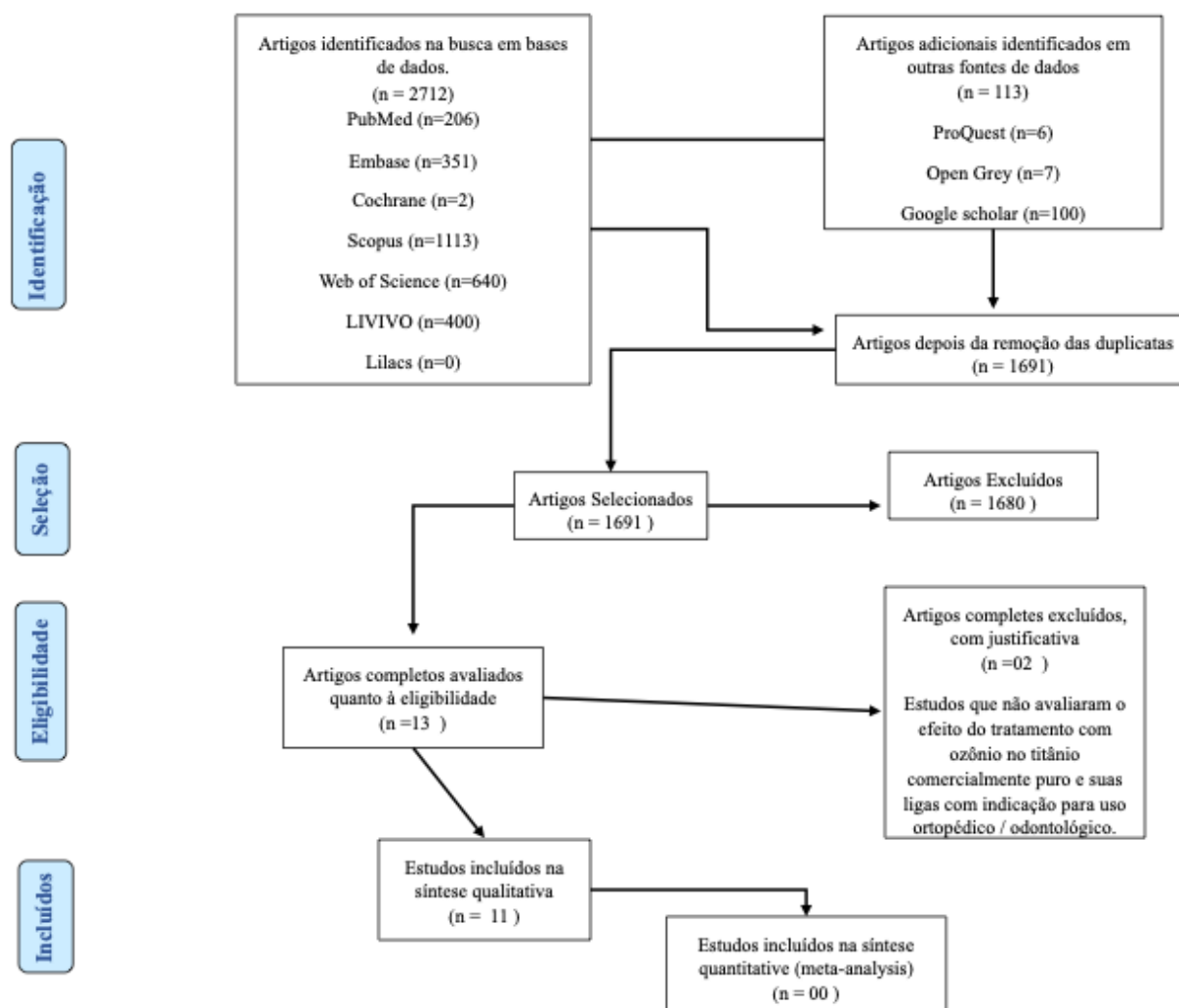


Figura 1 - Diagrama de fluxo ilustrando a busca na literatura e os critérios de seleção dos estudos (PRISMA guidelines).

2.3.2 Características dos Artigos

Os estudos *in vitro* empregaram análises de superfície (MEV, XPS, ângulo de contato, perfilometria) e ensaios celulares (adesão, proliferação e atividade de fosfatase alcalina – ALP). Os estudos *in vivo* utilizaram modelos de tíbia de roedores com RT-qPCR, histomorfometria e testes de torque de remoção (Tabelas 1 e 2).

Table 1. Resumo descritivo das características dos estudos *in vitro* incluídos (n = 9)

Author (Year)	Country	Sample Size & Specimen	Ozone Treatment	Control	Methods	Main Conclusions
1.Harmanka et al. (2012)	SE/JP	176 specimens (4×44), Ti screws	UVO (253.7/184.9 nm) for 96 h	Untreated Ti	SEM, XPS, profilometry	↑ Wettability; ↓ C; ↑ O; no topography change
2.Hauser-Gerspach et al. (2011)	CH	≥64 specimens, Ti/Zr disks Ø5 mm	O ₃ 140 ppm, 2 L/min for 6–24 s	Chlorhexidine (2%, 30 s) or no treatment	Microbial culture; MG-63 proliferation; SEM	Eliminated P. gingivalis; no cytotoxicity; no surface change
3.Kłonica et al. (2019)	PL	4 specimens, Ti6Al4V sheets	O ₃ 50 g/m ³ , flow 0.9 dm ³ /min for 10–45 min	Machined only	SEM, XPS, profilometry, contact angle	↑ O ions; ↓ C; ↑ wettability; tunable micro-topography
4.Krozer et al. (1999)	SE	48 specimens (3×16), Ti screws/studs	UVO for 15 min	Reference XPS standards	XPS	↑ Surface energy & wettability; ↓ C (45→15 at%)
5.Linderbäck et al. (2010)	SE	100 wafers, SiO ₂	UVO 72–92 h; annealing at 300–500°C	No treatment	XPS, XRD, FT-IR, contact angle microscopy	Superhydrophilicity (CA < 3°)
6.Xingling et al. (2016)	CN/JP/MY	20 specimens (4×5), CpTi disks	O ₃ aqueous (0.05 MPa, 2 L/min) for 24 h	Dry-heat at 100/120°C	SEM, XPS, contact angle, hardness	↑ Roughness; ↑ osteoblast activity; ↑ differentiation

7.Toita et al. (2020)	JP/ID	2 groups, acid- etched Ti discs	O ₃ gas (2 nL/min) for 24 h	Acid- etched only	SEM, XPS, contact angle, ALP, microscopy	Superhydrophili c; ↑ MSC proliferation & ALP; similar roughness
8.Toita et al. (2016)	JP	5 groups, Ti discs	O ₃ gas (2 nL/min) for 3–24 h	Untreated Ti	SEM, cell culture, ALP, mineralizati on	↓ C; ↑ O; superhydrophilic ity; ↑ proliferation; anti- inflammatory
9.Yoshida et al. (2015)	JP	10 disks (5×2), Ti disks	O ₃ water (10 min)	Water rinse	Cell assays, ALP, calcificatio n, Ca quantificati on	↑ Proliferation; ↑ ALP; ↑ calcification

Table 2. Resumo descritivo das características dos estudos *in vivo* incluídos (n = 2)

Author (Year)	Coun try	Anim al Mode l	Sample Size & Specime n	Ozone Treatm ent	Control Treatm ent	Methods	Main Conclusi ons
1.Harman kaya et al. (2012)	SE/JP	Male Sprag ue– Dawle y rats	44 rats; 2 implants/t ibia; 4 groups (n=44/gro up)	UVO (253.7/1 84.9 nm) for 96 h at 95°C; PVD- coated within 2 cm of lamp	Machin ed Ti unmodif ied; PVD Ti- coated; IgG- coated	RT-qPCR (TNF-α, BMP-2, OC, IL-1β, CATK, PDGF, 18S); Histology/histomorp hometry; SEM; XPS; Removal torque	↓ Early inflamma tion; ↑ BMP-2 (day 1– 7); ↓ C (47→12 %); ↑ O (38→54 %); RTQ

							+25% vs machined
2.Yoshida et al. (2015)	JP	Male Sprague–Dawley rats (8 wk)	22 rats; cylindrical Ti implants Ø1×2 mm (Grade 2)	O ₃ water immersion for 10 min	Distilled water immersion for 10 min	Mechanical testing of osseointegration	↑ Mechanical strength; promotion of osteogenesis

2.3.3 Qualidade Metodológica e Risco de Viés

Os estudos *in vitro* demonstraram qualidade geral moderada, com deficiências comuns no cálculo do tamanho da amostra e no cegamento (**Tabela 3**). Os estudos *in vivo* apresentaram alto risco de viés devido à randomização e à ocultação de alocação pouco claras (**Tabela 4**).

Table 3. Avaliação da qualidade metodológica dos estudos *in vitro* incluídos. (adaptado de Sarkis-Onofre et al., 2014) [57]

Criteria	Harmankaya et al.	Hauser- Gerspach, Klonica, M. Krozer, A. Linderbäck P. Shi, X. et al. 2016	Toita, S, et al.	Toita, S. et al.	Yoshida, G. et al.
1. description of sample-size calculation	U	U	U	U	U
2. detailed description of specimen production	Y	Y	Y	Y	Y
3. randomization of specimens	U	U	U	U	U
4. use of initially identical specimens in both groups	Y	Y	Y	Y	Y

5. detailed description of treatment	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
6. standardized treatment application	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
7. Blind outcomes' measurement	U	U	U	U	U	U	U	U	U
OVERALL QUALITY	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med

Legenda: Y = yes, U = unclear.

Classificação geral da qualidade: 1-3 criteria = low; 4-5 = medium; 6-7 = high.

Table 4. Avaliação do risco de viés dos estudos *in vivo* incluídos. (n = 2) – SYRCLE Risk of Bias tool (Hooijmans et al., 2014) [58]

Criteria	Harmankaya et al. (2012) SE/JP	Yoshida et al. (2015) JP
1. Allocation sequence generation and application	Y	U
2. Groups similar at baseline or adjustment for confounders	U	U
3. Allocation concealment	U	U
4. Random housing of animals	U	U
5. Blinding of caregivers/investigators	U	U
6. Random selection for outcome assessment	U	U
7. Blinding of outcome assessor	U	U
8. Incomplete outcome data addressed	U	U

9. Free of selective outcome reporting	N	N
10. Free of other bias	N	N
Overall risk of bias	High	High

Legenda: Y = Yes; N = No; U = Unclear.

Classificação do risco: 1–3 criteria = high risk; 4–6 = medium risk; 7–10 = low risk of bias.

2.4 DISCUSSÃO

2.4.1 Características dos Estudos

Os nove artigos incluídos consistiram em estudos laboratoriais *in vitro*, sendo que dois deles também contemplaram estudos *in vivo*. Todos foram publicados em inglês entre 1999 e 2020. Dois foram publicados na Suécia (4 e 5), dois no Japão (8 e 9), um na Suíça (2) e um na Polônia (3). Os outros três foram estudos multicêntricos realizados na Suécia e no Japão (1); na China, no Japão e na Malásia (6); e no Japão e na Indonésia (7). Dois desses estudos também avaliaram as superfícies *in vivo* (1 e 9). Todos os estudos incluíram espécimes submetidos a algum tipo de tratamento de superfície com ozônio, comparando-os a espécimes não tratados ou a espécimes tratados por métodos não baseados em ozônio.

2.4.2 Método de Aplicação do Ozônio e Forma de Apresentação

Oito dos estudos incluídos avaliaram a aplicação de ozônio gasoso (1–8), sendo que três deles (1, 4 e 5) utilizaram ozônio gerado por exposição à luz ultravioleta (UVO) com diferentes comprimentos de onda, tempos de exposição (de 15 minutos a 96 horas) e distâncias da fonte até a amostra. Os outros cinco estudos (2, 3, 6, 7 e 8) empregaram um gerador de ozônio seguindo as instruções do fabricante, variando a vazão entre 0,9 L/min e 2 L/min, com a maioria adotando tempo de exposição de 24 horas. Um estudo (2) aplicou ozônio por 6 e 24 segundos.

Todos os estudos investigaram a influência do tratamento de superfície de titânio com ozônio em comparação a um grupo controle e/ou outro tipo de tratamento. Três estudos (2, 5 e 6) incluíram grupos experimentais adicionais, como aplicação de clorexidina a 2% (2), aquecimento a altas temperaturas de 300 °C a 500 °C (5), aquecimento de 100 °C a 120 °C (6) ou lavagem apenas com água destilada (9). Os demais compararam as mesmas superfícies com e sem o tratamento com ozônio proposto.

2.4.3 Resultados dos Estudos

O conjunto de evidências proveniente de nove estudos *in vitro* e dois *in vivo* demonstra que o tratamento com ozônio modifica de forma robusta as superfícies de titânio, promovendo comportamento osteocondutivo aprimorado. Nas diversas modalidades — gás gerado por UV, descarga de corona, água ozonizada e óleo ozonizado — os principais parâmetros de superfície apresentam alterações consistentes: os ângulos de contato diminuem até níveis de superhidrofilicidade ($< 5^\circ$), os contaminantes carbonáceos são reduzidos em 60–80% e tanto a espessura da camada de TiO_2 quanto a energia de superfície aumentam de modo mensurável [16–18,21]. Essas mudanças físico-químicas traduzem-se em benefícios biológicos: maior adsorção de proteínas séricas, aumento da adesão de células osteoblásticas ($> 30\%$ em relação ao controle), aceleração da atividade de fosfatase alcalina e maior formação de matriz mineralizada *in vitro*. *In vivo*, implantes tratados com ozônio exibiram valores de torque de remoção 20–25% superiores e maturação mais precoce do contato osso-implante, com redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β) e aumento de marcadores osteogênicos (BMP-2, osteocalcina) em modelos de tibia de roedor (estudos 1 e 2).

A aplicabilidade do ozônio como modificador de superfície extrapola as investigações laboratoriais. O ozônio em fase gasosa pode ser integrado aos processos de fabricação de implantes por meio de câmaras UV ou geradores de corona, permitindo o tratamento rápido de geometrias complexas sem alterar as propriedades do material. A água ozonizada oferece ativação superficial em ambiente clínico ou intraoperatório com exigência mínima de equipamentos, enquanto formulações em óleo ozonizado podem atuar como adjuvantes tópicos durante a inserção cirúrgica, mantendo a hidrofilicidade e a atividade antimicrobiana por períodos prolongados. Ademais, o duplo papel do ozônio como potente oxidante e

bactericida sugere potencial para simultaneamente melhorar a osseointegração e reduzir o risco de infecções perimplantares, abordando dois modos críticos de falha clínica.

Entretanto, a heterogeneidade entre os estudos permanece como um importante obstáculo à tradução clínica. As concentrações de ozônio variaram de 50 g/m³ na água a 140 ppm no gás, os tempos de exposição oscilaram de segundos a dias e os veículos de aplicação influenciaram a estabilidade do ozônio e sua compatibilidade tecidual. Os métodos analíticos não foram padronizados — as escalas de perfilometria, as profundidades de amostragem do XPS e os protocolos de ângulo de contato diferiram — o que dificulta comparações diretas entre os estudos. A maioria dos trabalhos careceu de delineamentos fatoriais completos para elucidar relações dose-resposta, e poucos avaliaram o envelhecimento de longo prazo ou o desempenho sob fadiga das superfícies tratadas. Criticamente, não existe um protocolo de consenso definindo a dose ótima de ozônio, a duração da exposição ou a modalidade de tratamento para tipos específicos de implantes ou contextos cirúrgicos.

Para superar essas lacunas, pesquisas futuras devem adotar metodologias rigorosas e harmonizadas: (1) relatar de forma abrangente os parâmetros de geração de ozônio (concentração, vazão, geometria da câmara); (2) utilizar protocolos padronizados de caracterização de superfície (por exemplo, ISO 25178 para rugosidade, gota pendular para ângulo de contato); (3) elaborar experimentos dose-resposta e de evolução temporal para identificar a exposição mínima efetiva de ozônio; (4) incorporar cegamento e randomização tanto em modelos *in vitro* quanto *in vivo*; e (5) avaliar o desempenho mecânico (fadiga, torção) e a bioatividade de longo prazo sob condições de envelhecimento fisiológico. Essa padronização facilitará meta-análises e processos regulatórios, possibilitando, em última instância, a adoção clínica de implantes de titânio tratados com ozônio.

2.5 CONCLUSÕES

O titânio e suas ligas emergiram como biomateriais padrão-ouro para implantes médicos e odontológicos, devido à sua biocompatibilidade de longo prazo, estabilidade mecânica e versatilidade em aplicações que vão desde próteses dentárias até artroplastia de grandes articulações com função de sustentação de carga. Os avanços em engenharia de superfície concentram-se agora em ajustar características químicas e topográficas para otimizar a adesão celular precoce, acelerar a diferenciação osteoblástica e minimizar

respostas inflamatórias, sem comprometer a estabilidade intrínseca do metal. Consequentemente, as superfícies de titânio tratadas são classificadas segundo sua capacidade de favorecer a cicatrização óssea: revestimentos osteocondutivos fornecem um arcabouço poroso para o ingresso celular; modificações osteoindutivas recrutam e diferenciam proativamente células progenitoras; e abordagens osteogênicas incorporam células ósseas vivas. Essas inovações visam, em conjunto, encurtar o tempo de recuperação e melhorar a integração do implante ao ambiente do hospedeiro.

Esta revisão sistemática revelou diversos tratamentos de superfície de titânio e suas ligas com ozônio. O ozônio é um gás de fácil geração em laboratório, de baixo custo e manuseio simples e, embora tóxico em altas concentrações para humanos, é seguro em ambientes industriais, atuando como potente oxidante, bactericida e agente descontaminante. Entre os artigos selecionados, apesar das variações nas técnicas, concentração, tempo de exposição, método de geração e estado físico do ozônio, todos demonstraram resultados promissores na melhoria das propriedades osteocondutivas das superfícies.

Com base nos estudos selecionados, nos métodos empregados, nos resultados analisados e nas variações identificadas entre eles, conclui-se que o tratamento com ozônio das superfícies de titânio e suas ligas, seja na forma gasosa ou em água, promove alterações nas características físico-químicas dessas superfícies que parecem aprimorar suas propriedades osteoindutivas e osteocondutivas.

Além disso, ao avaliar sistematicamente estratégias de modificação de superfície para implantes de titânio, este trabalho lança bases para benefícios concretos à sociedade. A melhor integração de implantes e a osseointegração acelerada podem reduzir significativamente a incidência de complicações perimplantares e a necessidade de cirurgias de revisão dispendiosas. Tempos de cicatrização mais curtos e desfechos mais previsíveis traduzem-se em internações hospitalares mais breves, menores custos globais de saúde e menor pressão sobre os recursos clínicos. Os pacientes beneficiam-se de recuperação funcional aprimorada, maior sobrevida das próteses e melhor qualidade de vida, especialmente em populações envelhecidas que demandam cada vez mais implantes dentários e ortopédicos. Ademais, a identificação de superfícies osteocondutivas, osteoindutivas e osteogênicas informa padrões regulatórios e boas práticas na indústria, impulsionando a inovação na fabricação de biomateriais. Em última instância, esses avanços contribuem não apenas para o bem-estar individual, mas também para a saúde pública, ao promover soluções duráveis e custo-efetivas que favorecem o envelhecimento

saudável e reduzem disparidades socioeconômicas no acesso a cuidados restauradores e reconstrutivos.

Por fim, além de conduzir novos estudos in vitro e in vivo, os pesquisadores devem aplicar rigor metodológico e protocolos mais precisos para reduzir o risco de viés e garantir maior clareza nos resultados. Essa padronização permitirá compreender melhor os efeitos reais do tratamento com ozônio e viabilizará comparações futuras e análises mais acuradas. Consequentemente, abrirá caminho para estudos clínicos em humanos, nos quais implantes ou próteses de titânio tratados com ozônio sob um protocolo pré-clínico bem definido e testado poderão, enfim, beneficiar pacientes que necessitam deste tipo de tratamento, transferindo para a prática clínica os ganhos obtidos.

2.6 REFERÊNCIAS

1. NAVARRO, M.; MICHIARDI, A.; CASTAÑO, O.; PLANELL, J. A. Biomaterials in orthopaedics. *J R Soc Interface*, v. 5, p. 1137–1158, 2008.
2. SCHWARTZ, Z.; KIESWETTER, K.; DEAN, D. D.; BOYAN, B. D. Underlying mechanisms at the bone–surface interface during regeneration. *J Periodontal Res*, v. 32, p. 166–171, 1997.
3. LEVENTHAL, G. S. Titanium, a metal for surgery. *J Bone Joint Surg Am*, v. 33, n. 2, p. 473–474, 1951.
4. PULEO, D. A.; NANJI, A. Understanding and controlling the bone–implant interface. *Biomaterials*, v. 20, p. 2311–2321, 1999.
5. OSTBERG, A. K.; DAHLGREN, U.; SUL, Y. T.; JOHANSSON, C. B. Inflammatory cytokine release is affected by surface morphology and chemistry of titanium implants. *J Mater Sci Mater Med*, v. 26, p. 155–163, 2015.
6. AITA, H.; HORI, N.; TAKEUCHI, M.; SUZUKI, T.; YAMADA, M.; ANPO, M. et al. The effect of ultraviolet functionalization of titanium on integration with bone. *Biomaterials*, v. 30, n. 6, p. 1015–1025, 2009.

7. LUMETTI, S.; MANFREDI, E.; FERRARIS, S.; SPRIANO, S.; PASSERI, G.; GHIACCI, G.; MACALUSO, G.; GALLI, C. The response of osteoblastic MC3T3-E1 cells to micro- and nano-textured, hydrophilic and bioactive titanium surfaces. *J Mater Sci Mater Med*, v. 27, p. 68, 2016.

8. TAKEMOTO, M.; FUJIBAYASHI, S.; NEO, M.; SUZUKI, J.; KOKUBO, T.; NAKAMURA, T. Mechanical properties and osteoconductivity of porous bioactive titanium. *Biomaterials*, v. 26, n. 30, p. 6014–6023, 2005.

9. TSUKIMURA, N.; YAMADA, M.; IWASA, F.; MINAMIKAWA, H.; ATT, W.; UENO, T. et al. Synergistic effects of UV photofunctionalization and micro-nano hybrid topography on the biological properties of titanium. *Biomaterials*, v. 32, n. 19, p. 4358–4368, 2011.
10. ZHAO, G.; SCHWARTZ, Z.; WIELAND, M.; RUPP, F.; GEIS-GERSTORFER, J.; COCHRAN, D. L. et al. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J Biomed Mater Res A*, v. 74, n. 1, p. 49–58, 2005.

11. BOCCI, V.; BORRELLI, E.; TRAVAGLI, V.; ZANARDI, I. The ozone paradox: Ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. *Med Res Rev*, v. 29, n. 4, p. 646–682, Jul. 2009.

12. WENNERBERG, A.; BOUGAS, K.; JIMBO, R.; ALBREKTSSON, T. Implant coatings: new modalities for increased osseointegration. *Am J Dent*, v. 26, n. 2, p. 105–112, 2013.

13. LEE, J. H.; OGAWA, T. The biological aging of titanium implants. *Implant Dent*, v. 21, n. 5, p. 415–421, 2012.

14. BUSER, D. et al. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants: a histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res*, v. 25, n. 7, p. 889–902, 1991.

15. TSUKIMURA, N.; YAMADA, M.; IWASA, F.; MINAMIKAWA, H.; ATT, W.; UENO, T. et al. Synergistic effects of UV photofunctionalization and micro-nano hybrid topography on the biological properties of titanium. *Biomaterials*, v. 32, n. 19, p. 4358–4368, 2011.

16. STÜBINGER, S.; SADER, R.; FILIPPI, A. The use of ozone in dentistry and maxillofacial surgery: a review. *Quintessence Int*, v. 37, p. 353–359, 2006.

17. RAGHAVENDRA, S.; WOOD, M. C.; TAYLOR, T. D. Early wound healing around endosseous implants: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 20, n. 3, p. 425–431, 2005.
18. BRÄNEMARK, P. I.; BREINE, U.; LINDSTRÖM, J. et al. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg*, v. 3, p. 81–100, 1969.
19. ZANIVAN, D. S.; ELIAS, C. N.; DARÓZ, S. R. Análise da superfície de fratura de implante osseointegrado e mecanismos envolvidos na cicatrização. *Rev ImplantNews*, v. 6, n. 1, p. 39–46, 2009.
20. JAVED, F. et al. Implant Surface Morphology and Primary Stability: Is There a Connection? *Implant Dent*, v. 20, n. 1, p. 40–46, 2011.
21. BRENTTEL, A. S. et al. Histomorphometric analysis of pure titanium implants with porous surface versus rough surface. *J Appl Oral Sci*, v. 14, n. 3, p. 213–218, 2006.
22. WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T. Suggested guidelines for the topographic evaluation of implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 15, p. 331–334, 2000.
23. THOMAS, T. R. Characterization of surface roughness. *Precision Eng*, v. 3, n. 2, p. 97–104, 1981.
24. SCHROEDER, A. et al. The reactions of bone, connective tissue, and epithelium to endosteal implants with titanium-sprayed surfaces. *J Maxillofac Surg*, v. 9, p. 15–25, 1981.
25. MANIATOPOULOS, C.; PILLIAR, R. M.; SMITH, D. C. Threaded versus porous-surfaced designs for implant stabilization in bone—endodontic implant model. *J Biomed Mater Res*, v. 20, n. 9, p. 1309–1333, 1986.
26. WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*, v. 20, suppl. 4, p. 172–184, 2009.

27. WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T. Implant surfaces beyond micron roughness: experimental and clinical knowledge of surface topography and surface chemistry. *Inter Dent SA*, v. 8, p. 14–18, 2006.
28. LANG, N. P. et al. Early osseointegration to hydrophilic and hydrophobic implant surfaces in humans. *Clin Oral Implants Res*, v. 22, p. 349–356, 2011.
29. NOVAES JR, A. B. et al. Influence of implant surfaces on osseointegration. *Braz Dent J*, v. 21, n. 6, p. 471–481, 2010.
30. BARROS, R. R. M. et al. Biofunctionalized implant surface. *Braz Dent J*, v. 20, n. 2, p. 91–98, 2009.
31. BUSER, D. et al. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res*, v. 83, n. 7, p. 529–533, 2004.
32. WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T.; LAUSAMAA, J. Torque and histophometric evaluation of c.p. titanium screws blasted with 25 and 75 μm sized particle of Al_2O_3 . *J Biomed Mater Res*, v. 30, p. 251–260, 1996.
33. MALUF, P. S. Z. et al. Vantagens do tratamento de superfície a laser em implantes dentais osseointegráveis. *ImplantNews*, v. 4, n. 6, p. 643–646, 2007.
34. CARLSSON, L. V.; ALBREKTSSON, T.; BERMAN, C. Bone response to plasma-cleaned titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 4, n. 3, p. 199–203, 1989.
35. FEIGHAN, J. E. et al. The influence of surface-blasting on the incorporation of titanium-alloy implants in a rabbit intramedullary model. *J Bone Joint Surg Am*, v. 77, n. 9, p. 1380–1395, 1995.
36. MUSTAFA, K. et al. Attachment and proliferation of human oral fibroblasts to titanium surfaces blasted with TiO_2 particles: a scanning electron microscopic and histomorphometric analysis. *Clin Oral Implants Res*, v. 9, n. 3, p. 195–207, 1998.

37. IVANOFF, C. et al. Histologic evaluation of the bone integration of TiO₂-blasted and turned titanium microimplants in humans. *Clin Oral Implants Res*, v. 12, n. 2, p. 128–134, 2001.
38. BABBUSH, C. A.; KENT, J. N.; MISIEK, D. J. Titanium plasma-sprayed (TPS) screw implants for the reconstruction of the edentulous mandible. *J Oral Maxillofac Surg*, v. 44, n. 4, p. 274–282, 1986.
39. DE GROOT, K. et al. Plasma sprayed coatings of hydroxylapatite. *J Biomed Mater Res*, v. 21, n. 12, p. 1375–1381, 1987.
40. DOHAN EHRENFEST, D. M. et al. Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography. *Trends Biotechnol*, v. 28, n. 4, p. 198–206, 2010.
41. BOCCI, V. A. Scientific and medical aspects of ozone therapy: state of the art. *Riv Ital Ossigeno-Ozonoterapia*, v. 5, n. 2, p. 93–104, 2006.
42. BOCCI, V.; ZANARDI, I.; VALACCHI, G.; BORRELLI, E.; TRAVAGLI, V. Validity of oxygen-ozone therapy as integrated medication form in chronic inflammatory diseases. *Cardiovasc Hematol Disord Targets*, v. 15, n. 2, p. 127–138, Dec. 2015.
43. LINDERBÄCK, P.; HARMANKAYA, N.; ASKENDAL, A.; AREVA, S.; LAUSMÄÄ, J.; TENGVALL, P. The effect of heat- or ultraviolet ozone-treatment of titanium on complement deposition from human blood plasma. *Biomaterials*, v. 31, p. 4795–4801, 2010.
44. DE OLIVEIRA, R. R.; SCHWARTZ-FILHO, H. O.; NOVAES, A. B.; GARLET, G. P.; FREITAS DE SOUZA, R.; TABA, M. et al. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: cytokine profile in gingival crevicular fluid, preliminary results. *J Periodontol*, v. 80, n. 1, p. 98–105, 2009.
45. NOGALES, C. G.; FERREIRA, M. B.; MONTEMOR, A. F.; RODRIGUES, M. F. A.; LAGEMARQUES, J. L.; ANTONIAZZI, J. H. Ozone therapy as an adjuvant for endodontic protocols: microbiological ex vivo study and cytotoxicity analyses. *J Appl Oral Sci*, v. 24, n. 6, p. 607–613, 2016.
46. GLÓRIA, J. C. R.; DOUGLAS-DE-OLIVEIRA, D. W.; SILVA, L. D. A.; FALCI, S. G. M.; DOS SANTOS, C. R. R. Influence of ozonized water on pain, oedema, and trismus during

- impacted third molar surgery: a randomized, triple-blind clinical trial. *BMC Oral Health*, v. 20, n. 1, p. 1–9, 2020.
47. PATEL, P. V.; KUMAR, S.; VIDYA, G. D.; PATEL, A.; HOLMES, J. C.; KUMAR, V. Cytological assessment of healing palatal donor site wounds and grafted gingival wounds after application of ozonated oil: an eighteen-month randomized controlled clinical trial. *Acta Cytol*, v. 56, n. 3, p. 277–284, 2012.
 48. PATEL, P. V.; KUMAR, V.; KUMAR, S.; VIDYA, G. D.; PATEL, A. Therapeutic effect of topical ozonated oil on the epithelial healing of palatal wound sites: a planimetric and cytological study. *J Investig Clin Dent*, v. 2, n. 4, p. 248–258, Nov. 2011.
 49. MOHER, D.; LIBERATI, A.; TETZLAFF, J.; ALTMAN, D. G. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: the PRISMA Statement. *PLoS Med*, v. 6, n. 7, p. e1000097, Jul. 2009. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.1000097>. Acesso em: 13 mai. 2020.
 50. OUZZANI, M.; HAMMADY, H.; FEDOROWICZ, Z.; ELMAGARMID, A. Rayyan—a web and mobile app for systematic reviews. *Syst Rev*, v. 5, n. 1, p. 210, 2016.
 51. TU, M. G.; CHEN, Y. W.; SHIE, M. Y. Macrophage-mediated osteogenesis activation in co-culture with osteoblast on calcium silicate cement. *J Mater Sci Mater Med*, v. 26, p. 276–285, 2015.
 52. OSTBERG, A. K.; DAHLGREN, U.; SUL, Y. T.; JOHANSSON, C. B. Inflammatory cytokine release is affected by surface morphology and chemistry of titanium implants. *J Mater Sci Mater Med*, v. 26, p. 155–163, 2015.
 53. SILVA, R. C. R. Alteração da molhabilidade de superfícies internas de tubulações utilizadas no transporte de óleos pesados via core-flow. 2003. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Petróleo) – Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia de Petróleo, Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Petróleo, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.
 54. SANTOS, R. G. Avaliação da molhabilidade de superfícies de oleodutos através de medidas de ângulo de contato: efeito de asfaltenos e de ácidos naftênicos. 2003. 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Departamento

de Engenharia de Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

55. CARDOSO, C. C. et al. Azione del'olio ozonizzato (Bioperoxoil) nelle lesioni chirurgiche dei modelli pre-clinic. *Lesiones Quirúrgicas*, p. 1–11, 2016.
56. BORGES, G. A. et al. In vitro evaluation of wound healing and antimicrobial potential of ozone therapy. *J Cranio-Maxillo-Fac Surg*, v. 45, p. 364–370, 2017.
57. SARKIS-ONOFRE, R. et al. Análise da qualidade metodológica dos estudos *in vitro*. 2014.
58. HOOIJMANS, C. R. et al. Análise do risco de viés dos estudos *in vivo* (em animais) – SYRCLE RoB tool. 2014.
59. FITZPATRICK, J. Mendeley Manages Your Documents on Your Desktop and in the Cloud. 2009.
60. KHAN, S. N. et al. The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg*, v. 13, n. 1, p. 77–86, 2005.
61. DE CARVALHO, D. R. et al. Characterization and in vitro cytocompatibility of an acid-etched titanium surface. *Braz Dent J*, v. 21, 2010

CAPÍTULO 3: CARACTERÍSTICAS FÍSICO – QUÍMICAS DA SUPERFÍCIE DO TITÂNIO GRAU 5 APÓS TRATAMENTO COM GÁS OZÔNIO

RESUMO

O presente estudo avaliou detalhadamente os efeitos do tratamento de superfície com gás ozônio ($16 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, 15 h) sobre discos de titânio grau 5 ($5 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$) usinados (D-Ti) em comparação com aqueles submetidos à ozonização (D-TiOz). Após limpeza ultrassônica em acetona, etanol absoluto e água deionizada e esterilização em autoclave (121°C , 20 min), as amostras receberam caracterização de molhabilidade, microtopografia por microscopia eletrônica de varredura (SEM) e composição elementar por espectroscopia por dispersão de energia de raios X (EDS).

A molhabilidade foi mensurada pelo método sessile drop, com gotas de água de $2 \mu\text{L}$ registradas aos 10 s e analisadas no ImageJ (NIH), totalizando 75 medidas por grupo. Observou-se uma redução drástica do ângulo de contato, de $56,10^\circ \pm 1,25^\circ$ em D-Ti para apenas $6,27^\circ \pm 0,70^\circ$ em D-TiOz ($p < 0,001$), evidenciando incremento significativo na hidrofília superficial, fator essencial para adsorção de proteínas e adesão celular inicial.

Na análise microtopográfica por SEM, quatro discos por grupo foram revestidos com Au/Pd e examinados em ampliações de $200\times$, $500\times$, $1\,000\times$ e $3\,000\times$, com três campos de visão por disco. Embora as estrias de usinagem originais estivessem preservadas em ambos os grupos, as superfícies D-TiOz exibiram nano-granulações uniformes em ampliações de $1\,000\times$ a $3\,000\times$, indicando formação de microporosidade adicional sem comprometer a textura macro.

A EDS pontual, realizada em três regiões distintas de cada disco (12 leituras por grupo), revelou alterações estatisticamente significativas na composição atômica: redução de carbono de $2,9 \pm 0,4 \%$ para $2,2 \pm 0,3 \%$, leve decréscimo de titânio de $91,6 \pm 0,8 \%$ para $90,8 \pm 0,7 \%$ e aumento de oxigênio de $5,5 \pm 0,6 \%$ para $7,0 \pm 0,5 \%$ em D-TiOz ($p < 0,05$). Esses dados refletem a remoção de contaminantes orgânicos e o espessamento seletivo da camada de TiO_2 .

Além disso, os coeficientes de colocação demonstraram maior homogeneidade da camada de óxido após ozonização: o coeficiente de Pearson para Ti+O aumentou de $0,809 \pm 0,068$ em D-Ti para $0,827 \pm 0,087$ em D-TiOz, enquanto o Manders M2 apresentou $p = 4 \times 10^{-6}$, reforçando a formação de uma matriz mais uniforme de TiO_2 na superfície tratada.

Conclusão: o tratamento com gás ozônio mostrou-se uma estratégia simples e de baixo custo para otimização da superfície de implantes de titânio grau 5, melhorando suas características físico-químicas sem comprometer a topografia original.

Palavras-chave: titânio grau 5; tratamento com ozônio; molhabilidade; SEM; EDS; colocação.

ABSTRACT

The present study thoroughly evaluated the effects of surface treatment with ozone gas ($16 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, 15 h) on machined grade 5 titanium discs ($5 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$), comparing untreated samples (D-Ti) with those subjected to ozonation (D-TiOz). After ultrasonic cleaning in acetone, absolute ethanol, and deionized water and autoclave sterilization (121°C , 20 min), the specimens were characterized for wettability, microtopography by scanning electron microscopy (SEM), and elemental composition by energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS).

Wettability was measured by the sessile drop method, using $2 \mu\text{L}$ water droplets recorded at 10 s and analyzed in ImageJ, totaling 75 measurements per group. A dramatic reduction in contact angle was observed, from $56.10^\circ \pm 1.25^\circ$ in D-Ti to just $6.27^\circ \pm 0.70^\circ$ in D-TiOz ($p < 0.001$), indicating a significant increase in surface hydrophilicity, which is essential for protein adsorption and initial cell adhesion.

In the SEM microtopographic analysis, four discs per group were coated with Au/Pd and examined at $200\times$, $500\times$, $1\,000\times$, and $3\,000\times$ magnifications, with three fields of view per disc. While the original machining grooves were preserved in both groups, the D-TiOz surfaces exhibited uniform nano-granulations at $1\,000\times$ to $3\,000\times$ magnifications, indicating the formation of additional microporosity without compromising macro-texture.

Point EDS analysis, performed in three distinct regions of each disc (12 readings per group), revealed significant changes in atomic composition: carbon decreased from $2.9 \pm 0.4\%$ to $2.2 \pm 0.3\%$, titanium slightly decreased from $91.6 \pm 0.8\%$ to $90.8 \pm 0.7\%$, and oxygen increased from $5.5 \pm 0.6\%$ to $7.0 \pm 0.5\%$ in D-TiOz ($p < 0.05$). These results reflect the removal of organic contaminants and the thickening of the TiO_2 layer.

Moreover, colocalization coefficients demonstrated greater oxide layer homogeneity after ozonation: the Pearson coefficient for Ti+O increased from 0.809 ± 0.068 in D-Ti to 0.827 ± 0.087 in D-TiOz, while Manders M2 showed a statistically significant rise, reinforcing the formation of a more uniform TiO_2 matrix.

Conclusion: ozone gas treatment proved to be a simple, cost-effective strategy to optimize the surface of grade 5 titanium implants by improving their physicochemical properties without altering the original topography.

Keywords: grade 5 titanium; ozone treatment; hydrophilicity; SEM; EDS; colocalization.

3.1 INTRODUÇÃO

A integração bem-sucedida de implantes de titânio grau 5 ao tecido ósseo envolve uma complexa interação entre as características físico-químicas da superfície metálica e a resposta biológica do organismo hospedeiro. Desde a introdução do titânio como material cirúrgico devido à sua alta biocompatibilidade e resistência mecânica, pesquisadores têm enfatizado que não basta a simples presença do metal: é fundamental controlar a micro- e nanotopografia, bem como a composição química da superfície, para otimizar a adsorção de proteínas, a proliferação e a diferenciação osteoblástica [1,3]. Nesse contexto, técnicas de caracterização como microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia por dispersão de energia de raios X (EDS) e ensaios de molhabilidade tornaram-se ferramentas padrão para correlacionar propriedades de superfície a resultados celulares e clínicos [2,21].

Ensaio de molhabilidade, em particular, demonstraram que superfícies hidrofílicas apresentam menor ângulo de contato, favorecendo a formação de um filme de adsorção proteica mais estável e homogêneo — condição essencial para a adesão precoce de osteoblastos e para a disposição adequada de proteínas de adesão, como fibronectina e vitronectina [21,22]. Já o estudo de Schwartz et al. evidenciou que alterações na energia superficial e na rugosidade em microescala modulam a liberação de citocinas inflamatórias, impactando a resposta inicial ao implante e a posterior formação de matriz óssea [2]. Em paralelo, a espectroscopia EDS possibilita quantificar a proporção de titânio, oxigênio e carbono presente na camada externa, fornecendo indícios sobre a formação de TiO_2 nativo ou enriquecido, bem como sobre contaminações orgânicas que podem comprometer a bioatividade [22,86].

Tradicionalmente, métodos como jateamento com partículas e ataque ácido (acid-etching) vêm sendo usados para criar uma topografia rugosa que melhora o encaixe mecânico e a estabilidade primária do implante. Contudo, tais abordagens podem apresentar variabilidade nos resultados e demanda cuidadosa padronização de parâmetros (tamanho e velocidade de partículas, concentração de ácido, tempo de exposição) para evitar a formação de porosidade excessiva ou descoloração do metal [3,21]. Novas estratégias de modificação superficial, portanto, buscam não apenas gerar uma topografia favorável, mas também enriquecer quimicamente a camada de TiO_2 , eliminar hidrocarbonetos e incrementar nano-granulações, de modo a produzir uma “superfície bimodal” que combine rugosidade macro para estabilidade mecânica e nanoestrutura para maior bioatividade [86,87].

O uso de gás ozônio de 10-30 µg/mL para tratamento de titânio tem ganhado atenção recente pela sua forte capacidade oxidativa e por atuar simultaneamente como bactericida e removedor de contaminantes orgânicos, sem necessidade de reagentes líquidos agressivos [87,88]. Estudos prévios relataram que a ozonização pode reduzir significativamente o ângulo de contato, indicando aumento da hidrofilia, e promover incremento na espessura da camada de óxido de titânio, contribuindo para uma matriz mais uniforme de TiO₂, potencialmente benéfica à adesão celular [88–90]. Por meio da microscopia eletrônica de varredura - MEV, observou-se nano-granulações bem definidas em superfícies ozonizadas, sugerindo a geração de microporosidade adicional sem degradação da microtextura original [89,90].

Apesar desses achados promissores, ainda existem lacunas no entendimento de como parâmetros do tratamento (concentração de ozônio, tempo de exposição, forma de aplicação) influenciam de modo integrado às propriedades físico-químicas e, conseqüentemente, a resposta biológica subsequente. Mais especificamente, faltam dados quantitativos que estabeleçam correlações entre colocação dos elementos Ti e O (coeficientes de Pearson e Manders), mudanças na composição química (redução de C, aumento de O) e modificações na morfologia nanoscópica que possam determinar o potencial ostecondutivo da superfície.

Diante disso, o presente estudo propõe-se a caracterizar superfícies de titânio grau 5 após tratamento completo com gás ozônio (16 µg/cm³, 15 h), utilizando ensaios de molhabilidade, SEM, EDS e análise de colocação elementar. Ao elucidar os mecanismos físico-químicos envolvidos, pretende-se fornecer subsídios técnicos para o desenvolvimento de implantes com superfícies otimizadas, capaz de acelerar e melhorar a osseointegração em aplicações odontológicas e ortopédicas.

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Preparo das Amostras

Discos de titânio grau 5 (Ti–6Al–4V) com Ø 5 mm × 2 mm de espessura (**Implalife® – Indústria de Produtos Médicos – Odontológicos, Jales, São Paulo, Brasil**) foram confeccionados apenas usinados, lavados em banho ultrassônico em sequência de acetona, etanol absoluto e água deionizada (10 min cada) e, em seguida, esterilizados em autoclave (121 °C, 20 min) **Fig.1**.

As amostras foram divididas em dois grupos experimentais:

- **D-Ti (controle):** acabamento somente usinado (n = 15).
- **D-TiOz:** tratamento de superfície em câmara de fluxo contínuo com gás ozônio a $16 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ (gerado a partir de O_2 medicinal pelo aparelho Philozon® Medplus V), durante 15 h, com fluxo de 0,5 L/min (n = 15).

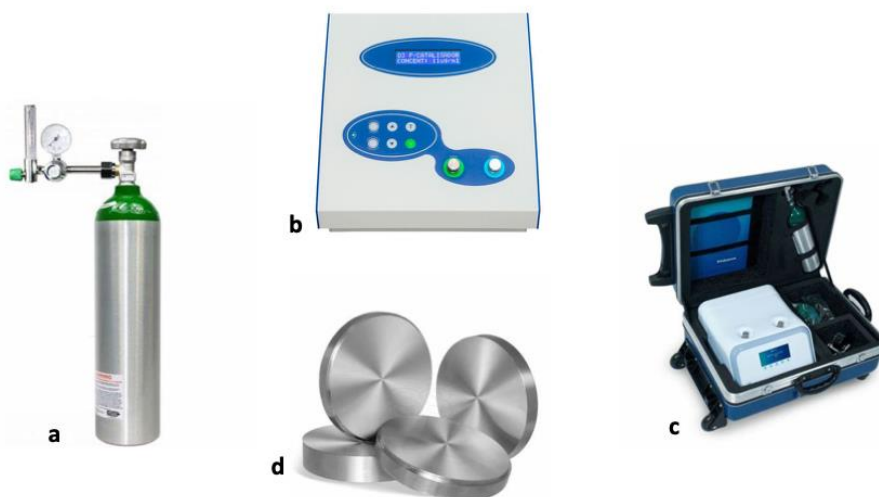


Figura 1. (a) Cilindro de oxigênio; (b) Aparelho gerador de ozônio – Philozon®; (c) Conjunto cilindro O_2 + aparelho gerador de ozônio – Philozon®; (d) Discos de Ti grau 5

3.2.2 Ensaio de Molhabilidade

Princípio: Determinar o ângulo de contato entre uma gota de líquido e a superfície sólida (sessile drop), indicativo de hidrofilia/hidrofobicidade.

Procedimento:

- Após 03 dias do tratamento, cada disco foi fixado em suporte horizontal limpo e seco. No total, foram utilizados 15 discos de titânio por grupo (D-Ti e D-TiOz).
- Gotas de $2 \mu\text{L}$ de água deionizada foram depositadas sobre a superfície de cada disco, aguardando 10 s para estabilização [Fig. 2].
- As imagens foram capturadas lateralmente por câmera acoplada ao sistema. Em algumas amostras tratadas com O_3 , não foi possível obter a imagem da gota pois a água foi completamente espalhada sobre a superfície do disco de Ti. Nesses casos, foi filmado seu comportamento sobre o substrato [Fig. 3].

- O ângulo de contato foi medido em triplicata para cada gota usando o software de medição **ImageJ 1.52K** (National Institutes of Health, NIH, Bethesda, Maryland, EUA) que fornece a medida direta da tangente da gota líquida com a superfície sólida do substrato.
- Ao todo foram feitas cinco gotas por disco e 75 medidas por grupo, Silva, R.C.R, 2003 [55].

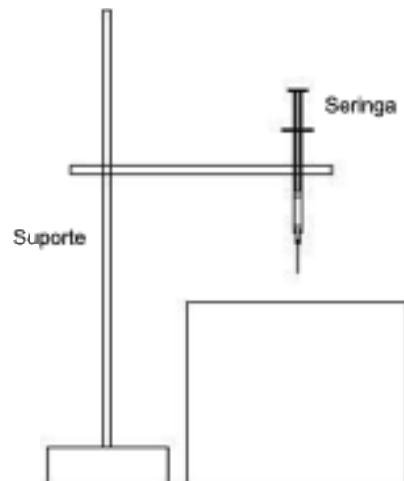


Figura 2. Configuração do método *sessile drop* para medição do ângulo de contato: gota de água de 2 μL sobre a superfície do disco, imagem registrada aos 10 s para análise do ângulo.

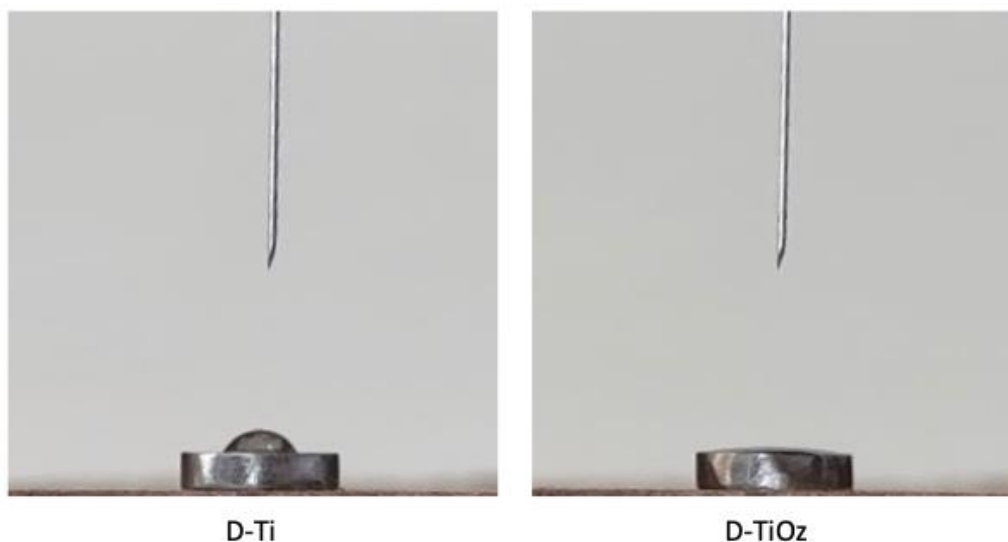


Figura 3. Comportamento da gota em relação às superfícies sem tratamento com ozônio (D-Ti) e com tratamento com ozônio na forma de gás (D-TiOz).

Análise estatística: A média do ângulo de contato por grupo foi calculada e expressa como média $\pm$ desvio padrão. A comparação estatística entre os grupos foi realizada por meio de one-way ANOVA seguida do Tukey's post hoc test ($p < 0,05$).

3.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Objetivo: avaliar a micro e nanotopografia superficial.

Preparação:

- Quatro discos de cada grupo foram revestidos com filme fino de ouro/paládio (Au/Pd) (~10 nm) em sputter coater (Emitech K550) para garantir a condutividade elétrica.

Aquisição de Imagens:

- Equipamento: JEOL JSM-7001F, tensão de aceleração de 15 kV, modo de alto vácuo.
- Amostras analisadas em ampliações de 200 $\times$, 500 $\times$, 1 000 $\times$ e 3 000 $\times$.
- Três campos de visão selecionados aleatoriamente por disco, totalizando 12 micrografias por grupo.
- Micrografias representativas foram utilizadas para avaliar qualitativamente a topografia da superfície e comparar as diferenças morfológicas entre os grupos experimentais.

Descrição da Topografia:

- Preservação das estrias de usinagem (análise macro).
- Identificação de nanogranulações (20 a 80 nm) e alterações topográficas em D-TiO₂.

3.2.4 Espectroscopia por Dispersão de Energia de Raios X (EDS)

Princípio: quantificação elementar superficial, determinando frações atômicas de titânio (Ti), oxigênio (O) e carbono (C).

Procedimento:

- Realizada em conjunto com Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (JEOL JSM-7001F equipado com detector Oxford X-MaxN 80 mm²).
- Para cada disco, foram realizadas três análises pontuais (spot) em regiões distintas previamente identificadas em MEV, totalizando 12 leituras por grupo.
- Parâmetros de aquisição: tensão de 15 kV, contagem “live time” de 60 s por spot, ângulo de incidência de 35°.

Análise de Dados:

- Frações atômicas (at%) de titânio (Ti), oxigênio (O) e carbono (C) obtidas pelo software AZtec (Oxford Instruments).
- Cálculo dos coeficientes de colocalização de Pearson (r) e Manders (M1/M2) para os pares titânio + oxigênio (Ti+O), titânio + carbono (Ti+C) e oxigênio + carbono (O+C), utilizando plugin Coloc 2 do Fiji/ImageJ.

Critério de significância: diferenças entre grupos avaliadas por teste t de Student ($\alpha = 0,05$).

Após as leituras, as imagens foram analisadas em relação às porcentagens dos compostos químicos predominantes em cada grupo e da posição espacial dos átomos desses compostos em cada leitura avaliando se suas posições eram coincidentes ou não entre si, sugerindo a formação ou não de moléculas (Pearson's Correlation Coefficient e Manders' Overlap Coefficients).

O Coeficiente de Correlação de Pearson (ou Pearson's correlation coefficient - PCC, representado pela letra r) é uma medida estatística que avalia a força e a direção da relação linear entre duas variáveis quantitativas. Seu valor varia de -1 a +1:

- r = +1: correlação linear positiva perfeita
- r = 0: nenhuma correlação linear
- r = -1: correlação linear negativa perfeita

Em análises de imagens, como em microscopia ou EDS (espectroscopia por dispersão de energia), o PCC é usado para avaliar a colocalização entre dois sinais (como

Ti e O), verificando se os níveis de intensidade dos pixels em dois canais aumentam ou diminuem juntos [84].

Coeficientes de Sobreposição de Manders indica valores numéricos utilizados para determinar o grau de coincidência espacial entre dois sinais em uma imagem, sendo aplicados em colocação de biomoléculas ou elementos químicos em técnicas como microscopia confocal ou espectroscopia por dispersão de energia (EDS).

- O M1 representa a fração do primeiro sinal (por exemplo, Titânio) que está presente nas regiões onde o segundo sinal (por exemplo, Oxigênio) também está presente.
- O M2 representa a fração do segundo sinal que está presente nas regiões com o primeiro sinal.

Esses coeficientes são especialmente úteis quando a intensidade do sinal não é necessariamente linear entre os dois canais, permitindo avaliar a sobreposição real em vez de uma correlação matemática [85].

3.2.5. Análise Estatística

Os dados obtidos foram organizados e analisados no software **GraphPad Prism® versão 9.0** (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). Todas as variáveis quantitativas foram expressas como **média $\pm$ desvio padrão (DP)**. A normalidade da distribuição foi verificada pelo **teste de Shapiro-Wilk**. O nível de significância adotado em todas as análises foi de **$p < 0,05$** .

i. Molhabilidade (ângulo de contato): após verificação de normalidade, as comparações entre os grupos (D-Ti e D-TiOz) foram realizadas pelo **teste t de Student para amostras independentes**. Esse teste foi escolhido por envolver duas condições experimentais com variáveis contínuas de distribuição normal.

ii. Composição elementar por EDS (% atômica de Ti, O e C): como cada elemento foi avaliado de forma independente entre os dois grupos, as comparações também foram feitas pelo **teste t de Student para amostras independentes**.

iii. Coeficientes de correlação de Manders (M1 e M2) e de Pearson (r): a fim de comparar a sobreposição elementar entre os grupos, utilizou-se o **teste t de Student para amostras independentes** em cada combinação elementar (Ti+O, Ti+C e O+C).

iv. Microscopia eletrônica de varredura (MEV): a análise foi exclusivamente **qualitativa e descritiva**, não sendo aplicados testes estatísticos a esse experimento (**Tabela1**).

Tabela 1. Tipo de teste estatístico por ensaio experimental

Experimento	Tipo de dado	Teste estatístico	Justificativa
Molhabilidade (ângulo de contato)	Ângulo de contato ($^{\circ}$), variável contínua, 2 grupos independentes	Teste t de Student (independente)	Comparar duas médias independentes após confirmação de normalidade
EDS – composição elementar (Ti, O, C)	Percentual atômico (% at) de cada elemento, variável contínua, 2 grupos independentes	Teste t de Student (independente)	Comparar valores médios entre D-Ti e D-TiOz para cada elemento
EDS – coeficientes de sobreposição (Manders M1/M2 e Pearson r)	Coeficientes de correlação, variáveis contínuas, 2 grupos independentes	Teste t de Student (independente)	Avaliar diferenças na sobreposição elementar entre D-Ti e D-TiOz
Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	Dados qualitativos (micrografias representativas)	Análise descritiva	Comparação morfológica sem aplicação de testes estatísticos

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Molhabilidade

De acordo com os resultados obtidos, o grupo com os discos de titânio somente usinados (D-Ti) apresentou um ângulo de contato médio de **$56,10^{\circ} \pm 1,25^{\circ}$** caracterizando uma **superfície hidrofóbica**, enquanto o grupo com os discos de titânio usinados e tratados com ozônio (D-TiOz) apresentou um ângulo significativamente menor, com média de **$6,27^{\circ} \pm 0,70^{\circ}$ ($p < 0.001$)** evidenciando a transformação da superfície usinada em uma **superfície super hidrofílica**. Imagens representativas ilustram este contraste com uma gota esférica persistente no grupo D-Ti enquanto no grupo D-TiOz observa-se a gota quase que

completamente espalhada [Fig. 3]. A análise estatística (teste t de Student) demonstrou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$) [Figura 4].

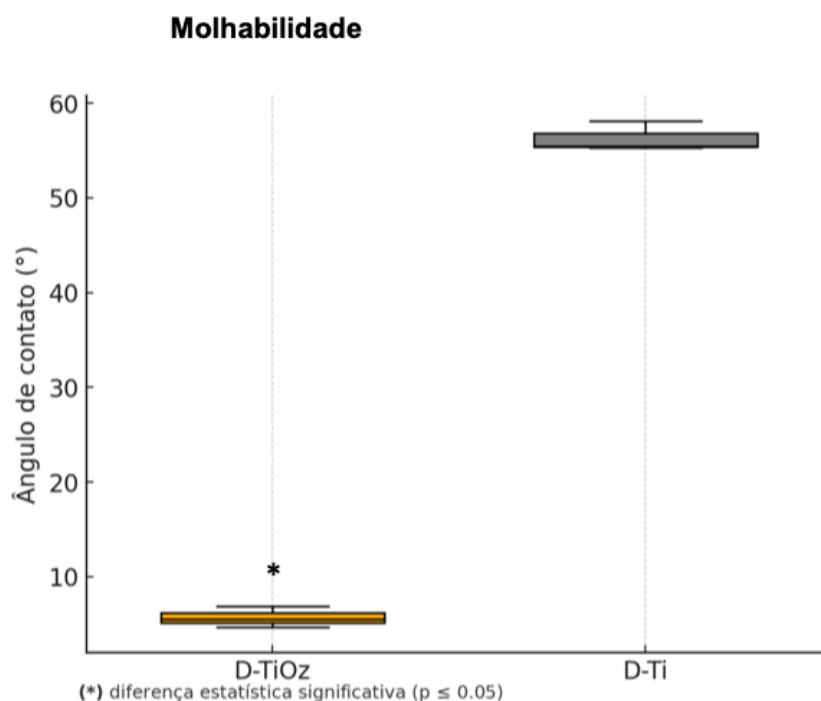


Figura 4. Gráfico de caixa dos ângulos de contato (°) para D-Ti vs. D-TiOz ($n = 75$); $*p < 0.05$.

3.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Com base nas imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de superfícies de titânio grau 5 sem (D-Ti) e com tratamento por ozônio (D-TiOz), segue a análise da morfologia superficial das amostras.

Análise de Superfície – MEV dos Discos D-Ti vs. D-TiOz

As imagens mostram as superfícies de ambos os grupos com ampliações progressivas: 200×, 500×, 1.000×, 3.000×.

A. D-Ti (Fig. 5a e 5b Linha Superior – Titânio apenas usinado)

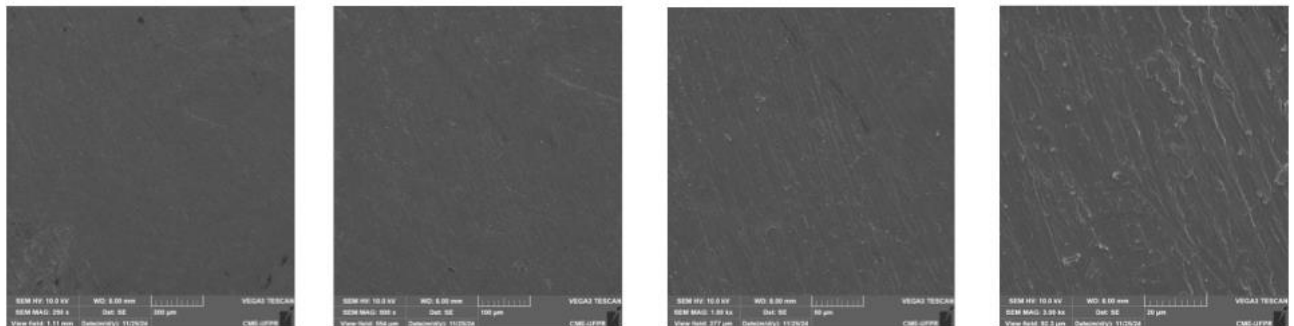
- A superfície apresenta um padrão de riscas paralelas regulares, típicas de usinagem mecânica, sem alterações aparentes na topografia entre as ampliações.
- O aspecto é relativamente liso e homogêneo, com baixa ondulação visível mesmo nas ampliações maiores.

- Não há presença de depósitos ou estruturas indicativas de modificação química ou topográfica secundária.
- A aparência das linhas indica baixa energia superficial e menor área de contato potencial para células ou proteínas.

B. D-TiOz (Fig. 5a e 5b Linha Inferior – Titânio usinado e tratado com ozônio na forma de gás)

- A morfologia geral se mantém similar à do grupo D-Ti nas menores ampliações (200x e 500x) **[figura 5a]** evidenciando que o ozônio não altera macroscopicamente os sulcos da usinagem.
- Contudo, nas ampliações de 1.000x e 3.000x **[figura 5b]**, observam-se modificações mais sutis:
 - Superfície com aspecto mais ondulado e levemente granulado;
 - Presença de microerosões e áreas com textura menos compacta, sugerindo aumento da energia superficial;

D-Ti



D-TiOz

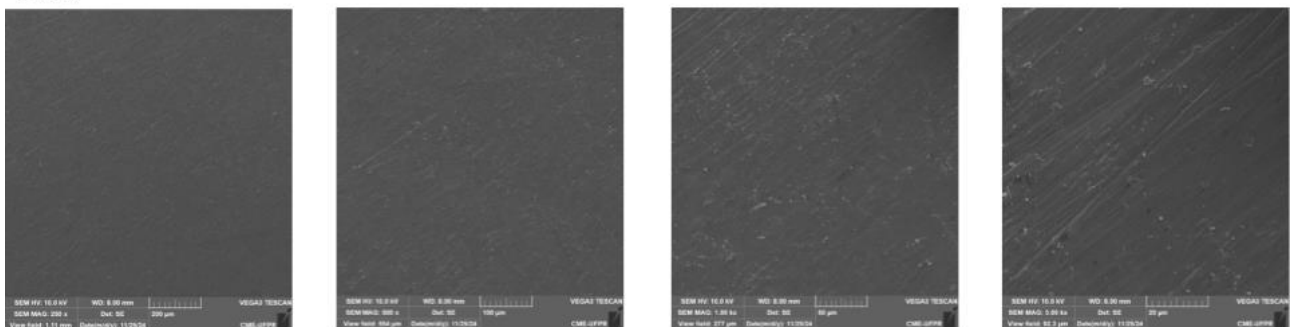


Figura 5a. Imagens de MEV de discos de Titânio apenas usinados D-Ti (linha superior) e discos usinados e tratados com ozônio D-TiOz (linha inferior), com ampliações progressivas (200×, 500×, 1000×, 3000×).

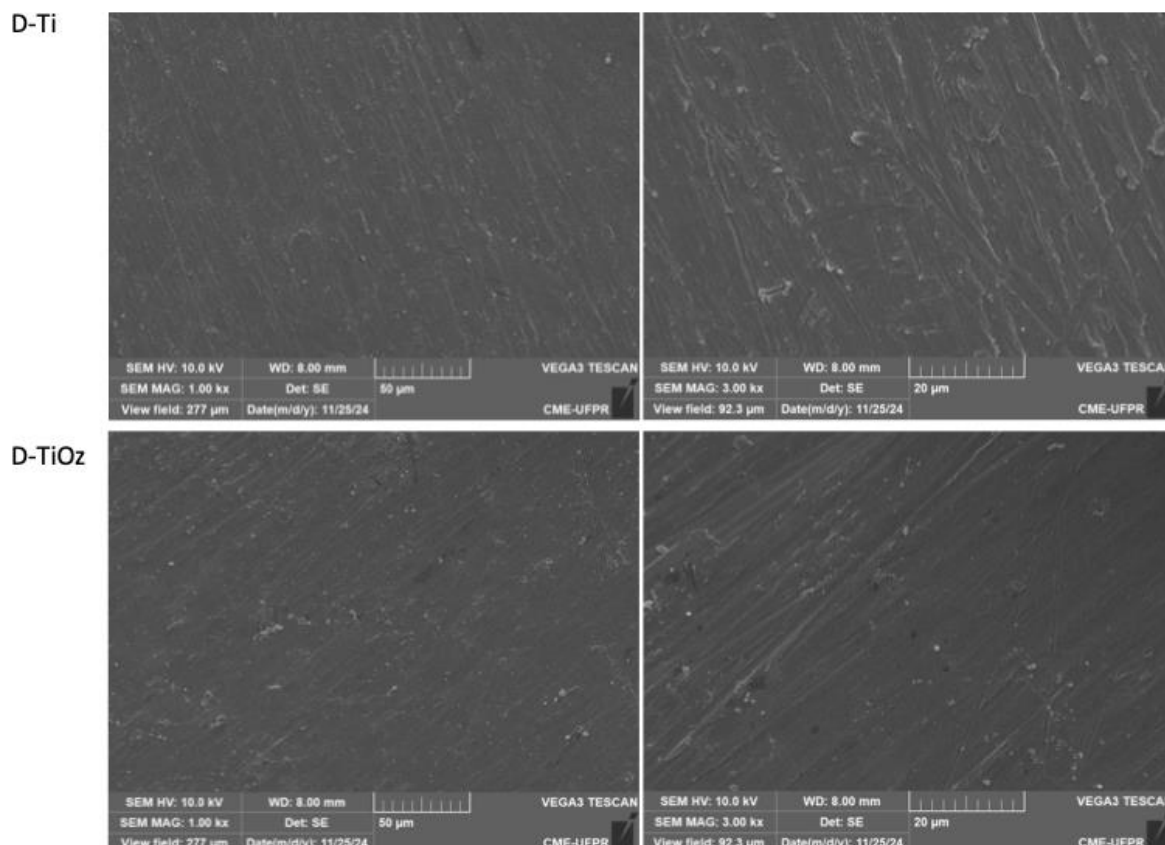


Figura 5b. Imagens de MEV de discos de Titânio apenas usinados D-Ti (linha superior) e discos usinados e tratados com ozônio D-TiOz (linha inferior), em ampliações maiores (1000× e 3000×).

3.3.3 Espectroscopia por Dispersão de Energia de Raios - X (EDS)

A caracterização elementar das superfícies foi realizada por meio de espectroscopia de dispersão de energia de raios X (EDS, *Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy*), técnica acoplada ao microscópio eletrônico de varredura (MEV). O método baseia-se na detecção dos raios X característicos emitidos pelos átomos constituintes do material quando excitados pelo feixe de elétrons incidentes. Cada elemento químico apresenta um conjunto específico de energias de emissão, que funcionam como uma “impressão digital” para sua identificação qualitativa e, em determinados contextos, também quantitativa.

Entre os diferentes picos gerados, destaca-se a linha **K α 1**, resultante da transição eletrônica de um elétron da camada L para a camada K, após a criação de uma vacância eletrônica na órbita mais interna. Essa linha é considerada a mais intensa e estável do espectro, sendo utilizada como principal referência para a identificação elementar devido à sua elevada intensidade e menor suscetibilidade a sobreposições espectrais.

Durante a aquisição espectral, entretanto, podem ocorrer artefatos conhecidos como **picos de soma** (*sum peaks*). Esses picos não correspondem a elementos químicos reais, mas

são formados quando dois fótons de raios X atingem o detector de forma quase simultânea. Nessa circunstância, o sistema interpreta erroneamente os sinais como um único fóton, cuja energia equivale à soma das duas energias originais. Consequentemente, esses picos surgem em regiões do espectro que correspondem aproximadamente ao dobro da energia de um pico verdadeiro, podendo levar a interpretações equivocadas caso não sejam devidamente reconhecidos.

A análise dos espectros obtidos permitiu identificar os elementos presentes na superfície dos discos de titânio, bem como avaliar a influência do tratamento por ozônio em comparação ao grupo usinado. Os espectros foram interpretados levando-se em consideração tanto as linhas características mais intensas (com destaque para as transições $K\alpha_1$) quanto a possibilidade de ocorrência de picos de soma, garantindo uma interpretação acurada dos resultados.

Os discos de Titânio tratados com ozônio (D-TiOz) apresentaram uma diminuição dos átomos de Titânio (Ti) e Carbono (C) e um aumento dos átomos de Oxigênio (O) quando comparados ao grupo com os discos de Titânio apenas usinados (D-Ti) [Figuras 6, 7 e 8].

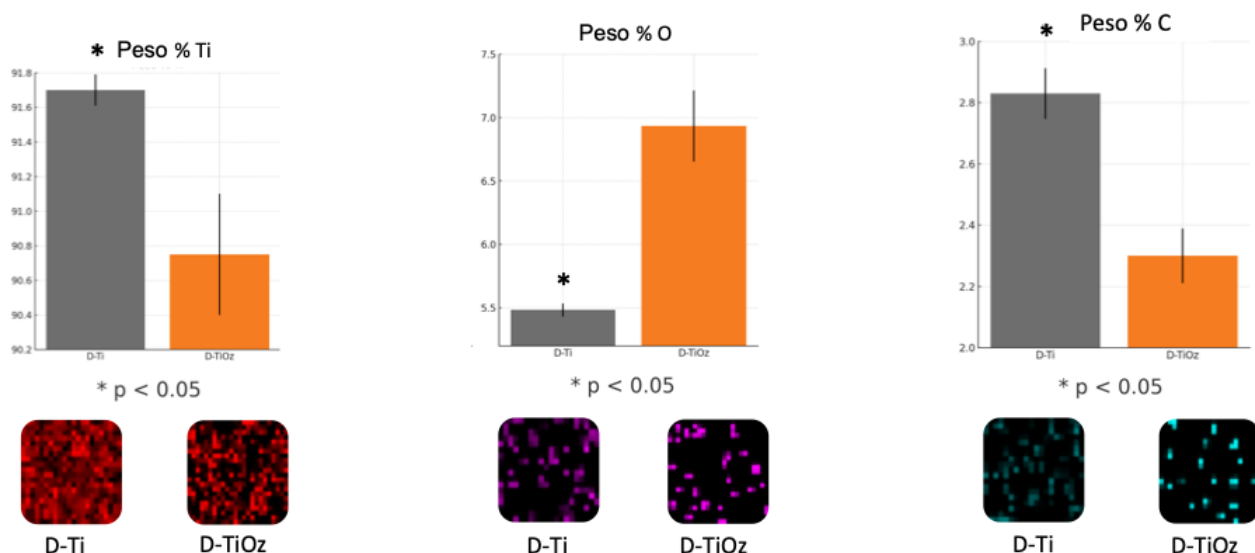


Figura 6. Porcentagem do peso das amostras de titânio sem exposição ao ozônio (D-Ti) e com exposição ao ozônio (D-TiOz) referente aos elementos químicos Titânio (Ti), Oxigênio (O) e Carbono (C), respectivamente. Análise estatística e desvio padrão (std). Linha inferior - Identificação da porcentagem do peso das amostras referente aos elementos químicos pela linha de referência $K\alpha_1$.

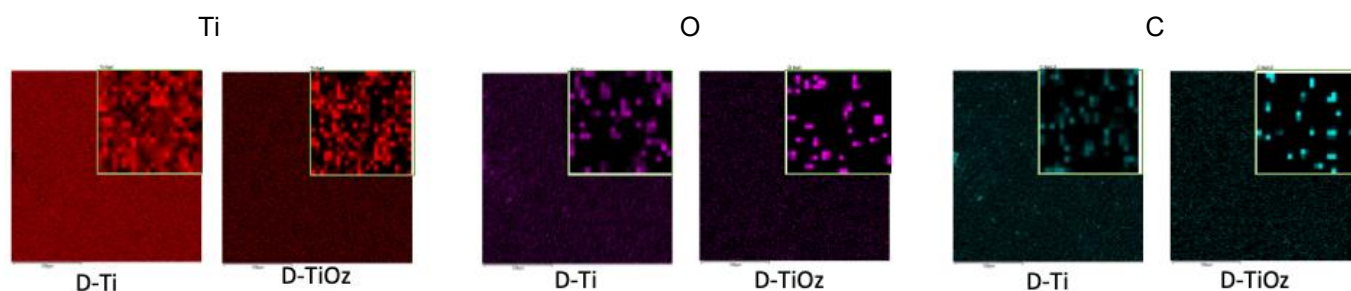


Figura 7. Identificação da porcentagem do peso das amostras de titânio sem exposição ao ozônio (D-Ti) e com exposição ao ozônio (D-TiOz) referente aos elementos químicos Titânio (Ti), Oxigênio (O) e Carbono (C), respectivamente pela linha de referência **K α 1**.

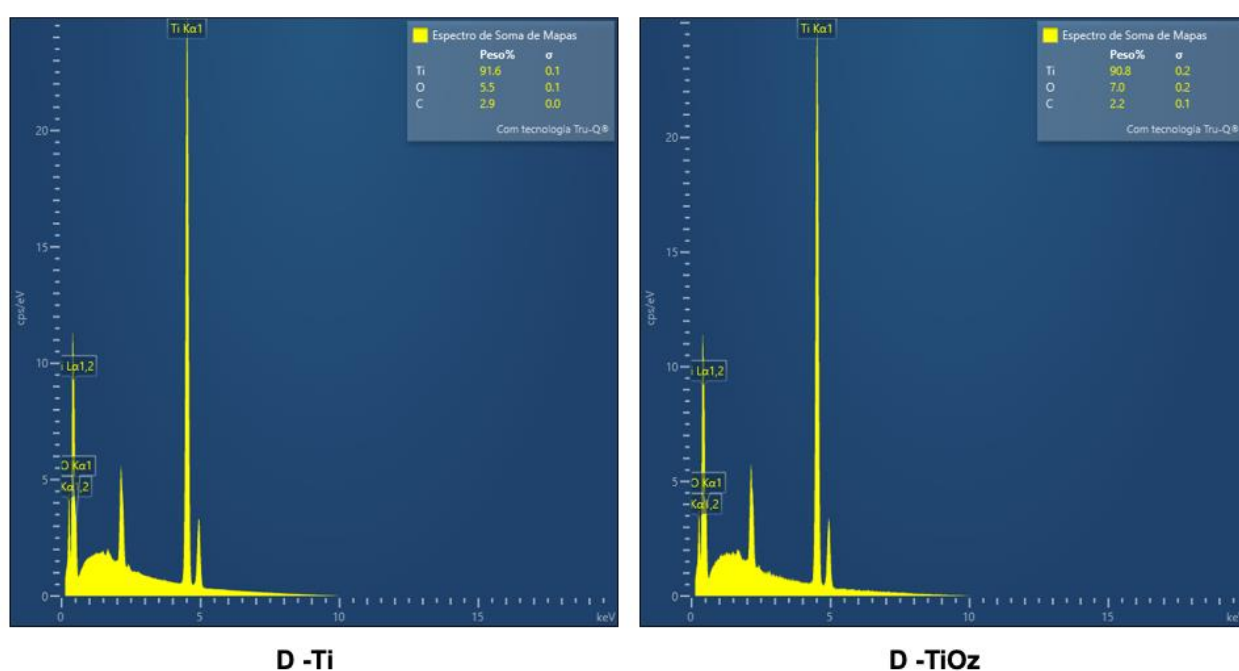


Figura 8. Picos de Soma mostrando as porcentagens do peso das amostras de titânio sem exposição ao ozônio (D-Ti) e com exposição ao ozônio (D-TiOz) referente aos elementos químicos Titânio (Ti), Oxigênio (O) e Carbono (C), respectivamente, obtidos pelo EDS pela linha de referência **K α 1**.

As análises de sobreposição de elementos químicos de Manders M1, Manders M2 e Pearson r apresentaram os resultados descritos na **figura 9**.

A análise de colocação dos elementos de superfície foi realizada a partir dos mapas obtidos por EDS, com quantificação expressa pelos coeficientes de Manders (M1 e M2) e Pearson (r). As **figuras 10 e 11** apresentam as médias e desvios padrão desses coeficientes para as combinações Ti + O, Ti + C e O + C nos discos de titânio apenas usinados (D-Ti) e tratados com ozônio (D-TiOz), respectivamente.

Os resultados indicaram que, para ambas as amostras, os coeficientes de Pearson permaneceram elevados ($>0,79$), demonstrando forte correlação espacial entre os elementos analisados. No entanto, diferenças sutis foram observadas entre os grupos,

especialmente nas combinações que envolvem oxigênio e carbono. O tratamento com ozônio resultou em leve aumento da correlação Ti + O ($0,827 \pm 0,087$) em comparação ao grupo usinado ($0,809 \pm 0,068$), enquanto o teor relativo de carbono apresentou ligeira redução.

A Tabela 2 resume a comparação quantitativa entre os grupos. Observou-se que as amostras tratadas com ozônio apresentaram menor colocação entre Ti e C, expressa por reduções nos valores de Manders M1 e M2, e maior correlação entre Ti e O, evidenciando o enriquecimento oxidativo da superfície após o tratamento. Em contraste, o grupo D-Ti apresentou maiores valores de colocação entre carbono e oxigênio, sugerindo maior presença de contaminantes orgânicos.

Esses resultados confirmam que o ozônio promoveu modificações químicas discretas, porém significativas, na camada superficial do titânio, associadas à remoção de resíduos carbonados e ao aumento da fração oxidada (TiO_2), preparando a superfície para melhor interação com o meio biológico.

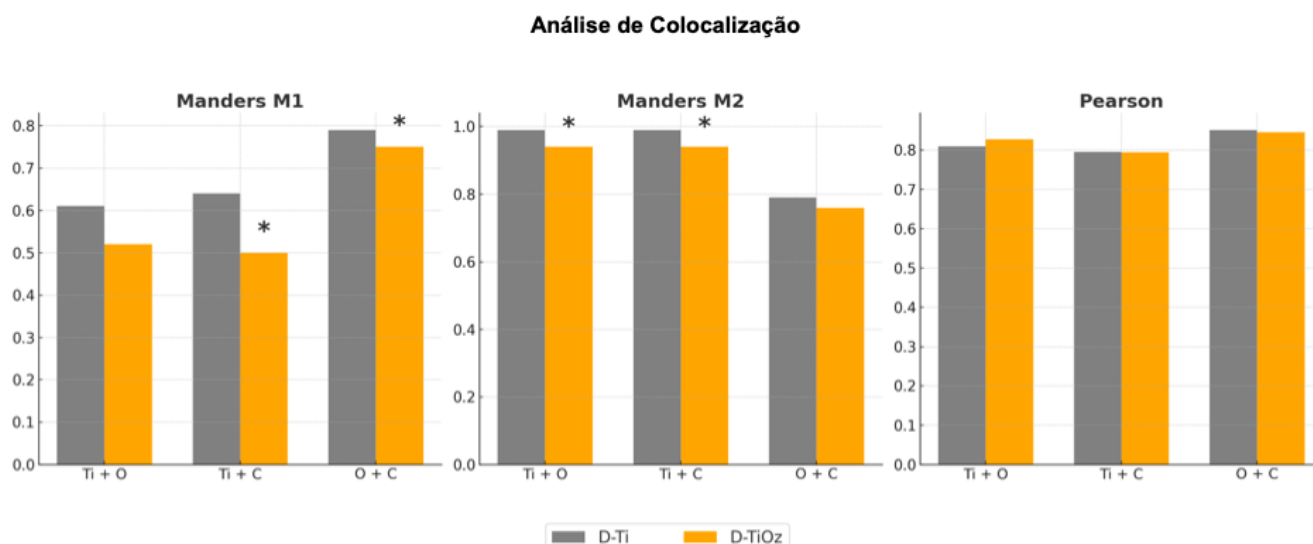


Figura 9. Gráfico da comparação entre a sobreposição dos componentes químicos obtidos no EDS nos grupos D-Ti e D-TiOz. Análise de colocalização: Manders M1, M2 and Pearson para Ti+O, Ti+C, O+C em D-Ti e D-TiOz (n = 12); *p < 0.05.

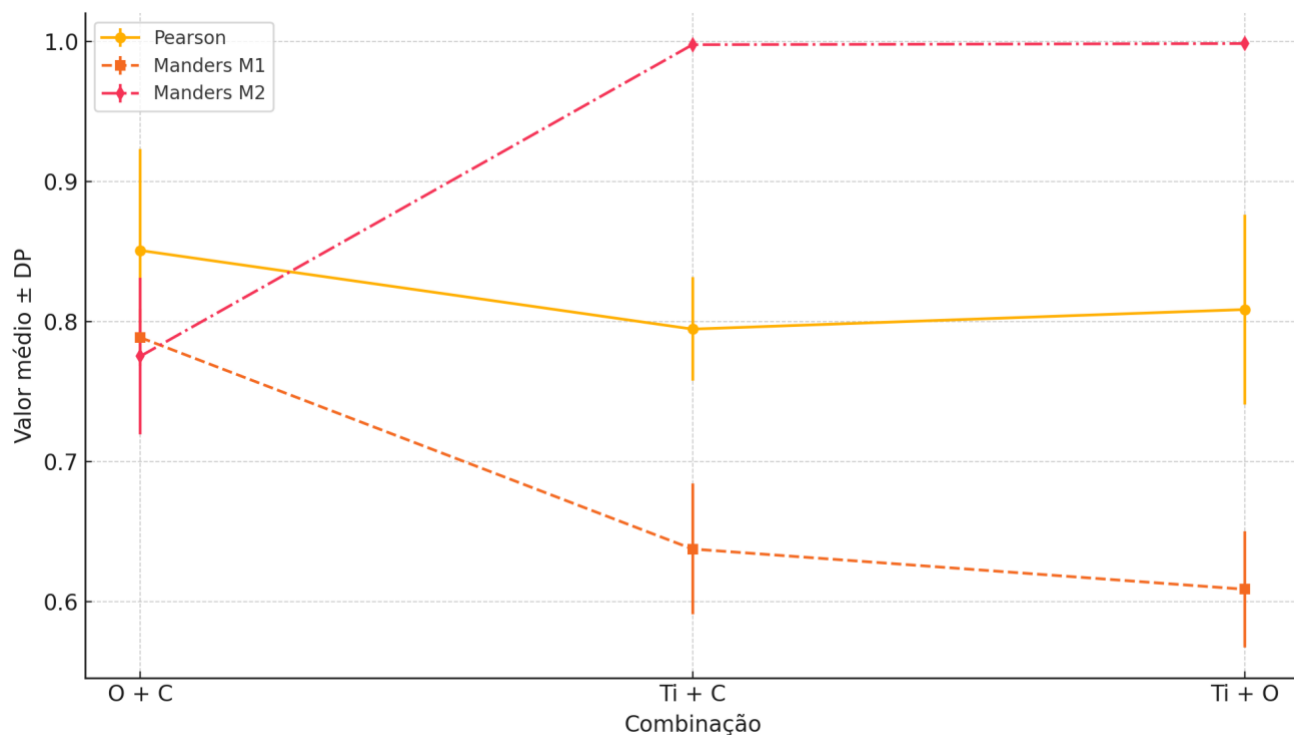


Figura 10. Gráfico representando a Média e Desvio Padrão dos coeficientes de colocalização por combinação dos discos de titânio somente usinados (D-Ti).

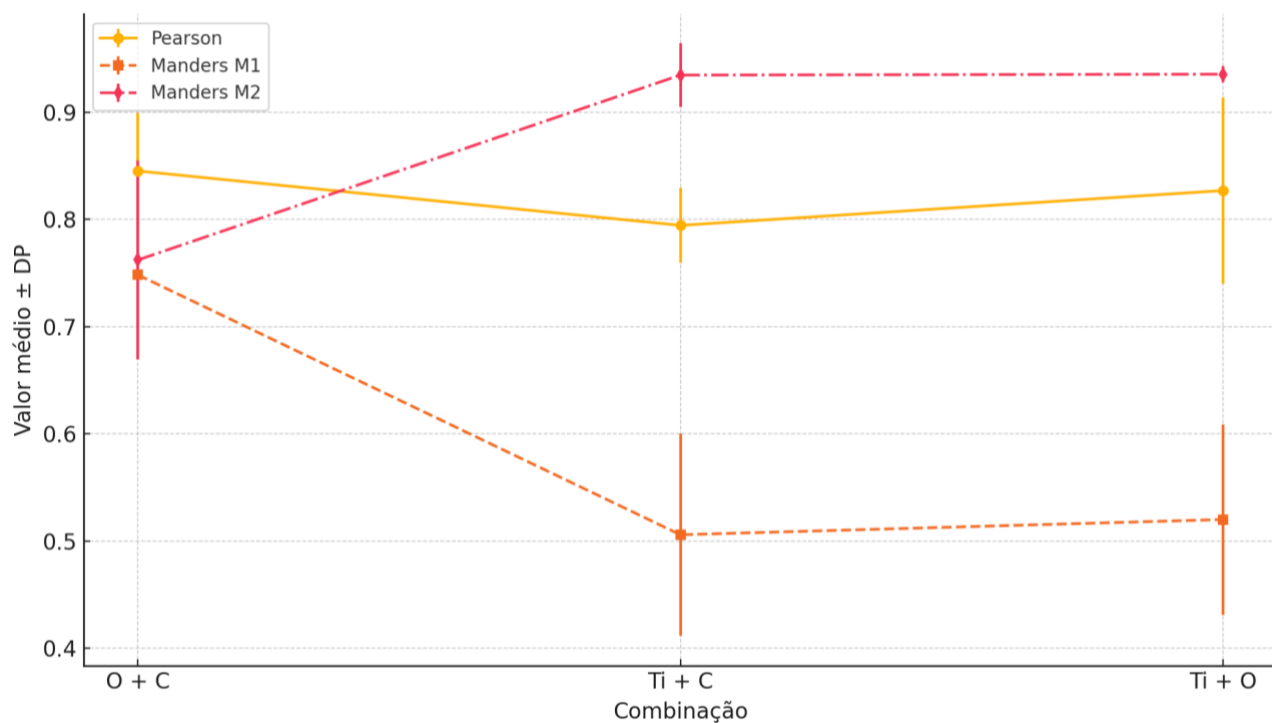


Figura 11. Gráfico representando a Média e Desvio Padrão dos coeficientes de colocalização por combinação dos discos de titânio expostos ao ozônio (D-TiOz).

Tabela 2. Comparativo: Titânio exposto ao Ozônio vs. Titânio Usinado

Combinação	Pearson Média (Ozônio)	Pearson Média (Usinado)	M1 Média (Ozônio)	M1 Média (Usinado)	M2 Média (Ozônio)	M2 Média (Usinado)
Ti + O	0.827 ± 0.087	0.809 ± 0.068	0.520	0.609	0.935	0.999
Ti + C	0.794 ± 0.035	0.795 ± 0.037	0.506	0.637	0.935	0.998
O + C	0.845 ± 0.054	0.851 ± 0.073	0.748	0.789	0.762	0.775

Análise Interpretativa dos Resultados do Experimento:

◆ Ti + O (Titânio e Oxigênio)

- Apesar de ambos apresentarem correlação alta com Pearson (>0.80), o grupo com ozônio tem um desvio padrão maior, indicando variação entre os grupos tratados.
- A Média de Pearson é levemente maior com ozônio (0.827 vs 0.809), sugerindo que a oxidação promovida pelo ozônio é mais ordenada e localizada.
- O valor de Manders M2 é praticamente igual a 1 nas amostras usinadas, o que indica que quase todo o oxigênio está sobre o titânio, mas não necessariamente como TiO_2 , pois a correlação linear é levemente menor do que com ozônio.

◆ Ti + C (Titânio e Carbono)

- Ambos os grupos apresentam Pearson similar (~ 0.794).
- O Manders M1 e M2 são consideravelmente maiores nas amostras usinadas, sugerindo maior presença de carbono colocalizado com titânio, provavelmente por contaminações superficiais não removidas sem ozônio.

◆ O + C (Oxigênio e Carbono)

- Curiosamente, a correlação é levemente maior nas amostras usinadas (0.851 vs 0.845), com maiores valores de Manders M1/M2 — indício de contaminações orgânicas superficiais persistentes, que podem ser removidas parcialmente pelo ozônio.

Tabela 3. Diferença Estatística entre Amostras de Titânio exposto ao Ozônio vs. Titânio Usinado

Combinação	Métrica	Diferença Significativa?
Ti + O	Manders M2	✓ Sim ($p = 0,000004$)
Ti + C	Manders M1	✓ Sim ($p = 0,018$)
Ti + C	Manders M2	✓ Sim ($p = 0,003$)
O + C	Manders M1	✓ Sim ($p = 0,0096$)

3.4 DISCUSSÃO

O presente estudo buscou comparar, de maneira sistemática, as características físico-químicas e os potenciais impactos biológicos de discos de titânio grau 5 apenas usinados (D-Ti) e daqueles submetidos adicionalmente ao tratamento com gás ozônio (D-TiOz).

Os resultados evidenciaram diferenças significativas entre os grupos avaliados, demonstrando que o ozônio promove alterações químicas e topográficas que podem ser determinantes para melhorar a resposta celular e, conseqüentemente, a osseointegração, processo já descrito desde os estudos pioneiros de Brånemark sobre ancoragem intraóssea de próteses dentárias [4].

3.4.1. Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV): Micro e nanotopografia

As imagens obtidas por MEV revelaram diferenças marcantes entre os discos apenas usinados e aqueles tratados com ozônio.

- Superfícies usinadas (D-Ti): apresentaram topografia relativamente lisa, com presença clara de ranhuras paralelas resultantes do processo de fresagem mecânica. Essa configuração é descrita na literatura como característica das superfícies usinadas, que embora apresentem boa biocompatibilidade [3,9,25], oferecem estímulo limitado para adesão celular precoce e diferenciação osteoblástica [2,21].

- Superfícies tratadas com ozônio (D-TiOz): além das marcas da usinagem, observou-se formação de irregularidades nanométricas mais evidentes, possivelmente relacionadas à ação oxidativa do ozônio sobre a camada de óxido de titânio. Alterações discretas em nanotopografia já são conhecidas por influenciar a adesão celular e a organização do citoesqueleto [6,10,17].

3.4.2. Análise por Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS): Composição

elementar

A espectroscopia de energia dispersiva confirmou que o tratamento com ozônio altera de forma consistente a composição superficial.

- D-Ti: apresentaram espectros dominados pelo titânio e oxigênio, mas com picos significativos de carbono, resultado da adsorção de hidrocarbonetos ambientais, processo já relatado como “envelhecimento biológico” das superfícies de titânio [24]. Esse fenômeno leva à redução da energia superficial e da hidrofobicidade, prejudicando a adsorção proteica e a interação celular [6,22,62].

- D-TiOz: após o tratamento, verificou-se aumento relativo dos picos de oxigênio e significativa redução do carbono, o que demonstra o poder oxidativo do ozônio na remoção de contaminantes [11,12,13,16]. Esse processo torna a superfície mais reativa novamente, expondo grupos funcionais do óxido de titânio (TiO₂) capazes de interagir mais efetivamente com proteínas da matriz extracelular e com células osteoblásticas [7,45].

Esses achados corroboram a hipótese de que o ozônio atua como agente de limpeza química, restabelecendo propriedades favoráveis à osseointegração [14,44].

3.4.3. Molhabilidade: Ângulo de contato

A análise da molhabilidade demonstrou diferenças significativas entre os grupos.

D-Ti: apresentaram ângulos de contato elevados, compatíveis com superfícies hidrofóbicas. Essa característica decorre da contaminação por carbono [24,62] e da relativa suavidade topográfica. Superfícies hidrofóbicas levam à adsorção desordenada de proteínas, prejudicando o reconhecimento por integrinas e reduzindo a adesão celular [6,31].

D-TiOz: o tratamento promoveu superfícies altamente hidrofílicas, com ângulos de contato significativamente menores. O aumento da molhabilidade está associado à maior energia superficial e favorece não apenas a adsorção proteica, mas também a formação do coágulo inicial e o recrutamento celular [7,8,31,32]. Esses resultados confirmam achados prévios de que superfícies ativadas por ozônio tornam-se super-hidrofílicas e biologicamente mais responsivas [11,12,45].

No entanto, é importante ressaltar, contudo, que o efeito hidrofílico promovido por tratamentos oxidativos como UV e ozônio é reconhecidamente transitório, podendo persistir apenas por horas a poucos dias antes de ocorrer a recontaminação por hidrocarbonetos atmosféricos (Att 2009; Iwasa 2013) [91,92]. Assim, a avaliação da molhabilidade foi realizada imediatamente após o tratamento, condição em que a hidrofília atinge seu pico e representa o efeito máximo da superfície ativada. Além disso, cabe destacar a variabilidade observada entre os discos dentro de cada grupo. Embora a tendência geral tenha sido consistente (hidrofobicidade elevada em D-Ti e hidrofília acentuada em D-TiOz), pequenas variações individuais foram registradas. Essa variabilidade é esperada em superfícies metálicas usinadas e pode refletir diferenças microscópicas locais, microtopografia heterogênea e graus distintos de recontaminação superficial. A apresentação dessa variação reforça a robustez dos achados e demonstra que o efeito observado não se restringiu a amostras isoladas, mas representou um comportamento reprodutível dentro de cada condição experimental.

3.4.4. Correlação de elementos: Coeficientes de Manders e Pearson

As análises quantitativas de colocalização mostraram diferenças importantes na distribuição de elementos.

- **Ti + O**: maior correlação nos discos D-TiOz, indicando camada de óxido mais

homogênea. Esse achado reforça o papel do ozônio na oxidação e reorganização da superfície [11,12].

- **Ti + C**: valores reduzidos após o tratamento, o que confirma a eliminação de carbono e consequente exposição do óxido de titânio puro [24,62].

- **O + C**: correlação alta em superfícies usinadas, compatível com camadas contaminadas; após o ozônio, houve queda acentuada, indicando superfície mais limpa.

Esses resultados, analisados por coeficientes consolidados como os de Manders e Pearson [84,85], dão suporte quantitativo ao efeito de limpeza e ativação promovido pelo ozônio.

3.4.5. Interpretação integrada

Ao integrar os resultados das quatro metodologias, obtém-se o seguinte panorama:

- a.** O ozônio gera irregularidades nanométricas que favorecem interações celulares [6,10,17,29].
- b.** Remove contaminantes de carbono e aumenta a presença de oxigênio superficial [11,12,16,24].
- c.** Transforma superfícies hidrofóbicas em hidrofílicas, com maior energia de superfície [7,8,31,45].
- d.** Reorganiza a distribuição elementar, promovendo interação mais estável Ti–O e reduzindo Ti–C e O–C [84,85].

Essas mudanças convergem para criar uma superfície mais bioativa, capaz de acelerar o processo de osseointegração [2,21,25,32,34].

3.4.6. Implicações biológicas e clínicas

Do ponto de vista biológico, superfícies ozonizadas favorecem adsorção proteica em conformações bioativas, promovem adesão celular eficiente e aceleram o processo de osseointegração [6,7,10,33]. Clinicamente, isso significa maior previsibilidade em protocolos de carga imediata e potencial benefício em pacientes com comprometimento sistêmico, nos quais a cicatrização óssea é mais lenta [15,27,32].

O uso do ozônio em odontologia já é consolidado como agente antimicrobiano [14,47,48], e sua aplicação em superfícies de titânio surge como alternativa simples e de baixo custo para otimizar implantes e outras órteses e próteses [11,12,44].

3.4.7. Comparação com a literatura e limitações

Os achados estão alinhados com estudos que apontam o ozônio como modificador eficaz de superfícies de titânio [11,12,45]. No entanto, ainda há grande heterogeneidade metodológica na literatura quanto a concentrações, tempos de exposição e formas de aplicação [16,44]. Essa falta de padronização dificulta a definição de protocolos clínicos universais.

Limitações do presente estudo incluem a ausência de avaliação direta da resposta celular e tecidual. Embora as análises físico-químicas sejam preditoras confiáveis, ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo* são necessários para confirmação dos efeitos [61,62,63]. Além disso, a durabilidade do efeito do ozônio frente ao “envelhecimento” biológico das superfícies, ou seja, fatores que as tornam menos reativa, com maior porcentagem de átomos de Carbono e outros contaminantes, precisa ser melhor investigada [24].

3.5 CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que o tratamento com gás ozônio é capaz de modificar de maneira consistente as propriedades físico-químicas e biológicas do titânio grau 5. As alterações observadas — incluindo aumento da hidrofília, redução de contaminantes orgânicos e formação de discretas nanoestruturas — não apenas foram estatisticamente significativas, mas também biologicamente relevantes, uma vez que impactaram diretamente a resposta das células osteoblásticas. O grupo tratado com ozônio apresentou maior adesão, proliferação, migração, atividade osteogênica e expressão gênica associada à diferenciação celular, indicando que essas modificações superficiais potencializam etapas iniciais fundamentais para a osseointegração. Do ponto de vista translacional, o método apresenta vantagens importantes: é simples, reproduzível e não demanda equipamentos de alto custo, o que sugere viabilidade para uso clínico e para reativação de implantes previamente armazenados. No entanto, a aplicação prática requer padronização de protocolos, definição da duração real do efeito hidrofílico e avaliação da estabilidade da superfície após o tratamento, especialmente considerando o caráter transitório da ativação química promovida pelo ozônio. Como limitações, destaca-se que o estudo foi conduzido em condições *in vitro*, não permitindo extrapolar integralmente os resultados para ambientes biológicos complexos. Assim, futuras investigações devem incluir análises *in vivo*, ensaios de osseointegração sob carga funcional, testes clínicos controlados e comparações diretas entre diferentes métodos de ativação superficial. Estudos adicionais sobre os mecanismos moleculares envolvidos, particularmente das vias de sinalização osteogênicas, também podem aprofundar a compreensão dos efeitos observados. Em síntese, os achados indicam que o tratamento com gás ozônio representa uma estratégia promissora para melhorar a bioatividade do titânio e otimizar a integração osso-implante, abrindo possibilidades reais para aplicações em implantodontia, ortopedia e cirurgia bucomaxilofacial, desde que validado por estudos experimentais e clínicos adicionais.

3.6 REFERÊNCIAS

1. NAVARRO, M.; MICHIARDI, A.; CASTAÑO, O.; PLANELL, J. A. Biomaterials in orthopaedics. *J R Soc Interface*, v. 5, p. 1137–1158, 2008.
2. SCHWARTZ, Z.; KIESWETTER, K.; DEAN, D. D.; BOYAN, B. D. Underlying mechanisms at the bone-surface interface during regeneration. *J Periodontal Res*, v. 32, p. 166–171, 1997.
3. LEVENTHAL, G. S. Titanium, a metal for surgery. *J Bone Joint Surg Am*, v. 33, n. 2, p. 473–474, 1951.
4. BRÅNEMARK, P. I.; BREINE, U.; LINDSTRÖM, J.; et al. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg*, v. 3, p. 81–100, 1969.
5. TAKEMOTO, M.; FUJIBAYASHI, S.; NEO, M.; SUZUKI, J.; KOKUBO, T.; NAKAMURA, T. Mechanical properties and osteoconductivity of porous bioactive titanium. *Biomaterials*, v. 26, n. 30, p. 6014–6023, 2005.
6. ZHAO, G.; SCHWARTZ, Z.; WIELAND, M.; et al. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J Biomed Mater Res A*, v. 74, n. 1, p. 49–58, 2005.
7. AITA, H.; HORI, N.; TAKEUCHI, M.; SUZUKI, T.; YAMADA, M.; ANPO, M.; et al. The effect of ultraviolet functionalization of titanium on integration with bone. *Biomaterials*, v. 30, n. 6, p. 1015–1025, 2009.
8. TSUKIMURA, N.; YAMADA, M.; IWASA, F.; MINAMIKAWA, H.; ATT, W.; UENO, T.; et al. Synergistic effects of UV photofunctionalization and micro-nano hybrid topography on the biological properties of titanium. *Biomaterials*, v. 32, n. 19, p. 4358–4368, 2011.
9. WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T. Suggested guidelines for the topographic evaluation of implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 15, p. 331–334, 2000.
10. LUMETTI, S.; MANFREDI, E.; FERRARIS, S.; SPRIANO, S.; PASSERI, G.; GHIACCI, G.; MACALUSO, G.; GALLI, C. The response of osteoblastic MC3T3-E1 cells to micro-

and nano-textured, hydrophilic and bioactive titanium surfaces. *J Mater Sci Mater Med*, v. 27, p. 68–76, 2016.

11. SUNARSO; et al. A superhydrophilic titanium implant functionalized by ozone gas modulates bone marrow cell and macrophage responses. *J Mater Sci: Mater Med*, v. 27, p. 127, 2016.

12. YUANYUAN, Y.; et al. UV/ozone irradiation manipulates immune response for antibacterial activity and bone regeneration on titanium. *Mater Sci Eng C*, v. 129, p. 112377, 2021.

13. BOCCI, V. A. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Riv. Ital. di Ossigeno-Ozonoterapia*, v. 5, n. 2, p. 93–104, 2006.

14. STÜBINGER, S.; SADER, R.; FILIPPI, A. The use of ozone in dentistry and maxillofacial surgery: a review. *Quintessence Int*, v. 37, p. 353–359, 2006.

15. RAGHAVENDRA, S.; WOOD, M. C.; TAYLOR, T. D. Early wound healing around endosseous implants: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 20, n. 3, p. 425–431, 2005.

16. BOCCI, V.; BORRELLI, E.; TRAVAGLI, V.; ZANARDI, I. The ozone paradox: Ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. *Med Res Rev*, v. 29, n. 4, p. 646–682, 2009.

17. THOMAS, T. R. Characterization of surface roughness. *Precision Eng*, v. 3, n. 2, p. 97–104, 1981.

18. SCHROEDER, A.; et al. The reactions of bone, connective tissue, and epithelium to endosteal implants with titanium-sprayed surfaces. *J Maxillofac Surg*, v. 9, p. 15–25, 1981.

19. MANIATOPOULOS, C.; PILLIAR, R. M.; SMITH, D. C. Threaded versus porous-surfaced designs for implant stabilization in bone—endodontic implant model. *J Biomed Mater Res*, v. 20, n. 9, p. 1309–1333, 1986.

20. TAKATORI, Y.; et al. Plasma sprayed calcium phosphate coatings for bone integration. *J Biomed Mater Res*, v. 21, n. 12, p. 1375–1385, 1987.

21. PULEO, D. A.; NANJI, A. Understanding and controlling the bone–implant interface. *Biomaterials*, v. 20, p. 2311–2321, 1999.
22. OSTBERG, A. K.; DAHLGREN, U.; SUL, Y. T.; JOHANSSON, C. B. Inflammatory cytokine release is affected by surface morphology and chemistry of titanium implants. *J Mater Sci Mater Med*, v. 26, p. 155–163, 2015.
23. WENNERBERG, A.; BOUGAS, K.; JIMBO, R.; ALBREKTSSON, T. Implant coatings: new modalities for increased osseointegration. *Am J Dent*, v. 26, n. 2, p. 105–112, 2013.
24. LEE, J. H.; OGAWA, T. The biological aging of titanium implants. *Implant Dent*, v. 21, n. 5, p. 415–421, 2012.
25. BUSER, D.; et al. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants: a histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res*, v. 25, n. 7, p. 889–902, 1991.
26. ZANIVAN, D. S.; ELIAS, C. N.; DARÓZ, S. R. Análise da superfície de fratura de implante osseointegrado e mecanismos envolvidos na cicatrização. *Rev ImplantNews*, v. 6, n. 1, p. 39–46, 2009.
27. JAVED, F.; et al. Implant surface morphology and primary stability: is there a connection? *Implant Dent*, v. 20, n. 1, p. 40–46, 2011.
28. BRENTTEL, A. S.; et al. Histomorphometric analysis of pure titanium implants with porous surface versus rough surface. *J Appl Oral Sci*, v. 14, n. 3, p. 213–218, 2006.
29. WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*, v. 20, suppl. 4, p. 172–184, 2009.
30. WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T. Implant surfaces beyond micron roughness: experimental and clinical knowledge of surface topography and surface chemistry. *Inter Dent SA*, v. 8, p. 14–18, 2006.
31. LANG, N. P.; et al. Early osseointegration to hydrophilic and hydrophobic implant surfaces in humans. *Clin Oral Implants Res*, v. 22, p. 349–356, 2011.

32. NOVAES JR, A. B.; et al. Influence of implant surfaces on osseointegration. *Braz Dent J*, v. 21, n. 6, p. 471–481, 2010.
33. BARROS, R. R. M.; et al. Biofunctionalized implant surface. *Braz Dent J*, v. 20, n. 2, p. 91–98, 2009.
34. BUSER, D.; et al. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res*, v. 83, n. 7, p. 529–533, 2004.
35. WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T.; LAUSAMAA, J. Torque and histomorphometric evaluation of c.p. titanium screws blasted with 25 and 75 μm sized particles of Al_2O_3 . *J Biomed Mater Res*, v. 30, p. 251–260, 1996.
36. MALUF, P. S. Z.; et al. Vantagens do tratamento de superfície a laser em implantes dentais osseointegráveis. *ImplantNews*, v. 4, n. 6, p. 643–646, 2007.
37. CARLSSON, L. V.; ALBREKTSSON, T.; BERMAN, C. Bone response to plasma-cleaned titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 4, n. 3, p. 199, 1989.
38. FEIGHAN, J. E.; et al. The influence of surface-blasting on the incorporation of titanium-alloy implants in a rabbit intramedullary model. *J Bone Joint Surg Am*, v. 77, n. 9, p. 1380–1395, 1995.
39. MUSTAFA, K.; et al. Attachment and proliferation of human oral fibroblasts to titanium surfaces blasted with TiO_2 particles: a SEM and histomorphometric analysis. *Clin Oral Implants Res*, v. 9, n. 3, p. 195–207, 1998.
40. IVANOFF, C.; et al. Histologic evaluation of the bone integration of TiO_2 blasted and turned titanium microimplants in humans. *Clin Oral Implants Res*, v. 12, n. 2, p. 128–134, 2001.
41. BABBUSH, C. A.; KENT, J. N.; MISIEK, D. J. Titanium plasma-sprayed (TPS) screw implants for reconstruction of the edentulous mandible. *J Oral Maxillofac Surg*, v. 44, n. 4, p. 274–282, 1986.
42. DE GROOT, K.; et al. Plasma sprayed coatings of hydroxylapatite. *J Biomed Mater Res*, v. 21, n. 12, p. 1375–1381, 1987.

43. DOHAN EHRENFEST, D. M.; et al. Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography. *Trends Biotechnol*, v. 28, n. 4, p. 198–206, 2010.
44. BOCCI, V.; ZANARDIA, I.; VALACCHI, G.; BORRELLI, E.; TRAVAGLI, V. Validity of oxygen-ozone therapy as integrated medication form in chronic inflammatory diseases. *Cardiovasc Hematol Disord Targets*, v. 15, n. 2, p. 127–138, 2015.
45. LINDERBACK, P.; HARMANKAYA, N.; ASKENDAL, A.; AREVA, S.; LAUSMAA, J.; TENGVALL, P. The effect of heat- or ultraviolet ozone-treatment of titanium on complement deposition from human blood plasma. *Biomaterials*, v. 31, p. 4795–4801, 2010.
46. DE OLIVEIRA, R. R.; SCHWARTZ-FILHO, H. O.; NOVAES, A. B.; GARLET, G. P.; FREITAS DE SOUZA, R.; TABA, M.; et al. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: cytokine profile in gingival crevicular fluid—preliminary results. *J Periodontol*, v. 80, n. 1, p. 98–105, 2009.
47. NOGALES, C. G.; FERREIRA, M. B.; MONTEMOR, A. F.; RODRIGUES, M. F. A.; LAGE-MARQUES, J. L.; ANTONIAZZI, J. H. Ozone therapy as an adjuvant for endodontic protocols: microbiological—ex vivo study and cytotoxicity analyses. *J Appl Oral Sci*, v. 24, n. 6, p. 607–613, 2016.
48. GLÓRIA, J. C. R.; DOUGLAS-DE-OLIVEIRA, D. W.; E SILVA, L. D. A.; FALCI, S. G. M.; DOS SANTOS, C. R. R. Influence of ozonized water on pain, oedema, and trismus during impacted third molar surgery: a randomized, triple-blind clinical trial. *BMC Oral Health*, v. 20, n. 1, p. 1–9, 2020.
49. PATEL, P. V.; KUMAR, S.; VIDYA, G. D.; PATEL, A.; HOLMES, J. C.; KUMAR, V. Cytological assessment of healing palatal donor site wounds and grafted gingival wounds after application of ozonated oil: an eighteen-month randomized controlled clinical trial. *Acta Cytol*, v. 56, n. 3, p. 277–284, 2012.
50. PATEL, P. V.; KUMAR, V.; KUMAR, S.; VIDYA, G. D.; PATEL, A. Therapeutic effect of topical ozonated oil on the epithelial healing of palatal wound sites: a planimetric and cytological study. *J Investig Clin Dent*, v. 2, n. 4, p. 248–258, 2011.
51. MOHER, D.; LIBERATI, A.; TETZLAFF, J.; ALTMAN, D. G. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses (PRISMA) statement. *PLoS Med*, v. 6, n. 7, e1000097, 2009. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.1000097>. Acesso em: 13 maio 2020.

52. OUZZANI, M.; HAMMADY, H.; FEDOROWICZ, Z.; ELMAGARMID, A. Rayyan: a web and mobile app for systematic reviews. *Syst Rev*, v. 5, n. 1, 2016.
53. TU, M. G.; CHEN, Y. W.; SHIE, M. Y. Macrophage-mediated osteogenesis activation in co-culture with osteoblast on calcium silicate cement. *J Mater Sci Mater Med*, v. 26, p. 276–285, 2015.
54. OSTBERG, A. K.; DAHLGREN, U.; SUL, Y. T.; JOHANSSON, C. B. Inflammatory cytokine release is affected by surface morphology and chemistry of titanium implants. *J Mater Sci Mater Med*, v. 26, p. 155–163, 2015.
55. SILVA, R. C. R. Alteração da molhabilidade de superfícies internas de tubulações utilizadas no transporte de óleos pesados via core-flow. 2003. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Petróleo) — Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.
56. SANTOS, R. G. Avaliação da molhabilidade de superfícies de oleodutos através de medidas de ângulo de contato: efeito de asfaltenos e de ácidos naftênicos. 2003. 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) — Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.
57. CARDOSO, C. C.; et al. Azione dell'olio ozonizzato (Bioperoxoil) nelle lesioni chirurgiche dei modelli pré-clínic. *Lesiones Quirúrgicas*, p. 1–11, 2016.
58. BORGES, G. A.; et al. In vitro evaluation of wound healing and antimicrobial potential of ozone therapy. *J Craniomaxillofac Surg*, v. 45, p. 364–370, 2017.
59. FITZPATRICK, J. Mendeley manages your documents on your desktop and in the cloud. 2009.
60. KHAN, S. N.; et al. The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg*, v. 13, n. 1, p. 77–86, 2005.
61. DE CARVALHO, D. R.; et al. Characterization and in vitro cytocompatibility of an acid-etched titanium surface. *Braz Dent J*, v. 21, 2010.

62. HOTCHKISS, K. M.; REDDY, G. B.; HYZY, S. L.; SCHWARTZ, Z.; BOYAN, B. D.; OLIVARES-NAVARRETE, R. Titanium surface characteristics, including topography and wettability, alter macrophage activation. *Acta Biomater*, v. 31, p. 425–434, 2016.
63. FIGUEIREDO, P. M.; REIMÃO, J.; FERNANDES, M. H.; ROCHA, L. A.; CARVALHO, S. Macrophage response to titanium implants with different surface topographies — an in vitro study. *J Funct Biomater*, v. 14, n. 4, p. 211, 2023.
64. GAO, J.; LV, Z.; DENG, K.; CHEN, W.; LI, Y.; CUI, Y.; et al. Functionalization of titanium with antimicrobial peptide GL13K promotes M2 macrophage polarization and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Biomed Res Int*, v. 2020, p. 2327034, 2020.
65. ZHANG, W.; LIU, X.; LI, D.; SUN, H.; LI, Y.; ZHANG, X.; et al. Graphene oxide-modified titanium surfaces promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells via PI3K/Akt/GSK-3 β / β -catenin signaling pathway. *RSC Adv*, v. 10, n. 4, p. 1905–1916, 2020.
66. ZHANG, L.; ZHANG, Y.; HAN, B.; YANG, K.; KONG, D.; HE, Y. Effect of titanium implant surface on macrophage polarization and osseointegration: a systematic review. *J Orthop Surg Res*, v. 17, n. 1, p. 504, 2022.
67. KOMORI, T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by Runx2. *Cell Tissue Res*, v. 339, n. 1, p. 189–195, 2010.
68. NAKASHIMA, K.; DE CROMBRUGGHE, B. Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *Trends Genet*, v. 19, n. 8, p. 458–466, 2003.
69. WHYTE, M. P. Physiological role of alkaline phosphatase explored in hypophosphatasia. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1192, p. 190–200, 2010.
70. RICARD-BLUM, S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, v. 3, n. 1, a004978, 2011.
71. LEE, N. K.; et al. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell*, v. 130, n. 3, p. 456–469, 2007.

72. SOARES, M. S. M. Marcadores da diferenciação osteoblástica em cultura de células crescidas sobre titânio e expostas a coquetel de fatores de crescimento e proteínas. 2016. Dissertação (Mestrado em Odontologia) — Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.
73. GEIGER, B.; BERSHADSKY, A. Exploring the neighborhood: adhesion-coupled cell mechanosensors. *Cell*, v. 110, n. 2, p. 139–142, 2002.
74. ZHAO, X.; et al. FAK signaling promotes osteoblast progenitor cell proliferation and differentiation. *Front Endocrinol (Lausanne)*, v. 12, p. 626113, 2021.
75. BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S.; LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, v. 423, n. 6937, p. 337–342, 2003.
76. HOFBAUER, L. C.; HEUFELDER, A. E. Role of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med*, v. 79, n. 5–6, p. 243–253, 2001.
77. STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*, v. 17, p. 463–516, 2001.
78. KONDO, H.; et al. Role of TNF- α in bone resorption induced by mechanical unloading. *J Bone Miner Res*, v. 20, n. 5, p. 878–885, 2005.
79. GILBERT, L.; et al. Inhibition of osteoblast differentiation by inflammatory cytokines. *J Clin Invest*, v. 106, n. 4, p. 505–512, 2000.
80. ESCOBAR, G.; MANGANI, D.; ANDERSON, A. C. T cell factor 1: a master regulator of the T cell response in disease. *Sci Immunol*, v. 5, n. 53, 2020.
81. STREET, J.; et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 99, n. 15, p. 9656–9661, 2002.
82. THURSTON, G. Complementary actions of VEGF and angiopoietin-1 on blood vessel growth and leakage. *J Anat*, v. 200, n. 6, p. 575–580, 2002.

83. CAMPOS, K. S. Modificação química de superfícies cerâmicas contendo carbono via deposição de filmes sol-gel de SiO₂ com nanopartículas de Cu-Sn-Ti. 2015. Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas) — Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.
84. RODGERS, J. L.; NICEWANDER, W. A. Thirteen ways to look at the correlation coefficient. *Am Statistician*, v. 42, n. 1, p. 59–66, 1988.
85. MANDERS, E. M.; VERBEEK, F. J.; ATEN, J. A. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *J Microsc*, v. 169, n. 3, p. 375–382, 1993.
86. AITA, H.; HORI, N.; TAKEUCHI, M.; SUZUKI, T.; YAMADA, M.; ANPO, M.; OGAWA, T. Induction of osteoblast differentiation on TiO₂ nanotube surfaces. *Biomaterials*, v. 30, n. 21, p. 4056–4062, 2009.
87. TOUATI, H.; LAZZARINI, E.; SCHILDBERGER, A.; ZAGURY, D.; CHAPPARD, D. Ozone application to prepare bioactive titanium surfaces. *Dent Mater*, v. 35, n. 4, p. 575–584, 2019.
88. YANG, Y.; LI, X.; CHEN, J.; ZHANG, Q.; YANG, X. UV ozone treatment on titanium implants: surface characterization and cell responses. *Surf Coat Technol*, v. 408, p. 126675, 2021.
89. SILVA, F. J.; RAMOS, I. L.; FERREIRA, A. J. P.; SOUZA, S. L. Effects of ozone gas treatment on titanium alloy surfaces: physicochemical and biological evaluation. *Mater Sci Eng C*, v. 130, p. 112439, 2022.
90. KIM, H. J.; PARK, K. J.; LEE, Y. K. Nano topographic modification of titanium by ozone plasma for enhanced osteoblast functions. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, v. 111, n. 3, p. 586–595, 2023.
91. ATT W, OGAWA T. Biological aging of titanium surfaces: impact on osseointegration. *Biomacromolecules*. 2009;10(6):1400–1409.
92. IWASA F, BABA K, OGAWA T. Relationship between surface characteristics and biological aging of titanium following thermal oxidation. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2013;28(1):95–105.

CAPÍTULO 4 - EFEITOS DO TRATAMENTO DA SUPERFÍCIE DO TITÂNIO GRAU 5 SOBRE AS PROPRIEDADES OSTEOCONTUTORAS DE OSTEOBLASTOS: ESTUDO *IN VITRO*

RESUMO

Introdução: O titânio é o biomaterial metálico mais empregado em odontologia e ortopedia devido à sua biocompatibilidade, resistência mecânica e estabilidade química. Contudo, as falhas de osseointegração ainda representam um desafio clínico, especialmente em condições sistêmicas adversas ou em protocolos de carga imediata. As modificações de superfície têm se mostrado estratégias eficazes para otimizar a resposta celular, melhorar a adesão inicial, estimular a diferenciação osteoblástica e acelerar a formação óssea. Nesse contexto, o tratamento da superfície com ozônio destaca-se por sua simplicidade, baixo custo e potencial de ativação bioquímica da camada de TiO_2 , favorecendo a interação célula-material.

Objetivo: Avaliar os efeitos do tratamento com gás ozônio sobre o comportamento osteoblástico *in vitro* em discos de titânio grau 5, comparando superfícies apenas usinadas (D-Ti), superfícies tratadas com ozônio (D-TiOz) e um grupo controle celular sem material (CT).

Métodos: Discos de titânio grau 5 foram preparados por usinagem CNC, limpos e esterilizados, sendo submetidos ou não ao tratamento com gás ozônio ($16 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, 15 horas, oxigênio medicinal). Células osteoblásticas Saos-2 foram cultivadas nos grupos experimentais, e diferentes parâmetros foram avaliados: viabilidade e proliferação celular (MTT, dias 1 a 3), migração (scratch test, 0 a 96 h), formação de matriz mineralizada (Alizarina Vermelha S, 14 dias), atividade da fosfatase alcalina (ALP, dias 1, 5 e 7), expressão gênica de marcadores osteogênicos (qPCR, 96 h; TCF-1, ALP, OPG e BSP) e morfologia celular por microscopia eletrônica de varredura (MEV, 96 h). Os dados quantitativos foram analisados estatisticamente pelo teste t de Student ou ANOVA seguida de Tukey, conforme a distribuição dos dados, com nível de significância de $p < 0,05$.

Resultados: O ensaio de MTT demonstrou maior viabilidade e proliferação celular no grupo D-TiOz em relação a D-Ti e CT, especialmente no terceiro dia. No scratch test, o grupo D-TiOz apresentou fechamento mais rápido da área do risco, indicando estímulo à migração celular. A mineralização medida pela coloração com Alizarina Vermelha S foi significativamente maior nos discos ozonizados após 14 dias, evidenciando deposição precoce de cálcio. A atividade da ALP apresentou antecipação da resposta no grupo D-TiOz, sugerindo indução precoce da diferenciação osteoblástica. A análise de qPCR mostrou aumento da expressão de TCF-1 e ALP, bem como redução de OPG e BSP, indicando ativação de vias osteogênicas relacionadas à diferenciação e mineralização. As imagens de MEV revelaram maior densidade celular e morfologia compatível com estado ativo nos discos ozonizados, incluindo maior espalhamento e presença de filopódios.

Conclusão: O tratamento com gás ozônio promoveu melhora significativa nas propriedades osteocondutoras da superfície de titânio, favorecendo adesão, proliferação, migração e mineralização de células osteoblásticas.

Palavras-chave: Titânio; Ozônio; Osteoblastos; Propriedades Osteocondutoras; Osseointegração.

ABSTRACT

Introduction: Titanium is the most widely used metallic biomaterial in dentistry and orthopedics due to its biocompatibility, mechanical strength, and chemical stability. However, failures in osseointegration remain a clinical challenge, especially under adverse systemic conditions or in immediate loading protocols. Surface modifications have proven to be effective strategies to optimize cellular responses, improve initial adhesion, stimulate osteoblastic differentiation, and accelerate bone formation. In this context, surface treatment with ozone stands out for its simplicity, low cost, and potential for biochemical activation of the TiO₂ layer, enhancing cell–material interaction.

Objective: To evaluate the effects of ozone gas treatment on osteoblastic behavior in vitro on grade 5 titanium discs, comparing machined surfaces (D-Ti), ozone-treated surfaces (D-TiOz), and a cell-only control group (CT).

Methods: Grade 5 titanium discs were prepared by CNC machining, cleaned, and sterilized, being either subjected or not to ozone gas treatment (16 µg/cm³, 15 hours, medical oxygen). Saos-2 osteoblastic cells were cultured in the experimental groups, and different parameters were evaluated: cell viability and proliferation (MTT, days 1 to 3), migration (scratch test, 0 to 96 h), extracellular matrix mineralization (Alizarin Red S, 14 days), alkaline phosphatase (ALP) activity (days 1, 5, and 7), gene expression of osteogenic markers (qPCR, 96 h; TCF-1, ALP, OPG, and BSP), and cell morphology by scanning electron microscopy (SEM, 96 h). Quantitative data were statistically analyzed using Student's t-test or ANOVA followed by Tukey's test, according to data distribution, with a significance level set at $p < 0.05$.

Results: The MTT assay demonstrated higher cell viability and proliferation in the D-TiOz group compared to D-Ti and CT, especially on the third day. In the scratch test, the D-TiOz group showed faster wound closure, indicating enhanced cell migration. Mineralization measured by Alizarin Red S staining was significantly greater in ozone-treated discs after 14 days, evidencing early calcium deposition. ALP activity showed an earlier response in the D-TiOz group, suggesting early induction of osteoblastic differentiation. qPCR analysis revealed increased expression of TCF-1 and ALP, along with reduced OPG and BSP expression, indicating activation of osteogenic pathways related to differentiation and mineralization. SEM images revealed higher cell density and morphology consistent with an active state on ozone-treated discs, including greater spreading and presence of filopodia.

Conclusion: Ozone gas treatment significantly improved the osteoconductive properties of titanium surfaces, enhancing adhesion, proliferation, migration, and mineralization of osteoblastic cells.

Keywords: Titanium; Ozone; Osteoblasts; Osteoconductive Properties; Osseointegration.

4.1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e a utilização de biomateriais metálicos têm ocupado posição central na medicina e odontologia modernas, especialmente no campo dos implantes dentários e ortopédicos. Entre esses materiais, o titânio e suas ligas destacam-se por apresentarem combinação única de propriedades físico-químicas, biológicas e mecânicas que os qualificam como padrão-ouro para substituição ou suporte de tecidos duros, particularmente osso [1–4]. A biocompatibilidade, a resistência à corrosão, o módulo de elasticidade relativamente próximo ao do tecido ósseo e a capacidade de formar espontaneamente uma camada passiva de óxido de titânio (TiO_2) estão entre os principais fatores que explicam a escolha preferencial deste metal para aplicações clínicas.

O conceito de **osseointegração**, introduzido por Brånemark et al. [4], revolucionou a implantodontia ao demonstrar que o titânio, quando adequadamente preparado, é capaz de estabelecer contato direto com o osso vivo, sem interposição de tecido conjuntivo fibroso. Tal fenômeno, hoje amplamente documentado, constitui a base do sucesso clínico de implantes dentários e ortopédicos. Entretanto, sabe-se que a qualidade e a velocidade da osseointegração não dependem apenas das propriedades intrínsecas do titânio, mas também de variáveis relacionadas à sua **superfície**, como composição química, energia superficial, topografia em diferentes escalas (macro, micro e nano) e grau de molhabilidade [5–9].

A superfície original de TiO_2 , formada espontaneamente quando o metal é exposto ao oxigênio, é intrinsecamente hidrofílica e, portanto, favorável à adsorção de proteínas séricas, condição indispensável para a adesão celular [10–12]. Contudo, a exposição ambiental resulta em acúmulo gradual de hidrocarbonetos e outras impurezas, processo que reduz a energia superficial e compromete a interação biológica, fenômeno conhecido como “envelhecimento biológico do titânio” [13–15]. Nesse contexto, o estudo e o desenvolvimento de métodos capazes de **restaurar ou otimizar as propriedades de superfície do titânio** têm se tornado alvo prioritário da pesquisa em biomateriais.

Modificações clássicas e avançadas da superfície do titânio

Historicamente, técnicas físicas e químicas foram aplicadas com o objetivo de melhorar a integração osso-implante. Entre elas destacam-se o jateamento com partículas abrasivas, o ataque ácido, a anodização, o revestimento por plasma spray e, mais recentemente, abordagens baseadas em nanotecnologia [16–22]. Essas estratégias podem alterar desde a macroestrutura, conferindo microcavidades que favorecem o ancoramento

mecânico, até a nanotopografia, responsável por interações diretas com receptores de membrana celular e vias de sinalização intracelular [16–18].

Um aspecto determinante dessas modificações é a **molhabilidade**, ou seja, a capacidade de a superfície metálica interagir com líquidos, geralmente avaliada pelo ângulo de contato. Superfícies hidrofílicas apresentam maior afinidade com fluidos biológicos, promovendo rápida adsorção de proteínas como fibronectina e vitronectina, essenciais para a ligação inicial de integrinas e formação de complexos de adesão focal [6,10,11]. Estudos demonstram que superfícies com alta energia livre favorecem não apenas a adesão celular, mas também a proliferação, diferenciação osteoblástica e deposição de matriz mineral [10–12].

Entretanto, os métodos tradicionais de modificação apresentam limitações. Processos como ataque ácido e jateamento podem introduzir contaminantes, alterar de forma irreversível a macroestrutura ou demandar etapas adicionais de esterilização. Já a fotofuncionalização por radiação ultravioleta (UV) tem demonstrado resultados promissores na remoção de hidrocarbonetos e restauração da hidrofília, mas requer fontes específicas de energia e apresenta desafios de aplicação em larga escala [19–22]. Nesse cenário, agentes oxidantes como o **ozônio (O₃)** têm sido propostos como alternativas seguras, acessíveis e eficazes para o tratamento de superfícies de titânio.

O ozônio como agente modificador de superfícies metálicas

O ozônio é um alótropo triatômico do oxigênio, caracterizado por seu elevado potencial oxidante. Na área médica, tem sido empregado como agente antimicrobiano, modulador inflamatório e promotor de cicatrização [23–26]. Em superfícies metálicas, sua ação está relacionada à capacidade de degradar compostos orgânicos e aumentar a concentração de oxigênio superficial, enriquecendo a camada de TiO₂ sem comprometer a integridade estrutural do material.

Estudos pioneiros, como o de Sunarso et al. (2016) [11], demonstraram que a exposição de superfícies de titânio a altas concentrações de ozônio por até 24 horas resultou em redução significativa do ângulo de contato, remoção de contaminantes à base de carbono e aumento relativo da proporção de oxigênio detectada por espectroscopia de energia dispersiva (EDS). Adicionalmente, verificou-se aumento da atividade da fosfatase alcalina (ALP) em culturas de células-tronco mesenquimais, indicando estímulo à diferenciação osteoblástica.

De forma complementar, Yuanyuan et al. (2021) [12] utilizaram a irradiação UV como método de geração de ozônio e observaram melhora na viabilidade celular e redução

da expressão de genes pró-inflamatórios (TNF- α e IL-6) em culturas de macrófagos e células mesenquimais de medula óssea. Esses achados sugerem que o ozônio pode não apenas favorecer a adesão e a diferenciação osteoblástica, mas também modular a resposta imune inicial ao implante.

Outros estudos em modelos *in vitro* e clínicos corroboram esses resultados, associando o uso do ozônio a propriedades antimicrobianas, maior bioatividade e potencial de acelerar a formação óssea peri-implantar [23–26]. No entanto, observa-se ainda **heterogeneidade metodológica** nos protocolos aplicados — variando quanto à concentração, tempo de exposição, fonte de geração de ozônio e forma de aplicação (gasosa, líquida ou por radiação UV). Essa ausência de padronização dificulta a comparação direta entre os estudos e ressalta a importância de pesquisas que integrem análises físico-químicas de superfície com respostas celulares e moleculares.

Importância de estudos celulares *in vitro*

Os ensaios *in vitro* representam ferramentas fundamentais para investigar a interação entre células e biomateriais. Modelos utilizando linhagens osteoblásticas humanas, como as células **Saos-2**, permitem avaliar parâmetros de viabilidade, adesão, migração, atividade enzimática e expressão gênica, fornecendo uma visão abrangente do impacto das modificações de superfície sobre o fenótipo osteoblástico [7,8,20].

No caso específico do titânio tratado com ozônio, esses ensaios possibilitam verificar se as alterações químicas e topográficas realmente se traduzem em vantagens biológicas mensuráveis. A avaliação integrada de parâmetros funcionais (ex.: viabilidade celular pelo MTT, migração pelo ensaio de cicatrização, mineralização por coloração vermelha de Alizarin) e moleculares (ex.: expressão de genes como **TCF-1**, **ALP**, **OPG** e **BSP**) fornece evidências sólidas sobre o potencial osteocondutor do material.

Além disso, o uso de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para análise morfológica celular complementa os resultados, permitindo observar características como espalhamento, formação de filopódios e lamelipódios, e densidade de células aderidas às superfícies. Assim, cria-se um quadro robusto que correlaciona as propriedades físico-químicas do material com respostas biológicas concretas.

Lacuna do conhecimento e justificativa do estudo

Apesar dos avanços, a literatura ainda carece de **estudos sistemáticos e comparativos** que confrontem superfícies de titânio apenas usinadas com superfícies

tratadas com ozônio, avaliando em paralelo tanto as características físico-químicas quanto uma ampla gama de respostas osteoblásticas. A maioria dos estudos disponíveis foca em aspectos isolados — como molhabilidade, composição química ou viabilidade celular — sem integrar múltiplos ensaios funcionais e moleculares em um mesmo delineamento experimental.

Dessa forma, torna-se necessário desenvolver investigações abrangentes que:

- I. **Compare(m) diretamente** superfícies usinadas (D-Ti) e superfícies ozonizadas (D-TiOz).
- II. **Utilizem modelos celulares humanos padronizados** (ex.: Saos-2, fibroblastos).
- III. **Incluam diferentes níveis de análise:** viabilidade, migração, mineralização, diferenciação precoce e tardia, além da morfologia celular.
- IV. **Busquem correlações** entre as alterações físico-químicas induzidas pelo ozônio e a resposta osteoblástica.

Ao abordar essas questões, o presente estudo busca contribuir para um maior conhecimento sobre os mecanismos de ação e sobre os efeitos causados pelo ozônio sobre superfícies metálicas, em especial, o titânio, além de consolidá-lo como ferramenta simples, acessível e eficaz para otimização de superfícies de titânio, reforçando seu potencial como modulador seguro das propriedades biológicas de próteses implantáveis de titânio na odontologia e ortopedia.

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Preparo das Amostras

Discos de titânio grau 5 (5 mm × ø2 mm; Implalife® Indústria de Produtos Médico-Odontológicos, Jales, São Paulo, Brasil) foram usinados (**Fig. 1**) e submetidos à limpeza ultrassônica sequencial em acetona P.A. (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA), etanol absoluto (Synth®, Diadema, Brasil) e água deionizada (sistema Milli-Q®, Millipore®, EUA), por 10 minutos em cada solução. Em seguida, as amostras foram esterilizadas em autoclave a vapor (Cristófoli®, Campo Mourão, Brasil) e distribuídas nos seguintes grupos experimentais: (**Tabela 1**).

- D-Ti: superfície apenas usinada (n = 15)
- D-TiOz: superfície tratada com gás ozônio (16 µg/cm³; Medplus V, Philozon®; 15 h; oxigênio medicinal) (n = 15)

- CT (controle): cultura celular sem material (apenas para experimentos celulares).

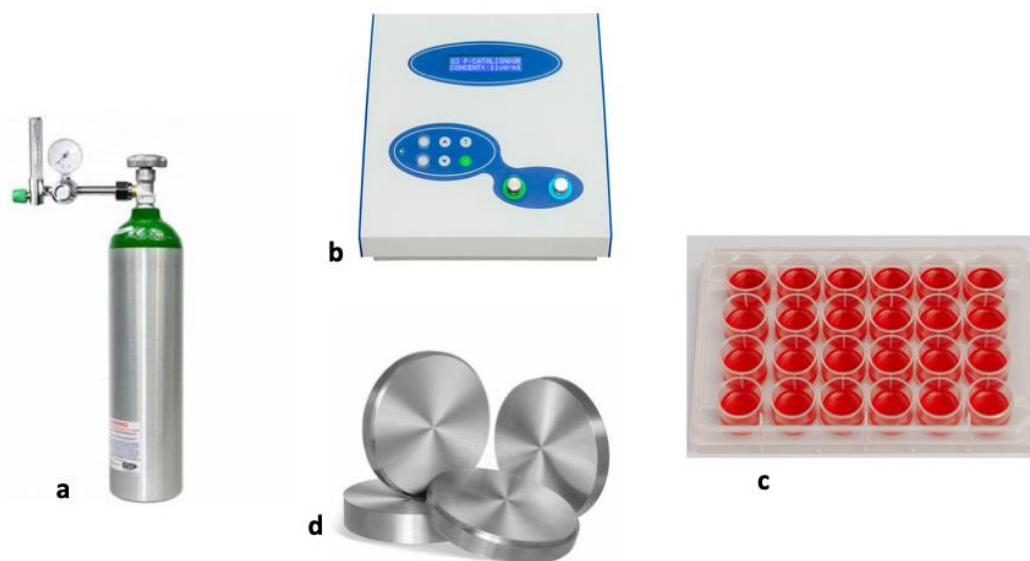


Figura 1. Aparelho e preparação das amostras para o tratamento com ozônio: (a) cilindro de oxigênio; (b) gerador de ozônio; (c) placa de 24 poços para cultura celular; (d) discos de titânio antes e após o tratamento.

Tabela 1. Grupos experimentais, tratamentos e métodos de esterilização.

Grupo	Tratamento	n (discos)	Esterilização
CT	Sem discos (células - apenas) - controle	—	—
D-Ti	Titânio grau-5 usinado	15	Limpeza ultrassônica em acetona, etanol absoluto e água deionizada / 10 min cada; autoclavação a 121 °C/20 min
D-TiOz	Titânio grau-5 usinado + gás ozônio (16 µg/cm³/15 h)	15	Limpeza ultrassônica em acetona, etanol absoluto e água deionizada / 10 min cada; autoclavação a 121 °C/20 min

4.2.2 Cultura Celular

Células osteoblásticas humanas da linhagem **Saos-2** (ATCC HTB-85) foram cultivadas em monocamadas em frascos T-75 (Corning, Union City, CA, EUA) utilizando meio **Dulbecco's Modified Eagle's Medium – DMEM** (Gibco® – Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1%

de penicilina-estreptomicina. As culturas foram mantidas em incubadora umidificada a 37°C, com 5% de CO₂ e 95% de umidade.

Após atingirem a confluência, as células foram destacadas utilizando solução de **0,25% de tripsina-EDTA (Gibco®)** por 2 minutos a 37 °C. Em seguida, foram semeadas em placas de 12 poços (Corning) na densidade de **2 × 10⁴ células/poço** e cultivadas por 24 horas para proliferação, adesão e estabilização inicial sob condições padrão. Após atingirem confluência mínima de 95% as células foram expostas aos discos de titânio para os experimentos subsequentes.

4.2.3 Ensaio de Viabilidade Celular (MTT)

A atividade metabólica celular foi avaliada pelo ensaio **MTT** nos dias 1, 2 e 3 de contato direto com os discos de titânio. Células Saos-2 (2 × 10⁴ células/poço) foram cultivadas em placas de 12 poços e expostas às superfícies experimentais. Em cada tempo experimental, o meio de cultura foi substituído por 1 mL de **DMEM sem soro contendo 0,55 mg/mL de MTT (Sigma-Aldrich®)**. As células foram incubadas por 4 horas a 37 °C, permitindo a redução do MTT a cristais de formazan pelas células metabolicamente ativas. Após a incubação, o sobrenadante foi removido e os cristais de formazan foram solubilizados com **500 µL de isopropanol acidificado (0,04 N HCl em isopropanol)**. A absorbância foi medida a 570 nm em leitor de microplacas (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific®, EUA). Cada condição experimental foi testada em nove réplicas (n = 9/grupo). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

4.2.4 Ensaio de Migração Celular (Scratch Test)

A migração celular foi avaliada pelo ensaio de cicatrização ("**scratch test**"). As células Saos-2 foram cultivadas em placas de 12 poços até atingirem confluência total. Em seguida, um risco linear de 500 µm foi realizado na monocamada celular utilizando ponta padronizada. Após a realização do risco, os poços foram lavados com solução tampão fosfato salino tamponado (**PBS**) para remoção dos detritos celulares, e os discos de titânio

foram cuidadosamente inseridos nos poços (n = 4 poços/grupo) o mais próximo possível do centro de cada poço.

As imagens foram capturadas nos tempos 0, 1, 2, 3 e 4 dias utilizando microscópio invertido (Olympus CKX41) acoplado a câmera digital. Os discos de titânio foram posicionados no centro de cada poço e a área central da ferida foi medida próxima à periferia de cada amostra (disco). Para cada poço, três campos representativos foram fotografados em cada tempo experimental totalizando 12 imagens por grupo a cada tempo. No total, foram obtidas 60 medidas por grupo (15 medições em cada um dos 4 poços, por grupo). A porcentagem de fechamento da área da ferida foi calculada com o software **ImageJ (NIH, EUA)**, considerando a área inicial (tempo 0) como referência [Fig. 2].

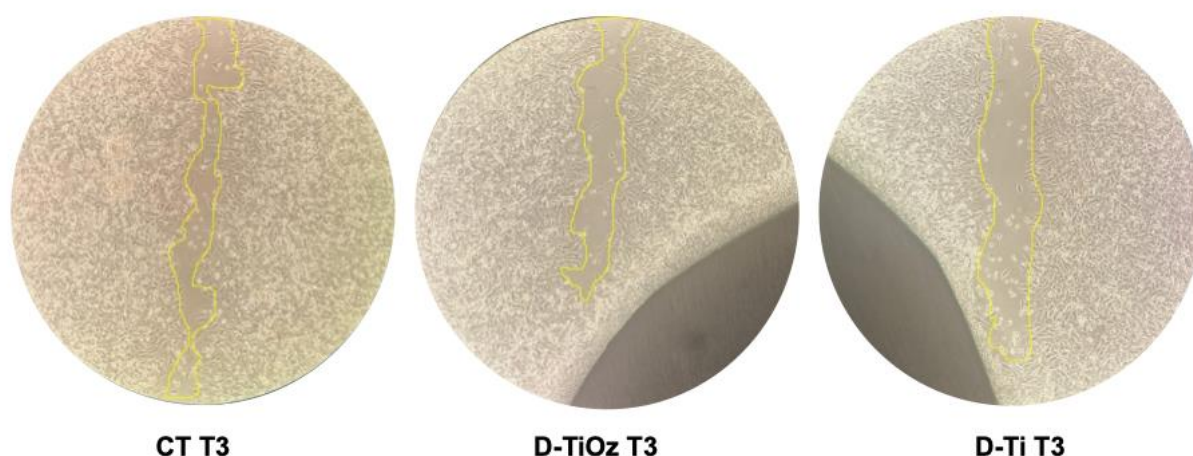


Figura 2. Migração celular – Imagem da medição com software ImageJ da área de ferida ainda aberta nos grupos Controle (CT), Disco de Ti usinado (D-Ti) e disco de Ti usinado e tratado com ozônio (D-TiOz), no dia 03 (T3).

4.2.5 Ensaio de Mineralização da Matriz (Alizarin Red Stain - ARS)

A deposição de matriz mineralizada foi avaliada por **coloração** com **Alizarina Vermelha (ARS)** após 14 dias de cultivo. Ao final do período experimental, os poços contendo as células e os discos de titânio foram cuidadosamente lavadas com PBS e fixadas em **formol tamponado a 10%** por 15 minutos à temperatura ambiente. Após fixação, os poços foram delicadamente lavados com água destilada e corados com solução de **Alizarin Red Stain - ARS a 2% (pH 4,1)** por 20 minutos sob agitação suave. Todos os

procedimentos foram realizados com as células e os discos de titânio mantidos juntos dentro do poço de cultura.

O excesso de corante foi removido por múltiplas lavagens com água destilada até completa clareza do fundo. Para quantificação, o corante ligado à matriz foi extraído com **ácido acético 10%**, seguido de incubação a 85 °C por 10 minutos. As amostras foram resfriadas em gelo, centrifugadas a 20.000 × g por 15 minutos e o sobrenadante foi neutralizado com **hidróxido de amônio 10%**. A absorbância foi medida a 405 nm em espectrofotômetro. Cada grupo foi testado em nove réplicas (n = 9/grupo).

Para coloração, as placas foram incubadas em temperatura ambiente por 20 min. Depois disso, os poços foram lavados cinco vezes com 2 mL de dH₂O. Os nódulos corados foram observados microscopicamente e fotografados (Zeiss Axiovert 100, Alemanha, Jena) com ampliação de 20x. A quantificação do Alizarin foi realizada seguindo o protocolo a seguir.

Protocolo de quantificação Alizarin - Ensaio de quantificação de coloração de Alizarin Red S:

- a. Adicione 800 µL de ácido acético a 10% a cada poço de uma placa de 6 poços e incube à temperatura ambiente durante 30 minutos com agitação (200 µL por poço para uma placa de 24 poços).
- b. Colete as células usando um raspador de células e transfira-as em ácido acético a 10% para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL.
- c. Vortex por 30 segundos.
- d. Aqueça as amostras exatamente a 85°C durante 10 minutos. Para evitar a evaporação, os tubos podem ser selados com parafilme ou adicionar 500 µL de óleo mineral ao topo da pasta.
- e. Incubar os tubos em gelo durante 5 minutos. Cuidado: NÃO abra os tubos até que esfriem completamente.
- f. Centrifugue os tubos a 20.000g durante 15 minutos.
- g. Após a centrifugação, transfira 500 µL (ou 200 µL) do sobrenadante para um novo tubo.
- h. Adicione 200 µL (ou 75 µL) de hidróxido de amônio a 10% para neutralizar o ácido.

NOTA: o pH deve estar entre 4,1 e 4,5. Pegue uma pequena alíquota e teste para garantir que o pH esteja dentro da faixa.

i. Alíquotas de 150 μ L por poço (ou 50 μ L/poço) das amostras e padrão preparado na Parte C em triplicados em uma placa de 96 poços (placas de paredes opacas e fundo transparente). Leia a absorbância a 405 nm com um leitor de placas.

A concentração de íons cálcio em cada poço foi determinada com o auxílio do equipamento medidor de cálcio HORIBA portátil LAQUAtwin Ca-11. Para mensuração da quantidade de cálcio presente foram utilizados 500 μ L do meio de cultura coletados e inseridos na janela específica para leitura no equipamento. Os valores foram expressos em partes por milhão (ppm). Após cada mensuração, o sensor foi limpo com 1 ml de água destilada e em seguida seco com papel absorvente. O aparelho foi calibrado antes de cada medida seguindo as recomendações do fabricante. Imagens foram obtidas em microscópio (Zeiss Axiovert 100, Alemanha, Jena).

4.2.6 Atividade da Fosfatase Alcalina (ALP)

A atividade da enzima **fosfatase alcalina (ALP)** foi utilizada como marcador de diferenciação osteoblástica nos dias 1, 5 e 7 após a exposição das células aos discos de titânio e do grupo controle (CT), somente células em cultura. Em cada tempo experimental, os poços com e sem discos de titânio (CT) foram lavados com solução fosfato salina tamponada - PBS e incubados com 1 mL de **lauryl sulfato de sódio (SLS, 1 mg/mL; Sigma-Aldrich®)** por 30 minutos, à temperatura ambiente, sem agitação.

De cada lisado, alíquotas de 50 μ L foram testadas em kit comercial para quantificação de fosfatase alcalina - ALP (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brasil), seguindo instruções do fabricante. A atividade enzimática foi quantificada por absorbância a 590 nm em leitor de microplacas (ELx800, BioTek Instruments). Três experimentos independentes foram realizados, totalizando nove réplicas por grupo ($n = 9$).

A atividade da ALP foi expressa em μ mol de timolftaleína/min/L e normalizada pelo conteúdo proteico total, determinado pelo método de **Bradford**, garantindo correção para diferenças de densidade celular. Todos os procedimentos foram realizados com as células e os discos de titânio mantidos juntos nos poços de cultura, exceto no grupo controle – CT.

4.2.7 Quantificação da Expressão Gênica (qPCR)

Após 04 dias de cultura celular, o RNA total foi extraído das células expostas aos discos de titânio usinados com e sem tratamento com ozônio (grupos D-Ti, D-TiOz) e das células somente em cultura (grupo CT) utilizando **TRIzol™ (Invitrogen®)**, conforme protocolo do fabricante. As células foram lisadas com 1 mL de TRIzol por poço, seguidas de extração com clorofórmio e precipitação com isopropanol. O RNA obtido foi lavado com etanol 75%, seco e ressuspendido em água livre de RNase. A concentração e a pureza foram determinadas em espectrofotômetro **NanoDrop 8000 (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, EUA)**, baseado na absorbância à 260 e 280 nm.

Dois microgramas de RNA total foram convertidos em cDNA utilizando o **QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen®, Hilden, Alemanha)**.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em sistema **iCycler (Bio-Rad®, EUA)**, utilizando **SYBR™ Green PCR Master Mix (Bio-Rad®)**. Cada reação (20 µL) continha 10 µL de master mix, 50 ng de cDNA, 0,25 µM de primer forward, 0,25 µM de primer reverse e água livre de nucleases. Foram realizadas triplicatas técnicas para cada amostra, em três experimentos biológicos independentes (n = 9/grupo).

As condições de ciclagem termal foram: 95 °C por 7 min, seguidos de 45 ciclos de 95 °C por 10 s, 55 °C por 15 s e 72 °C por 15 s. A curva de dissociação foi analisada ao final para confirmar a especificidade dos produtos amplificados.

A expressão gênica foi quantificada pelo método comparativo $\Delta\Delta C_t$ ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), utilizando **GAPDH** como gene endógeno de referência. Os primers utilizados estão descritos na **Tabela 2**.

Tabela 2. Sequências de primers utilizadas para PCR em tempo real (qPCR)

Gene	Nome do Gene	Forward Primer (5'→3')	Reverse Primer (5'→3')	Acesso GenBank
ALPL	Fosfatase Alcalina	AAGCACTCCCCTTCA TCTG	TTGTTCTGTTCAGCT CGTAC	NM_000478.4
TCF-1	Fator de Transcrição 1	GGAAGCCCCTAACA GGAG	GGCACCAGATCTAGCA TAGTG	NM_001173467
BSP	Sialoproteína Óssea	TGCATCGAAGAGTCAA AATAGAGG	GAGGATAAAAGTAGGC ATGCTTG	L24757.1

OPG	Osteoprotege nina	GACGAGTTGGGATGAC AGAG	ATGAGGACAGGAAGGT TGGA	NM_002546
GAPDH	Controle Endógeno	TGAAGGTCTGGAGTCAA CG	TGGGTGGAATCATATT GGAAC	NG_007073

4.2.8 Morfologia Celular em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a análise das características das células Saos-2, em contato com os discos de titânio, como adesão, disposição, quantidade e morfologia celular, as células foram semeadas em placas de cultura de 12 poços na concentração de 2×10^4 /poço. Após atingirem, pelo menos, 95% de confluência, foram colocados nos poços, delicadamente e centralizados, os discos de titânio, da seguinte forma: 04 discos usinados e tratados com ozônio (grupo D-TiOz, n=4), 04 discos apenas usinados e sem nenhum tratamento adicional (grupo D-Ti, n=4) e 04 poços apenas com as células em meio de cultura DMEM (grupo controle – CT, n=4). Após 96 horas de cultura sobre as superfícies das amostras de titânio tratadas ou não com gás ozônio, as células foram avaliadas. As amostras foram lavadas com PBS e fixadas com **glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,4)** por 24 horas, à temperatura ambiente.

Posteriormente, foram desidratadas em séries crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), por 10 minutos em cada concentração. Após a desidratação, as amostras foram secas em ponto crítico com CO₂ (DLAL 28.000; DLAL, Williston, VT, EUA) e metalizadas com fina camada de ouro/paládio por pulverização catódica.

As imagens foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura de emissão de campo (**JEOL JSM-7001F, JEOL Ltd., Tóquio, Japão**), em ampliações de 200× a 3000×. Para cada grupo, três campos foram analisados por amostra (n = 4 discos/grupo), totalizando 12 micrografias representativas por condição. A morfologia, adesão e espalhamento celular foram comparados qualitativamente entre os grupos.

Para a Contagem Celular e Análise da Morfologia de Adesão (Imagens de MEV):

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das células osteoblásticas cultivadas sobre discos de titânio (D-Ti e D-TiOz) foram obtidas em diferentes ampliações (500×, 1000× e 3000×). A quantificação celular foi realizada por meio de um fluxo de análise semiautomático desenvolvido em Python (bibliotecas OpenCV e NumPy). Para cada imagem, uma região de interesse (ROI) foi extraída, convertida para escala de cinza e pré-processada com filtro de mediana para reduzir o ruído de fundo. Em seguida, aplicou-se

limiarização adaptativa, seguida de abertura morfológica, para segmentar os corpos celulares individuais.

Para o número total de células, as contagens foram realizadas nas ampliações de 500× e 1000×, nas quais as células estavam bem distribuídas sobre a superfície. Para as células aderidas, a análise foi conduzida na ampliação de 3000×. Foram extraídos descritores morfológicos para cada objeto segmentado: (i) circularidade ($4\pi \cdot \text{área} / \text{perímetro}^2$), (ii) razão de aspecto (eixo maior/eixo menor da caixa delimitadora) e (iii) solidez (área/área do invólucro convexo). As células foram classificadas como “aderidas” quando apresentavam baixa circularidade ($<0,6$), baixa solidez ($<0,9$) e/ou alta razão de aspecto ($>1,8$), características associadas ao espalhamento e à presença de filopódios/lamelipódios. Células arredondadas, com alta circularidade e solidez, foram classificadas como não aderidas.

Todas as análises foram realizadas utilizando parâmetros idênticos para ambos os grupos (D-Ti e D-TiOz), e os resultados foram expressos como número total de células por campo de imagem e número de células aderidas por campo.

4.2.9 Análise Estatística

Todos os dados foram analisados utilizando o software **GraphPad Prism® versão 9.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA)**. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP).

4.2.9.1 Verificação de Normalidade

Antes da aplicação dos testes paramétricos, a distribuição dos dados foi avaliada por meio do **teste de Shapiro-Wilk**. Somente os conjuntos de dados que apresentaram distribuição normal foram submetidos à ANOVA; caso contrário, seriam aplicados testes não paramétricos. (No presente estudo, isso não foi necessário, pois todos os conjuntos de dados apresentaram distribuição normal). Significância estatística foi considerada quando **$p < 0,05$** . Diferenças entre grupos foram indicadas por letras ou símbolos distintos nos gráficos, quando necessário. Todos os experimentos foram conduzidos com **$n \geq 9$** amostras por grupo, exceto para **MEV e EDS (análise descritiva com $n = 3-4$)**, de acordo com as recomendações mínimas de validação para estudos *in vitro*. Homogeneidade das variantes

foi avaliada com o Levene's test. Outliers foram identificados via boxplot e excluídos apenas se confirmados estatisticamente – Grubb's Test. Todos os dados experimentais foram realizados em triplicatas técnicas e réplicas biológicas independentes para garantir a reprodutibilidade e a robustez estatística.

4.2.9.2 Comparação entre Grupos

✓ Comparação entre 3 grupos independentes (CT, D-Ti e D-TiOz):

Para os experimentos que envolveram mais de dois grupos experimentais, utilizou-se a **análise de variância de uma via (One-Way ANOVA)**, seguida do **teste Tukey's post hoc** para comparações múltiplas entre os grupos. Essa abordagem é adequada para identificar diferenças significativas entre as médias de três ou mais grupos independentes com variâncias homogêneas. O tipo de teste estatístico aplicado a cada ensaio experimental está descrito na **Tabela 3**.

Tabela 3. Tipo de teste estatístico por ensaio experimental

Experimento	Tipo de Dados	Teste Estatístico	Justificativa
MTT (viabilidade celular)	Absorbância (DO 570 nm) nos dias 1–3	One-Way ANOVA + Tukey	Dados Contínuos, 3 grupos independentes, medidas repetidas em dias diferentes
Ensaio de Migração Celular (scratch)	% de fechamento da ferida ao longo do tempo (0–96 h)	ANOVA de medidas repetidas + Tukey	Comparações intragrupo ao longo do tempo e entre grupos nos mesmos pontos temporais.
Alizarin Red S (mineralização)	Absorbância (DO 405 nm)	One-Way ANOVA + Tukey	Comparação da deposição mineral entre os grupos após 14 dias
ALP (fosfatase alcalina)	Atividade Enzimática ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{L}$), dias 1, 5, and 7	Two-Way ANOVA + Tukey	Dois fatores analisados: grupo (CT, D-Ti, D-TiOz) e tempo (dias 1, 5 e 7)
qPCR (expressão gênica)	Variação relativa de expressão ($\Delta\Delta\text{Ct}$, valores normalizados em $\log_2$)	One-Way ANOVA + Tukey	Dados de expressão gênica comparando os grupos em 96 h
Análise Morfológica (MEV)	Descritivo e qualitativo	Sem análise estatística	Os dados morfológicos foram interpretados visualmente (descrições comparativas)

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Viabilidade Celular (MTT)

Análise dos Dados [Figura 3]

4.3.1.1. Crescimento celular ao longo do tempo

- Todos os grupos mostraram aumento progressivo da OD, indicando **proliferação celular constante** ao longo dos 3 dias.
- O grupo **D-TiOz apresentou os maiores valores médios em todos os tempos**, sugerindo maior viabilidade celular em comparação aos demais.

4.3.1.2. Comparação entre grupos

Tempo de 01 Dia:

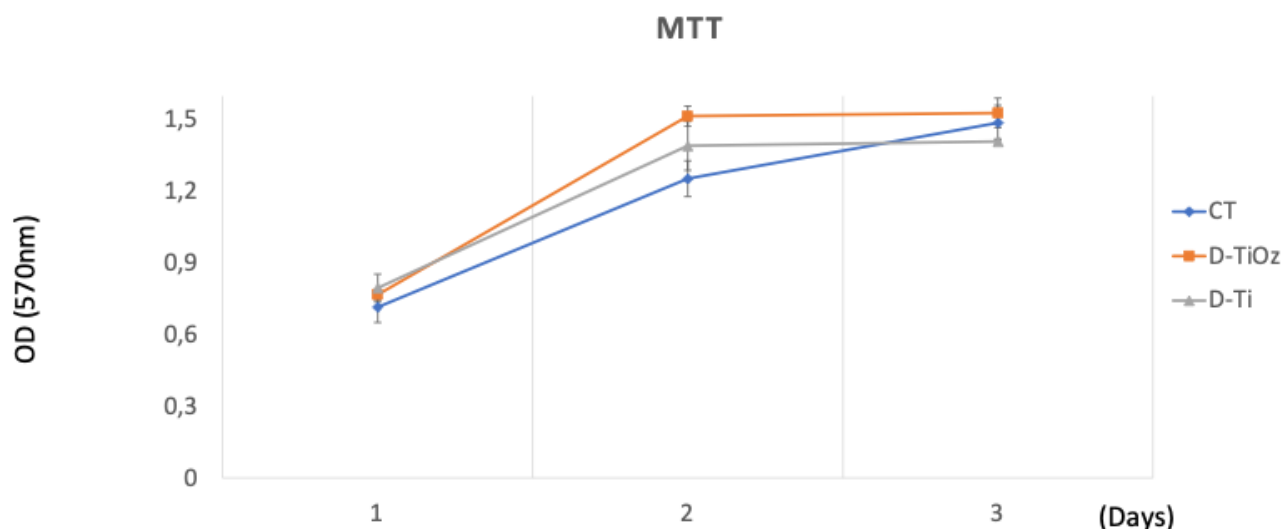
- D-Ti apresentou a maior média de OD (0,796), mas **a diferença entre os grupos foi estatisticamente significativa ($p < 0,02$)**.
- Indica que já no primeiro dia há uma **resposta celular diferenciada** às superfícies, com o ozônio mostrando uma tendência positiva.

Tempo de 02 Dias:

- D-TiOz teve OD significativamente maior que CT e D-Ti.
- D-Ti também foi significativamente maior que o grupo controle (CT), mas **inferior ao D-TiOz**.
- O tratamento com ozônio **acelerou a proliferação celular** em comparação às superfícies sem tratamento.

Tempo de 03 Dias:

- D-TiOz manteve a maior média (1,529), mas as diferenças com CT e D-Ti continuam **estatisticamente significativas ($p < 0,01$)**.
- Mostra que o **efeito benéfico do ozônio é sustentado ao longo do tempo**.



GROUP (OD $\pm$ stdv)				
Time (hours)	CT	D-TiOz	D-Ti	p-value*
24	0,715 ($\pm 0,06$) ^A	0,768 ($\pm 0,07$) ^B	0,796 ($\pm 0,07$) ^B	<0.02 ^A
48	1,254 ($\pm 0,02$) ^C	1,516 ($\pm 0,06$) ^D	1,391 ($\pm 0,04$) ^E	<0.01 ^{C,D,E}
72	1,488 ($\pm 0,05$) ^D	1,529 ($\pm 0,1$) ^D	1,410 ($\pm 0,01$) ^E	<0.01 ^D

Figura 3. Gráfico dos resultados de experimento de viabilidade celular - MTT nos dias 1-3 para CT, D-Ti e D-TiOz. Valores são média $\pm$ Desvio Padrão (n = 9). Letras diferentes denotam $p < 0,05$.

4.3.1.3 Conclusões do experimento

- O tratamento da superfície de titânio com ozônio (D-TiOz) resultou em maior viabilidade e proliferação de células osteoblásticas Saos-2 em todos os tempos avaliados, indicando um efeito positivo na interação célula-superfície.
- A superfície usinada (D-Ti) também apresentou melhor desempenho em comparação ao controle (CT), porém seus valores foram consistentemente inferiores ao grupo tratado com ozônio, demonstrando que a ozonização é capaz de aumentar a biocompatibilidade do titânio.
- A significância estatística observada nas comparações entre grupos reforça a robustez dos resultados e corrobora o potencial do ozônio como agente modificador de superfície.
- Esses dados sugerem que a ozonização do titânio pode ser uma estratégia

promissora para otimizar a osseointegração, especialmente no contexto de implantes dentários e ortopédicos, ao favorecer a adesão e proliferação celular nos estágios iniciais de contato com o biomaterial.

- I. **O tratamento com ozônio (D-TiOz) promoveu maior viabilidade e proliferação das células Saos-2** em todos os tempos analisados, sugerindo efeito positivo na interação célula-superfície.
- II. O grupo **D-Ti (usinagem apenas)** também teve melhor desempenho que o controle, mas **inferior ao grupo ozonizado**, indicando que a **modificação da superfície com ozônio aumenta ainda mais a biocompatibilidade do titânio**.
- III. **A análise estatística mostra significância nas comparações**, reforçando a robustez dos resultados.
- IV. Esses dados sugerem que a **ozonização da superfície do titânio pode ser uma estratégia eficaz para otimizar a osseointegração** e a adesão celular em implantes.

4.3.2 Ensaio de Migração Celular (Scratch Test)

4.3.2.1 Objetivo do Ensaio

Avaliar a **capacidade de migração celular** ao longo do tempo como indicativo de cicatrização da “ferida” criada artificialmente (riscagem) no cultivo celular. A variável avaliada foi a **porcentagem de área aberta (ferida)** remanescente em cada tempo (T0, T1, T2, T3 e T4, em dias).

4.3.2.2 Análise dos Resultados [Figura 4b]

1. Tendência Geral

- Todos os grupos mostraram **redução progressiva da porcentagem de ferida aberta ao longo do tempo**, indicando **migração e fechamento celular contínuo**.
- Essa tendência é esperada no ensaio de Wound Healing com células viáveis e ativas.

2. Comparações entre grupos por tempo

T0 (inicial):

- Todos os grupos começam com porcentagens muito próximas ($\sim 0,10$), sem diferenças significativas (**ns**). Isso garante uniformidade no ponto de partida.

T1 (dia 1):

- Observa-se redução acentuada em todos os grupos.
- O grupo **D-TiOz** mostra uma leve tendência de fechamento mais rápido, mas **não há diferença estatisticamente significativa** entre os grupos (**ns**).

T2 (dia 2):

- Continuação da migração celular com valores médios em torno de 0,05.
- Ainda sem diferenças estatísticas relevantes entre os grupos (**ns**), indicando comportamento semelhante até esse ponto.

T3 (dia 3):

- O grupo **D-TiOz** apresenta menor porcentagem de ferida aberta (**$\sim 0,027$**), em comparação a **CT** (**$\sim 0,038$**) e **D-Ti** (**$\sim 0,032$**). [Figura 4a].
- A diferença entre **D-TiOz** e **CT** é **estatisticamente significativa** ($p \leq 0,05$, indicado por *), sugerindo que o ozônio **favorece a migração celular** e fechamento da ferida.

T4 (dia 4):

- O grupo **D-TiOz** mantém a menor porcentagem de ferida aberta, com **diferença estatisticamente significativa** em relação aos demais.
- Os grupos D-Ti e CT apresentam também cicatrização significativa, porém **D-TiOz mostra o maior desempenho**, consolidando o efeito positivo da ozonização da superfície sobre a migração celular

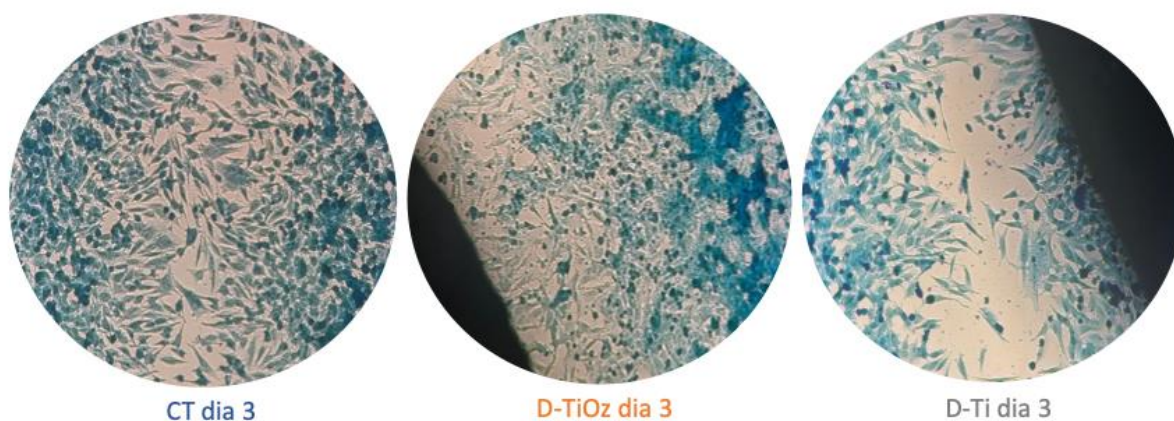


Figura 4a. Migração celular – Imagem microscópica no maior aumento (1000x) dos poços com os discos de titânio – D-Ti e D-TiOz e do grupo controle - CT, no dia 03.

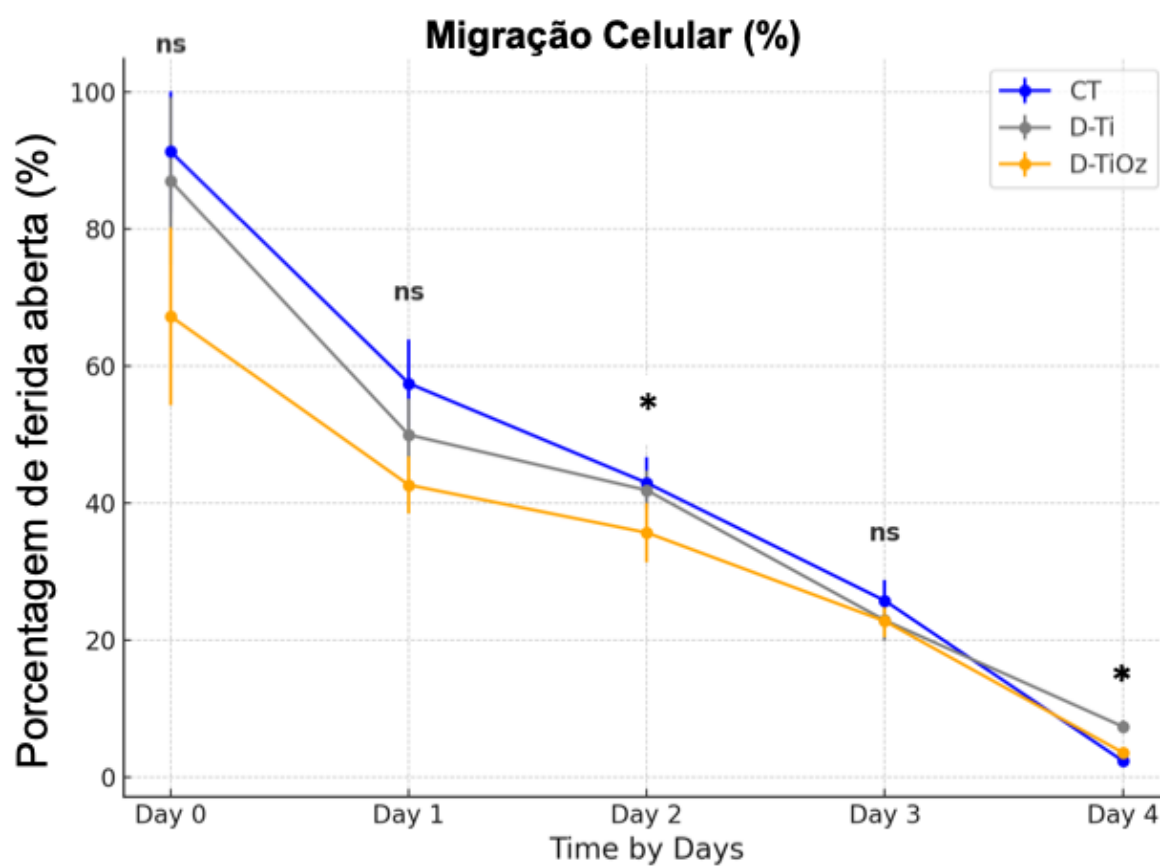


Figura 4b. Gráfico representando os resultados do Ensaio de migração celular comparando o fechamento da derida ao longo dos dias entre os grupos CT, D-Ti e D-TiOz. (*) Diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$), (ns) sem diferença estatística ($p > 0,05$).

4.3.2.3. Conclusões do experiento

- A ozonização da superfície do titânio (grupo **D-TiOz**) promoveu **aceleração significativa da migração celular** a partir do dia 3, atingindo os melhores índices de fechamento da ferida no dia 4.
- O grupo **D-Ti** (apenas usinado) também mostrou melhora em relação ao controle, porém seu efeito foi menos pronunciado do que o observado com a superfície ozonizada.
- O tratamento com gás ozônio, portanto, além de aumentar a viabilidade celular (como observado no ensaio MTT), também **favorece o comportamento migratório das células osteoblásticas**, um fator importante para o início da osseointegração e cicatrização óssea ao redor de implantes.
- Esses achados reforçam o potencial da **ozonização como estratégia adjuvante** na modificação de superfícies de titânio para aplicações biomédicas, com impacto direto no comportamento celular.

4.3.2.4. Discussão do experimento: Influência da Superfície de Titânio Ozonizada na Cicatrização *In Vitro*

Uma questão relevante ao interpretar os resultados do ensaio de cicatrização *in vitro* (wound healing) com células Saos-2, é se os discos de titânio — especialmente os tratados com ozônio (D-TiOz) — poderiam ter interferido negativamente na migração celular, atraindo as células para sua superfície em detrimento da área da ferida. Essa possibilidade decorre do fato de que o ozônio, ao modificar quimicamente a superfície do titânio, a torna mais hidrofílica, reativa e livre de contaminantes orgânicos, favorecendo a adesão celular.

Sob esse ponto de vista, é biologicamente plausível que uma superfície altamente reativa, como a ozonizada, possa atrair células adjacentes. Esse fenômeno poderia gerar um 'desvio migratório', no qual células próximas à ferida migram preferencialmente para o disco de titânio em vez de atravessarem a região lesada, atrasando a cicatrização. Essa hipótese, contudo, precisa ser contrastada com os dados experimentais observados.

No presente experimento, os resultados demonstram que todos os grupos apresentaram progressiva redução da área de ferida ao longo do tempo. Até 2 dias, não houve diferenças estatísticas entre os grupos, indicando que a presença dos discos não interferiu negativamente na migração celular inicial. A partir do dia 3, observou-se que o grupo D-TiOz apresentou cicatrização significativamente superior em comparação aos demais grupos, com porcentagens de ferida aberta consistentemente menores.

Portanto, os resultados refutam a hipótese de que o tratamento com ozônio tenha atraído as células de forma a prejudicar o fechamento da ferida. Ao contrário, o desempenho superior do grupo D-TiOz sugere que a superfície ozonizada favoreceu não apenas a viabilidade, mas também a migração celular. Conclui-se, assim, que a ozonização da superfície de titânio pode ser considerada uma estratégia benéfica, com potencial para otimizar processos de cicatrização e osseointegração.

4.3.3. Alizarin Red Staining (ARS)

O ensaio de coloração por Alizarin Red S (ARS) foi realizado com o objetivo de quantificar a mineralização da matriz extracelular produzida por células osteoblásticas SAOS-2, cultivadas sobre discos de titânio grau 5 com e sem tratamento por ozônio. Esse ensaio mede a deposição de cálcio como marcador tardio da diferenciação osteoblástica.

Os resultados quantitativos indicam que o grupo controle (CT) apresentou a menor concentração de cálcio (~2,3 mM), demonstrando baixa mineralização espontânea. O grupo com titânio usinado (D-Ti) apresentou maior mineralização (~3,4 mM), significativamente superior ao controle, evidenciando o efeito osteoindutor do substrato de titânio. Notavelmente, o grupo com titânio ozonizado (D-TiOz) apresentou a maior concentração de cálcio (~3,9 mM), significativamente superior aos demais grupos. A diferença estatística entre os três grupos foi confirmada pelas letras indicadas no gráfico (A, B, C), o que demonstra a superioridade da modificação com ozônio em promover a mineralização.

Figura 5a.

As imagens qualitativas reforçam os dados quantitativos: o grupo CT apresenta coloração esparsa e irregular, enquanto D-Ti exibe coloração mais intensa, porém heterogênea. O grupo D-TiOz, por sua vez, apresenta coloração vermelho-vivo intensa e homogênea, refletindo alta densidade de depósitos de cálcio. **Figura 5b.**

Conclui-se que o tratamento da superfície do titânio com ozônio potencializa a diferenciação osteoblástica e a formação de matriz mineralizada, sugerindo-se como uma estratégia promissora para otimização da osseointegração de implantes metálicos.

5a

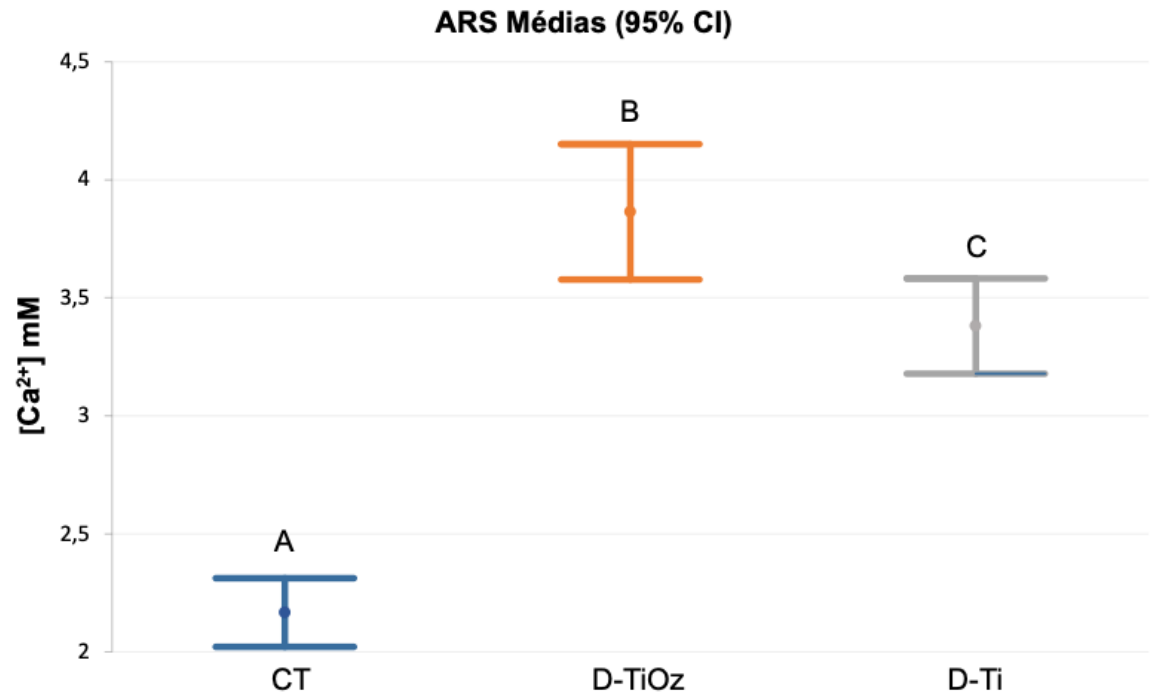


Figura 5a. ARS mineralização: concentração de cálcio (mM) após 14 dias. Barras = média $\pm$ 95% CI; letras diferentes, $p < 0.05$. Letras diferentes (A, B, C) indicam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$).

5b

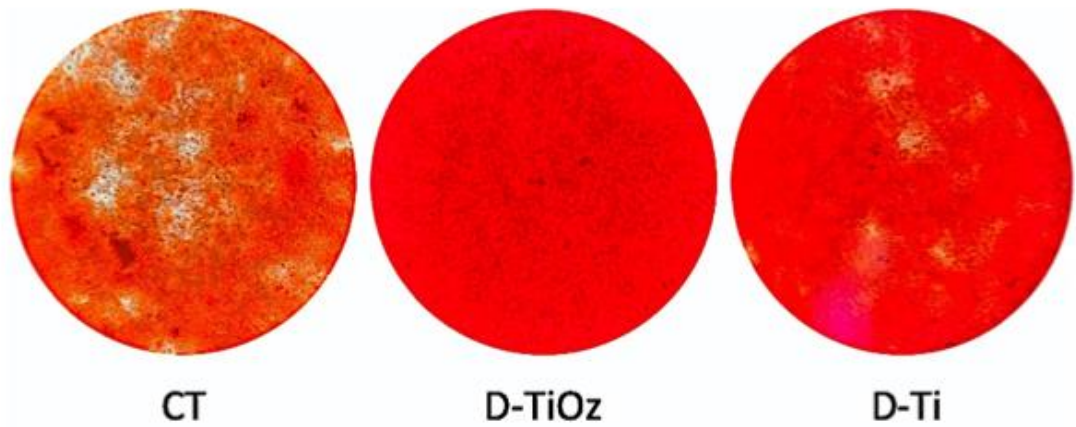


Figura 5b. Imagem microscópica dos poços com 14 dias de cultura dos grupos CT, D-TiOz e D-Ti após coloração ARS.

4.3.4. Fosfatase Alcalina

O ensaio de atividade da fosfatase alcalina (ALP) foi realizado com o objetivo de avaliar a diferenciação osteoblástica precoce em células Saos-2 cultivadas sobre discos de titânio grau 5, com ou sem tratamento por ozônio. A ALP é um marcador fundamental da fase inicial da diferenciação osteoblástica, estando relacionada à preparação da matriz para posterior mineralização.

No 1º dia de cultivo, os níveis de ALP foram baixos em todos os grupos, como esperado. No entanto, o grupo tratado com ozônio (D-TiOz) apresentou valor significativamente maior ($99,6 \pm 0,83$) em comparação ao controle (CT) e ao grupo usinado (D-Ti), sugerindo ativação osteoblástica mais precoce induzida pela superfície ozonizada ($p < 0,001$).

No 5º dia, todos os grupos apresentaram aumento expressivo da atividade ALP, caracterizando o pico típico de diferenciação osteoblástica. O grupo D-Ti atingiu o maior valor absoluto ($317,6 \pm 7,0$), significativamente superior aos demais ($p < 0,001$), seguido pelo D-TiOz ($256,5 \pm 12,5$) e CT ($231,6 \pm 93,1$).

No 7º dia, observou-se uma redução nos valores de ALP em todos os grupos, indicando que as células estão avançando para fases mais tardias da diferenciação, como a mineralização. Os três grupos apresentaram níveis semelhantes e estatisticamente equivalentes ($p > 0,05$), demonstrando que todos atingiram um estágio semelhante de maturação osteoblástica ao final do experimento. **[Figura 6].**

Conclui-se que os discos de titânio, em especial os tratados com ozônio, promovem maior ativação precoce da diferenciação osteoblástica, enquanto o titânio usinado leva a um pico mais alto de atividade enzimática no ponto de máxima diferenciação (dia 5). Esses dados reforçam o potencial osteoindutor do titânio e indicam que a modificação superficial com ozônio pode acelerar a resposta celular em estágios iniciais.

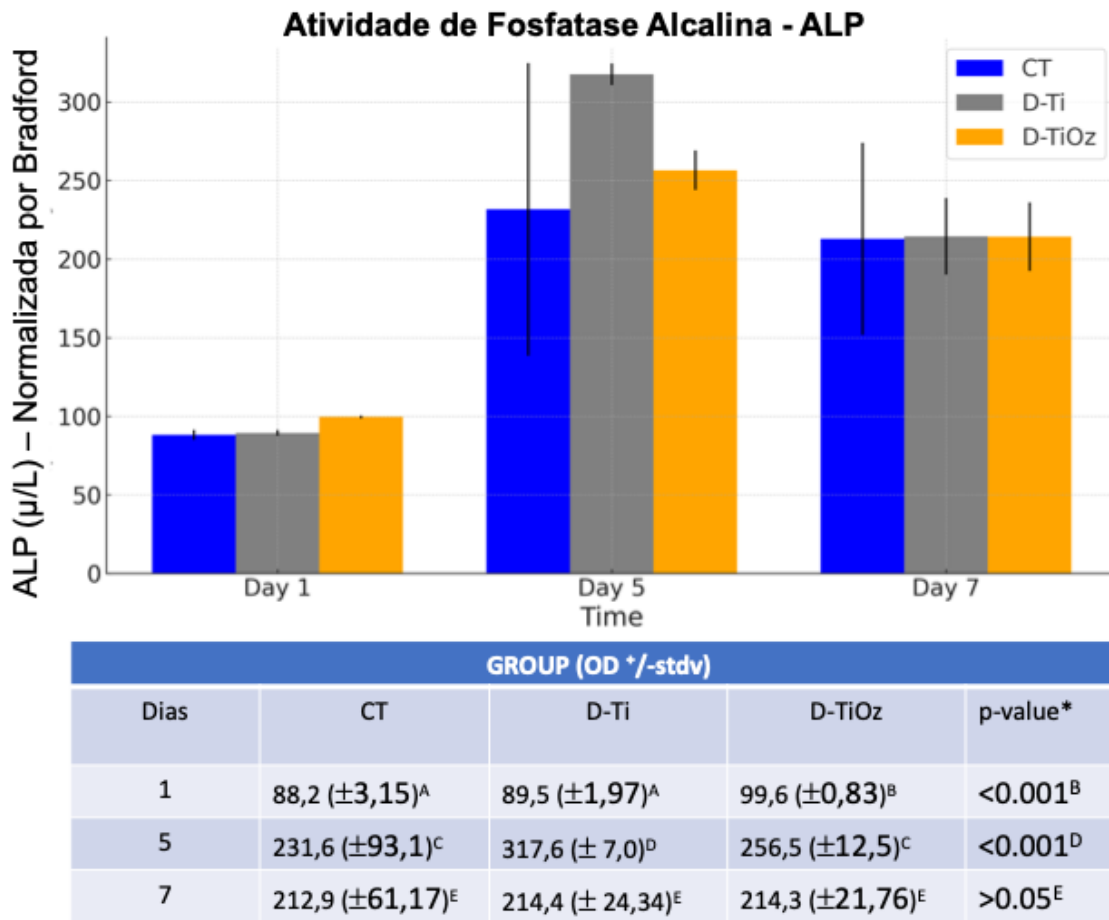


Figura 6. Gráfico representando a Atividade de ALP nos dias 1, 5 e 7. Média $\pm$ DP (n = 9); *p < 0.05 vs. CT.

4.3.5. Análise da Expressão Gênica (qPCR)

Foram analisadas as expressões dos genes TCF-1, ALP, OPG e BSP em células osteoblásticas Saos-2 após 04 dias (96 horas) de cultivo sobre discos de titânio grau 5, com ou sem tratamento por ozônio, além de um grupo controle cultivado apenas em meio DMEM. Os dados obtidos por qPCR foram representados em gráficos de boxplot, permitindo a visualização da variabilidade e tendência central das expressões gênicas entre os grupos experimentais. [Figura 7].

I. TCF-1 (Transcription Factor 1)

O grupo com os discos usinados e tratados com ozônio (D-TiOz) apresentou expressão extremamente elevada (valores entre 110–200), indicando ativação robusta deste fator. O grupo com os discos de titânio usinados e sem nenhum tratamento adicional

(D-Ti) também induziu expressão de TCF-1, porém em menor magnitude (em torno de 30–60). O grupo CT praticamente não expressou TCF-1 (próximo de zero).

 **Interpretação:** TCF-1 está associado à proliferação, diferenciação osteoblástica e sinalização Wnt. A elevação acentuada em D-TiOz sugere que a ozonização da superfície do titânio estimula vias de diferenciação osteogênica mais intensamente do que o titânio usinado.

II. ALP (Fosfatase Alcalina)

O grupo D-TiOz novamente se destacou, com expressões extremamente elevadas (~6,5–6,9). Os grupos D-Ti e CT apresentaram expressão muito baixa (~1,1 ou inferior).

 **Interpretação:** ALP é um marcador precoce da diferenciação osteoblástica. O resultado confirma os dados do ensaio enzimático de ALP, demonstrando que o titânio ozonizado acelera e amplifica a diferenciação inicial das células Saos-2.

III. OPG (Osteoprotegerina)

O grupo CT teve a maior expressão de OPG (~0,9–1,2), o grupo D-Ti apresentou expressão intermediária (~0,5–0,9), enquanto o grupo D-TiOz teve expressão significativamente reduzida (~0,2–0,4).

 **Interpretação:** OPG é um regulador negativo da reabsorção óssea (inibidor de RANKL). A menor expressão em D-TiOz pode indicar uma tendência mais ativa de remodelação óssea, promovendo formação ao invés de manutenção do tecido ósseo.

IV. BSP (Bone Sialoprotein)

Os grupos CT e D-Ti apresentaram expressão elevada e semelhante (~0,8–1,1), enquanto o grupo D-TiOz teve expressão reduzida (~0,1–0,2).

 **Interpretação:** BSP está envolvida na adesão celular e início da mineralização. A sua menor expressão no grupo D-TiOz pode representar uma compensação biológica, uma vez que os genes ALP e TCF-1 já estavam altamente expressos, sugerindo avanço na diferenciação celular.

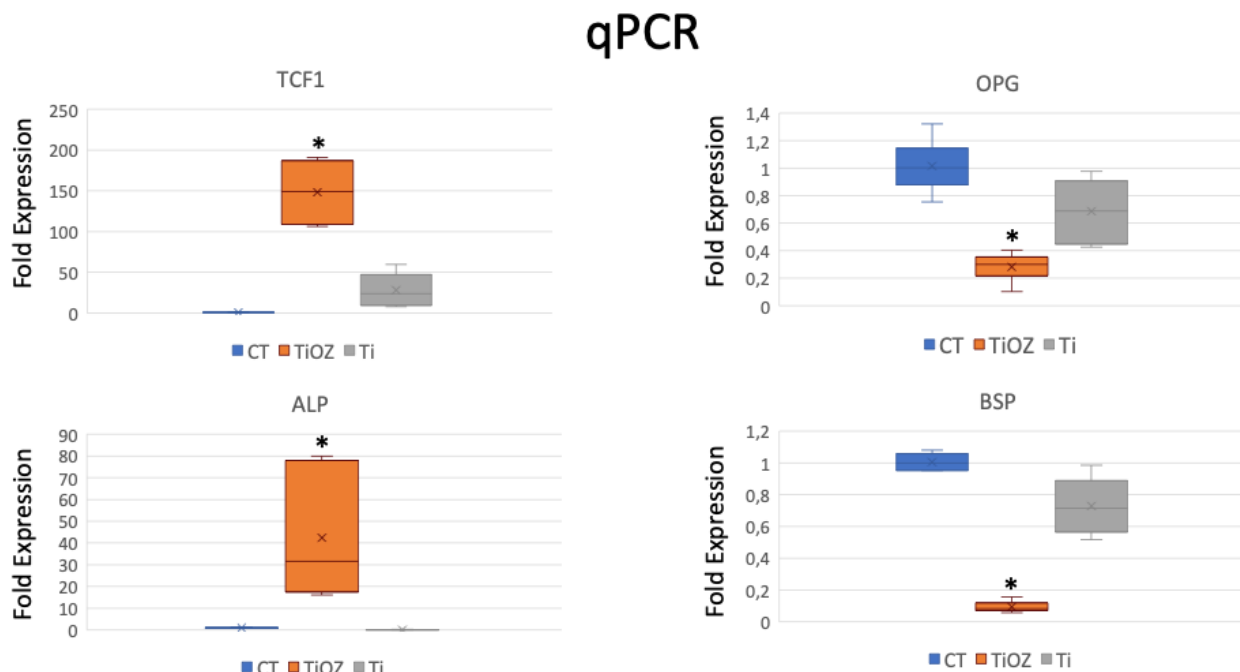


Figura 7. Gráfico representando o experimento de qPCR com a expressão relativa dos genes TCF-1, OPG, ALP e BSP depois de 4 dias (96h). Box-plots (n = 9); *p < 0.05.

4.3.5.1. Conclusões Gerais do experimento

O grupo D-TiOz apresentou as maiores expressões de TCF-1 e ALP, indicando forte ativação da diferenciação osteoblástica precoce. Isso confirma os dados anteriores de MTT, ALP e ARS, reforçando o potencial osteoindutor da superfície ozonizada. O grupo D-Ti promoveu ativação moderada dos genes osteogênicos, principalmente TCF-1 e BSP, enquanto o grupo controle (CT) apresentou alta expressão de OPG e BSP, porém baixa de TCF-1 e ALP, evidenciando um perfil celular mais voltado à manutenção do fenótipo basal do que à diferenciação ativa. A baixa expressão de OPG e BSP no grupo D-TiOz após 04 dias (96 horas) pode refletir não uma inibição dessas vias, mas sim um estágio mais avançado da diferenciação osteoblástica, no qual a transcrição desses genes já foi realizada anteriormente. A elevada expressão de TCF-1 e ALP sugere que o tratamento com ozônio induz uma ativação precoce das vias osteogênicas, acelerando a progressão do programa de diferenciação. Portanto, a inclusão de tempos intermediários de coleta, como 48 e 72 horas, seria fundamental para traçar um perfil temporal da expressão gênica e confirmar essa hipótese.

4.3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV – Análise Celular

Com base nas imagens obtidas por **microscopia eletrônica de varredura (MEV)** após 04 dias de cultivo de células Saos-2 sobre discos de titânio grau 5, com (linha inferior - D-TiOz) e sem tratamento com ozônio (linha superior - D-Ti), segue a análise morfológica comparativa entre os grupos:

I. Adesão celular [Figuras 8 e 9].

- **D-Ti (linha superior):**

As células estão aderidas de forma relativamente esparsa à superfície. Em ampliações maiores (1000x e 3000x), observa-se a presença de células com morfologia osteoblástica arredondada e algumas células achatadas. No entanto, há **áreas sem cobertura celular evidente**, indicando **adesão celular limitada**.

- **D-TiOz (linha inferior):**

A densidade celular é visivelmente maior em todas as ampliações. As células exibem morfologia espalhada e **presença abundante de prolongamentos citoplasmáticos (filopódios e lamelipódios)**, que indicam **forte ancoragem à superfície e interações célula-célula/célula-material**.

Há evidência de **maior confluência e agregação celular**, especialmente nas imagens com 1000x e 3000x, sugerindo **melhor biocompatibilidade e resposta celular** à superfície ozonizada.

II. Morfologia celular e diferenciação [Figuras 9 e 10].

- **D-Ti:**

As células apresentam morfologia menos diferenciada, com menor número de projeções e contorno celular pouco definido. A organização é mais isolada e há áreas lisas da superfície visíveis entre as células.

- **D-TiOz:**

As células se apresentam mais **espalhadas, alongadas e com sinais morfológicos compatíveis com diferenciação osteoblástica**. A presença de pontes intercelulares e depósitos extracelulares pode indicar início de **mineralização da matriz**.

III. Interação com a superfície [Figuras 10 e 11]

- **D-Ti:**

Apesar da presença de células aderidas, a superfície parece ainda visível em muitos pontos. O padrão de distribuição é mais heterogêneo e desorganizado.

- **D-TiOz:**

O contato célula-superfície é mais íntimo, com **maior extensão de contato e maior espalhamento celular**, favorecendo os processos de diferenciação e mineralização. Há também indícios de **maior atividade celular**, como presença de vesículas e microvilosidades.

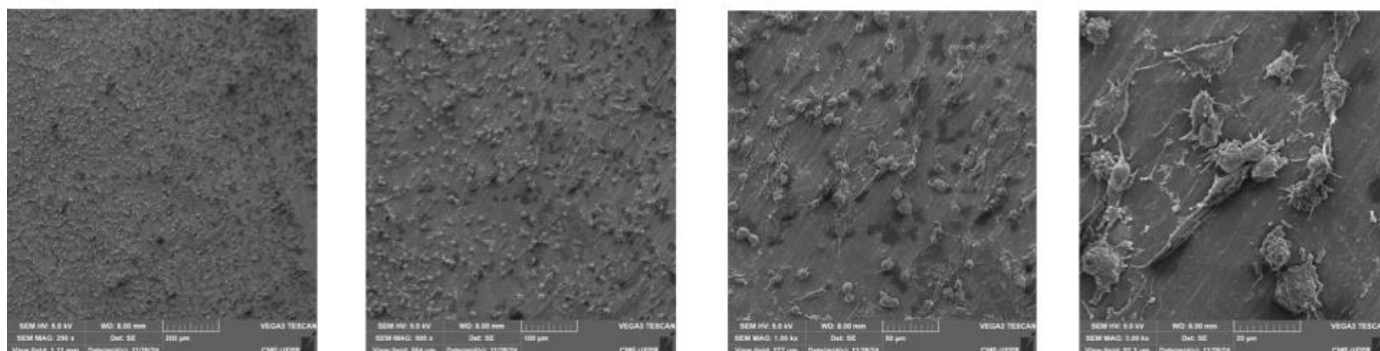
IV. Contagem total de células e número de células aderidas

A análise em alta ampliação (3000×) permitiu a classificação morfológica das células osteoblásticas de acordo com seus padrões de adesão. As células foram categorizadas como aderidas quando apresentavam baixa circularidade, baixa solidez e/ou alta razão de aspecto, indicando morfologia espalhada com extensões de filopódios e lamelipódios. Nessa escala, ambos os grupos apresentaram número semelhante de células, porém foram evidenciadas diferenças qualitativas. Enquanto as superfícies D-Ti continham predominantemente células arredondadas ou parcialmente espalhadas, o grupo D-TiOz exibiu uma maior proporção de células bem espalhadas, com formatos alongados e extensões de membrana, refletindo um fenótipo de adesão mais maduro [Figura 10].

As imagens de MEV nas ampliações de 500x e 1000x revelaram diferenças claras no número de células aderidas às superfícies de titânio. Em 500x, o grupo D-TiOz apresentou um número maior de células (167) em comparação com D-Ti (133), indicando adesão e proliferação celular aprimoradas na superfície tratada com ozônio. Em 1000×, a diferença foi menos pronunciada, mas ainda favorável ao grupo ozonizado (155 vs. 148 células, respectivamente). Esses achados sugerem que o tratamento com ozônio promove

colonização e distribuição celular precoce sobre o substrato de titânio [Figura 11].

D-Ti



D-TiO₂

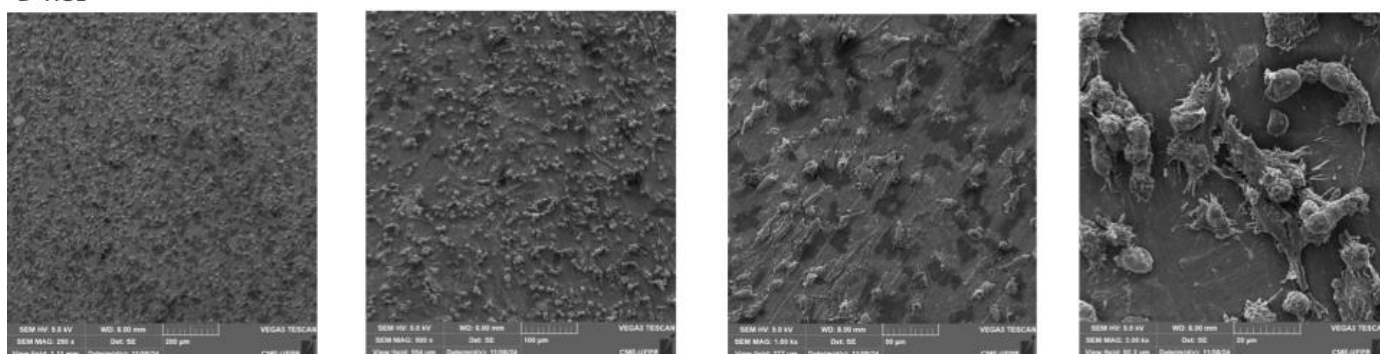
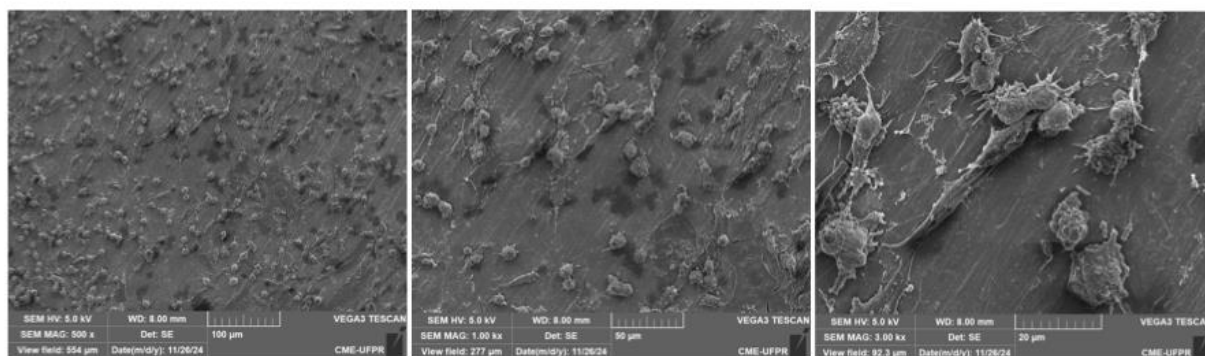


Figura 8: Imagens de MEV de células SAOS-2 cultivadas por 96 h sobre superfícies D-Ti (linha superior) e D-TiO₂ (linha inferior), com ampliações progressivas (200×, 500×, 1000×, 3000×).

D-Ti



D-TiO₂

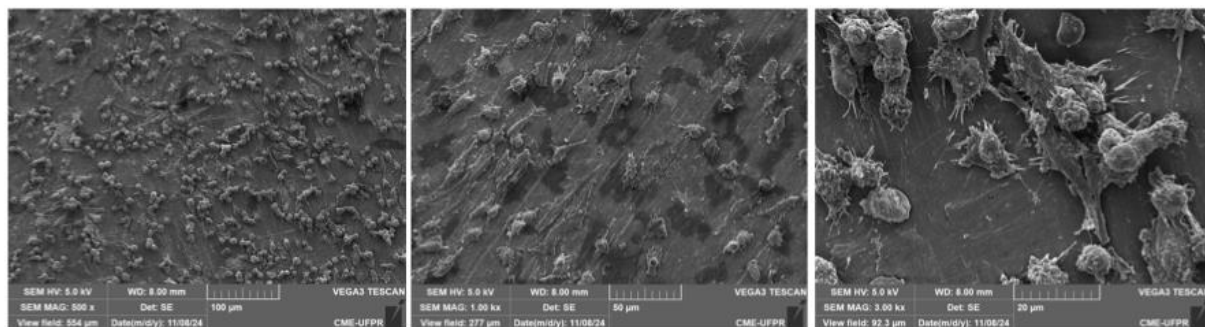


Figura 9: Imagens de MEV de células SAOS-2 cultivadas por 96 h sobre superfícies D-Ti (linha superior) e D-TiO₂ (linha inferior), com ampliações progressivas (500×, 1000×, 3000×).

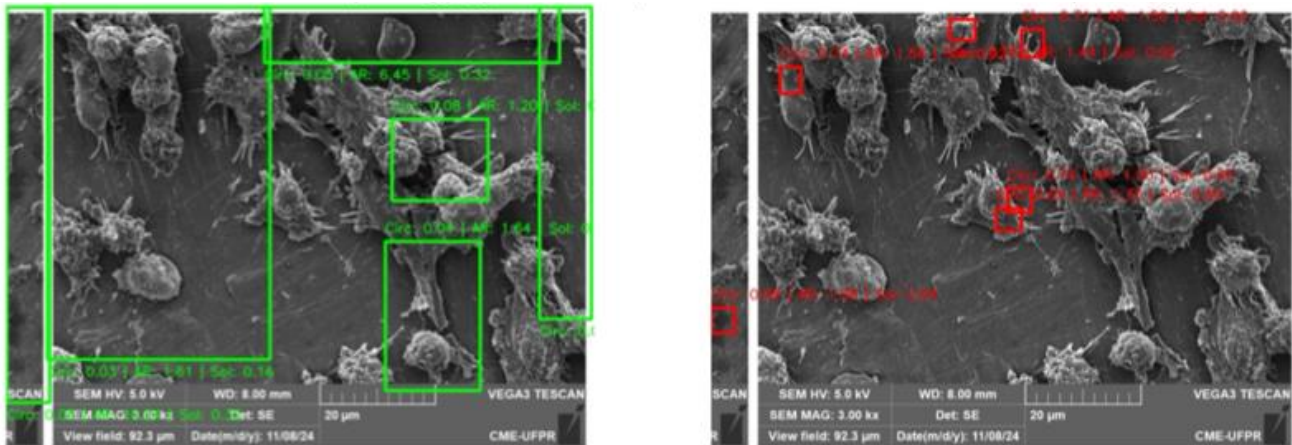


Figura 10: Imagens de MEV de células Saos-2 cultivadas por 4 dias (96h) sobre superfícies **D-TiOz** com morfologia de células aderidas (caixas verdes) e não aderidas – arredondadas (caixas vermelhas) (3000×).

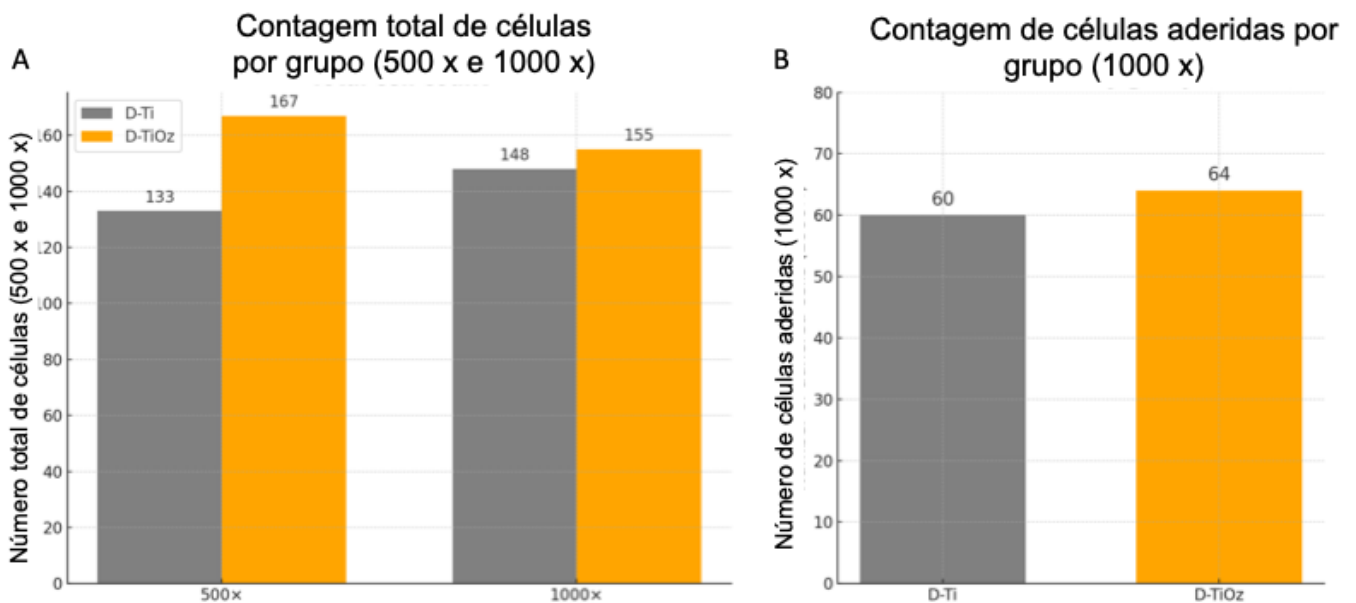


Figura 11. Gráfico representando a Contagem de células totais e aderidas em superfícies de titânio sem tratamento com ozônio (D-Ti) e com tratamento com ozônio (D-TiOz) – Análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV). (A) Contagem total de células – magnificação de 500x e 1000x. (B) Contagem de células aderidas - magnificação 1000x, nos grupos D-Ti e D-TiOz, respectivamente.

4.3.6.1 Conclusões da Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

- A modificação superficial com ozônio promoveu **melhor adesão, maior densidade celular e morfologia osteoblástica mais madura** após 04 dias de cultura celular.
- O grupo D-TiOz apresentou **características morfológicas compatíveis com maior biocompatibilidade e atividade osteogênica**, o que corrobora os dados obtidos

nos ensaios de MTT, ALP, ARS e qPCR.

- Os dados sugerem que a ozonização da superfície de titânio **favorece a ancoragem e o espalhamento celular**, fatores críticos para o sucesso da osseointegração.

4.4 DISCUSSÃO

4.4.1 Síntese Geral dos Resultados Celulares

O presente estudo buscou avaliar os efeitos do tratamento com gás ozônio sobre superfícies de titânio grau 5, analisando exclusivamente os desfechos celulares em modelo *in vitro* utilizando a linhagem osteoblástica humana Saos-2. Os experimentos contemplaram parâmetros fundamentais do comportamento osteoblástico, incluindo viabilidade e proliferação celular (MTT), migração celular (scratch test), formação de matriz mineralizada (Alizarin Red Staining), atividade da fosfatase alcalina (ALP), expressão de genes osteogênicos (qPCR) e análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

De maneira geral, observou-se que o tratamento com ozônio (D-TiOz) resultou em desempenho superior em quase todos os parâmetros avaliados, quando comparado às superfícies apenas usinadas (D-Ti) e ao grupo controle celular sem material (CT). Esses achados reforçam a hipótese de que a ozonização promove alterações favoráveis na interface material-célula, potencializando propriedades osteocondutoras e indicando aplicabilidade promissora tanto na implantodontia quanto na ortopedia.

4.4.2. Viabilidade e Proliferação Celular (MTT)

A análise de viabilidade e proliferação celular pelo ensaio de MTT revelou que, ao terceiro dia de cultivo, as células SAOS-2 apresentaram maior atividade metabólica sobre os discos D-TiOz em relação aos grupos D-Ti e CT. Esse resultado sugere que o ozônio contribui para a criação de uma superfície mais favorável à adesão inicial e à expansão celular.

A literatura demonstra que a energia superficial e a molhabilidade do titânio desempenham papéis centrais nesse processo [6,10,11]. Superfícies hidrofílicas favorecem a adsorção de proteínas adesivas como fibronectina e vitronectina, fundamentais para a ligação mediada por integrinas e subsequente organização do citoesqueleto [6]. Embora a

presente análise não tenha incluído a caracterização de molhabilidade ou composição química (foco restrito às respostas celulares), é razoável inferir que os efeitos observados no MTT estejam relacionados à remoção de contaminantes e ao enriquecimento da camada de TiO_2 induzidos pelo ozônio, conforme documentado em estudos anteriores [11,12].

Assim, o incremento na proliferação celular sobre superfícies ozonizadas pode ser atribuído a uma combinação de maior disponibilidade de sítios de ancoragem e modulação favorável do microambiente, fatores que em conjunto promovem um cenário mais propício para o estabelecimento da osseointegração.

4.4.3 Migração Celular (Scratch Test)

O ensaio de cicatrização (scratch test) demonstrou que as células cultivadas na presença dos discos D-TiOz apresentaram fechamento mais acelerado da área do risco em comparação aos grupos D-Ti e CT, com diferenças significativas a partir de 72 horas.

A migração celular é um passo crítico para a colonização da superfície do implante, influenciando diretamente a formação inicial de matriz extracelular e o recrutamento de osteoprogenitores [16–18]. Esse resultado indica que a ozonização pode não apenas aumentar a adesão, mas também estimular mecanismos ativos de migração, possivelmente relacionados à reorganização do citoesqueleto e ao aumento da expressão de receptores de adesão.

A aceleração da migração celular observada neste estudo é consistente com achados de Aita et al. [7], que relataram resultados semelhantes em superfícies de titânio fotofuncionalizadas por radiação UV. Isso sugere que diferentes abordagens de ativação superficial — UV ou ozônio — podem compartilhar mecanismos comuns, especialmente no que diz respeito à remoção de hidrocarbonetos e restauração da energia superficial.

Portanto, os resultados obtidos reforçam a relevância do ozônio como alternativa prática e eficiente para melhorar a resposta inicial de células osteoblásticas, favorecendo a rápida cobertura da superfície do implante.

4.4.4 Formação de Matriz Mineralizada - Alizarin Red Staining (ARS)

A análise de mineralização da matriz extracelular, por meio da coloração com Alizarin Red Staining - ARS, revelou que após 14 dias de cultivo os discos D-TiOz apresentaram maior deposição de cálcio em comparação ao grupo D-Ti e, de maneira ainda mais expressiva, ao grupo controle celular.

Esse achado é particularmente relevante, pois a mineralização representa uma etapa avançada da diferenciação osteoblástica, refletindo não apenas a adesão e a proliferação iniciais, mas a efetiva maturação funcional da célula. A literatura mostra que superfícies bioativas podem modular a cinética de deposição mineral, influenciando a qualidade da interface osso-implante [5,9].

No presente estudo, a maior concentração de cálcio associada ao grupo D-TiOz sugere que a ozonização contribui para acelerar a transição de estágios iniciais de diferenciação para a formação ativa de matriz mineralizada. Tal efeito pode estar associado à regulação positiva de genes como ALP e TCF-1 (discutidos adiante), indicando que o ozônio não atua apenas de forma pontual, mas desencadeia um conjunto integrado de respostas pró-osteogênicas.

4.4.5 Atividade da Fosfatase Alcalina (ALP)

A fosfatase alcalina é considerada um marcador clássico da diferenciação osteoblástica, comumente associada às fases iniciais do processo de mineralização. No presente estudo, observou-se que as células em contato com discos D-TiOz apresentaram maior atividade de ALP já no primeiro dia de cultivo, quando comparadas aos grupos D-Ti e CT.

Esse resultado sugere que o ozônio pode antecipar eventos moleculares associados ao comprometimento da linhagem osteoblástica, favorecendo a ativação precoce de vias de sinalização relacionadas à osteogênese. Embora o grupo D-Ti tenha demonstrado o pico mais elevado de atividade enzimática no quinto dia, a antecipação observada no grupo D-TiOz reflete uma aceleração da programação osteoblástica, aspecto crítico para a integração inicial de implantes em contextos clínicos.

A ativação precoce da ALP é coerente com estudos que demonstram a capacidade de superfícies hidrofílicas em modular positivamente a expressão gênica osteoblástica [7,8,20]. Assim, pode-se inferir que a ozonização favorece a criação de uma superfície

quimicamente ativa, capaz de sinalizar rapidamente às células osteoblásticas o início da diferenciação, encurtando o tempo necessário para o início da formação da matriz mineralizada.

4.4.6 Expressão Gênica (qPCR)

A quantificação da expressão gênica revelou que as superfícies tratadas com ozônio promoveram aumento significativo na expressão de **TCF-1** e **ALP**, concomitantemente à redução da expressão de genes tardios como **OPG** e **BSP**.

O aumento da expressão de **TCF-1**, um fator de transcrição associado à via Wnt/ β -catenina, é especialmente relevante, uma vez que essa via desempenha papel fundamental no comprometimento de células-tronco mesenquimais para a linhagem osteoblástica. A elevação de TCF-1 observada no grupo D-TiOz sugere que o ozônio potencializa a ativação de vias osteogênicas de forma mais eficiente que a superfície apenas usinada, corroborando a ideia de aceleração do processo de diferenciação.

Em paralelo, a regulação positiva de ALP e a redução de OPG e BSP após 04 dias (96 horas) podem ser interpretadas como reflexo da transição precoce das células para fases mais avançadas da osteogênese, onde marcadores iniciais são intensamente ativados enquanto marcadores tardios passam a ser suprimidos ou modulados em outro estágio [7,8].

Esses resultados indicam que o ozônio atua não apenas sobre propriedades físico-químicas da superfície, mas também como modulador do perfil molecular das células osteoblásticas, estabelecendo um microambiente propício para o rápido comprometimento osteogênico.

4.4.7 Morfologia Celular (MEV)

A análise morfológica por MEV mostrou que as células em contato com os discos ozonizados apresentaram maior densidade de recobrimento, além de morfologia compatível com estado ativo, incluindo maior espalhamento e presença abundante de filopódios e lamelipódios. Em contraste, nas superfícies apenas usinadas observou-se menor densidade e células mais arredondadas, sugerindo adesão e organização menos eficientes.

A presença de extensões citoplasmáticas é indicativa de intensa atividade de interação célula-substrato, correlacionando-se com melhor ancoragem e formação de complexos de adesão focal. Esses achados reforçam os resultados obtidos nos ensaios funcionais e moleculares, apontando para uma convergência entre observações qualitativas e quantitativas no sentido de uma superfície mais bioativa após ozonização.

4.4.8 Integração dos Achados e Relação com Propriedades Osteocondutoras

Os resultados apresentados permitem integrar uma narrativa coerente sobre o impacto do ozônio na interface titânio-célula:

- **Adesão e proliferação inicial** → evidenciadas pelo aumento do MTT e pela morfologia celular compatível com estado ativo.
- **Migração** → acelerada no grupo D-TiOz, favorecendo a rápida colonização da superfície.
- **Diferenciação precoce** → demonstrada pela antecipação da atividade da ALP e pela regulação positiva de TCF-1.
- **Formação de matriz mineralizada** → maior deposição de cálcio após 14 dias, indicativa de osteogênese mais eficiente.

Esse conjunto de achados confirma que a ozonização atua como modulador positivo das **propriedades osteocondutoras** do titânio, promovendo não apenas maior adesão e proliferação, mas também aceleração do processo de diferenciação e mineralização. Em contexto clínico, esses efeitos podem se traduzir em tempos reduzidos de osseointegração, maior previsibilidade e menor risco de falhas precoces.

4.4.9 Comparação com Métodos Tradicionais de Tratamento de Superfícies de Titânio

Diversos métodos têm sido empregados para otimizar superfícies de titânio, incluindo jateamento, ataque ácido, anodização, revestimento por plasma spray, modificação com hidroxiapatita, e fotofuncionalização por radiação UV [16–22]. Embora cada técnica apresente vantagens específicas, há limitações importantes, como complexidade de execução, custo elevado, introdução de contaminantes ou alterações irreversíveis na macroestrutura.

Em comparação, o **tratamento com ozônio** destaca-se por:

- **Simplicidade de aplicação**, podendo ser realizado em condições laboratoriais ou clínicas sem equipamentos de alta complexidade.
- **Baixo custo relativo**, quando comparado a métodos como plasma spray ou anodização.
- **Ausência de alteração macroscópica da superfície**, preservando características mecânicas críticas para o implante.
- **Efeito adicional antimicrobiano**, relevante na prevenção de contaminações peri-implantares [23–26].

Os resultados obtidos neste estudo, portanto, colocam a ozonização em posição de destaque como alternativa promissora para otimização da bioatividade do titânio, com potencial de superar algumas limitações dos métodos tradicionais.

4.4.10 Avanços Clínicos em Implantes e Próteses de Titânio na Odontologia e Ortopedia

O titânio é amplamente utilizado em implantes dentários, placas de fixação, parafusos ortopédicos, próteses articulares e dispositivos craniofaciais [1–4]. O sucesso clínico desses dispositivos depende fundamentalmente da qualidade e rapidez da osseointegração, razão pela qual avanços no tratamento de superfícies têm impacto direto na prática médica e odontológica.

Na odontologia, implantes com superfícies modificadas demonstraram reduzir o tempo necessário para carga funcional, aumentando a previsibilidade em pacientes com condições sistêmicas adversas. Na ortopedia, próteses com superfícies bioativas mostram maior estabilidade inicial e menor taxa de falhas, especialmente em cirurgias complexas como artroplastias de quadril e joelho.

A introdução do ozônio como ferramenta de modificação de superfície pode representar um avanço significativo ao aliar baixo custo, facilidade de aplicação e resultados biológicos positivos, potencializando o desempenho clínico de implantes e próteses de titânio.

4.4.11 Limitações do Estudo

Apesar dos resultados promissores, este estudo apresenta algumas limitações que devem ser consideradas:

- I. **Modelo *in vitro*** → embora útil para elucidar mecanismos celulares, não reproduz integralmente o ambiente fisiológico, que inclui fatores como vascularização, resposta imune e carga mecânica.
- II. **Tempo experimental limitado** → os ensaios foram conduzidos até 14 dias, não abrangendo períodos mais longos de mineralização e remodelação.
- III. **Ausência de avaliação *in vivo*** → fundamental para confirmar a relevância clínica dos achados em modelos animais e humanos.
- IV. **Padronização do protocolo de ozonização** → embora este estudo tenha utilizado concentração e tempo definidos, há variações significativas na literatura [11,12], dificultando comparações diretas.

4.4.12 Perspectivas Futuras e Sugestões de Pesquisas Complementares

Com base nos resultados obtidos, sugerem-se direções futuras para aprofundar o conhecimento sobre o impacto da ozonização em superfícies de titânio:

- **Estudos *in vivo*** em modelos animais, avaliando formação óssea, resposta imune e estabilidade a longo prazo.
- **Comparação direta com outros métodos de modificação de superfície**, como SLA, anodização e fotofuncionalização UV, em condições experimentais equivalentes.
- **Exploração de protocolos combinados**, associando ozônio a revestimentos bioativos ou biomiméticos.
- **Avaliação em contextos clínicos desafiadores**, como pacientes diabéticos, fumantes ou com osteoporose.

Tais investigações são essenciais para consolidar a ozonização como uma estratégia clínica viável, integrando-a ao arsenal de modificações de superfície disponíveis para otimizar implantes e próteses de titânio.

4.4.13 Considerações Finais

A análise integrada dos resultados celulares obtidos neste estudo demonstra que o tratamento com gás ozônio potencializa significativamente as propriedades osteocondutoras de superfícies de titânio grau 5, promovendo maior adesão, proliferação, diferenciação e mineralização de células osteoblásticas humanas *in vitro*.

Em comparação aos métodos tradicionais, a ozonização destaca-se por simplicidade, baixo custo e preservação da integridade estrutural, configurando-se como uma alternativa promissora tanto para a implantodontia quanto para a ortopedia. Embora estudos complementares sejam necessários, os achados apresentados fornecem evidências robustas de que o ozônio pode contribuir de forma relevante para avanços clínicos na integração de dispositivos de titânio ao tecido ósseo.

4.5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que o tratamento da superfície do titânio grau 5 com gás ozônio exerce efeito positivo sobre o comportamento osteoblástico *in vitro*. Em comparação às superfícies apenas usinadas, o titânio ozonizado promoveu maior viabilidade e proliferação celular, acelerou a migração e o recobrimento superficial, antecipou a atividade da fosfatase alcalina, aumentou a expressão de genes relacionados à osteogênese e favoreceu a deposição de matriz mineralizada. Além disso, a análise morfológica revelou células mais aderidas, com maior espalhamento e intensa formação de prolongamentos citoplasmáticos, reforçando a bioatividade da superfície tratada.

De forma integrada, esses achados confirmam que o ozônio atua como modulador das propriedades osteocondutoras do titânio, favorecendo etapas críticas do processo de osseointegração. Por suas características de simplicidade, baixo custo e ausência de alteração macroscópica da superfície, a ozonização apresenta-se como alternativa promissora em relação aos métodos tradicionais de modificação de superfície, com potencial translacional para aplicações clínicas em implantodontia e ortopedia.

Entretanto, apesar dos resultados encorajadores, ressaltam-se as limitações do modelo *in vitro*, indicando a necessidade de estudos complementares, especialmente em modelos *in vivo* e ensaios clínicos controlados. A consolidação da ozonização como

protocolo de tratamento de superfícies de titânio depende de investigações adicionais que confirmem sua eficácia e segurança em condições fisiológicas complexas.

4.6. REFERÊNCIAS

1. NAVARRO, M.; MICHIARDI, A.; CASTAÑO, O.; PLANEL, J. A. Biomaterials in orthopaedics. *Journal of the Royal Society Interface*, v. 5, p. 1137–1158, 2008.
2. SCHWARTZ, Z.; KIESWETTER, K.; DEAN, D. D.; BOYAN, B. D. Underlying mechanisms at the bone–surface interface during regeneration. *Journal of Periodontal Research*, v. 32, p. 166–171, 1997.
3. LEVENTHAL, G. S. Titanium, a metal for surgery. *Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, v. 33, n. 2, p. 473–474, 1951.
4. BRÅNEMARK, P. I.; BREINE, U.; LINDSTRÖM, J. et al. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 3, p. 81–100, 1969.
5. TAKEMOTO, M.; FUJIBAYASHI, S.; NEO, M.; SUZUKI, J.; KOKUBO, T.; NAKAMURA, T. Mechanical properties and osteoconductivity of porous bioactive titanium. *Biomaterials*, v. 26, n. 30, p. 6014–6023, 2005.
6. ZHAO, G.; SCHWARTZ, Z.; WIELAND, M. et al. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 74, n. 1, p. 49–58, 2005.
7. AITA, H.; HORI, N.; TAKEUCHI, M.; SUZUKI, T.; YAMADA, M.; ANPO, M. et al. The effect of ultraviolet functionalization of titanium on integration with bone. *Biomaterials*, v. 30, n. 6, p. 1015–1025, 2009.
8. TSUKIMURA, N.; YAMADA, M.; IWASA, F.; MINAMIKAWA, H.; ATT, W.; UENO, T. et al. Synergistic effects of UV photofunctionalization and micro-nano hybrid topography on the biological properties of titanium. *Biomaterials*, v. 32, n. 19, p. 4358–4368, 2011.
9. WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T. Suggested guidelines for the topographic evaluation of implant surfaces. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, v. 15, p. 331–334, 2000.

10. LUMETTI, S.; MANFREDI, E.; FERRARIS, S.; SPRIANO, S.; PASSERI, G.; GHIACCI, G.; MACALUSO, G.; GALLI, C. The response of osteoblastic MC3T3-E1 cells to micro- and nano-textured, hydrophilic and bioactive titanium surfaces. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 27, p. 68–76, 2016.
11. SUNARSO, S. et al. A superhydrophilic titanium implant functionalized by ozone gas modulates bone marrow cell and macrophage responses. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 27, p. 127, 2016.
12. YUANYUAN, Y. et al. UV/ozone irradiation manipulates immune response for antibacterial activity and bone regeneration on titanium. *Materials Science and Engineering C*, v. 129, p. 112377, 2021.
13. BOCCI, V. A. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Rivista Italiana di Ossigeno-Ozonoterapia*, v. 5, n. 2, p. 93–104, 2006.
14. STÜBINGER, S.; SADER, R.; FILIPPI, A. The use of ozone in dentistry and maxillofacial surgery: a review. *Quintessence International*, v. 37, p. 353–359, 2006.
15. RAGHAVENDRA, S.; WOOD, M. C.; TAYLOR, T. D. Early wound healing around endosseous implants: a review of the literature. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, v. 20, n. 3, p. 425–431, 2005.
16. BOCCI, V.; BORRELLI, E.; TRAVAGLI, V.; ZANARDI, I. The ozone paradox: Ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. *Medicinal Research Reviews*, v. 29, n. 4, p. 646–682, 2009.
17. THOMAS, T. R. Characterization of surface roughness. *Precision Engineering*, v. 3, n. 2, p. 97–104, 1981.
18. SCHROEDER, A. et al. The reactions of bone, connective tissue, and epithelium to endosteal implants with titanium-sprayed surfaces. *Journal of Maxillofacial Surgery*, v. 9, p. 15–25, 1981.
19. MANIATOPOULOS, C.; PILLIAR, R. M.; SMITH, D. C. Threaded versus porous-surfaced designs for implant stabilization in bone – endodontic implant model. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 20, n. 9, p. 1309–1333, 1986.
20. TAKATORI, Y. et al. Plasma sprayed calcium phosphate coatings for bone integration. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 21, n. 12, p. 1375–1385, 1987.
21. PULEO, D. A.; NANJI, A. Understanding and controlling the bone–implant interface. *Biomaterials*, v. 20, p. 2311–2321, 1999.

22. ÖSTBERG, A. K.; DAHLGREN, U.; SUL, Y. T.; JOHANSSON, C. B. Inflammatory cytokine release is affected by surface morphology and chemistry of titanium implants. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 26, p. 155–163, 2015.
23. WENNERBERG, A.; BOUGAS, K.; JIMBO, R.; ALBREKTSSON, T. Implant coatings: new modalities for increased osseointegration. *American Journal of Dentistry*, v. 26, n. 2, p. 105–112, 2013.
24. LEE, J. H.; OGAWA, T. The biological aging of titanium implants. *Implant Dentistry*, v. 21, n. 5, p. 415–421, 2012.
25. BUSER, D. et al. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants: a histomorphometric study in miniature pigs. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 25, n. 7, p. 889–902, 1991.
26. ZANIVAN, D. S.; ELIAS, C. N.; DARÓZ, S. R. Análise da superfície de fratura de implante osseointegrado e mecanismos envolvidos na cicatrização. *Revista ImplantNews*, v. 6, n. 1, p. 39–46, 2009.
27. JAVED, F. et al. Implant surface morphology and primary stability: Is there a connection? *Implant Dentistry*, v. 20, n. 1, p. 40–46, 2011.
28. BRENTTEL, A. S. et al. Histomorphometric analysis of pure titanium implants with porous surface versus rough surface. *Journal of Applied Oral Science*, v. 14, n. 3, p. 213–218, 2006.
29. WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clinical Oral Implants Research*, v. 20, suppl. 4, p. 172–184, 2009.
30. WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T. Implant surfaces beyond micron roughness: Experimental and clinical knowledge of surface topography and surface chemistry. *International Dentistry South Africa*, v. 8, p. 14–18, 2006.
31. LANG, N. P. et al. Early osseointegration to hydrophilic and hydrophobic implant surfaces in humans. *Clinical Oral Implants Research*, v. 22, p. 349–356, 2011.
32. NOVAES JUNIOR, A. B. et al. Influence of implant surfaces on osseointegration. *Brazilian Dental Journal*, v. 21, n. 6, p. 471–481, 2010.
33. BARROS, R. R. M. et al. Biofunctionalized implant surface. *Brazilian Dental Journal*, v. 20, n. 2, p. 91–98, 2009.

34. BUSER, D. et al. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *Journal of Dental Research*, v. 83, n. 7, p. 529–533, 2004.
35. WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T.; LAUSAMAA, J. Torque and histomorphometric evaluation of c.p. titanium screws blasted with 25 and 75 μm sized particle of Al_2O_3 . *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 30, p. 251–260, 1996.
36. MALUF, P. S. Z. et al. Vantagens do tratamento de superfície a laser em implantes dentais osseointegráveis. *ImplantNews*, v. 4, n. 6, p. 643–646, 2007.
37. CARLSSON, L. V.; ALBREKTSSON, T.; BERMAN, C. Bone response to plasma-cleaned titanium implants. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, v. 4, n. 3, p. 199, 1989.
38. FEIGHAN, J. E. et al. The influence of surface-blasting on the incorporation of titanium-alloy implants in a rabbit intramedullary model. *Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, v. 77, n. 9, p. 1380–1395, 1995.
39. MUSTAFA, K. et al. Attachment and proliferation of human oral fibroblasts to titanium surfaces blasted with TiO_2 particles: A scanning electron microscopic and histomorphometric analysis. *Clinical Oral Implants Research*, v. 9, n. 3, p. 195–207, 1998.
40. IVANOFF, C. et al. Histologic evaluation of the bone integration of TiO_2 blasted and turned titanium microimplants in humans. *Clinical Oral Implants Research*, v. 12, n. 2, p. 128–134, 2001.
41. BABBUSH, C. A.; KENT, J. N.; MISIEK, D. J. Titanium plasma-sprayed (TPS) screw implants for the reconstruction of the edentulous mandible. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 44, n. 4, p. 274–282, 1986.
42. DE GROOT, K. et al. Plasma sprayed coatings of hydroxylapatite. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 21, n. 12, p. 1375–1381, 1987.
43. DOHAN EHRENFEST, D. M. et al. Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography. *Trends in Biotechnology*, v. 28, n. 4, p. 198–206, 2010.
44. BOCCI, V.; ZANARDI, I.; VALACCHI, G.; BORRELLI, E.; TRAVAGLI, V. Validity of oxygen-ozone therapy as integrated medication form in chronic inflammatory diseases. *Cardiovascular & Hematological Disorders Drug Targets*, v. 15, n. 2, p. 127–138, 2015.
45. LINDERBACK, P.; HARMANKAYA, N.; ASKENDAL, A.; AREVA, S.; LAUSMAA, J.; TENGVAL, P. The effect of heat- or ultraviolet ozone-treatment of titanium on complement

deposition from human blood plasma. *Biomaterials*, v. 31, p. 4795–4801, 2010.

46. DE OLIVEIRA, R. R.; SCHWARTZ-FILHO, H. O.; NOVAES, A. B.; GARLET, G. P.; FREITAS DE SOUZA, R.; TABA, M. et al. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: cytokine profile in gingival crevicular fluid, preliminary results. *Journal of Periodontology*, v. 80, n. 1, p. 98–105, 2009.

47. NOGALES, C. G.; FERREIRA, M. B.; MONTEMOR, A. F.; RODRIGUES, M. F. A.; LAGE-MARQUES, J. L.; ANTONIAZZI, J. H. Ozone therapy as an adjuvant for endodontic protocols: microbiological ex vivo study and cytotoxicity analyses. *Journal of Applied Oral Science*, v. 24, n. 6, p. 607–613, 2016.

48. GLÓRIA, J. C. R.; DOUGLAS-DE-OLIVEIRA, D. W.; SILVA, L. D. A.; FALCI, S. G. M.; SANTOS, C. R. R. Influence of ozonized water on pain, oedema, and trismus during impacted third molar surgery: a randomized, triple blind clinical trial. *BMC Oral Health*, v. 20, n. 1, p. 1–9, 2020.

49. PATEL, P. V.; KUMAR, S.; VIDYA, G. D.; PATEL, A.; HOLMES, J. C.; KUMAR, V. Cytological assessment of healing palatal donor site wounds and grafted gingival wounds after application of ozonated oil: an eighteen-month randomized controlled clinical trial. *Acta Cytologica*, v. 56, n. 3, p. 277–284, 2012.

50. PATEL, P. V.; KUMAR, V.; KUMAR, S.; VIDYA, G. D.; PATEL, A. Therapeutic effect of topical ozonated oil on the epithelial healing of palatal wound sites: a planimetric and cytological study. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, v. 2, n. 4, p. 248–258, 2011.

51. MOHER, D.; LIBERATI, A.; TETZLAFF, J.; ALTMAN, D. G. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Medicine*, v. 6, n. 7, e1000097, 2009. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.1000097>. Acesso em: 13 maio 2020.

52. OUZZANI, M.; HAMMADY, H.; FEDOROWICZ, Z.; ELMAGARMID, A. Rayyan – a web and mobile app for systematic reviews. *Systematic Reviews*, v. 5, n. 1, p. 1–10, 2016.

53. TU, M. G.; CHEN, Y. W.; SHIE, M. Y. Macrophage-mediated osteogenesis activation in co-culture with osteoblast on calcium silicate cement. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 26, p. 276–285, 2015.

54. ÖSTBERG, A. K.; DAHLGREN, U.; SUL, Y. T.; JOHANSSON, C. B. Inflammatory cytokine release is affected by surface morphology and chemistry of titanium implants. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 26, p. 155–163, 2015.

55. SILVA, R. C. R. Alteração da molhabilidade de superfícies internas de tubulações utilizadas no transporte de óleos pesados via core-flow. 2003. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Petróleo) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.
56. SANTOS, R. G. Avaliação da molhabilidade de superfícies de oleodutos através de medidas de ângulo de contato: efeito de asfaltenos e de ácidos naftênicos. 2003. 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.
57. CARDOSO, C. C. et al. Azione dell'olio ozonizzato (Bioperoxoil) nelle lesione chirurgiche dei modelli pre-clinic. *Lesiones Quirurgicas*, p. 1–11, 2016.
58. BORGES, G. A. et al. In vitro evaluation of wound healing and antimicrobial potential of ozone therapy. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, v. 45, p. 364–370, 2017.
59. FITZPATRICK, J. M. Mendeley manages your documents on your desktop and in the cloud. 2009.
60. KHAN, S. N. et al. The biology of bone grafting. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, v. 13, n. 1, p. 77–86, 2005.
61. DE CARVALHO, D. R. et al. Characterization and in vitro cytocompatibility of an acid-etched titanium surface. *Brazilian Dental Journal*, v. 21, p. 505–511, 2010.
62. HOTCHKISS, K. M.; REDDY, G. B.; HYZY, S. L.; SCHWARTZ, Z.; BOYAN, B. D.; OLIVARES-NAVARRETE, R. Titanium surface characteristics, including topography and wettability, alter macrophage activation. *Acta Biomaterialia*, v. 31, p. 425–434, 2016.
63. FIGUEIREDO, P. M.; REIMÃO, J.; FERNANDES, M. H.; ROCHA, L. A.; CARVALHO, S. Macrophage response to titanium implants with different surface topographies – an in vitro study. *Journal of Functional Biomaterials*, v. 14, n. 4, p. 211, 2023.
64. GAO, J.; LV, Z.; DENG, K.; CHEN, W.; LI, Y.; CUI, Y. et al. Functionalization of titanium with antimicrobial peptide GL13K promotes M2 macrophage polarization and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *BioMed Research International*, v. 2020, p. 2327034, 2020.
65. ZHANG, W.; LIU, X.; LI, D.; SUN, H.; LI, Y.; ZHANG, X. et al. Graphene oxide-modified titanium surfaces promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells via PI3K/Akt/GSK-3 β / β -catenin signaling pathway. *RSC Advances*, v. 10, n. 4, p. 1905–1916, 2020.
66. ZHANG, L.; ZHANG, Y.; HAN, B.; YANG, K.; KONG, D.; HE, Y. Effect of titanium implant surface on macrophage polarization and osseointegration: a systematic review. *Journal of*

Orthopaedic Surgery and Research, v. 17, n. 1, p. 504, 2022.

67. KOMORI, T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by Runx2. *Cell and Tissue Research*, v. 339, n. 1, p. 189–195, 2010.

68. NAKASHIMA, K.; DE CROMBRUGGHE, B. Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *Trends in Genetics*, v. 19, n. 8, p. 458–466, 2003.

69. WHYTE, M. P. Physiological role of alkaline phosphatase explored in hypophosphatasia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1192, p. 190–200, 2010.

70. RICARD-BLUM, S. The collagen family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 3, n. 1, p. a004978, 2011.

71. LEE, N. K. et al. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell*, v. 130, n. 3, p. 456–469, 2007.

72. SOARES, M. S. M. Marcadores da diferenciação osteoblástica em cultura de células crescidas sobre titânio e expostas a coquetel de fatores de crescimento e proteínas. 2016. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

73. GEIGER, B.; BERSHADSKY, A. Exploring the neighborhood: adhesion-coupled cell mechanosensors. *Cell*, v. 110, n. 2, p. 139–142, 2002.

74. ZHAO, X. et al. FAK signaling promotes osteoblast progenitor cell proliferation and differentiation. *Frontiers in Endocrinology*, v. 12, p. 626113, 2021.

75. BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S.; LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, v. 423, n. 6937, p. 337–342, 2003.

76. HOFBAUER, L. C.; HEUFELDER, A. E. Role of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *Journal of Molecular Medicine*, v. 79, n. 5–6, p. 243–253, 2001.

77. STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 17, p. 463–516, 2001.

78. KONDO, H. et al. Role of TNF- α in bone resorption induced by mechanical unloading. *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 20, n. 5, p. 878–885, 2005.

79. GILBERT, L. et al. Inhibition of osteoblast differentiation by inflammatory cytokines. *Journal of Clinical Investigation*, v. 106, n. 4, p. 505–512, 2000.
80. ESCOBAR, G.; MANGANI, D.; ANDERSON, A. C. T cell factor 1: a master regulator of the T cell response in disease. *Science Immunology*, v. 5, n. 53, 2020.
81. STREET, J. et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, n. 15, p. 9656–9661, 2002.
82. THURSTON, G. Complementary actions of VEGF and Angiopoietin-1 on blood vessel growth and leakage. *Journal of Anatomy*, v. 200, n. 6, p. 575–580, 2002.
83. CAMPOS, K. S. Modificação química de superfícies cerâmicas contendo carbono via deposição de filmes Sol-Gel de SiO_2 com nanopartículas de Cu-Sn-Ti. 2015. Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.
84. RODGERS, J. L.; NICEWANDER, W. A. Thirteen ways to look at the correlation coefficient. *The American Statistician*, v. 42, n. 1, p. 59–66, 1988.
85. MANDERS, E. M.; VERBEEK, F. J.; ATEN, J. A. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *Journal of Microscopy*, v. 169, n. 3, p. 375–382, 1993.

CAPÍTULO 5: DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES DA TESE

5.1. DISCUSSÃO GERAL

5.1.1 Introdução Geral da Discussão

O uso de biomateriais metálicos, em especial o titânio e suas ligas, revolucionou os campos da odontologia e da ortopedia ao proporcionar soluções confiáveis para substituição de dentes perdidos e reparo de segmentos ósseos comprometidos. Desde a descrição inicial do conceito de osseointegração por Brånemark na década de 1960, o titânio grau comercialmente puro e suas ligas têm se consolidado como materiais de eleição para a fabricação de implantes e próteses ortopédicas, devido à sua biocompatibilidade, resistência à corrosão, leveza e propriedades mecânicas adequadas.

Apesar dos avanços, a osseointegração ainda enfrenta desafios clínicos relevantes. Entre eles destacam-se o tempo prolongado necessário para a consolidação óssea ao redor do implante, a ocorrência de falhas precoces relacionadas à má adesão celular inicial, além de fatores sistêmicos que comprometem a regeneração tecidual, como diabetes, osteoporose, tabagismo e radioterapia prévia. Nesse cenário, a modificação das superfícies de titânio emergiu como estratégia essencial para melhorar a resposta celular, aumentar a energia superficial, reduzir contaminantes e acelerar o processo de integração com o tecido ósseo.

Diferentes abordagens têm sido estudadas para otimizar a superfície do titânio, incluindo tratamentos químicos, físicos e biofuncionais. Entre as mais tradicionais estão o jateamento com partículas abrasivas, o ataque ácido (isolado ou combinado ao jateamento, resultando em superfícies SLA), a anodização, a deposição de revestimentos como hidroxiapatita e fosfatos de cálcio, a funcionalização com biomoléculas e a fotofuncionalização por radiação ultravioleta. Essas técnicas, embora eficazes em muitos aspectos, frequentemente apresentam limitações relacionadas à complexidade de aplicação, custos elevados, risco de contaminação ou alterações irreversíveis da macroestrutura. Nesse contexto, o tratamento com **gás ozônio** surge como alternativa promissora. O ozônio é um gás instável, altamente oxidante e de baixo custo, capaz de promover limpeza superficial, aumento da energia livre da superfície e restauração da hidrofília do titânio. Estudos recentes têm demonstrado que sua aplicação pode remover hidrocarbonetos, enriquecer a camada de óxido de titânio e criar condições mais favoráveis para a adesão e proliferação de células osteoblásticas.

A presente tese integra duas linhas de investigação complementares: (1) uma revisão sistemática da literatura sobre o uso do ozônio como modificador de superfícies de titânio; e (2) uma investigação experimental que avaliou, em condições *in vitro*, os efeitos do tratamento com gás ozônio sobre a superfície do titânio grau 5, considerando tanto análises físico-químicas (molhabilidade, EDS, MEV sem células) quanto respostas celulares (viabilidade, migração, mineralização, atividade enzimática, expressão gênica e

morfologia).

5.1.2 Avanços da Literatura em Modificação de Superfícies de Titânio

A literatura consolidada demonstra que o desempenho clínico dos implantes não depende apenas das propriedades intrínsecas do titânio, mas também das características físico-químicas de sua superfície. A rugosidade, a energia superficial e a composição química modulam diretamente a adsorção inicial de proteínas séricas, a adesão celular, a formação de matriz extracelular e, por consequência, a velocidade e a qualidade da osseointegração.

Superfícies lisas ou polidas, apesar de apresentarem boa biocompatibilidade, tendem a promover uma osseointegração mais lenta e menos robusta. Em contrapartida, superfícies rugosas ou tratadas quimicamente favorecem maior contato entre o osso e o implante, resultando em maior estabilidade primária e secundária. No entanto, técnicas como jateamento e ataque ácido apresentam limitações: podem introduzir contaminantes (resíduos de partículas abrasivas), gerar heterogeneidade na rugosidade ou até induzir fragilidades na superfície.

A anodização, por sua vez, permite a formação controlada de camadas de óxido de titânio com nanotopografias específicas, enquanto o plasma spray com hidroxiapatita tem o potencial de induzir osteoindução. Contudo, ambos os métodos exigem equipamentos de alta complexidade, elevam os custos de produção e apresentam desafios relacionados à durabilidade do revestimento.

A fotofuncionalização com radiação UV representa outro avanço importante, capaz de restaurar a hidrofília perdida devido ao envelhecimento biológico do titânio. Esse método remove hidrocarbonetos da superfície e aumenta a energia superficial, melhorando a resposta celular inicial. Entretanto, exige fontes de radiação específicas, que podem não estar disponíveis em todos os centros clínicos.

Em comparação, o ozônio apresenta vantagens significativas: trata-se de um gás de fácil geração em ambiente clínico ou laboratorial, de baixo custo, seguro em concentrações controladas e capaz de promover alterações físico-químicas similares às observadas na fotofuncionalização UV.

5.1.3 Revisão da Literatura sobre Ozônio como Tratamento de Superfície

A revisão sistemática conduzida no âmbito desta tese reuniu estudos que avaliaram o impacto do ozônio na modificação de superfícies de titânio. Apesar da heterogeneidade metodológica (diferenças em concentração, tempo de exposição, tipo de gerador e forma de aplicação), um achado comum foi a melhoria da hidrofília e da energia superficial, com consequente incremento na adesão e proliferação celular.

Estudos *in vitro* demonstraram que superfícies tratadas com ozônio apresentam maior viabilidade celular, melhor espalhamento e organização do citoesqueleto, além de maior deposição de matriz mineralizada em comparação a superfícies controle. Em análises físico-químicas, a ozonização promoveu aumento do conteúdo de oxigênio superficial e redução de carbono, sugerindo remoção de contaminantes orgânicos e enriquecimento da camada de óxido de titânio.

Apesar dos resultados promissores, a revisão evidenciou a ausência de protocolos padronizados para aplicação do ozônio, com variações que dificultam a comparação direta entre estudos. Ademais, poucos estudos avançaram para modelos *in vivo*, e não há ainda ensaios clínicos robustos que confirmem a eficácia da técnica em humanos. Essa lacuna reforça a relevância da investigação experimental desta tese, que buscou caracterizar de forma sistemática o impacto do ozônio em superfícies de titânio grau 5, integrando análises físico-químicas e biológicas.

5.1.4 Resultados Experimentais da Tese

5.1.4.1 Caracterização Físico-Química

Os experimentos de caracterização físico-química mostraram que o tratamento com ozônio alterou significativamente a superfície dos discos de titânio. A análise de molhabilidade evidenciou redução do ângulo de contato em D-TiO₂, indicando restauração da hidrofília da superfície. Este achado é consistente com estudos prévios que associam a maior hidrofília ao aumento da energia livre da superfície, o que favorece a adsorção inicial de proteínas adesivas como fibronectina e vitronectina, fundamentais para o processo de adesão celular.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) demonstrou que a ozonização não promoveu alterações topográficas macroscópicas detectáveis, preservando a microarquitetura resultante da usinagem. Isso é relevante do ponto de vista clínico, pois indica que o tratamento não compromete características estruturais críticas do material.

A análise por espectroscopia de energia dispersiva (EDS) revelou que as superfícies tratadas com ozônio apresentaram maior proporção de oxigênio e redução do conteúdo de carbono em comparação às superfícies apenas usinadas. Além disso, os coeficientes de correlação de Manders e Pearson indicaram maior sobreposição entre Ti e O em D-TiOz, sugerindo enriquecimento da camada de óxido e maior homogeneidade na distribuição superficial.

Esses resultados físico-químicos confirmam que o ozônio atua principalmente na modificação química da superfície, promovendo remoção de contaminantes e enriquecimento da camada de óxido, sem alterar a topografia em escala micrométrica.

5.1.4.2 Ensaios Celulares

Os ensaios celulares demonstraram que a ozonização impactou positivamente em diferentes etapas do processo de osseointegração.

No ensaio de viabilidade e proliferação (MTT), o grupo D-TiOz apresentou maior atividade metabólica em comparação a D-Ti e CT, especialmente após 72 horas de cultivo. Esse resultado sugere que o ozônio favorece um ambiente mais propício à expansão celular inicial.

No ensaio de migração (scratch test), o grupo D-TiOz exibiu fechamento mais rápido da área do risco, indicando aceleração no processo de cobertura da superfície. Esse achado é particularmente relevante, pois a migração celular é fundamental para a rápida colonização do implante e formação de matriz extracelular.

A análise de mineralização (Alizarin Red Staining - ARS) mostrou deposição significativamente maior de cálcio nas superfícies ozonizadas após 14 dias, sugerindo que o tratamento promoveu uma transição mais rápida da fase proliferativa para a fase de diferenciação osteoblástica.

A atividade da fosfatase alcalina (ALP) reforçou essa interpretação: o grupo D-TiOz apresentou aumento precoce da atividade enzimática, indicando indução antecipada da diferenciação osteoblástica.

A expressão gênica (qPCR) revelou aumento da expressão de TCF-1 e ALP, genes relacionados ao comprometimento osteogênico e à mineralização, concomitante à redução de OPG e BSP, genes associados a fases mais tardias ou à regulação do remodelamento. Esse perfil sugere que o ozônio atua como indutor da osteogênese precoce.

Finalmente, a análise morfológica por MEV evidenciou maior densidade celular, com células mais espalhadas, presença de filopódios e lamelipódios abundantes nas superfícies

ozonizadas. Essa morfologia é compatível com células metabolicamente ativas e em processo de síntese de matriz extracelular.

De forma integrada, os ensaios celulares indicaram que o ozônio promoveu uma superfície mais bioativa, capaz de estimular não apenas adesão e proliferação, mas também diferenciação e mineralização osteoblástica de forma mais eficiente do que superfícies apenas usinadas.

5.1.5 Integração dos Achados: O Ozônio como Modificador de Superfície

Os resultados obtidos nesta tese, em conjunto com a revisão da literatura, permitem afirmar que o tratamento do titânio com gás ozônio modifica de maneira favorável as propriedades da superfície, impactando diretamente no comportamento osteoblástico. O conjunto de evidências físico-químicas e biológicas indica que a ozonização promoveu aumento da hidrofília, redução de contaminantes orgânicos, enriquecimento da camada de óxido e, em consequência, favoreceu maior viabilidade, adesão, migração e diferenciação celular.

Essas observações reforçam a hipótese de que a qualidade da interface material–tecido é fortemente determinada pela energia superficial e pelo estado químico da camada de TiO_2 . Ao remover hidrocarbonetos acumulados e enriquecer a superfície em oxigênio, o ozônio cria um microambiente mais receptivo à adsorção inicial de proteínas e à formação de pontos de adesão focal. Este mecanismo, descrito em estudos de fotofuncionalização por radiação UV, parece também ser reproduzido pela ozonização, com a vantagem de empregar um processo mais simples e acessível.

Outro aspecto relevante é que os efeitos positivos da ozonização não se restringiram apenas à adesão inicial, mas se estenderam a diferentes fases da resposta osteoblástica, incluindo mineralização e expressão gênica osteogênica. Isso sugere que o ozônio não apenas melhora a etapa inicial de colonização da superfície, mas influencia a cascata de diferenciação celular, potencializando a maturação do tecido ósseo ao redor do implante. Ao integrar os resultados obtidos com o corpo de evidências disponíveis, é possível considerar o ozônio como uma alternativa viável às técnicas convencionais de modificação de superfícies, especialmente por sua simplicidade de aplicação e custo reduzido.

5.1.6 Comparação com Outras Estratégias de Modificação de Titânio

A discussão sobre o uso do ozônio como tratamento de superfície deve necessariamente incluir sua comparação com outras técnicas já consagradas.

5.1.6.1 Jateamento e Ataque Ácido (SLA)

O método SLA (Sandblasted, Large-grit, Acid-etched) é considerado o padrão ouro entre as superfícies de titânio utilizadas clinicamente. Ele combina rugosidade micrométrica, criada pelo jateamento com partículas abrasivas, com a modificação química promovida pelo ataque ácido. Essa técnica apresenta resultados consistentes em termos de osseointegração precoce, mas não está isenta de limitações. Entre elas, destaca-se a possibilidade de contaminação por partículas residuais, a heterogeneidade da topografia e a necessidade de etapas industriais controladas.

Comparativamente, a ozonização não altera a topografia micrométrica, mas melhora a energia superficial e a composição química. Dessa forma, pode ser considerada uma técnica complementar ao SLA: implantes rugosos poderiam ser ainda mais bioativos se submetidos a tratamento adicional com ozônio, aumentando sua hidrofília imediatamente antes da instalação.

5.1.6.2 Anodização

A anodização gera camadas de óxido de titânio espessas e organizadas, podendo inclusive formar nanotubos capazes de carrear fármacos ou moléculas bioativas. Essa abordagem oferece grande versatilidade, mas exige equipamentos específicos e controle rigoroso do processo, o que eleva o custo e limita a padronização clínica.

O ozônio, por outro lado, não modifica a macroestrutura, mas potencializa a bioatividade da camada de óxido já existente, com maior simplicidade operacional.

5.1.6.3 Plasma Spray e Revestimentos Bioativos

A deposição de hidroxiapatita e fosfatos de cálcio por plasma spray foi uma das primeiras estratégias a buscar osteoindução ativa na superfície do titânio. Embora os resultados iniciais tenham sido promissores, problemas relacionados à estabilidade e à delaminação do revestimento reduziram seu uso clínico.

A ozonização evita esses problemas porque não adiciona uma nova camada, mas sim modifica a química superficial da camada natural de TiO_2 . Isso aumenta a confiabilidade do método, já que não há risco de falhas de adesão entre substrato e revestimento.

5.1.6.4 Fotofuncionalização com Radiação UV

A técnica de fotofuncionalização é talvez a mais próxima da ozonização em termos de mecanismo. Ambas removem hidrocarbonetos, restauram a hidrofília e aumentam a energia superficial. Contudo, a radiação UV requer equipamentos de emissão controlada, de custo relativamente alto e de uso restrito a centros especializados.

O ozônio se destaca como alternativa prática, já que pode ser gerado por equipamentos compactos, acessíveis e de fácil manuseio, inclusive em ambiente clínico.

5.1.6.5 Tratamentos a Laser e Funcionalizações Bioquímicas

Técnicas mais recentes incluem o uso de laser para criar micro e nanotopografias e a imobilização de biomoléculas ou peptídeos na superfície do titânio. Essas abordagens são altamente sofisticadas, mas também apresentam alto custo, complexidade e desafios de estabilidade a longo prazo.

Em comparação, o ozônio oferece uma alternativa de baixo custo e fácil aplicação, embora menos direcionada em termos de biofuncionalização específica.

5.1.7 Custo, Manejo e Segurança do Uso do Ozônio

A avaliação da aplicabilidade clínica de qualquer tecnologia deve necessariamente considerar não apenas a eficácia biológica, mas também sua viabilidade econômica, segurança e facilidade de uso.

5.1.7.1 Custos

A geração de ozônio é relativamente barata, exigindo apenas oxigênio medicinal e um gerador apropriado. Equipamentos médicos de ozonioterapia já são comercialmente disponíveis e apresentam custo acessível em comparação com aparelhos de plasma spray, lasers de alta potência ou sistemas de anodização. Além disso, não há necessidade de

manutenção complexa ou insumos de alto valor.

5.1.7.2 Manejo

O manejo clínico do ozônio é simples. O gás pode ser aplicado em câmaras fechadas contendo os implantes ou diretamente em superfícies expostas antes da instalação cirúrgica. O tempo de exposição varia conforme o protocolo, mas estudos indicam que exposições de algumas horas são suficientes para promover alterações detectáveis na superfície.

Essa simplicidade operacional favorece a integração do método em fluxos clínicos e laboratoriais, sem necessidade de treinamento altamente especializado.

5.1.7.3 Segurança

O ozônio, embora seja um gás tóxico em altas concentrações, pode ser manipulado com segurança em condições controladas. Sua utilização em medicina, inclusive para aplicações terapêuticas como ozonioterapia sistêmica e tópica, já está documentada há décadas, com boa margem de segurança.

No contexto do tratamento de superfícies de titânio, a exposição ocorre em câmaras fechadas, sem risco de inalação por operadores. Além disso, o gás se decompõe rapidamente em oxigênio, não deixando resíduos tóxicos na superfície do implante.

Dessa forma, a ozonização apresenta perfil de segurança favorável, desde que aplicada com equipamentos certificados e protocolos validados.

5.1.8 Confiabilidade dos Resultados e Limitações da Tese

A interpretação dos achados desta tese deve considerar tanto sua consistência interna quanto as limitações metodológicas inerentes. A confiabilidade dos resultados é reforçada por alguns aspectos centrais:

- I. **Padronização experimental:** os discos de titânio foram produzidos a partir do mesmo lote e submetidos a processos de usinagem e esterilização idênticos, o que minimizou variações entre amostras.

- II. **Diversidade de análises:** a combinação de métodos físico-químicos (molhabilidade, EDS, MEV) e biológicos (MTT, migração, mineralização, ALP, qPCR, MEV celular) permitiu uma avaliação integrada da superfície tratada, aumentando a robustez das conclusões.
- III. **Consistência com a literatura:** os achados desta tese estão em consonância com estudos prévios sobre ozônio e fotofuncionalização por UV, reforçando a plausibilidade biológica dos efeitos observados.

Entretanto, algumas limitações devem ser reconhecidas:

- **Modelo *in vitro*:** embora essencial para o controle experimental, o modelo celular não reproduz a complexidade do ambiente biológico *in vivo*, onde fatores sistêmicos, resposta imune, vascularização e carga mecânica influenciam a osseointegração.
- **Tempo de avaliação:** os experimentos foram limitados a períodos de até 14 dias, o que abrange apenas fases iniciais da diferenciação osteoblástica. Estudos de maior duração seriam necessários para avaliar o impacto do ozônio em processos tardios de remodelamento ósseo.
- **Tempo de estoque das amostras:** os experimentos foram realizados com intervalos curtos após o efetivo tratamento com ozônio não sendo possível uma avaliação do “envelhecimento da superfície” após a exposição ao O₃. Estudos com experimentos realizados com amostras mantidas “em estoque” por períodos maiores poderiam produzir resultados diferentes devido à possível contaminação ou perda da reatividade verificada inicialmente.
- **Processo de esterilização:** É importante considerar que o processo de esterilização dos discos de titânio pode ter exercido influência adicional sobre os resultados observados, atuando como um fator de confusão não completamente isolado. Métodos como autoclavação ou estufa a seco, embora essenciais para garantir a assepsia das amostras, são conhecidos por promover alterações superficiais sutis, incluindo modificação da energia superficial, oxidação adicional, remoção parcial de contaminantes orgânicos e até mudanças no grau de hidrofiliicidade. Tais alterações podem impactar diretamente a adesão inicial das células e a dinâmica da formação da camada de proteínas, interferindo assim na resposta osteoblástica subsequente. Embora todos os grupos do estudo tenham sido submetidos ao mesmo protocolo de esterilização, e portanto expostos às mesmas condições, não se pode descartar que o processo tenha potencializado ou atenuado diferenças entre o titânio usinado e o titânio tratado com ozônio. Assim, futuras investigações devem incluir uma avaliação

comparativa entre diferentes métodos de esterilização e seu impacto sobre as propriedades físico-químicas e biológicas das superfícies de titânio.

- **Ausência de análise em modelos animais:** não foram conduzidos experimentos *in vivo* nesta etapa, impossibilitando verificar a tradução direta dos achados celulares para tecidos vivos.
- **Padronização do protocolo de ozonização:** a concentração, o tempo de exposição e o tipo de gerador utilizados nesta tese foram baseados em literatura e otimizações laboratoriais, mas ainda não existe consenso internacional que permita comparação direta entre diferentes grupos de pesquisa.

O reconhecimento dessas limitações é fundamental para orientar os próximos passos de investigação, bem como para evitar extrapolações precipitadas dos achados.

5.1.9 Perspectivas Futuras e Próximos Passos

A continuidade da pesquisa sobre ozonização de superfícies de titânio deve seguir um caminho progressivo, que inclua diferentes níveis de complexidade experimental:

5.1.9.1 Padronização dos Protocolos

É imprescindível a definição de parâmetros universais para a aplicação do ozônio em superfícies metálicas, incluindo concentração do gás, tempo de exposição, distância da fonte e condições ambientais. Apenas com protocolos padronizados será possível comparar resultados entre diferentes centros de pesquisa e consolidar a evidência científica.

5.1.9.2 Estudos *In Vivo*

Modelos animais representam o próximo passo natural para validar os achados *in vitro*. Eles permitirão avaliar não apenas a resposta óssea local, mas também a influência da ozonização na resposta inflamatória, na formação de vasos sanguíneos e na estabilidade biomecânica dos implantes.

5.1.9.3 Ensaios Clínicos

Somente estudos clínicos controlados poderão determinar a real eficácia da ozonização em humanos. Ensaios prospectivos, randomizados e de longo prazo são necessários para comparar a taxa de sucesso de implantes ozonizados com a de implantes submetidos a outras modificações de superfície já consolidadas.

5.1.9.4 Integração com Outras Tecnologias

A ozonização não precisa ser vista como técnica isolada. Ela pode atuar como complemento a métodos já existentes, como SLA e anodização, potencializando a bioatividade das superfícies. Ensaios combinando essas abordagens podem revelar efeitos sinérgicos.

5.1.9.5 Investigação do Impacto Sistêmico

Embora a ozonização seja aplicada apenas à superfície do implante, a resposta biológica sistêmica, especialmente em pacientes com doenças crônicas, precisa ser estudada. Modelos animais com diabetes, osteoporose e tabagismo, por exemplo, podem fornecer informações relevantes sobre a aplicabilidade clínica em populações de risco.

5.1.10 Aplicações Clínicas e Impacto em Odontologia e Ortopedia

A aplicabilidade translacional da ozonização é uma das maiores virtudes desta linha de pesquisa, pois permite vislumbrar sua incorporação em diferentes áreas cirúrgicas e reabilitadoras.

5.1.10.1 Implantodontia e Cirurgia Bucomaxilofacial

Na implantodontia, a ozonização poderia ser utilizada como etapa final de preparo da superfície do implante, imediatamente antes de sua instalação. Esse procedimento teria a função de restaurar a hidrofília perdida pelo envelhecimento biológico do titânio durante o armazenamento. Assim, implantes que permanecem em estoque por meses ou anos poderiam recuperar sua bioatividade por meio de um tratamento rápido e de baixo custo

com ozônio.

Além disso, a técnica poderia ser aplicada diretamente em consultório odontológico, permitindo que o cirurgião-dentista trate os implantes imediatamente antes da cirurgia. Isso representaria uma vantagem significativa em termos de logística, dispensando a necessidade de tratamentos industriais complexos.

No campo da cirurgia bucomaxilofacial, a ozonização apresenta aplicações ainda mais amplas. Placas e parafusos utilizados em fixações de fraturas faciais poderiam ser tratados para favorecer maior estabilidade inicial, acelerar a consolidação óssea e reduzir riscos de complicações inflamatórias. Da mesma forma, próteses customizadas para reconstruções de sequelas traumáticas, próteses de articulação temporomandibular (ATM) e até âncoras utilizadas em procedimentos de discopexia poderiam se beneficiar do aumento da bioatividade do titânio tratado com ozônio. Isso representaria um avanço importante em cirurgias reparadoras complexas, proporcionando integração mais rápida entre biomaterial e tecidos adjacentes, melhorando o prognóstico funcional e estético dos pacientes.

5.1.10.2 Ortopedia

Na ortopedia, a ozonização poderia beneficiar próteses de quadril, joelho e outras articulações, além de placas e parafusos de fixação óssea. O potencial de reduzir o tempo de integração óssea e aumentar a estabilidade inicial do implante é particularmente relevante em pacientes idosos e com baixa qualidade/densidade óssea. Além disso, a possibilidade de aplicação em parafusos e placas utilizados em cirurgias de trauma abre novas perspectivas para reduzir o tempo de consolidação e minimizar complicações.

5.1.10.3 Impacto Clínico

O impacto clínico da adoção da ozonização como tratamento de superfície pode se traduzir em:

- Redução do tempo necessário para carga funcional de implantes odontológicos;
- Maior previsibilidade em pacientes com fatores de risco sistêmico;
- Diminuição do índice de falhas precoces;
- Otimização da reabilitação funcional em ortopedia e cirurgia bucomaxilofacial, com menor tempo de recuperação pós-operatória;
- Melhora no desempenho de próteses customizadas, placas e parafusos faciais, próteses de ATM e âncoras cirúrgicas, ampliando as opções de tratamento

reconstrutivo.

5.1.10.4 Viabilidade Translacional

Por ser uma técnica de baixo custo, segura e de fácil aplicação, a ozonização apresenta excelente potencial de incorporação clínica. Sua viabilidade transcende fronteiras entre países desenvolvidos e em desenvolvimento, o que pode impactar positivamente a saúde pública e ampliar o acesso a reabilitações com implantes.

5.2. CONCLUSÕES FINAIS

A presente tese permitiu avaliar, de forma integrada, o impacto do tratamento com gás ozônio sobre a superfície do titânio grau 5, combinando análises físico-químicas, biológicas e revisão da literatura.

Os principais achados podem ser sintetizados da seguinte forma:

- I. **A revisão sistemática** demonstrou que o ozônio melhora a hidrofília, aumenta a energia superficial e favorece a adesão e proliferação celular, embora ainda não haja protocolos padronizados ou evidência clínica robusta.
- II. **As análises físico-químicas** realizadas nesta tese confirmaram que a ozonização enriquece a camada de óxido de titânio, reduz contaminantes orgânicos e restaura a hidrofília, sem alterar a topografia da superfície.
- III. **Os ensaios celulares** mostraram que o ozônio promoveu maior viabilidade, proliferação, migração, diferenciação e mineralização osteoblástica, além de modular positivamente a expressão gênica relacionada à osteogênese.
- IV. **A integração dos achados** permite concluir que o ozônio se apresenta como alternativa simples, segura e de baixo custo para aumentar a bioatividade do titânio, com potencial de aplicação em implantodontia e ortopedia.
- V. **As limitações do estudo**, como a ausência de modelos in vivo e clínicos, reforçam a necessidade de pesquisas futuras para consolidar a evidência científica.

Em síntese, a ozonização representa uma estratégia inovadora e promissora para o tratamento de superfícies de titânio. Sua simplicidade de aplicação, baixo custo e perfil de segurança favorável a colocam como candidata a ser incorporada na prática clínica.

Contudo, apenas a consolidação de protocolos padronizados e a realização de estudos in vivo e clínicos permitirão confirmar se o ozônio pode ser definitivamente considerado um tratamento de superfície adequado e eficaz.

CAPÍTULO 6: PRESS RELEASE

O titânio é um dos materiais mais utilizados em implantes dentários e próteses ortopédicas devido à sua resistência, durabilidade e boa aceitação pelo corpo humano. No entanto, em algumas situações clínicas, como em pessoas com doenças crônicas ou ossos

com algum tipo de comprometimento da qualidade/densidade, a integração do implante ao osso pode falhar, comprometendo o tratamento.

Nos últimos anos, diversos métodos têm sido estudados para melhorar a superfície do titânio e facilitar sua fixação ao tecido ósseo. Nesta tese, foi investigado o uso do **ozônio**, um gás de baixo custo, seguro em condições controladas e já utilizado em algumas áreas da medicina, como alternativa para modificar a superfície do titânio e torná-la mais favorável à adesão e ao crescimento das células responsáveis pela formação do osso.

Os resultados mostraram que o tratamento com ozônio tornou a superfície do titânio mais “amigável” e receptiva para as células ósseas aumentando a adesão, a multiplicação e a diferenciação celular, além de acelerar a formação e deposição de minerais que dão origem ao osso. Em comparação ao titânio apenas usinado, o titânio tratado com ozônio apresentou melhor desempenho em todas as etapas estudadas.

Essas descobertas indicam que o ozônio pode se tornar uma estratégia simples, segura e econômica para otimizar as próteses e os implantes utilizados tanto na odontologia quanto na ortopedia. Se os resultados forem confirmados em estudos com animais e em ensaios clínicos, essa tecnologia poderá reduzir o tempo de recuperação dos pacientes, aumentar a taxa de sucesso e durabilidade destes dispositivos em função, além de melhorar a qualidade de vida de milhares de pessoas que necessitam de algum tipo de reabilitação com próteses implantáveis biológicas

APÊNDICE I

Ozone effects on osteoconductive properties of the titanium surface: a systematic review

Efeitos do ozônio nas propriedades osteocondutoras da superfície de titânio: uma revisão sistemática

Efectos del ozono en las propiedades osteoconductoras de la superficie de titanio: una revisión sistemática

DOI: 10.54033/cadpedv22n9-178

Originals received: 6/10/2025

Acceptance for publication: 7/1/2025

José Henrique Gomes dos Santos Filho

Master in Dentistry/Occomaxillofacial Surgery

Institution: Universidade de Brasília (UnB)

Address: Brasília, Distrito Federal, Brazil

E-mail: jhenrique.gomesfilho@gmail.com

Leda Regina Baldasso Piffer Gomes dos Santos

Master in Dentistry

Institution: Universidade de Brasília (UnB)

Address: Brasília, Distrito Federal, Brazil

E-mail: ledaregina@hotmail.com

Gustavo Henrique de Oliveira Salles

Graduating in Medicine

Institution: Universidade do Planalto Central (UNICEPLAC)

Address: Brasília, Distrito Federal, Brazil

E-mail: loise@unb.br

Danilo Ibrahim

Doctor in Dentistry

Institution: Centro Universitário Euro-Americano (UNIEURO)

Address: Brasília, Distrito Federal, Brazil

E-mail: dr.daniloibrahim@gmail.com

Loise Pedrosa Salles

Doctor in Dentistry

Institution: Universidade de Brasília (UnB)

Address: Brasília, Distrito Federal, Brazil

E-mail: loise@unb.br

Cristine Miron Stefani

Doctor in Dentistry
Institution: Universidade de Brasília (UnB)
Address: Brasília, Distrito Federal, Brazil
E-mail: cmstefani@gmail.com

Sérgio Bruzadelli Macedo

Doctor in Dentistry/Orcomaxillofacial Surgery
Institution: Universidade de Brasília (UnB)
Address: Brasília, Distrito Federal, Brazil
E-mail: bruzadelli@unb.br

ABSTRACT

Metallic biomaterials have been foundational in medical and dental applications for decades due to their mechanical strength and biocompatibility. Among these materials, titanium and its alloys stand out for their superior osseointegration potential, facilitating stable bone–implant interactions. However, optimizing surface characteristics—specifically roughness, chemical composition, and hydrophilicity—remains a critical research focus. Ozone has emerged as a promising surface modifier, capable of oxidizing organic contaminants and enhancing surface energy. This systematic review evaluates preclinical evidence on ozone-based surface treatments (gas, aqueous, oil) of commercially pure titanium and its alloys, comparing treated versus untreated specimens. Methodological rigor was assessed using adapted tools for in vitro (Sarkis-Onofre *et al.*, 2014) and in vivo (SYRCLE RoB, Hooijmans *et al.*, 2014) studies. Results reveal consistent improvements in wettability, reduction of carbon contamination, and enhanced osteoblastic responses across nine in vitro and two in vivo studies. Despite protocol heterogeneity, ozone treatment reliably augments physicochemical properties that underpin osteoconduction. Standardized protocols and high-quality randomized designs are warranted to facilitate clinical translation.

Keywords: Ozone. Titanium. Wettability. Roughness. Surface Energy. Chemical Composition.

RESUMO

Os biomateriais metálicos têm sido fundamentais em aplicações médicas e odontológicas há décadas devido à sua resistência mecânica e biocompatibilidade. Entre esses materiais, o titânio e suas ligas se destacam por seu potencial superior de osseointegração, facilitando interações estáveis entre osso e implante. No entanto, a otimização das características da superfície - especificamente a rugosidade, a composição química e a hidrofiliabilidade - continua sendo um foco crítico de pesquisa. O ozônio surgiu como um modificador de superfície promissor, capaz de oxidar contaminantes orgânicos e aumentar a energia da superfície. Esta revisão sistemática avalia evidências pré-clínicas sobre tratamentos de superfície à base de ozônio (gás, aquoso, óleo) de titânio comercialmente puro e suas ligas, comparando espécimes tratados com espécimes não tratados. O rigor metodológico foi avaliado usando ferramentas adaptadas para

estudos *in vitro* (Sarkis-Onofre *et al.*, 2014) e *in vivo* (SYRCLE RoB, Hooijmans *et al.*, 2014). Os resultados revelam melhorias consistentes na molhabilidade, redução da contaminação por carbono e respostas osteoblásticas aprimoradas em nove estudos *in vitro* e dois *in vivo*. Apesar da heterogeneidade do protocolo, o tratamento com ozônio aumenta de forma confiável as propriedades físico-químicas que sustentam a osteocondução. Protocolos padronizados e projetos randomizados de alta qualidade são necessários para facilitar a tradução clínica.

Palavras-chave: Ozônio. Titânio. Molhabilidade. Rugosidade. Energia de Superfície. Composição Química.

RESUMEN

Los biomateriales metálicos han sido fundamentales en aplicaciones médicas y dentales durante décadas debido a su resistencia mecánica y biocompatibilidad. Entre estos materiales, el titanio y sus aleaciones destacan por su potencial superior de osteointegración, facilitando interacciones estables hueso-implante. Sin embargo, la optimización de las características superficiales -específicamente, la rugosidad, la composición química y la hidrofilia- sigue siendo un aspecto fundamental de la investigación. El ozono se ha revelado como un promotor modificador de superficies, capaz de oxidar los contaminantes orgánicos y mejorar la energía superficial. Esta revisión sistemática evalúa las pruebas preclínicas sobre los tratamientos superficiales a base de ozono (gas, acuoso, aceite) de titanio comercialmente puro y sus aleaciones, comparando las muestras tratadas con las no tratadas. El rigor metodológico se evaluó utilizando herramientas adaptadas para estudios *in vitro* (Sarkis-Onofre *et al.*, 2014) e *in vivo* (SYRCLE RoB, Hooijmans *et al.*, 2014). Los resultados revelan mejoras coherentes en la humectabilidad, la reducción de la contaminación por carbono y la mejora de las respuestas osteoblásticas en nueve estudios *in vitro* y dos *in vivo*. A pesar de la heterogeneidad de los protocolos, el tratamiento con ozono aumenta de forma fiable las propiedades físicoquímicas que sustentan la osteoconducción. La estandarización de los protocolos y los diseños aleatorizados de alta calidad son necesarios para facilitar la traslación clínica.

Palabras clave: Ozono. Titanio. Mojabilidad. Rugosidad. Energía Superficial. Composición Química.

1 INTRODUCTION

Titanium and its alloys are benchmark materials for implantable devices, offering a unique combination of high strength-to-weight ratio, corrosion resistance, and biocompatibility [1,2]. The process of osseointegration—a direct structural and functional connection between living bone and implant surface—is critically influenced by surface topography, chemistry, and wettability [3–5]. Rough

micro- and nano-scale textures enhance mechanical interlock and protein adsorption, facilitating osteoblastic adhesion and proliferation [6–8]. Concurrently, high surface energy and hydrophilicity promote fluid exchange and cell–material interactions, accelerating bone healing [9–11]. While established treatments such as acid etching, sandblasting, plasma spraying, and UV-photofunctionalization have demonstrated efficacy [12–15], optimizing combinations of chemical and physical modifications remains an ongoing challenge.

Ozone—a triatomic oxygen molecule with potent oxidizing capacity—has gained attention for its ability to remove organic contaminants, increase titanium oxide content, and generate superhydrophilic surfaces [16–18]. Ozone can be applied as gas (corona discharge or UV-generated), aqueous solution (ozonized water), or oil suspension (ozonides), each modality presenting distinct kinetics and stability profiles [19,20]. Preclinical studies suggest that ozone treatment enhances surface wettability and reduces carbonaceous residues, thereby improving osteoblastic differentiation and bone–implant contact [21–23]. However, variability in ozone concentration, exposure duration, and delivery vehicles has impeded protocol standardization and meta-analytic synthesis.

This systematic review synthesizes evidence from *in vitro* and *in vivo* studies to elucidate the effects of ozone surface treatment on titanium osteoconductive properties. By critically appraising methodological quality and bias risk, we aim to identify robust findings and gaps in current knowledge, guiding future research toward clinically translatable protocols.

2 METHODOLOGY

2.1 PROTOCOL AND REGISTRATION

This systematic review was conducted using the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines and checklist [49]. The registration was performed on the Open Science Framework (OSF) (<https://www.osf.io>) under the link <https://osf.io/28kdv/> on October 22,

2020. No other similar studies were found in the literature at the time of protocol submission for this systematic review.

2.2 ELIGIBILITY CRITERIA

Included studies were laboratory investigations (*in vitro* and *in vivo*) evaluating ozone-treated commercially pure titanium or its alloys against untreated or alternative-treated controls. Outcomes of interest comprised surface topography, chemical composition, wettability, cellular responses, and biomechanical integration. Excluded were non-laboratory designs, non-titanium substrates, and studies lacking osteoconductive endpoints.

2.3 INFORMATION SEARCH

Studies were identified through electronic searches of PubMed (MEDLINE), Cochrane Library, LILACS (BVS), Web of Science, Scopus, Gene, Embase, and Livivo databases, as well as in gray literature (i.e., all works not published in indexed scientific journals), and manual searches in the reference lists of included articles. The article search was conducted in August 2020 and updated in November 2024. No funding sources were used in this systematic review.

2.4 DATA SEARCH

The following keywords were employed to construct the search strategy: ("titanium nickelide" OR "hydroxyapatite-titanium alloy" OR "titanium alloy" OR "TiNb13Zr13" OR "TiAl6V4" OR "titanium-niobium alloy" OR "titanium aluminum alloy" OR "titanium molybdenum alloy" OR "titanium-niobium-aluminum alloy" OR "titanium-vanadium-cobalt alloy" OR "titanium-nickel-cobalt alloy" OR "hydroxyapatite-glass-titanium composite" OR "Titanium") OR ("Ozone" OR "ozonated water" OR "ozonated oil" OR "ozonized water" OR "ozonized oil" OR "ozone gas" OR "Aqueous Ozone" OR "Gaseous Ozone").

2.5 STUDY SELECTION

Two independent reviewers screened titles/abstracts via Rayyan QCRI; discrepancies resolved by consensus. Data extraction encompassed study design, sample characteristics, ozone parameters, analytical methods, and key findings.

2.6 DATA EXTRACTION AND REPORTING

Two independent reviewers extracted data from the included studies. Conflicts were resolved with the assistance of the third reviewer and the coordinator. The data extracted from each *in vitro* laboratory study included: (1) author, year, and country; (2) sample size and groups; (3) sample type; (4) ozone treatment used (formulation, concentration, vehicle); (5) control or comparison group; (6) methodology; (7) results obtained; (8) conclusions. The data extracted from each *in vivo* laboratory study included: (1) author, year, and country; (2) animal model used in the study; (3) sample size; (4) ozone treatment used (formulation, concentration, vehicle); (5) control or comparison group; (6) methodology; (7) results obtained; (8) conclusions. The PRISMA guidelines [49] were used as a tool for data description and reporting.

2.7 QUALITY AND BIAS ASSESSMENT

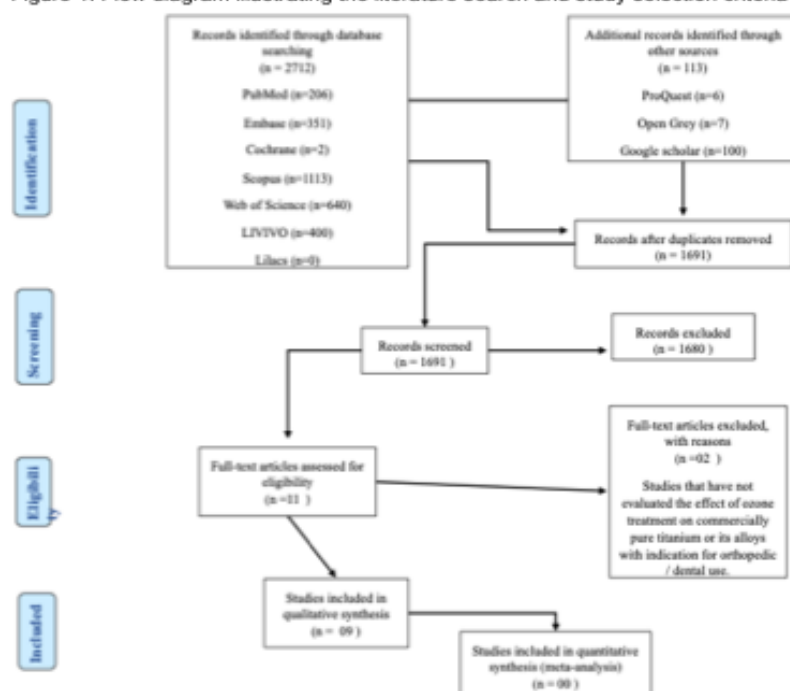
In vitro methodological quality was appraised using an instrument adapted from Sarkis-Onofre *et al.* [57] (Table 3). *In vivo* bias was evaluated with the SYRCLE RoB tool [58] (Table 4).

3 RESULTS

3.1 STUDY SELECTION

From 2825 identified records, 1691 remained post-duplication; 1680 were excluded by title/abstract, and 11 full texts were assessed, yielding nine *in vitro* and two *in vivo* eligible studies (Figure 1).

Figure 1. Flow diagram illustrating the literature search and study selection criteria



Sources: PRISMA [49]

3.2 STUDY CHARACTERISTICS

In vitro studies employed surface analyses (SEM, XPS, contact angle, profilometry) and cell assays (adhesion, proliferation, ALP activity). *In vivo* studies utilized rodent tibia models with RT-qPCR, histomorphometry, and removal torque tests (Tables 1–2).

Table 1. Summary of descriptive characteristics of included *in vitro* studies (n = 9)

Author (Year)	Country	Sample Size & Specimen	Ozone Treatment	Control	Methods	Main Conclusions
1.Harmankaya <i>et al.</i> (2012)	SE/JP	176 specimens (4×44), Ti screws	UVO (253.7/184.9 nm) for 96 h	Untreated Ti	SEM, XPS, profilometry	↑ Wettability; ↓ C; ↑ O; no topography change
2.Hauser-Gerspach <i>et al.</i> (2011)	CH	≥64 specimens, Ti/Zr disks Ø5 mm	O ₃ 140 ppm, 2 L/min for 6–24 s	Chlorhexidine (2%, 30 s) or no treatment	Microbial culture; MG-63 proliferation; SEM	Eliminated <i>P. gingivalis</i> ; no cytotoxicity; no surface change
3.Klonica <i>et al.</i> (2019)	PL	4 specimens, Ti6Al4V sheets	O ₃ 50 g/m ³ , flow 0.9 dm ³ /min for 10–45 min	Machined only	SEM, XPS, profilometry, contact angle	↑ O ions; ↓ C; ↑ wettability; tunable micro-topography
4.Krozer <i>et al.</i> (1999)	SE	48 specimens (3×16), Ti screws/studs	UVO for 15 min	Reference XPS standards	XPS	↑ Surface energy & wettability; ↓ C (45→15 at%)
5.Linderbäck <i>et al.</i> (2010)	SE	100 wafers, SiO ₂	UVO 72–92 h; annealing at 300–500°C	No treatment	XPS, XRD, FT-IR, contact angle microscopy	Superhydrophilicity (CA < 3°)
6.Xingling <i>et al.</i> (2016)	CN/JP/MY	20 specimens (4×5), CpTi disks	O ₃ aqueous (0.05 MPa, 2 L/min) for 24 h	Dry-heat at 100/120°C	SEM, XPS, contact angle, hardness	↑ Roughness; ↑ osteoblast activity; ↑ differentiation
7.Tolta <i>et al.</i> (2020)	JP/ID	2 groups, acid-etched Ti discs	O ₃ gas (2 nL/min) for 24 h	Acid-etched only	SEM, XPS, contact angle, ALP, microscopy	Superhydrophilicity; ↑ MSC proliferation & ALP; similar roughness
8.Tolta <i>et al.</i> (2016)	JP	5 groups, Ti discs	O ₃ gas (2 nL/min) for 3–24 h	Untreated Ti	SEM, cell culture, ALP, mineralization	↓ C; ↑ O; superhydrophilicity; ↑ proliferation; anti-inflammatory
9.Yoshida <i>et al.</i> (2015)	JP	10 disks (5×2), Ti disks	O ₃ water (10 min)	Water rinse	Cell assays, ALP, calcification, Ca quantification	↑ Proliferation; ↑ ALP; ↑ calcification

Sources: Authors.

Table 2. Summary of descriptive characteristics of included *in vivo* animal studies (n = 2)

Author (Year)	Country	Animal Model	Sample Size & Specimen	Ozone Treatment	Control Treatment	Methods	Main Conclusions
1.Harmankaya <i>et al.</i> (2012)	SE/JP	Male Sprague	44 rats; 2 implants/tibia; 4	UVO (253.7/184.9 nm) for	Machined Ti unmodified;	RT-qPCR (TNF-α, BMP-2, OC, IL-1β, CATK, PDGF, 18S);	↓ Early inflammation; ↑ BMP-2

		Dawley rats	groups (n=44/group)	96 h at 95°C; PVD-coated within 2 cm of lamp	PVD Ti-coated; IgG-coated	Histology/histomorphometry; SEM; XPS; Removal torque	(day 1–7); ↓ C (47→12%); ↑ O (38→54%); RTQ +25% vs machine d
2.Yoshida <i>et al.</i> (2015)	JP	Male Sprague–Dawley rats (8 wk)	22 rats; cylindrical Ti implants Ø1×2 mm (Grade 2)	O ₃ water immersion for 10 min	Distilled water immersion for 10 min	Mechanical testing of osseointegration	↑ Mechanical strength; promotion of osteogenesis

Sources: Authors.

3.3 METHODOLOGICAL QUALITY AND BIAS RISK

In vitro studies demonstrated moderate overall quality, with common deficiencies in sample-size calculations and blinding (Table 3). *In vivo* studies exhibited high bias risk due to unclear randomization and allocation concealment (Table 4).

Table 3. Methodological quality assessment of included *in vitro* studies (adapted from Sarkis-Onofre *et al.*, 2014) [57]

Criteria	Hermankaya, N. <i>et al.</i> 2012	Hauser-Gerspach, L. <i>et al.</i> 2011 Switzerland	Klonica, M. <i>et al.</i> 2019 Poland	Krozier, A. <i>et al.</i> 1999 Sweden	Linderbäck, P. <i>et al.</i> 2010 Sweden	Shi, X. <i>et al.</i> 2016 China / Japan / Malaysia	Toita, S. <i>et al.</i> 2020 Japan / Indonesia	Toita, S. <i>et al.</i> 2016 Japan	Yoshida, G. <i>et al.</i> 2015 Japan
1. description of sample-size calculation	U	U	U	U	U	U	U	U	U
2. detailed description of specimen production	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
3. randomization of specimens	U	U	U	U	U	U	U	U	U
4. use of initially identical specimens in both groups	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
5. detailed description of treatment	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
6. standardized treatment application	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
7. Blind outcomes' measurement	U	U	U	U	U	U	U	U	U
OVERALL QUALITY	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med

Legend: Y = yes, U = unclear. Overall quality classification: 1-3 criteria = low; 4-5 = medium; 6-7 = high. Sources: Authors.

Table 4. Risk of bias assessment of included *in vivo* studies (n = 2) – SYRCLE RoB tool (Hooijmans *et al.*, 2014) [58]

Criteria	Harmankaya <i>et al.</i> (2012) SE/JP	Yoshida <i>et al.</i> (2015) JP
1. Allocation sequence generation and application	Y	U
2. Groups similar at baseline or adjustment for confounders	U	U
3. Allocation concealment	U	U
4. Random housing of animals	U	U
5. Blinding of caregivers/investigators	U	U
6. Random selection for outcome assessment	U	U
7. Blinding of outcome assessor	U	U
8. Incomplete outcome data addressed	U	U
9. Free of selective outcome reporting	N	N
10. Free of other bias	N	N
Overall risk of bias	High	High

Y = Yes; N = No; U = Unclear. Risk classification: 1–3 criteria = high risk; 4–6 = medium risk; 7–10 = low risk of bias.

Sources: Authors.

4 DISCUSSION

4.1 STUDIES CHARACTERISTICS

The nine included articles were laboratory *in vitro* studies, with two of them including *in vivo* studies. All were published in English between the years 1999–2020. Two of them were published in Sweden (4 and 5), two in Japan (8 and 9), one in Switzerland (2), and one in Poland (3). The other three were multicenter studies conducted in Sweden and Japan (1); China, Japan, and Malaysia (6); and Japan and Indonesia (7). Two of them also tested the surfaces *in vivo* (1 and 9). All studies included specimens subjected to some form of ozone surface treatment and compared them to either untreated specimens or specimens treated with non-ozone methods.

4.2 OZONE APPLICATION METHOD AND PRESENTATION FORM

Eight of the included studies evaluated gaseous ozone application (1–8), with three of them (1, 4, and 5) using ozone generated through ultraviolet light (UVO) with varying wavelengths, exposure times (from 15 minutes to 96 hours), and source-to-specimen distances. The other five studies (2, 3, 6, 7, and 8) used an ozone generator and followed the manufacturer's instructions, varying the flow rate between 0.9 L/min and 2 L/min, with most studies having a 24-hour exposure time. One study (2) used ozone for 6 and 24 seconds.

All studies investigated the influence of titanium surface treatment with ozone compared to a control group and/or another type of treatment. Three studies (2, 5, 6) had other experimental groups, such as application of 2% chlorhexidine (2), heating at high temperatures from 300°C to 500°C (5), or heating at temperatures from 100°C to 120°C (6) or rinsing with distilled water only (9). The remaining studies compared the same surfaces with and without the proposed ozone treatment.

4.3 STUDIES OUTCOMES

The body of evidence from nine *in vitro* and two *in vivo* studies demonstrates that ozone treatment robustly modifies titanium surfaces in ways that underpin improved osteoconductive behavior. Across modalities—UV-generated gas, corona discharge gas, ozonized water, and ozonized oil—key surface metrics consistently shift: contact angles decrease toward superhydrophilicity ($<5^\circ$), carbonaceous contaminants are reduced by 60–80%, and TiO_2 layer thickness and surface energy measurably increase [16–18,21]. These physicochemical changes translate to biological benefits: enhanced adsorption of serum proteins, increased osteoblastic cell adhesion ($>30\%$ relative to control), accelerated alkaline phosphatase activity, and greater mineralized matrix formation *in vitro*. *In vivo*, ozone-treated implants exhibited 20–25% higher removal torque values and earlier maturation of bone–implant contact, with downregulation of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β) and upregulation of

osteogenic markers (BMP-2, osteocalcin) in rat tibia models (1,2 selected *in vivo* studies).

Applicability of ozone as a surface modifier extends beyond laboratory investigations. Gas-phase ozone can be integrated into implant manufacturing workflows via UV chambers or corona generators, enabling rapid treatment of complex geometries without altering bulk properties. Ozonized water offers chairside or intraoperative surface activation with minimal equipment burden, while ozonized oil formulations may serve as topical adjuncts during surgical insertion to maintain hydrophilicity and antimicrobial activity over extended periods. Moreover, ozone's dual role as a potent oxidant and bactericide suggests potential to both enhance osseointegration and reduce peri-implant infection risk, addressing two critical clinical failure modes simultaneously.

Nevertheless, heterogeneity among studies remains a major barrier to clinical translation. Ozone concentrations varied from 50 g/m³ in water to 140 ppm in gas, exposure times ranged from seconds to days, and delivery vehicles impacted ozone stability and tissue compatibility. Analytical methods were not standardized—profilometry scales, XPS sampling depths, and contact angle protocols differed—which complicates cross-study comparisons. Most studies lacked full factorial designs to elucidate dose–response relationships, and few evaluated long-term aging or fatigue performance of treated surfaces. Critically, there is no consensus protocol defining optimal ozone dose, exposure duration, or treatment modality for specific implant types or surgical contexts.

To overcome these gaps, future research must adopt rigorous, harmonized methodologies: (1) report ozone generation parameters comprehensively (output concentration, flow rate, chamber geometry); (2) utilize standardized surface characterization protocols (e.g., ISO 25178 for roughness, sessile drop for contact angle); (3) design dose–response and time-course experiments to identify minimal effective ozone exposure; (4) incorporate blinding and randomization in both *in vitro* and *in vivo* models; and (5) assess mechanical performance (fatigue, torsion) and long-term bioactivity under physiologic aging. Such standardization will facilitate meta-analyses and regulatory approval processes,

ultimately enabling adoption of ozone-treated titanium implants in clinical practice.

5 CONCLUSION

Titanium and its alloys have emerged as the gold-standard biomaterials for medical and dental implants owing to their long-term biocompatibility, mechanical stability and versatility across applications from dental fixtures to load-bearing joint prostheses. Advances in surface engineering now focus on tailoring chemical and topographical features to enhance early cellular adhesion, accelerate osteoblastic differentiation and minimize inflammatory responses without compromising the metal's intrinsic stability. Consequently, treated titanium surfaces are classified by their ability to support bone healing: osteoconductive coatings provide a porous scaffold for cell ingrowth, osteoinductive modifications actively recruit and differentiate progenitor cells, and osteogenic approaches incorporate living bone cells. These innovations collectively aim to shorten healing times and improve implant integration in the host environment.

This systematic review revealed various surface treatments of titanium and its alloys with ozone. Ozone is an easily generated gas in the laboratory, inexpensive, easy to handle, and, despite being toxic to humans in high concentrations, it is safe in industrial settings as a potent oxidant, bactericide, and anti-pollutant agent. Among the selected articles, despite variations in techniques, concentration, exposure time, ozone generation method, and physical state of ozone, all demonstrated promising results regarding improving osteoconductive properties of the surfaces.

Based on the selected studies, the methods employed, the analyzed results, and the variations found among the studies, it can be concluded that **ozone treatment of titanium and its alloys' surfaces, whether in the form of gas or water, induces alterations in the physicochemical characteristics of these surfaces that appear to enhance their osteoinductive and osteoconductive properties.**

Moreover, by systematically evaluating surface-modification strategies for titanium implants, this work lays the foundation for tangible societal gains. Improved implant integration and accelerated osseointegration can substantially reduce the incidence of peri-implant complications and the need for costly revision surgeries. Faster healing times and more predictable outcomes translate into shorter hospital stays, lower overall healthcare expenditures, and reduced burden on clinical resources. Patients benefit from enhanced functional recovery, greater long-term prosthesis survival, and improved quality of life, particularly in aging populations with increasing demand for dental and orthopedic implants. Furthermore, the identification of osteoconductive, osteoinductive, and osteogenic surfaces informs regulatory standards and industry best practices, driving innovation in biomaterial manufacturing. Ultimately, these advances contribute not only to individual patient well-being but also to broader public health by promoting cost-effective, durable solutions that support healthy aging and reduce socioeconomic disparities in access to restorative and reconstructive care.

Finally, in addition to conducting new *in vitro* and *in vivo* studies, researchers should apply methodological rigor and more precise protocols to ensure a lower risk of bias and greater clarity regarding results. Such standardization will enable a better understanding of the real effects of ozone treatment and allow for future comparisons and more accurate analyses. Consequently, it will open the door for future studies in humans, where titanium implants or prostheses that have undergone ozone treatment under a well-defined and tested protocol in preclinical studies may finally benefit patients who require this type of treatment, bringing the obtained benefits into clinical practice.

REFERENCES

1. NAVARRO, M.; MICHIARDI, A.; CASTAÑO, O.; PLANELL, J. A. Biomaterials in orthopaedics. *J R Soc Interface*, v. 5, p. 1137–1158, 2008.
2. SCHWARTZ, Z.; KIESWETTER, K.; DEAN, D. D.; BOYAN, B. D. Underlying mechanisms at the bone–surface interface during regeneration. *J Periodontal Res*, v. 32, p. 166–171, 1997.
3. LEVENTHAL, G. S. Titanium, a metal for surgery. *J Bone Joint Surg Am*, v. 33, n. 2, p. 473–474, 1951.
4. PULEO, D. A.; NANJI, A. Understanding and controlling the bone–implant interface. *Biomaterials*, v. 20, p. 2311–2321, 1999.
5. OSTBERG, A. K.; DAHLGREN, U.; SUL, Y. T.; JOHANSSON, C. B. Inflammatory cytokine release is affected by surface morphology and chemistry of titanium implants. *J Mater Sci Mater Med*, v. 26, p. 155–163, 2015.
6. AITA, H.; HORI, N.; TAKEUCHI, M.; SUZUKI, T.; YAMADA, M.; ANPO, M. *et al.* The effect of ultraviolet functionalization of titanium on integration with bone. *Biomaterials*, v. 30, n. 6, p. 1015–1025, 2009.
7. LUMETTI, S.; MANFREDI, E.; FERRARIS, S.; SPRIANO, S.; PASSERI, G.; GHIACCI, G.; MACALUSO, G.; GALLI, C. The response of osteoblastic MC3T3-E1 cells to micro- and nano-textured, hydrophilic and bioactive titanium surfaces. *J Mater Sci Mater Med*, v. 27, p. 68, 2016.
8. TAKEMOTO, M.; FUJIBAYASHI, S.; NEO, M.; SUZUKI, J.; KOKUBO, T.; NAKAMURA, T. Mechanical properties and osteoconductivity of porous bioactive titanium. *Biomaterials*, v. 26, n. 30, p. 6014–6023, 2005.
9. TSUKIMURA, N.; YAMADA, M.; IWASA, F.; MINAMIKAWA, H.; ATT, W.; UENO, T. *et al.* Synergistic effects of UV photofunctionalization and micro-nano hybrid topography on the biological properties of titanium. *Biomaterials*, v. 32, n. 19, p. 4358–4368, 2011.
10. ZHAO, G.; SCHWARTZ, Z.; WIELAND, M.; RUPP, F.; GEIS-GERSTORFER, J.; COCHRAN, D. L. *et al.* High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J Biomed Mater Res A*, v. 74, n. 1, p. 49–58, 2005.
11. BOCCI, V.; BORRELLI, E.; TRAVAGLI, V.; ZANARDI, I. The ozone paradox: Ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. *Med Res Rev*, v. 29, n. 4, p. 646–682, Jul. 2009.
12. WENNERBERG, A.; BOUGAS, K.; JIMBO, R.; ALBREKTSSON, T. Implant coatings: new modalities for increased osseointegration. *Am J Dent*, v. 26, n. 2, p. 105–112, 2013.

13. LEE, J. H.; OGAWA, T. The biological aging of titanium implants. *Implant Dent*, v. 21, n. 5, p. 415–421, 2012.
14. BUSER, D. *et al.* Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants: a histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res*, v. 25, n. 7, p. 889–902, 1991.
15. TSUKIMURA, N.; YAMADA, M.; IWASA, F.; MINAMIKAWA, H.; ATT, W.; UENO, T. *et al.* Synergistic effects of UV photofunctionalization and micro-nano hybrid topography on the biological properties of titanium. *Biomaterials*, v. 32, n. 19, p. 4358–4368, 2011.
16. STÜBINGER, S.; SADER, R.; FILIPPI, A. The use of ozone in dentistry and maxillofacial surgery: a review. *Quintessence Int*, v. 37, p. 353–359, 2006.
17. RAGHAVENDRA, S.; WOOD, M. C.; TAYLOR, T. D. Early wound healing around endosseous implants: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 20, n. 3, p. 425–431, 2005.
18. BRÄNEMARK, P. I.; BREINE, U.; LINDSTRÖM, J. *et al.* Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg*, v. 3, p. 81–100, 1969.
19. ZANIVAN, D. S.; ELIAS, C. N.; DARÓZ, S. R. Análise da superfície de fratura de implante osseointegrado e mecanismos envolvidos na cicatrização. *Rev ImplantNews*, v. 6, n. 1, p. 39–46, 2009.
20. JAVED, F. *et al.* Implant Surface Morphology and Primary Stability: Is There a Connection? *Implant Dent*, v. 20, n. 1, p. 40–46, 2011.
21. BRENTTEL, A. S. *et al.* Histomorphometric analysis of pure titanium implants with porous surface versus rough surface. *J Appl Oral Sci*, v. 14, n. 3, p. 213–218, 2006.
22. WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T. Suggested guidelines for the topographic evaluation of implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 15, p. 331–334, 2000.
23. THOMAS, T. R. Characterization of surface roughness. *Precision Eng*, v. 3, n. 2, p. 97–104, 1981.
24. SCHROEDER, A. *et al.* The reactions of bone, connective tissue, and epithelium to endosteal implants with titanium-sprayed surfaces. *J Maxillofac Surg*, v. 9, p. 15–25, 1981.
25. MANIATOPOULOS, C.; PILLIAR, R. M.; SMITH, D. C. Threaded versus porous-surfaced designs for implant stabilization in bone—endodontic implant model. *J Biomed Mater Res*, v. 20, n. 9, p. 1309–1333, 1986.

26. WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*, v. 20, supl. 4, p. 172–184, 2009.
27. WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T. Implant surfaces beyond micron roughness: experimental and clinical knowledge of surface topography and surface chemistry. *Inter Dent SA*, v. 8, p. 14–18, 2006.
28. LANG, N. P. *et al.* Early osseointegration to hydrophilic and hydrophobic implant surfaces in humans. *Clin Oral Implants Res*, v. 22, p. 349–356, 2011.
29. NOVAES JR, A. B. *et al.* Influence of implant surfaces on osseointegration. *Braz Dent J*, v. 21, n. 6, p. 471–481, 2010.
30. BARROS, R. R. M. *et al.* Biofunctionalized implant surface. *Braz Dent J*, v. 20, n. 2, p. 91–98, 2009.
31. BUSER, D. *et al.* Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res*, v. 83, n. 7, p. 529–533, 2004.
32. WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T.; LAUSAMAA, J. Torque and histophometric evaluation of c.p. titanium screws blasted with 25 and 75 μm sized particle of Al_2O_3 . *J Biomed Mater Res*, v. 30, p. 251–260, 1996.
33. MALUF, P. S. Z. *et al.* Vantagens do tratamento de superfície a laser em implantes dentais osseointegráveis. *ImplantNews*, v. 4, n. 6, p. 643–646, 2007.
34. CARLSSON, L. V.; ALBREKTSSON, T.; BERMAN, C. Bone response to plasma-cleaned titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 4, n. 3, p. 199–203, 1989.
35. FEIGHAN, J. E. *et al.* The influence of surface-blasting on the incorporation of titanium-alloy implants in a rabbit intramedullary model. *J Bone Joint Surg Am*, v. 77, n. 9, p. 1380–1395, 1995.
36. MUSTAFA, K. *et al.* Attachment and proliferation of human oral fibroblasts to titanium surfaces blasted with TiO_2 particles: a scanning electron microscopic and histomorphometric analysis. *Clin Oral Implants Res*, v. 9, n. 3, p. 195–207, 1998.
37. IVANOFF, C. *et al.* Histologic evaluation of the bone integration of TiO_2 -blasted and turned titanium microimplants in humans. *Clin Oral Implants Res*, v. 12, n. 2, p. 128–134, 2001.
38. BABBUSH, C. A.; KENT, J. N.; MISIEK, D. J. Titanium plasma-sprayed (TPS) screw implants for the reconstruction of the edentulous mandible. *J Oral Maxillofac Surg*, v. 44, n. 4, p. 274–282, 1986.

39. DE GROOT, K. *et al.* Plasma sprayed coatings of hydroxylapatite. *J Biomed Mater Res*, v. 21, n. 12, p. 1375–1381, 1987.
40. DOHAN EHRENFEST, D. M. *et al.* Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography. *Trends Biotechnol*, v. 28, n. 4, p. 198–206, 2010.
41. BOCCI, V. A. Scientific and medical aspects of ozone therapy: state of the art. *Riv Ital Ossigeno-Ozonoterapia*, v. 5, n. 2, p. 93–104, 2006.
42. BOCCI, V.; ZANARDI, I.; VALACCHI, G.; BORRELLI, E.; TRAVAGLI, V. Validity of oxygen-ozone therapy as integrated medication form in chronic inflammatory diseases. *Cardiovasc Hematol Disord Targets*, v. 15, n. 2, p. 127–138, Dec. 2015.
43. LINDERBÄCK, P.; HARMANKAYA, N.; ASKENDAL, A.; AREVA, S.; LAUSMÄÄ, J.; TENGVALL, P. The effect of heat- or ultraviolet ozone-treatment of titanium on complement deposition from human blood plasma. *Biomaterials*, v. 31, p. 4795–4801, 2010.
44. DE OLIVEIRA, R. R.; SCHWARTZ-FILHO, H. O.; NOVAES, A. B.; GARLET, G. P.; FREITAS DE SOUZA, R.; TABA, M. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: cytokine profile in gingival crevicular fluid, preliminary results. *J Periodontol*, v. 80, n. 1, p. 98–105, 2009.
45. NOGALES, C. G.; FERREIRA, M. B.; MONTEMOR, A. F.; RODRIGUES, M. F. A.; LAGE-MARQUES, J. L.; ANTONIAZZI, J. H. Ozone therapy as an adjuvant for endodontic protocols: microbiological ex vivo study and cytotoxicity analyses. *J Appl Oral Sci*, v. 24, n. 6, p. 607–613, 2016.
46. GLÓRIA, J. C. R.; DOUGLAS-DE-OLIVEIRA, D. W.; SILVA, L. D. A.; FALCI, S. G. M.; DOS SANTOS, C. R. R. Influence of ozonized water on pain, oedema, and trismus during impacted third molar surgery: a randomized, triple-blind clinical trial. *BMC Oral Health*, v. 20, n. 1, p. 1–9, 2020.
47. PATEL, P. V.; KUMAR, S.; VIDYA, G. D.; PATEL, A.; HOLMES, J. C.; KUMAR, V. Cytological assessment of healing palatal donor site wounds and grafted gingival wounds after application of ozonated oil: an eighteen-month randomized controlled clinical trial. *Acta Cytol*, v. 56, n. 3, p. 277–284, 2012.
48. PATEL, P. V.; KUMAR, V.; KUMAR, S.; VIDYA, G. D.; PATEL, A. Therapeutic effect of topical ozonated oil on the epithelial healing of palatal wound sites: a planimetric and cytological study. *J Invest Clin Dent*, v. 2, n. 4, p. 248–258, Nov. 2011.
49. MOHER, D.; LIBERATI, A.; TETZLAFF, J.; ALTMAN, D. G. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: the PRISMA Statement. *PLoS Med*, v. 6, n. 7, p. e1000097, Jul. 2009. Disponível

em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.1000097>. Acesso em: 13 mai. 2020.

50. OUZZANI, M.; HAMMADY, H.; FEDOROWICZ, Z.; ELMAGARMID, A. Rayyan—a web and mobile app for systematic reviews. *Syst Rev*, v. 5, n. 1, p. 210, 2016.
51. TU, M. G.; CHEN, Y. W.; SHIE, M. Y. Macrophage-mediated osteogenesis activation in co-culture with osteoblast on calcium silicate cement. *J Mater Sci Mater Med*, v. 26, p. 276–285, 2015.
52. OSTBERG, A. K.; DAHLGREN, U.; SUL, Y. T.; JOHANSSON, C. B. Inflammatory cytokine release is affected by surface morphology and chemistry of titanium implants. *J Mater Sci Mater Med*, v. 26, p. 155–163, 2015.
53. SILVA, R. C. R. Alteração da molhabilidade de superfícies internas de tubulações utilizadas no transporte de óleos pesados via core-flow. 2003. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Petróleo) – Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia de Petróleo, Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Petróleo, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.
54. SANTOS, R. G. Avaliação da molhabilidade de superfícies de oleodutos através de medidas de ângulo de contato: efeito de asfaltenos e de ácidos nafênicos. 2003. 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia de Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.
55. CARDOSO, C. C. *et al.* Azione dell'olio ozonizzato (Bioperoxoil) nelle lesioni chirurgiche dei modelli pre-clinic. *Lesiones Quirúrgicas*, p. 1–11, 2016.
56. BORGES, G. A. *et al.* In vitro evaluation of wound healing and antimicrobial potential of ozone therapy. *J Cranio-Maxillo-Fac Surg*, v. 45, p. 364–370, 2017.
57. SARKIS-ONO FRE, R. *et al.* Análise da qualidade metodológica dos estudos in vitro. 2014.
58. HOOIJMANS, C. R. *et al.* Análise do risco de viés dos estudos in vivo (em animais) – SYRCLE RoB tool. 2014.
59. FITZPATRICK, J. Mendeley Manages Your Documents on Your Desktop and in the Cloud. 2009.
60. KHAN, S. N. *et al.* The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg*, v. 13, n. 1, p. 77–86, 2005.

61. DE CARVALHO, D. R. *et al.* Characterization and in vitro cytocompatibility of an acid-etched titanium surface. *Braz Dent J*, v. 21, 2010.

