

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



Dissertação de Mestrado

**EFEITOS DO TRATAMENTO DA SUPERFÍCIE DO TITÂNIO COM OZÔNIO SOBRE AS  
PROPRIEDADES OSTEOCONDUTORAS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**

**José Henrique Gomes dos Santos Filho**

Brasília, 23 de novembro de 2020

**EFEITOS DO TRATAMENTO DA SUPERFÍCIE DO TITÂNIO COM OZÔNIO SOBRE AS  
PROPRIEDADES OSTEOCONDUTORAS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**

Dissertação 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 Mestre em Odontologia.

Orientador: Sérgio Bruzadelli Macedo

Co-Orientadora: Cristine Miron Stefani

Brasília, 23 de novembro de 2020

**Efeitos Do Tratamento Da Superfície Do Titânio Com Ozônio Sobre As Propriedades  
Osteocondutoras: Uma Revisão Sistemática**

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

Data da defesa: 23 de novembro de 2020

Banca examinadora:

---

Prof. Dr Sérgio Bruzadelli Macedo (Orientador)

---

Prof<sup>a</sup>. Dra Érica Negrini Lia

---

Prof. Dr. Daniel Rey de Carvalho

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Fernanda Cristina Pimentel Garcia (suplente)

*A Deus, à Leda e às minhas filhas*

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela minha vida, pela minha saúde, por me dar sabedoria e perseverança para superar as dificuldades em meu caminho que me fizeram crescer com a busca de soluções, me tornando quem eu 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 sem. Sempre com uma palavra amiga, um abraço acolhedor, um olhar carinhoso, enfim... mãe. O que mais dizer.

Gratidão eterna a vocês.

Às minhas filhas **Lara e Isabella**. 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**. Minha amiga, minha confidente, minha companheira na jornada da vida. Você tem me mostrado como as coisas podem ser mais fáceis e que qualquer situação pode ser um momento especial. Que a felicidade está dentro de nós e que todos tem o direito e o dever de “se permitir”. Uma viagem, um passeio, uma tarde de folga, um dia dedicado a si mesmo, a poder dizer não, a deixar para depois, a ser eu mesmo. Você me traz paz.

Ao meu orientador **Sérgio Bruzadelli Macedo**, que hoje posso chamar de amigo, por ter me apresentado 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, principalmente nos momentos de incerteza quando tivemos que deixar de lado tudo

## AGRADECIMENTOS

que já havíamos produzido para dar início a outro trabalho. Você soube me dar autonomia e confiança no momento que considero o mais difícil de todos. Sua dedicação e exemplo foram e sempre serão fonte de inspiração.

À professora **Cristine Stefani** por ter me acolhido como orientado com tão pouco tempo disponível. Sempre focada, extremamente científica e profissional. Sem sua ajuda este trabalho 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 técnicos sobre as revisões sistemáticas. Certamente seus exemplos me mostraram o que é realmente ser professor. Não se trata apenas de conhecimento técnico, mas sim de uma filosofia de trabalho. 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!

À minha irmã **Juliana**, obrigado por estar sempre comigo em todos os momentos, bons e ruins. Obrigado pela amizade e companheirismo. Juntos somos muito mais fortes.

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.

À **Universidade de Brasília**, na pessoa da reitora Profa. Dra. Márcia Abrahão.

Ao **programa de pós-graduação em Odontologia da UnB**, na pessoa da professora coordenadora Dra. Soraya Coelho Leal.

À equipe da **Unesp Araçatuba**, na pessoa do Professor Idelmo Rangel Garcia Junior e dos doutorandos Lara e Martin. Agradeço por toda ajuda, gentileza e disponibilidade. Nosso trabalho foi adiado mas vamos até o final.

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

Biomateriais metálicos têm sido utilizados na prática clínica médica e odontológica há muitos anos. De todos esses compostos metálicos o titânio e suas ligas estão entre aqueles com melhores resultados, principalmente por apresentarem biocompatibilidade e um eficiente mecanismo de união com o osso do paciente chamado de osseointegração. A partir do sucesso do titânio, muitos estudos foram realizados com o objetivo de se identificar quais características físicas e químicas e em quais condições a osseointegração poderia ser favorecida. Atualmente, sabe-se que rugosidade, composição química e molhabilidade (hidrofilia) são características da superfície do titânio com papel determinante na osseointegração. Assim, tornou-se objeto de muitas pesquisas qual seria o melhor método para o tratamento do titânio com o propósito de melhorar essas propriedades. A partir dessa premissa, inúmeros métodos de tratamento da superfície do titânio foram descritos na literatura, inclusive o ozônio, conhecido como potente oxidante que reage com substâncias orgânicas e inorgânicas. No entanto, existe uma certa inconsistência na literatura acerca dos resultados, concentração ideal, tempo de exposição, veículos de aplicação tópica do ozônio e da sua real efetividade. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do tratamento da superfície do titânio com ozônio sobre suas propriedades osteocondutoras. Método: Busca nas bases de dados Pubmed, Cochrane, LILACS, Web of Science, Scopus e complementação pela busca em literatura cinzenta por meio Google Scholar, OpenGrey, Proquest e pesquisa manual. Foram incluídos apenas estudos laboratoriais *in vitro* e *in vivo* (em animais) em que a superfície de corpos de prova de titânio comercialmente puro ou suas ligas tenham sido tratada com gás ozônio, água ou óleo ozonizados, comparados com corpos de prova não tratados ou tratados com ar, água ou óleo não ozonizados, ou ainda outro tratamento ativo de superfície, e em que as propriedades osteocondutoras foram testadas (topografia da superfície, composição química e/ou hidrofilia/molhabilidade, além de crescimento celular, morfologia e atividade de fosfatase alcalina). A qualidade metodológica foi avaliada por meio de instrumento para estudos *in vitro* adaptado de Sarkis-Onofre et al. (2014) e por meio de instrumento para análise do risco de viés dos estudos *in vivo* SYRCLE RoB tool (Hooijmans et al., 2014). Resultados: Após o processo de seleção de artigos, nove estudos laboratoriais *in vitro* preenchem os critérios de elegibilidade. Oito deles avaliaram o efeito do tratamento da superfície do titânio com ozônio na forma de gás e um trabalho avaliou o tratamento com água ozonizada. Todos relataram as alterações provocadas nas superfícies tratadas em relação à molhabilidade, rugosidade e composição da superfície. Seis deles também relataram resultados de análises celulares como morfologia, crescimento e atividade de fosfatase alcalina. Em oito estudos o tratamento com ozônio alterou a superfície do titânio de forma positiva em relação às propriedades osteocondutoras e em um estudo não houve alteração significativa em relação ao grupo controle, provavelmente pelo tempo de exposição das amostras ao gás ter sido consideravelmente menor que nos outros estudos, porém, por não ter alterado a superfície não prejudicou a osteocondução. Dentre os nove estudos incluídos, dois deles [1,9] apresentaram análises *in vivo*. Os implantes com as superfícies tratadas foram cirurgicamente instalados em tíbias de ratos. Em diferentes períodos pós-operatórios esses ratos foram sacrificados e vários testes realizados como Torque para remoção (RTQ), teste mecânico de osseointegração, análise histológica e histomorfométrica. Como resultados descreveram que o tratamento com ozônio promoveu diminuição da resposta inflamatório e do tempo para osseointegração, além de melhorar a força mecânica e promover osteogênese. No geral, o risco de viés foi moderado para os estudos *in vitro* e alto para os estudos *in vivo*. Isso se deve ao fato dos artigos não definirem de forma

## **RESUMO**

clara os cálculos amostrais e padronização das amostras e grupos, além de não descreverem adequadamente os meios para cegamento dos pesquisadores e cuidadores. Conclusão: Existe evidência de que o tratamento da superfície do titânio e suas ligas com ozônio possa influenciar positivamente na melhora das características de superfície como rugosidade, molhabilidade e composição química favorecendo a osteocondução, porém deve-se ter cautela ao avaliar os dados pois diferentes meios de aplicação, concentração, tempo e frequência podem ter influenciado os resultados.

**Palavras-chave:** Ozônio, Titânio, Molhabilidade, rugosidade, energia de superfície, Composição química.

## ABSTRACT

Metallic biomaterials have been used in medical and dental practice for many years. Of all these metallic compounds titanium and its alloys are among those with the best results, mainly because they present biocompatibility and an efficient mechanism of union with the bone of the patient called osseointegration. Based on the success of titanium, many studies have been conducted in order to identify which physical and chemical characteristics and under which conditions osseointegration could be favored. Currently, it is known that roughness, chemical composition and wettability (hydrophilia) are characteristics of the surface of titanium with a determining role in osseointegration. Thus, it has become the object of much research what would be the best method for the treatment of titanium with the purpose of improving these properties. From this premise, several methods of titanium surface treatment have been described in literature, including ozone, known as a potent oxidizer that reacts with organic and inorganic substances. However, there is a certain inconsistency in the literature about the results, ideal concentration, exposure time, topical application vehicles of ozone and its real effectiveness. The objective of this work was to evaluate the effects of titanium surface treatment with ozone on its osteoconductive properties. Method: Search in Pubmed, Cochrane, LILACS, Web of Science, Scopus databases and complementation by gray literature search through Google Scholar, OpenGrey, Proquest and manual search. Only *in vitro* and *in vivo* laboratory studies (in animals) were included in which the surface of commercially pure titanium specimens or their alloys were treated with ozone gas, water or oil ozonized, compared with untreated specimens or treated with air, water or oil non-ozonized, or other active surface treatment, and in which osteoconductive properties were tested (surface topography, chemical composition and/or hydrophilia/waterability, as well as cell growth, morphology and alkaline phosphatase activity). The methodological quality was evaluated by means of an instrument for *in vitro* studies adapted from Sarkis-Onofre et al. (2014) and by means of an instrument for bias analysis of the SYRCLE RoB tool *in vivo* studies (Hooijmans et al., 2014). Results: After the article selection process, nine *in vitro* laboratory studies met the eligibility criteria. Eight of them evaluated the effect of titanium surface treatment with ozone in the form of gas and one study evaluated the treatment with ozonized water. All reported the changes caused on the treated surfaces in relation to wettability, roughness and surface composition. Six of them also reported results of cellular analysis such as morphology, growth and alkaline phosphatase activity. In eight studies the treatment with ozone altered the titanium surface in a positive way in relation to the osteoconducting properties and in one study there was no significant alteration in relation to the control group, probably because the time of exposure of the samples to gas was considerably less than in the other studies, however, because it did not alter the surface it did not harm the osteoconduction. Among the nine studies included, two of them [1,9] presented *in vivo* analyses. The implants with the treated surfaces were surgically installed in rat tibias. In different postoperative periods these rats were sacrificed and several tests were performed such as Torque for removal (RTQ), mechanical osseointegration test, histological analysis and histomorphometric. As results they described that the treatment with ozone promoted reduction of the inflammatory response and time for osseointegration, besides improving the mechanical force and promoting osteogenesis. In general, the risk of bias was moderate for *in vitro* studies and high for *in vivo* studies. This is due to the fact that the articles do not clearly define the sample calculations and standardization of samples and groups, and do not adequately describe the means for blinding researchers and caregivers. Conclusion: There is evidence that the treatment of titanium surface and its alloys with ozone can positively influence the improvement of surface characteristics

## **ABSTRACT**

such as roughness, wettability and chemical composition favoring osteoconduction, but one must be cautious when evaluating the data because different means of application, concentration, time and frequency may influence the results.

Keywords: Ozone, Titanium, wettability, roughness, surface energy, chemical composition.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 – .....	29
-------------------	----

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 01** – Síntese das características descritivas dos dados extraídos dos estudos *in vitro* incluídos nesta revisão ..... 31
- Tabela 02** – Síntese das características descritivas dos dados extraídos dos estudos *in vivo* incluídos nesta revisão ..... 34
- Tabela 03** – Análise da qualidade metodológica dos estudos *in vitro* incluídos nesta revisão..... 38
- Tabela 04** – Análise do Risco de Viés dos estudos *in vivo* incluídos nesta revisão. 39

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

Ti - Titânio

SEM – Scanning Electron Microscopy

XPS – X-ray photoelectron spectroscopy

UVO – Ultra violet ozone

PVD – Physical Vapour Deposition

BA – Bone Area

BIC – Bone Implant Contact

ALP – Alcaline Phosphate Activity

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
2.1 GERAL.....	18
2.2 ESPECÍFICOS.....	18
2.3 HIPÓTESE ALTERNATIVA. ....	19
2.4 HIPÓTESES NULAS.....	19
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>19</b>
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>24</b>
4.1 PROTOCOLO E REGISTRO.....	24
4.2 CRITÉRIO DE ELEGIBILIDADE. ....	24
4.3 PESQUISA DE INFORMAÇÃO .....	25
4.4 PESQUISA DE DADOS .....	25
4.5 SELEÇÃO DOS ESTUDOS.....	25
4.6 EXTRAÇÃO E RELATÓRIO DOS DADOS.....	26
4.7 ANÁLISE DA QUALIDADE DA METODOLOGIA.....	26
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>27</b>
5.1 SELEÇÃO DO ESTUDO.....	27
5.2 CARACTERÍSTICAS DOS ESTUDOS .....	30
<b>5.2.1 Métodos</b> .....	<b>36</b>
<b>5.2.2 Método de Aplicação do Ozônio e Formas de Apresentação</b> .....	<b>36</b>
<b>5.2.3 Grupos</b> .....	<b>36</b>
<b>5.2.4 Desfechos</b> .....	<b>37</b>
<b>5.2.5 Efeitos do Tratamento com Ozônio</b> .....	<b>37</b>
<b>5.2.6 Análise da Qualidade Metodológica</b> . ....	<b>38</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>40</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> .. ..	<b>44</b>
<b>8 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>44</b>
<b>9 PRESS RELEASE</b> .....	<b>49</b>
<b>APÊNDICE I</b> .....	<b>50</b>



<b>APÊNDICE II.....</b>	<b>55</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXO II.....</b>	<b>64</b>

## 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 detalhado 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 Ultra Violeta (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 e duplo, nos quais o agente do tratamento reage com a superfície do implante alterando os compostos presentes na mesma, também são frequentemente utilizados.

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]. Assim, o objetivo deste trabalho é realizar uma revisão sistemática sobre o tratamento da superfície do titânio e suas ligas metálicas, com ozônio, em suas diferentes formas de apresentação, gás, água e óleo, buscando um maior entendimento sobre sua efetividade na melhora das propriedades biológicas deste metal e responder à seguinte pergunta focada: Quais os efeitos do tratamento com ozônio na superfície do titânio ou suas ligas em relação às propriedades osteocondutoras *in vitro* e *in vivo*?

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL:

Realizar uma revisão sistemática sobre os efeitos do tratamento da superfície do titânio e suas ligas com ozônio sobre as propriedades osteocondutoras.

### 2.2. ESPECÍFICOS:

- i. Avaliar a influência do tratamento da superfície do titânio e suas ligas com ozônio na forma de gás, água ozonizada e óleo ozonizado sobre a topografia e rugosidade da superfície.
- ii. Avaliar a influência do tratamento da superfície do titânio e suas ligas com ozônio na forma de gás, água ozonizada e óleo ozonizado sobre a energia de superfície, ângulo de contato e molhabilidade da superfície.
- iii. Avaliar a influência do tratamento da superfície do titânio e suas

ligas com ozônio na forma de gás, água ozonizada e óleo ozonizado sobre composição química da superfície.

- iv. Avaliar a influência do tratamento da superfície do titânio e suas ligas com ozônio na forma de gás, água ozonizada e óleo ozonizado sobre o crescimento e morfologia celular.
- v. Avaliar a influência do tratamento da superfície do titânio e suas ligas com ozônio na forma de gás, água ozonizada e óleo ozonizado sobre crescimento ósseo, atividade de fosfatase alcalina e osseointegração.

### 2.3 HIPÓTESE ALTERNATIVA

- i. O tratamento da superfície do titânio e suas ligas com ozônio nas suas formas de gás, água ozonizada ou óleo ozonizado melhora as suas propriedades osteocondutoras.

### 2.4 HIPÓTESES NULAS

- i. Não existem diferenças significativas nas propriedades osteocondutoras da superfície do titânio e suas ligas entre as amostras tratadas e não tratadas com ozônio nas suas formas de gás, água ozonizada ou óleo ozonizado
- ii. O tratamento da superfície do titânio e suas ligas com ozônio nas suas formas de gás, água ozonizada ou óleo ozonizado piora as suas propriedades osteocondutoras.

## 3 REVISÃO DE LITERATURA

Biomateriais metálicos têm sido utilizados na prática clínica médica e odontológica na forma de próteses e/ou implantes, além de placas e parafusos para fixação de fraturas ósseas, há muitos anos. Muitos destes, após acompanhamentos funcionais após instalação nos pacientes por períodos mais longos e maior conhecimento 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 por provocarem reação inflamatória de corpo estranho, oxidação com liberação de resíduos e perda de estabilidade na união com o osso [1,2,3,17]. De todos os compostos metálicos utilizados como o ferro, o aço, cobre, níquel, cromo, entre outros, o titânio e algumas de 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 do paciente chamado de osseointegração [14,18]. Esta união é caracterizada pelo íntimo contato estrutural e funcional entre o osso e a superfície de titânio [1,2,18]. Após a implantação, o osso interage com a superfície do titânio e ocorre a fixação [3,4]. A partir do sucesso do titânio, muitos estudos foram realizados com o objetivo de se identificar quais características do mesmo e em quais condições o processo de osseointegração poderia ser favorecido [12,13,14]. Com a evolução dos trabalhos e produção de conhecimento mais específico, sabe-se hoje que, durante o processo de reparo, a estabilidade inicial e as características de superfície dos implantes de titânio como composição química, rugosidade e hidrofília (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, 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]. Estas características citadas podem favorecer ainda mais 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, já descrita por Thomas (1981) [23] como a média entre a altura de picos e profundidade de vales observados na superfície em questão. A superfície rugosa foi apontada como sendo mais vantajosa do que a superfície lisa. Schoroeder *et al.* (1981) [24] avaliaram o crescimento ósseo ao redor de implantes de titânio com tratamentos de superfície variados, em primatas. Os resultados demonstraram crescimento ósseo maior nas superfícies rugosas formando uma “anquilose” junto ao metal. Maniatopoulos *et al.* (1986) [25], compararam a fixação óssea de implantes usinados cilíndricos e lisos, ou seja, sem roscas e nenhum tratamento adicional, com implantes com roscas lisas e sem roscas com a superfície porosa. Os autores relataram uma força de união entre implante e osso, maior para implantes porosos em relação aos lisos, no teste pull-out, assim como a presença de um tecido fibroso nos implantes lisos para cargas prematuras, sugerindo

que o uso de implantes porosos permite um crescimento ósseo mesmo quando há movimentação precoce.

Os primeiros implantes de titânio utilizados como substitutos de dentes perdidos, não apresentavam tratamento e modificações na 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 trabalhos mostram, inclusive, que um implante apenas usinado pode ser mais rugoso do que alguns implantes que possuem 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 apresentam melhores propriedades osteocondutoras e osseointegração [24]. Este fenômeno é devido a 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].

A partir destes novos dados observados nos estudos, visando acelerar o processo de osteocondução e de osseointegração dos implantes de Ti e conseguir um melhor contato entre o osso e o implante, foram sugeridas modificações em suas superfícies, denominadas tratamentos de superfície [32]. São classificados em tratamento por adição / químico (eletroquímico, plasma de titânio e hidroxiapatita) ou subtração / físico (ataque ácido, jateamento abrasivo, laser, luz UV) e/ou associação 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 [34,35,36,37].

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: o clorídrico (HCL), o fluorídrico (HF), o nítrico (HNO<sub>3</sub>), o sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ou a combinação deles [40]. O tratamento também pode ser feito após o jateamento de partículas, associando os dois métodos. [14]

Atualmente, o ozônio tem sido utilizado 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 diminui a energia de superfície do metal e aumenta a quantidade de óxidos de 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 a sua curta meia-vida, que é de aproximadamente 40 min 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 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. [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, a temperatura da água, a pureza, o pH além de outros fatores inerentes ao equipamento utilizado para a ozonização. 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 8ug/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 atuam 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 de tempos 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. O mais comum é o óleo de oliva, devido ao seu pH e baixo índice de peroxidase, o que mantém o ozônio ativo por mais tempo [47,48].

Diante deste panorama, ainda não se tem um protocolo de tratamento de superfície para o titânio e suas ligas considerado ideal. A literatura descreve inúmeras formas e resultados porém, sempre citando a necessidade de novos estudos e a definição de tratamentos específicos para cada região na qual essas prótese ou implantes serão inseridos. No caso do ozônio, tratamento em questão neste trabalho, apesar de já existirem relatos em vários estudos de suas propriedades oxidativas e sua capacidade de remoção de átomos de carbono tornando as superfícies tratadas mais reativas, suas diversas formas de apresentação, concentrações e tempo de exposição ainda deixam uma lacuna em relação a um protocolo de tratamento considerado ideal.



## 4 METODOLOGIA

### 4.1 PROTOCOLO E REGISTRO

Essa revisão sistemática foi realizada utilizando o guia de recomendações e checklist para revisões sistemáticas e meta-análise (PRISMA) [49]. O registro foi realizado no Open Science Framework (OSF) ( <https://www.osf.io> ) sob link <https://osf.io/28kdv/>, no dia 22/10/20. Nenhum outro estudo semelhante foi encontrado na literatura no momento do envio do protocolo desta revisão sistemática.

### 4.2 CRITÉRIO DE ELEGIBILIDADE

Os trabalhos incluídos foram estudos laboratoriais *in vitro* e *in vivo* em que a superfície de corpos de prova de titânio comercialmente puro ou suas ligas tenha sido tratada com gás ozônio, água ou óleo ozonizados, comparados com corpos de prova não tratados ou tratados com ar, água ou óleo não ozonizados, ou ainda outro tratamento ativo de superfície, e em que as propriedades osteocondutoras foram testadas (topografia da superfície, composição química e/ou hidrofília/molhabilidade).

Foram excluídas revisões, cartas, opiniões, capítulos de livros e livros, abstracts de conferências, estudos com outros desenhos experimentais que não laboratoriais *in vitro* e/ou *in vivo*, estudos que testaram a aplicação de ozônio em outros materiais para uso em ortopedia/odontologia que não o titânio puro ou suas ligas, estudos que não avaliaram os desfechos de interesse (propriedades osteocondutoras: topografia superficial, composição química e hidrofília/molhamento).

### 4.3 PESQUISA DE INFORMAÇÃO

Os estudos foram identificados por meio de pesquisa eletrônica de bases de dados PubMed (MEDLINE), Cochrane Library, LILACS (BVS), Web of Science, Scopus, Gene, Embase e Livivo), na literatura cinzenta, ou seja, todos os trabalhos que não foram publicados em periódicos científicos indexados (Proquest, OpenGrey e Google Scholar) e pesquisa manual nas listas de referências dos artigos incluídos. A busca dos artigos foi realizada em agosto de 2020 e atualizada em outubro de 2020. Nenhuma fonte de financiamento foi utilizada nesta revisão sistemática.

### 4.4 PESQUISA DE DADOS

Para construção da estratégia de busca foram empregadas as seguintes palavras: ("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")

A estratégia de busca completa desenvolvida para cada base de dados encontra-se disponível no Apêndice 1.

### 4.5 SELEÇÃO DOS ESTUDOS

Dois revisores independentes (JHGSF e LRBP) realizaram a pesquisa nas bases de dados, literatura adicional e pesquisa manual. Inicialmente as referências obtidas na pesquisa nas bases de dados foram importadas para o gerenciador de referências Mendeley [59], onde os estudos duplicados foram identificados e removidos pelo coordenador da pesquisa (CMS).

Para a organização das duas etapas de seleção e inclusão dos estudos na revisão sistemática foi utilizado o aplicativo Rayyan QCRI [50]. Na primeira etapa, os

títulos e resumos dos artigos identificados foram avaliados independentemente por ambos revisores de maneira cegada, de acordo com os critérios de inclusão. Os artigos selecionados para a etapa dois foram lidos na íntegra por pelos mesmos dois revisores independentes e aqueles que não atenderam os critérios de inclusão foram excluídos. As discordâncias entre os revisores foram decididas por consenso com ajuda de um terceiro revisor (SBM) e do coordenador (CMS).

A lista de estudos excluídos na fase dois com as razões para exclusão pode se encontrada no Apêndice II.

#### 4.6 EXTRAÇÃO E RELATÓRIO DOS DADOS

Os dois revisores (JHGSF e LRBP) extraíram dados dos estudos incluídos independentemente. Conflitos foram resolvidos com auxílio do terceiro revisor e do coordenador. Os dados extraídos de cada Estudo Laboratorial *in vitro* foram: (1) autor, ano, país; (2) tamanho e grupos da amostra; (3) Tipo de amostra; (4) Tratamento com ozônio empregado (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* foram: (1) autor, ano, país; (2) Modelo animal utilizado no estudo; (3) Tamanho da amostra; (4) Tratamento com ozônio empregado (formulação, concentração, veículo); (5) Grupo controle ou de comparação; (6) Metodologia; (7) Resultados obtidos; (8) Conclusões. Para a descrição e relatórios dos dados foi utilizada como ferramenta de orientação as recomendações do PRISMA [49].

#### 4.7 ANÁLISE DA QUALIDADE METODOLÓGICA

A qualidade metodológica estudos *in vitro* foi avaliada por meio de instrumento adaptado de Sarkis-Onofre et al. (2014) e por meio da Análise do risco de viés dos estudos *in vivo* (em animais) – SYRCLE RoB tool (Hooijmans et al., 2014) para os estudos *in vivo*. Os autores JHGSF e SBM avaliaram cada domínio de maneira independente. Discordâncias foram resolvidas após consenso. Estes instrumentos contém sete e dez domínios, respectivamente, sendo: 1: Descrição do cálculo

amostral; 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 empregado; 6: Padronização na aplicação do tratamento; 7: Cegamento na análise dos resultados, para a Análise da qualidade metodológica dos estudos *in vitro* (adaptado de Sarkis-Onofre et al., 2014) e 1: Foi gerada e aplicada uma adequada sequência de alocação? 2: Os grupos eram similares no início ou foram ajustados de acordo com os confundidores? 3: Houve cegamento na alocação? 4: Os animais foram alojados aleatoriamente durante o experimento? 5: Houve cegamento dos cuidadores e pesquisadores sobre qual intervenção cada animal recebeu? 6: Os animais foram selecionados aleatoriamente para avaliação dos resultados? 7: Houve cegamento para a coleta de dados? 8: Os dados de resultados incompletos foram tratados de forma adequada? 9: Os relatos dos estudos estavam livres de relatos seletivos? 10: O estudo apresentava algum outro problema que pudesse resultar em viés?

Para interpretação da qualidade metodológica dos estudos *in vitro* (Sarkis-Onofre et al., 2014) [57], adotou-se a seguinte norma: se os autores relataram de forma adequada e clara o critério, este é avaliado como "Y". (sim); se não for possível obter a informação, o critério é avaliado como "N". (não). Os artigos que relatam apenas um a três critérios foram classificados como “baixa qualidade”, quatro ou cinco artigos como “média qualidade”, e seis ou mais como estudos de “alta qualidade”.

Para a Análise do risco de viés dos estudos *in vivo* (em animais) – SYRCLE RoB tool (Hooijmans et al., 2014) [58], um único domínio assinalado com “não” bastou para classificar o estudo como “alto risco de viés”, e um único “incerto” como risco de viés incerto.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 SELEÇÃO DOS ESTUDOS

Um total de 2825 artigos foram coletados utilizando seis bases de dados online (PubMed, Cochrane, LILACS (BVS), LIVIVO, Scopus e Web of Science) e procura manual e literatura cinzenta (Google Scholar, Open Grey e ProQuest). Após a remoção das duplicatas restaram 1691 artigos. Destes, 1680 foram excluídos durante a fase um de triagem de títulos e resumos por não estarem de acordo com os critérios de inclusão. Onze artigos foram selecionados para leitura na íntegra. Nove artigos

atendiam aos critérios de inclusão e foram incluídos nesta revisão sistemática. O diagrama de fluxo com as etapas de seleção dos estudos pode ser encontrado na figura 1.

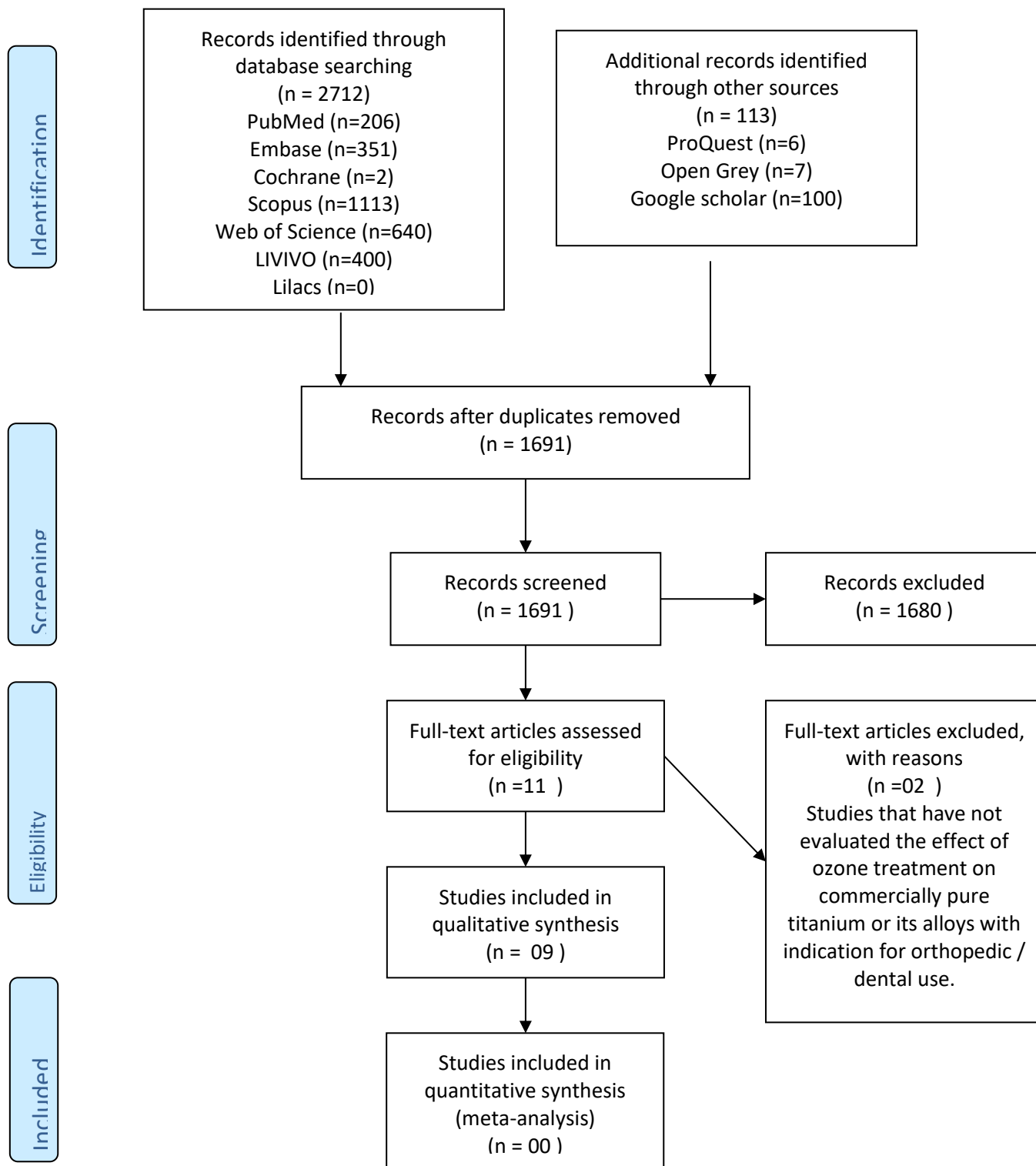


Figura 1 - Fluxograma da busca da literatura e critérios de seleção dos estudos (PRISMA [49])

## 5.2 CARACTERÍSTICAS DO ESTUDOS

A síntese qualitativa dos dados extraídos dos estudos incluídos pode ser encontrada na Tabela 1 para os estudos *in vitro* e na Tabela 2 para estudos *in vivo*.

**Table 1** - Summary of descriptive characteristics of included *in vitro* studies (n= 09).

Author, year Country	Sample size (specimens per group)	Type of specimen	Ozone surface treatment (concentration, formulation, vehicle)	Control or comparison group	Methods (describe adopted methodology)	Main Conclusions
<b>Harmankaya et al., 2012 Sweden / Japan (1)</b>	176 specimens 04 groups 44 per group	Machined Ti implants cylindrical, threaded screws 3.2 mm long ( $\varnothing =$ 2.0 mm) and a external quadrant head for screwing, with the following treatments:	Illumination for 96 h in a UVO preparation chamber. The wavelengths of the emitted light were 253.7 nm (81%) and 184.9 nm (19%), respectively.	Machined Ti implants with no additional treatment	Implant surface roughness evaluated by light profilometer  Topography was evaluated by scanning electron microscopy (SEM),  Surface chemistry was assessed by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS).	The UVO treatment: -Improved oxide stoichiometry and surface wettability -No changes in topography -Decreased carbon -Increased Oxygen
<b>Hauser- Gerspach et al., 2011 – Switzerland (2)</b>	Two analysis: a. Microbiological experiments: 04 material groups 03 testing groups + control group N $\geq$ 4 *Total $\geq$ 64 b. Cellular experiments: 04 surfaces 03 treatments 03 analysis (morphology, spreading and cell proliferation) 05 samples for each analysis N = 180	Disks (5.0 mm in diameter) of titanium and zirconia in two surface qualities each.	Gaseous ozone 140 ppm; 2 L/min  for 6 and 24 s.	a. The samples were treated with chlorhexidine (2%, 30 s)  b. Ozone was not applied to control samples	a. The number of bacterias presents on the samples surface was determined by culturing appropriate dilutions. b. Cell growth was determined by cell culture and compared to cell growth in the control group that received no treatment. Topographic surface analysis was performed by SEM (scanning electrons microscopy).	-Gaseous ozone at 140 ppm for 24 s eliminated P.gingivalis but not S. sanguinis to below detection limit from all surfaces. -The ozone treatment did not negatively affect adhesion and proliferation of osteoblast-like MG- 63 -Material surfaces both, titanium and zirconia, did not change by the treatment.
<b>Klonica et al., 2019 – Poland (3)</b>	04 groups 01 sample per group Total = 04 samples For each test a small portion of the samples was analysed	25 mm _ 100 mm _ 1.6 mm Ti6Al4V titanium alloy samples were adhesively joined with the two- component epoxy adhesive	50g O3/m3 for 10, 30 e 45 minutes in a constant flow of 0,9 dm <sup>3</sup> / min	Samples after machining prior to ozone treatment	1. Surface free energy (SFE) - contact angle measurement 2. The surface roughness- optical profilometry 3. Topography - SEM 4. Surface chemistry -XPS Photoelectron Spectroscopy	- Ozone treatment can be used in bonding technologies to shape surface micro-topography and free energy - Ozone increased Oxygen ions and decreased the Carbon ions concentration on the samples surfaces - Wettability – improved



<p><b>Krozer et al., 1999 – Sweden (4)</b></p>	<p>03 groups 16 samples for group Total: 48 samples</p>	<p>Two kinds of samples: 1. Screw-shaped Ti implants (nobel Biocare) 2. Ti studs 5mm diameter, 4mm length, machined from pure Ti</p>	<p>Samples were rinsed in running water for 2 minutes followed by exposure to UV-ozone for 15 minutes</p>	<p>Reference Samples based on the literature for XPS of Ti without contact with amino-alcohol solutions</p>	<p>Surface chemistry - XPS analysis</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- UV-Ozone treatment increased energy surface and wettability</li> <li>- Carbon decreased from 45at% to approximately 15at%</li> <li>- The results suggested that the amino-alcohol is removed from the surface by UVO exposure</li> </ul>
<p><b>Linderbäck et al., 2010 – Sweden (5)</b></p>	<p>100 silicon wafers TiO<sub>2</sub>-surface characterizations n = 9 CA-analysis n = 3</p>	<p>Spontaneously air oxidised silicon (100) wafers were cleaned in a basic peroxide solution of 5:1:1 parts of distilled water UVO 72h UVO 92h 300°C 24h 400°C 24h 500°C 24h</p>	<p>UVO 72 h UVO 92 h</p>	<p>Control samples – No treatment</p>	<p>- Surface chemistry: X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS), X-ray Diffraction (XRD) and fourier transform infra-red spectroscopy (FT-IR) analysis -Changes in surface hydrophilicity prior and subsequent to UVO-illumination or annealing was characterized using a contact angle microscope (CAM).</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Increased hydrophilicity, and the contact angle decreased to &lt;3_ after 96 hours of UVO illumination.</li> </ul>
<p><b>Xingling et al, 2016 – China / Japan / Malaysia (6)</b></p>	<p>4 groups Control H-TiN 100 H-TiN 120 O-TiN (n=5) Total = 20</p>	<p>Disk-shaped specimens with diameter of 14.5mm and thickness of 1 mm, prepared with commercially pure titanium, divided in four groups:  -control group: no treatment -Samples heated in a dry-heat oven at 100C° and 120°C, for 24h. -Samples exposed to ozone gas using an O<sub>3</sub> generator and distilled water</p>	<p>Specimens were transferred into a tailor-made glass vessel filled with 300 ml of ultrapure water. O<sub>3</sub> gas was generated from an O<sub>3</sub> generator and then introduced into distilled water with a pressure of 0.05 MPa and a flow rate of 2.0 L/min. A tip was installed at the opening of glass tube below water level to generate O<sub>3</sub> bubbles continuously during the treatment. The glass vessel was kept in a water bath set at 40 °C and the treatment lasted for 24 h.</p>	<p>Samples with no treatment</p>	<p>SEM – for morphology surface CA (contact angle) – for wettability XPS – for surface chemical composition Micro-Vickers hardness – for hardness Ar<sup>+</sup> ions etching at 1000 ev with chamber pressure of less than 7.0 x 10<sup>-5</sup> Pa – for depth profiles</p>	<p>The ozone treatment: - improved the osteoconductivity, wettability, decreased the surface free energy and the surface contact angle and Increased roughness - Enhanced osteoblast attachment, spreading and proliferation - Promoted osteoblastic differentiation - Enhanced mineralizing capability of osteoblast</p>

<p><b>Toita et al., 2020 – Japan / Indonesia (7)</b></p>	<p>02 groups</p> <p>1.UnTi – Acid etched Ti discs</p> <p>2. O<sub>3</sub> – Ti – Acid etched Ti discs, ozone gas - treated</p>	<p>Commercial pure Ti discs with a diameter of 10 mm and a thickness of 1 mm (Grade 2, The Niraco Co., Tokyo, Japan) were etched in a concentrated acid mixture containing 30% H<sub>2</sub>O, 20% HCl, and 50% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (all from Wako, Osaka, Japan) at 70°C for 30 min.</p>	<p>The samples were placed in a glass chamber connected to an ozone generator and then ozone gas was flowed into the glass chamber at room temperature for 24 h at a flow rate of 2 nL/min with current of 3.4 A (EcoDesign Inc., Saitama, Japan).</p>	<p>Acid – etched Ti discs without Ozone exposure</p>	<p>1.The contact angles were measured with a contact angle meter</p> <p>2.Laser scanning microscopy was performed to measure the mean surface roughness.</p> <p>3. The surface topography was observed by scanning electron microscopy (SEM)</p> <p>4.The chemical composition was analyzed by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS)</p> <p>5. Fluorescence microscope was then used to observe the cell morphologies.</p> <p>6. The number of viable cells was calculated after 4 and 8 days of culturing by measuring the absorbance at 450 nm with a microplate reader.</p> <p>7. The ALP activity was quantified using a Lab Assay ALP Kit (Wako).</p> <p>8.The bone-like nodule was stained using a bone nodule staining kit</p> <p>9.The positive area was quantified by Image J software</p>	<p>1.The O<sub>3</sub>-Ti surface was superhydrophilic.</p> <p>2.Both samples had similar mean surface roughness values and microstructures after ozone treatment.</p> <p>3. Superhydrophilic Ti facilitated MSC responses, such as cell proliferation, ALP activity, and bone-like nodule formation.</p> <p>4. Ozone-gas treatment has the possibility of improving osseointegration of Ti implants.</p> <p>5. Removal of the hydrocarbon contaminants and introduction of –OH groups on the surface decreased the water contact angle from 72.6° to 0.0°.</p>
<p><b>Toita et al 2016 – Japan (8)</b></p>	<p>05 groups:</p> <p>-Control</p> <p>-Ozone exposure for 3, 6, 12 e 24 hours</p>	<p>Machined pure titanium discs (10mm in diameter and 1 mm in thickness) Untreated and functionalized specimens were denoted as unTi and O<sub>3</sub>-Ti, respectively</p>	<p>Discs were washed by acetone and ultrapure water before surface functionalization. The specimens were placed in a glass chamber connected to an ozone generator. Ozone gas was flowed into the glass chamber at a rate of 2 nL/min at</p>	<p>Untreated specimens denoted as unTi were used as control group</p>	<p>1) Implant surface characterization - SEM</p> <p>2)Cell attachment and proliferation - Cell culture</p> <p>3)Cell morphology - Cell culture</p> <p>4)ALP activity and mineralization - Lab Assay ALP Kit</p> <p>5)Cytokine measurement</p>	<p>- Chemical composition: carbon decreased and oxygen increased resulting in superhydrophilic property</p> <p>- The superhydrophilic O<sub>3</sub>-Ti exhibited favorable cellular characteristics, including cell size, cell perimeter and cell proliferation</p> <p>-Bone-like nodule formation of MSCs were largely facilitated on the O<sub>3</sub>-Ti surface.</p> <p>- MSC on O<sub>3</sub>-Ti produced lower level of proinflammatory cytokines.</p> <p>- Superhydrophilic titanium implant had both excellent osteoconductivity</p>

			room temperature for 3, 6, 12, and 24 h			and anti-inflammatory properties  - ALP activity was significantly higher - Contact angle diminishes with prolonged ozone treatment time - Both unTi and O <sub>3</sub> -Ti exhibited similar topography and roughness
<b>Yoshida et al., 2015 – Japan (9)</b>	5 male SD rats (Japan SLC, Hamamatsu, Japan), used for cells culture  02 groups a. rinsed in distilled water b. rinsed in Ozonated water	Machined pure titanium disks (diameter 20 mm, thickness 1 mm, Grade 2)	Samples were pre-treated for 10 min in ozonated water (O <sub>3</sub> group)	Distilled water (control group)	1)Cell proliferation test 2)Measurement of ALP activity 3)Evaluation of calcification 4)Calcium determination test	- The results showed that ozonated water treatment of the titanium surface promoted osteoblast-like cell proliferation and differentiation - On culture days 5 and 7, ALP activity was significantly higher in the O <sub>3</sub> group - On culture days 14 and 21, calcium quantity was significantly higher in the O <sub>3</sub> group

Legend: TG: teste group; CG: Control Group

**Table 2** - Summary of descriptive characteristics of *in vivo* (animals) included articles (n=2).

Author, year Country	Animal model	Sample size (animals per group)	Ozone surface treatment (concentration, formulation, vehicle)	Control or comparison group treatment	Methods (describe adopted methodology)	Main Conclusions
<b>Harmankaya et al., 2012 Sweden / Japan (2)</b>	Male Sprague–Dawley rats.	44 rats. Each rat received two implants in each tibia, in proximal and distal positions. Each implant represents one of the four types of surface. So, 44 rats, four groups and 44 samples per group.	Illumination for 96 h in a UVO preparation chamber. The wavelengths of the emitted light were 253.7 nm (81%) and 184.9 nm (19%), respectively. PVD-coated samples were then placed within 2 cm of the lamp, with the UVO-chamber temperature 95° C (368 K). Illumination was programmed such that it ended shortly before surgery.	Machined Ti implants cylindrical, threaded screws 3.2 mm long (Ø = 2.0 mm) and an external quadrant head for screwing with the following treatments: 1. Machined Ti with no additional treatment 2. Machined Ti	The rats received four implants, two per tibia. The rats were sacrificed at 1, 7 and 28 days pos surgery. The following tests and analysis were applied:  1. Reverse transcription and the design of primers for TNF- $\alpha$ , BMP-2, osteocalcin (OC), IL-1 $\beta$ , cathepsin K (CATK), PDGF and 18S. Quantitative PCR was performed in duplicate.  2. Histomorphometric and histological analysis	- UVO-treated titanium with low complement activation gives rise to lower early inflammatory activation The difference in inflammatory response resulted in improved osseointegration at 7 and 28 days of implantation in rat tibia, although no significant differences were obtained at the final period evaluated. - UVO-treated surface had BMP2 level relatively high and constant from day 1 to day 7 - XPS showed that the UVO treatment decreased the surface carbon

				coated with physical vapour deposited (PVD) Ti layer 3. Machined Ti coated with IgG	3. Surface characteristics with SEM (scanning electron microscopy). 4. Chemical surface characterization by XPS (X-ray photoelectron spectroscopy). 5. Removal Torque - RTQ value at break point.	concentration from 47% to 12% and increased oxygen concentration from 38% to 54%. - RTQ value was 25% higher for UVO-treated surfaces compared with machined ones
<b>Yoshido et al., 2015 Japan (2)</b>	Twenty-two 8-week old male SD rats	Cylindrical titanium implants (diameter 1 mm, length 2 mm, Grade 2; Nishimura Metal, Fukui, Japan)	Samples were pre-treated for 10 min in ozonated water (O3 group)	Samples were pre-treated for 10 min in distilled water (control group)	Mechanical testing of osseointegration	The results showed that ozonated water improved the mechanical strength and suggested promotion of osteogenesis

Legend: TG: teste group; CG: Control Group

### 5.2.1 Métodos

Os 09 artigos incluídos foram estudos laboratoriais *in vitro* sendo que dois deles incluíam estudos *in vivo*. Todos foram publicados em inglês, entre os anos de 1999-2020. Dois deles 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 multicêntricos, realizados na Suécia e Japão [1]; China, Japão e Malásia [6]; Japão e Indonésia [7]. Dois também testaram as superfícies obtidas *in vivo* [1 e 9] .

Todos os estudos incluíam corpos de prova submetidos a algum tipo de tratamento de superfície com ozônio e comparados a outro tratamento e/ou corpos de prova sem nenhum tratamento adicional.

### 5.2.2 Método de Aplicação do Ozônio e Forma de Apresentação

Oito estudos incluídos avaliaram a aplicação da forma gasosa [1–8], sendo que destes, três [1, 4 e 5] utilizaram ozônio gerado por meio de luz ultravioleta (UVO), variando os comprimentos de onda, tempo de exposição (de 15 minutos a 96 horas) e distância da fonte de luz. Os outros cinco [2, 3, 6, 7 e 8] utilizaram um gerador de ozônio e seguiram as instruções do fabricante variando o fluxo entre 0,9 L/min e 2L/min e tempo de exposição foi de 24 horas na maioria dos trabalhos. Com exceção de um estudo [2] que utilizou ozônio por 6 e 24 segundos.

Dentre os trabalhos avaliados somente um [9] utilizou ozônio na forma de água ozonizada com exposição dos corpos de prova por 10 minutos.

### 5.2.3 Grupos

Todos os trabalhos investigaram a influência do tratamento de superfície do titânio com ozônio comparada com um grupo controle e/ou outro tipo de tratamento. Três estudos [2,5,6] tiveram outros grupos experimentais como: Aplicação de clorexidina 2% [2], cozimento em altas temperaturas, de 300°C a 500°C [5] e de 100°C

a 120°C [6] ou lavagem apenas com água destilada [9]. Os demais trabalhos compararam as mesmas superfícies com e sem o tratamento com ozônio proposto.

#### 5.2.4 Desfechos

Todos os estudos investigaram o efeito de diferentes formas de tratamento da superfície do titânio com ozônio em relação às suas propriedades osteocondutoras. A rugosidade obtida por perfilômetro de luz e a topografia de superfície foi medida por microscopia eletrônica de varredura (SEM) avaliando os sulcos e fissuras causados após o tratamento [1-3, 5-8]; a molhabilidade foi analisada com base nos resultados do ângulo de contato (CA) e energia de superfície [1,3,4,6,7]. As características químicas das superfícies foram analisadas por meio de espectrofotometria (XPS) [1,3-7]. Crescimento e morfologia celular além de atividade de fosfatase alcalina, contato osso implante (BIC) e quantidade de osso formado (BA), também foram investigados por meio de cultura de células [2,6-9]. Nos trabalhos *in vivo* também foi possível a avaliação da osseointegração em diferentes tempos de cicatrização por meio do teste de contra-torque (RTQ) [2] e das análises histológicas e histomorfométricas [1,2]. Cinco artigos tiveram como resultado que o tratamento com ozônio promoveu melhora na osseointegração e osteocondução [6-8, *in vitro*] [1-2, *in vivo*] e todos relataram melhora nas propriedades físico-químicas das superfícies tratadas, quando comparadas aos grupos controle.

Como resultados complementares foi relatado que o tratamento com ozônio promoveu diminuição dos átomos de carbono e aumento de oxigênio nas superfícies tratadas [1-4,7,8]; redução significativa do número de bactérias aderidas sem piorar as propriedades osteocondutoras do titânio [2]; os estudos *in vitro* e um trabalho *in vivo* relataram diminuição significativa do processo inflamatório nos estágios iniciais para o grupo tratado com Ozônio [1].

#### 5.2.5 Efeitos do Tratamento com Ozônio

Todos os experimentos mostraram efeitos positivos do tratamento das superfícies com ozônio. Oito trabalhos apresentaram melhoras relevantes nas



production according to the manufacturer's instructions or use of commercially available formulations with adequate description)									
6. standardized treatment application (ozone application performed by the same operator, under same conditions)	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
7. Blind outcomes' measurement (testing machine/device operator)	U	U	U	U	U	U	U	U	U
OVERALL QUALITY	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med

If the authors adequately and clearly reported the criterium, it is evaluated as "Y" (yes); if it is not possible to access the information, the criterium is evaluated as "N" (no) and U (Unclear). Articles reporting one to three criteria are classified as having low quality, four or five items as medium quality, and six or seven items as high quality.

**Table 4** - Análise do risco de viés dos estudos *in vivo* (em animais) – SYRCLE RoB tool (Hooijmans et al., 2014):

	Harmankaya, N. et al. 2012 Sweden / Japan	Yoshida, G. et al. 2015 Japan
1. Was the allocation sequence adequately generated and applied?	Y	U
2. Were the groups similar at baseline or were they adjusted for confounders in the analysis?	U	U
3. Was the allocation adequately concealed?	U	U
4. Were the animals randomly housed during the experiment?	U	U
5. Were the caregivers and /or investigators blinded from knowledge which intervention each animal received during the experiment?	U	U
6. Were animals selected at random for outcome assessment?	U	U
7. Was the outcome assessor blinded?	U	U
8. Were incomplete outcome data adequately addressed?	U	U
9. Are reports of the study free of selective outcome reporting?	N	N
10. Was the study apparently free of other problems that could result in high risk of bias?	N	N
OVERALL RISK OF BIAS	High	High

Y (Yes), N (No), U (Unclear). Articles reporting one to three criteria are classified as having high risk, four to six items as medium risk, and seven to ten items as low risk of bias.



## 6 DISCUSSÃO

Os implantes e próteses de titânio e suas ligas estão cada vez mais presentes no cotidiano médico - odontológico sendo opções viáveis, relativamente seguras, estáveis e biocompatíveis a médio e longo prazo [1,3]. Podem ser utilizados desde a reposição de dentes perdidos por meio dos implantes dentários até próteses maiores como as próteses de ATM ou de quadril. Também estão presentes nas placas e parafusos utilizados para fixar fraturas ósseas possibilitando excelente estabilidade inicial e retorno precoce à função [3,4,18].

Inicialmente, o titânio era apenas usinado e a característica principal era a biocompatibilidade [18]. Atualmente, com o avanço dos estudos, novas aplicações, novas tecnologias e necessidades, os desafios e objetivos avançaram também, e o foco das pesquisas passou a ser em novas formas de se melhorar a resposta do organismo no processo de reparo após a introdução dessas próteses e implantes no meio biológico. Melhor resposta celular, menor tempo de cicatrização, menor resposta inflamatória e características de superfície desses materiais que favorecessem o crescimento e proliferação celular.[4,5,6].

Seguindo essa tendência, várias formas de tratamento para o titânio já foram descritas, todas buscando alterações químico-físicas que conseguissem potencializar os mecanismos celulares sem perder a estabilidade desse metal no meio biológico que o torna biocompatível [4]. Em outras palavras, acelerar a cicatrização e formação óssea sem perder as características atuais que tornam o titânio estável no interior dos tecidos sem provocar resposta inflamatória de corpo estranho. [14]. Com isso as superfícies tratadas começam a ser classificadas também como osteocondutoras ou não [61]. Esse termo, juntamente aos termos osteogênico e osteoindutor eram utilizados apenas para os substitutos ósseos e materiais de enxertia. Por definição, **osteogênico** traz células ósseas vivas (osteoprogenitoras, osteoblastos e osteócitos) em seu interior. Esta característica basicamente se restringe ao enxerto de osso autógeno; **Osteoindutor** estimula o recrutamento, a proliferação e a diferenciação de células mesenquimais osteoprogenitoras em osteoblastos promovendo o aumento da população de osteoblastos no local do reparo ósseo, acelerando e otimizando o processo como os materiais que contém proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), por exemplo. Por fim, **Osteocondutor** tem a habilidade de servir de ambiente para a infiltração de células mesenquimais indiferenciadas, osteoblastos e osteoclastos, atuando como arcabouço passivo que,

aos poucos, vai sendo absorvido e substituído no processo de reparo ósseo, devendo ter estrutura e porosidade semelhantes ao trabeculado do osso nativo [60,61]. Em função das melhoras obtidas nas superfícies com os tratamentos, essa propriedade pôde também ser atribuída a elas.

Nesta Revisão Sistemática, foram analisados trabalhos que descrevem diversas formas de tratamento da superfície do titânio e suas ligas com ozônio, um gás facilmente gerado em laboratório, barato, de fácil manipulação e, apesar de tóxico ao ser humano em altas concentrações, tem sido manipulado de forma segura no meio industrial como potente oxidante, como bactericida e agente anti-poluinte. Dentre os artigos selecionados, apesar da variação de técnica, concentração, tempo de exposição, forma de obtenção e estado físico do ozônio, todos demonstraram resultados promissores em relação à melhora das propriedades osteocondutoras das superfícies.

Dos nove artigos selecionados, três deles utilizaram o ozônio na forma de gás gerado por luz ultravioleta [1,4 e 5], todos tendo como comparação a mesma superfície não tratada. Os tempos de exposição em dois estudos [1 e 5] foram semelhantes (96 horas), no entanto, em um trabalho [4] o tempo de exposição foi de apenas 15 minutos, talvez por tratar-se de um estudo sobre a capacidade de limpeza e descontaminação da superfície do titânio e, como consequência, alteração da sua superfície. Um deles [5] também comparou uma outra forma de tratamento por meio de cozimento em altas temperaturas. Neste estudo, em relação às características físicas da superfície (topografia e rugosidade) não foram encontradas diferenças significativas entre o tratamento com ozônio e com calor. Mesmo assim, os três estudos concluíram que o tratamento com ozônio alterou positivamente as superfícies tratadas.

Cinco estudos [2,3,6-8] utilizaram o ozônio na forma de gás obtido por gerador. Todos utilizaram um fluxo de oxigênio semelhante variando entre 0,9 L/min e 2 L/min por 24 horas. O estudo [8], além de ter como tempo de exposição 24 horas, também testou diferentes tempos, 3, 6 e 12 horas. O estudo [3] testou três tempos de exposição diferentes dos demais, 10, 30 e 45 minutos. Apesar de tratar por tempos significativamente menores, este trabalho teve como desfecho que o ozônio melhorou a molhabilidade. Destes cinco estudos, apenas um [2] não relatou alterações significativas da topografia das superfícies tratadas. Provavelmente por ter utilizado um tempo de exposição muito menor que os demais, 6 segundos e 24 segundos, porém, o tratamento não tornou a superfície pior e ainda relata como um de seus desfechos uma diminuição significativa da quantidade de bactérias presentes na

superfície. Neste caso, um fator relevante pode ser observado: Apesar de não alterar de forma significativa a topografia da superfície tratada houve alteração química com a remoção dos átomos de carbono que diminuem a reatividade do material e aumento dos átomos de oxigênio e titânio como resultado da quebra das moléculas do ozônio e exposição de maiores áreas do titânio sem a cobertura do carbono. Isso pode explicar os resultados indicando melhora nas propriedades celulares e osteocondutoras na conclusão do estudo. Isso nos leva a um questionamento sobre o real efeito das alterações físicas nas superfícies sobre as propriedades osteocondutoras. No entanto, nenhum dos estudos incluídos apresentou as medidas da rugosidade obtida com os tratamentos.

Apenas um estudo [9] utilizou água ozonizada como forma de tratamento e realizou testes *in vitro* e *in vivo*. Em ambas as situações os resultados apresentados apontaram para favorecimento na diferenciação e proliferação celular, citando especificamente osteoblastos, além de relatar aceleração na osseointegração por meio do teste de torque de remoção, realizado em diversos períodos da cicatrização. A resistência ao torque para remoção dos implantes instalados apresentou-se maior em períodos mais precoces do que no grupo controle. Neste estudo, apesar de não relatado, possivelmente não obteve também alterações significativas na topografia das amostras. Isso porque foi realizado o tratamento das superfícies das amostras com água ozonizada que, entre os veículos, carrega as mais baixas concentrações de ozônio, por um período de 10 minutos, ou seja, tempo consideravelmente menor que a maioria dos estudos incluídos. Mesmo assim, os resultados foram positivos, principalmente em relação aos fatores celulares como diferenciação, proliferação e osteogênese. Sugerindo também que as alterações químicas na superfície dos implantes podem, por si só, favorecerem as propriedades osteocondutoras. Esse dado vai de encontro com os dados encontrados na literatura sobre outros tipos de tratamento de superfície como duplo ataque ácido e jateamento com óxidos. Estes estudos também mostram melhoras significativas nas propriedades dos implantes, porém associam a rugosidade como um fator indispensável [2,12, 24]. Superfícies com rugosidade entre 100 e 300 micrômetros apresentaram os melhores resultados. [32].

No geral, em todos os estudos, houve alteração em relação ao aumento da rugosidade, aumento da energia livre de superfície e diminuição do ângulo de contato, que chegou praticamente a zero após o tratamento. Esses resultados foram relatados como precursores de uma superfície mais hidrofílica que favoreceria a molhabilidade e, conseqüentemente, a adesão e o crescimento celular. Da mesma

forma, os estudos concluíram que os tratamentos testados promoveram também alterações químicas nas superfícies que, de uma maneira geral, removeram os átomos de carbono que são considerados contaminantes e tornam essas superfícies menos reativas, além de aumentar a quantidade de átomos de titânio e de oxigênio, pela quebra das moléculas de ozônio, tornando a superfície mais reativa. Apesar das variações de tempo e concentração do ozônio, essas alterações químicas foram observadas em todos os estudos. Por outro lado, as alterações físicas só ocorreram nos casos com maiores tempos de exposição ao ozônio. Assim, podemos sugerir que, mesmo em baixas concentrações e em curtos períodos de exposição, o ozônio foi capaz de promover uma limpeza da superfície tratada com a remoção dos átomos de carbono tornando-a mais reativa e favorecendo a resposta celular. No entanto, para uma alteração significativa da topografia do titânio tornam-se necessários tratamento com concentrações e tempo de exposição mais elevados. Além disso, testes de medição da rugosidade obtida com o tratamento com o ozônio poderiam fornecer dados essenciais para parâmetros de comparação com os resultados obtidos com outros tipos de tratamento de superfície e melhor análise da sua importância associada às alterações químicas também presentes.

Devido à heterogeneidade dos estudos nos aspectos de intervenção, protocolo (tempo, concentração) e veículo de aplicação do ozônio, não foi possível proceder com uma meta-análise. Todas essas variações demonstram que não existe ainda um protocolo pré-determinado que seja consenso na literatura, porém, mesmo sem uma descrição clara dos cálculos amostrais nos trabalhos selecionados e da forma como as amostras e animais foram randomizados e alocados assim como os cuidados com o cegamento dos pesquisadores e cuidadores não estarem bem determinados, o que nos levou a considerar os estudos com risco de viés moderado (*in vitro*) e alto (*in vivo*), todos os resultados demonstraram efeitos positivos do tratamento com ozônio sobre as superfícies tratadas. Em outras palavras, o ozônio tornou as superfícies tratadas, em comparação com as não tratadas, mais reativas, com menos contaminantes, mais favorável à adesão, proliferação e crescimento celular, com menor resposta inflamatória e formação óssea precoce com maior área de contato osso - implante, resultados extremamente relevantes e expressivos. Entretanto, é importante que seja enfatizado novamente que esses dados devem ser avaliados com cautela, por esta revisão sistemática ter apresentado, de maneira geral, alta heterogeneidade das amostras, dos métodos e do tempo de exposição ao ozônio, além do risco de viés dos trabalhos incluídos ter sido considerado moderado a alto, com a ressalva de que para os estudos *in vitro*, por utilizarem espécimes produzidos industrialmente, a necessidade de randomização

pode tornar-se discutível.

Por fim, entende-se que além da realização de novos estudos *in vitro* e *in vivo*, um maior rigor metodológico e protocolos mais claros devem ser testados para que se possa assegurar menor risco de viés e maior clareza quanto aos resultados. Além disso, permitir a compreensão dos reais efeitos produzidos pelo tratamento com ozônio, além de permitir futuras comparações e análises mais fiéis. Com isso, cria-se espaço para futuros trabalhos em humanos, nos quais esses implantes ou próteses de titânio que receberem um tratamento com ozônio sob um protocolo bem determinado e testado nos tipos de estudos que antecedem os estudos clínicos poderão, finalmente, favorecer pacientes que necessitem deste tipo de tratamento, trazendo os benefícios obtidos para a prática clínica.

## 7 CONCLUSÃO

Com base nos estudos selecionados, métodos empregados, nos resultados analisados e nas variações encontradas entre os estudos, pode-se concluir que o tratamento da superfície do titânio e suas ligas com ozônio na forma de gás ou água promove alterações nas características físico-químicas dessas superfícies que parecem melhorar as propriedades osteoindutoras e osteocondutoras.

## 8 REFERÊNCIAS

1. Navarro M, Michiardi A, Castañõ 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 TiO<sub>2</sub> 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 TiO<sub>2</sub> 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 ultra violet 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 potencial 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.

## 9 PRESS RELEASE

Cada vez mais os materiais metálicos têm feito parte da prática médica – odontológica por meio das próteses e implantes. Por esse motivo, inúmeros estudos têm tido como foco a melhoria desses materiais, em especial o titânio presente, inclusive, nos implantes dentários e placas e parafusos utilizados para a fixação de fraturas ósseas. Dentre as opções descritas atualmente na literatura como forma de melhora das propriedades biológicas do titânio estão os tratamentos de superfície, nos quais esses materiais são expostos a substâncias químicas como ácidos e ações físicas como jateamento com óxidos como a sílica, por exemplo, que irão produzir modificações do titânio para torná-lo mais biocompatível. Outra opção de tratamento, que tem ganhado relevância é o ozônio que, por ter efeito oxidativo e facilidade de agir uniformemente sobre toda a superfície em questão tem apresentado resultados importantes e promissores.

Porém, ainda não são encontrados muitos trabalhos científicos que avaliam, de forma rigorosa e criteriosa, sua eficácia como forma de tratamento de superfícies metálicas. Desta forma, este trabalho teve como objetivo realizar uma busca minuciosa, seguindo padrões pré-definidos, sobre os efeitos do tratamento da superfície do titânio com ozônio sobre as propriedades osteocondutoras. Após essa pesquisa foi possível concluir que existem boas evidências quanto aos efeitos positivos deste tratamento, em especial para a utilização do ozônio na forma de gás. As superfícies tratadas demonstraram melhoras no tempo e na qualidade de cicatrização. Porém, são necessários mais estudos para podermos saber com maiores detalhes quais são os benefícios obtidos, as melhores formas e frequências de exposição ao ozônio e a definição de um protocolo. Este trabalho serve como orientação sobre como o ozônio pode agir nas superfícies de titânio e quais modificações pode provocar no mesmo.

Por ser um tratamento relativamente barato em relação aos outros e de fácil realização pode, após avanço nas pesquisas, colaborar com a produção de próteses e implantes de alta qualidade, com valores mais acessíveis aos pacientes, que poderão ter tempos de recuperação mais curtos e com mais conforto.

### APÊNDICE I - Estratégia de Busca

Base de Dados	Estratégia de Busca	Número de Artigos
PubMed	((((((((((((((((("Ozone"[All Fields] OR "ozonated water"[All Fields]) OR "ozonated oil"[All Fields]) OR "ozonized water"[All Fields]) OR "ozonized oil"[All Fields]) OR "ozone gas"[All Fields]) OR "Aqueous Ozone"[All Fields]) OR "Gaseous Ozone"[All Fields]) OR "ozone ultraviolet"[All Fields]) OR (((((((("ozonated"[All Fields] OR "ozonating"[All Fields]) OR "ozonation"[All Fields]) OR "ozonations"[All Fields]) OR "Ozone"[MeSH Terms]) OR "Ozone"[All Fields]) OR "ozone s"[All Fields]) OR "ozonization"[All Fields]) OR "ozonized"[All Fields]) OR "ozonizer"[All Fields]) AND "ultra violet"[All Fields])) OR (((((((("ozonated"[All Fields] OR "ozonating"[All Fields]) OR "ozonation"[All Fields]) OR "ozonations"[All Fields]) OR "Ozone"[MeSH Terms]) OR "Ozone"[All Fields]) OR "ozone s"[All Fields]) OR "ozonization"[All Fields]) OR "ozonized"[All Fields]) OR "ozonizer"[All Fields]) AND "ultra"[All Fields] AND (((("viola"[MeSH Terms] OR "viola"[All Fields]) OR "violet"[All Fields]) OR "violets"[All Fields]))) OR "ultraviolet ozone"[All Fields]) OR "ultra-violet	206

	<p>ozone"[All Fields]) OR "ultra-violet ozone"[All Fields]) OR "UVO"[All Fields]) OR (((("hot temperature"[MeSH Terms] OR ("hot"[All Fields] AND "temperature"[All Fields])) OR "hot temperature"[All Fields]) OR "heat"[All Fields]) AND "ozone treatment"[All Fields])) OR "ultra violet ozone treatment"[All Fields]) OR "ultraviolet ozone-treatment"[All Fields]) OR "ultra violet ozone treatment"[All Fields]) OR (((((((("ozonated"[All Fields] OR "ozonating"[All Fields]) OR "ozonation"[All Fields]) OR "ozonations"[All Fields]) OR "Ozone"[MeSH Terms]) OR "Ozone"[All Fields]) OR "ozone s"[All Fields]) OR "ozonization"[All Fields]) OR "ozonized"[All Fields]) OR "ozonizer"[All Fields]) AND ((((((("gas"[All Fields] OR "gasoline"[MeSH Terms]) OR "gasoline"[All Fields]) OR "gasolines"[All Fields]) OR "petrol"[All Fields]) OR "petroleum"[MeSH Terms]) OR "petroleum"[All Fields]) OR "petroleums"[All Fields]) AND (((((((((((((((("functional"[All Fields] OR "functional s"[All Fields]) OR "functionalities"[All Fields]) OR "functionality"[All Fields]) OR "functionalization"[All Fields]) OR "functionalizations"[All Fields]) OR "functionalize"[All Fields]) OR "functionalized"[All Fields]) OR "functionalizes"[All Fields]) OR "functionalizing"[All Fields]) OR "functionally"[All Fields]) OR "functionals"[All Fields]) OR "functioned"[All Fields]) OR "functioning"[All Fields]) OR "functionings"[All Fields]) OR "functions"[All Fields]) OR "physiology"[MeSH Subheading]) OR "physiology"[All Fields]) OR "function"[All Fields]) OR "physiology"[MeSH Terms]))) AND (((((((((((((((("titanium nickelide"[All Fields] OR "hydroxyapatite-titanium alloy"[All Fields]) OR "titanium alloy"[All Fields]) OR "TiNb13Zr13"[All Fields]) OR "TiAl6V4"[All Fields]) OR "titanium-niobium alloy"[All Fields]) OR "titanium aluminum alloy"[All Fields]) OR "titanium molybdenum alloy"[All Fields]) OR "titanium-niobium-aluminum alloy"[All Fields]) OR "titanium-vanadium-cobalt alloy"[All Fields]) OR "titanium-nickel-cobalt alloy"[All Fields]) OR "hydroxyapatite-glass-titanium composite"[All Fields]) OR "Titanium"[All Fields]) OR "Titanium oxide"[All Fields]) OR "Titanium dioxide"[All Fields]) OR "Ti-oxide"[All Fields]) OR "Ti oxidation"[All Fields]) OR "Titanium oxidation"[All Fields]) OR (("superhydrophilic"[All Fields] OR "superhydrophilicity"[All Fields]) AND (("Titanium"[MeSH Terms] OR "Titanium"[All Fields]) OR "titaniums"[All Fields])))) OR "hydrophilic titanium"[All Fields])</p>	
<p><b>Embase</b></p>	<p>('Ozone' OR 'ozonated water' OR 'ozonated oil' OR 'ozonized water' OR 'ozonized oil' OR 'ozone gas' OR 'Aqueous Ozone' OR 'Gaseous Ozone' OR 'ozone ultraviolet' OR 'ozone ultra-violet' OR 'ozone ultra violet' OR 'ultraviolet ozone' OR 'ultra-violet ozone' OR 'ultra violet ozone' OR 'UVO' OR 'heat ozone-treatment' OR 'ultra-violet ozone-treatment' OR 'ultraviolet ozone-treatment' OR 'ultra violet ozone-treatment' OR 'ozone gas functionalization') AND ('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-</p>	<p><b>351</b></p>

	vanadium-cobalt alloy' OR 'titanium-nickel-cobalt alloy' OR 'hydroxyapatite-glass-titanium composite' OR 'Titanium' OR 'Titanium oxide' OR 'Titanium dioxide' OR 'Ti-oxide' OR 'Ti oxidation' OR 'Titanium oxidation' OR 'superhydrophilic titanium' OR 'hydrophilic titanium')	
<b>Cochrane</b>	("Ozone" OR "ozonated water" OR "ozonated oil" OR "ozonized water" OR "ozonized oil" OR "ozone gas" OR "Aqueous Ozone" OR "Gaseous Ozone" OR "ozone ultraviolet" OR "ozone ultra-violet" OR "ozone ultra violet" OR "ultraviolet ozone" OR "ultra-violet ozone" OR "ultra violet ozone" OR "UVO" OR "heat ozone-treatment" OR "ultra-violet ozone-treatment" OR "ultraviolet ozone-treatment" OR "ultra violet ozone-treatment" OR "ozone gas functionalization") AND ("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 "Titanium oxide" OR "Titanium dioxide" OR "Ti-oxide" OR "Ti oxidation" OR "Titanium oxidation" OR "superhydrophilic titanium" OR "hydrophilic titanium") in Title Abstract Keyword - (Word variations have been searched)	<b>2</b>
<b>Scopus</b>	TITLE-ABS-KEY ( ( "Ozone" OR "ozonated water" OR "ozonated oil" OR "ozonized water" OR "ozonized oil" OR "ozone gas" OR "Aqueous Ozone" OR "Gaseous Ozone" OR "ozone ultraviolet" OR "ozone ultra-violet" OR "ozone ultra violet" OR "ultraviolet ozone" OR "ultra-violet ozone" OR "ultra violet ozone" OR "UVO" OR "heat ozone-treatment" OR "ultra-violet ozone-treatment" OR "ultraviolet ozone-treatment" OR "ultra violet ozone-treatment" OR "ozone gas functionalization" ) AND ( "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 "Titanium oxide" OR "Titanium dioxide" OR "Ti-oxide" OR "Ti oxidation" OR "Titanium oxidation" OR "superhydrophilic titanium" OR "hydrophilic titanium" ) )	<b>1113</b>
<b>Web of Science</b>	TÓPICO: (("Ozone" OR "ozonated water" OR "ozonated oil" OR "ozonized water" OR "ozonized oil" OR "ozone gas" OR "Aqueous Ozone" OR "Gaseous Ozone" OR "ozone ultraviolet" OR "ozone ultra-violet" OR "ozone ultra violet" OR "ultraviolet ozone" OR "ultra-violet ozone" OR "ultra violet ozone" OR "UVO" OR "heat ozone-treatment" OR "ultra-violet ozone-treatment" OR "ultraviolet ozone-treatment" OR "ultra violet ozone-treatment" OR "ozone gas functionalization") AND ("titanium nickelide" OR "hydroxyapatite-titanium alloy" OR "titanium alloy" OR "TiNb13Zr13" OR "TiAl6V4" OR "titanium-niobium alloy" OR "titanium aluminum alloy" OR "titanium molybdenum	<b>640</b>

	<p>alloy" OR "titanium-niobium-aluminum alloy" OR "titanium-vanadium-cobalt alloy" OR "titanium-nickel-cobalt alloy" OR "hydroxyapatite-glass-titanium composite" OR "Titanium" OR "Titanium oxide" OR "Titanium dioxide" OR "Ti-oxide" OR "Ti oxidation" OR "Titanium oxidation" OR "superhydrophilic titanium" OR "hydrophilic titanium"))</p> <p>Tempo estipulado: Todos os anos. Índices: SCI-EXPANDED, SSCI, A&amp;HCI, CPCI-S, CPCI-SSH, ESCI.</p>	
<b>LIVIVO</b>	<p>("Ozone" OR "ozonated water" OR "ozonated oil" OR "ozonized water" OR "ozonized oil" OR "ozone gas" OR "Aqueous Ozone" OR "Gaseous Ozone" OR "ozone ultraviolet" OR "ozone ultra-violet" OR "ozone ultra violet" OR "ultraviolet ozone" OR "ultra-violet ozone" OR "ultra violet ozone" OR "UVO" OR "heat ozone-treatment" OR "ultra-violet ozone-treatment" OR "ultraviolet ozone-treatment" OR "ultra violet ozone-treatment" OR "ozone gas functionalization") AND ("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 "Titanium oxide" OR "Titanium dioxide" OR "Ti-oxide" OR "Ti oxidation" OR "Titanium oxidation" OR "superhydrophilic titanium" OR "hydrophilic titanium")</p>	<b>400</b>
<b>LILACS (Portuguese and Spanish)</b>	<p>("Ozone" OR "ozonated water" OR "ozonated oil" OR "ozonized water" OR "ozonized oil" OR "ozone gas" OR "Aqueous Ozone" OR "Gaseous Ozone" OR "ozone ultraviolet" OR "ozone ultra-violet" OR "ozone ultra violet" OR "ultraviolet ozone" OR "ultra-violet ozone" OR "ultra violet ozone" OR "UVO" OR "heat ozone-treatment" OR "ultra-violet ozone-treatment" OR "ultraviolet ozone-treatment" OR "ultra violet ozone-treatment" OR "ozone gas functionalization" OR "Ozonio" OR "ozônio") AND ("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 "Titanium oxide" OR "Titanium dioxide" OR "Ti-oxide" OR "Ti oxidation" OR "Titanium oxidation" OR "superhydrophilic titanium" OR "hydrophilic titanium" OR "titania" OR "titânio")</p>	<b>0</b>
<b>ProQuest</b>	<p>noft(("Ozone" OR "ozonated water" OR "ozonated oil" OR "ozonized water" OR "ozonized oil" OR "ozone gas" OR "Aqueous Ozone" OR "Gaseous Ozone" OR "ozone ultraviolet" OR "ozone ultra-violet" OR "ozone ultra violet" OR "ultraviolet ozone" OR "ultra-violet ozone" OR "ultra violet ozone" OR "UVO" OR "heat ozone-treatment" OR "ultra-violet ozone-treatment" OR "ultraviolet ozone-</p>	<b>6</b>

	treatment" OR "ultra violet ozone-treatment" OR "ozone gas functionalization") AND ("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 "Titanium oxide" OR "Titanium dioxide" OR "Ti-oxide" OR "Ti oxidation" OR "Titanium oxidation" OR "superhydrophilic titanium" OR "hydrophilic titanium"))	
<b>Open Grey</b>	("Ozone" OR "ozonated water" OR "ozonated oil" OR "ozonized water" OR "ozonized oil" OR "ozone gas" OR "Aqueous Ozone" OR "Gaseous Ozone" OR "ozone ultraviolet" OR "ozone ultra-violet" OR "ozone ultra violet" OR "ultraviolet ozone" OR "ultra-violet ozone" OR "ultra violet ozone" OR "UVO" OR "heat ozone-treatment" OR "ultra-violet ozone-treatment" OR "ultraviolet ozone-treatment" OR "ultra violet ozone-treatment" OR "ozone gas functionalization") AND ("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 "Titanium oxide" OR "Titanium dioxide" OR "Ti-oxide" OR "Ti oxidation" OR "Titanium oxidation" OR "superhydrophilic titanium" OR "hydrophilic titanium")	<b>7</b>
<b>Google Scholar</b>	Ozone AND ("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")	<b>1500 (100 first references)</b>

**APÊNDICE II - Artigos excluídos e razões para ( n=2 ).**

<b>Autor, ano</b>	<b>Razão para exclusão</b>
El Hadary, A.A. et. al. 2011*	Estudo que não avaliou o efeito do tratamento com ozônio da superfície do titânio comercialmente puro e/ou suas ligas com indicação médica – odontológica
Yücesoy, T. Et al. 2019**	Estudo que não avaliou o efeito do tratamento com ozônio da superfície do titânio comercialmente puro e/ou suas ligas com indicação médica – odontológica
<b>Total: 2</b>	

*Fonte:* Dados fictícios, apenas para fins ilustrativos

\*El Hadary, Amany A; Yassin, Hala H; Mekhemer, Sameh T; Holmes, Julian C; Grootveld, Martin. Evaluation of the effect of ozonated plant oils on the quality of osseointegration of dental implants under the influence of Cyclosporin A an in vivo study. *Journal of Oral Implantology* - V 37, Ed 2, pp. 247-257. 2011.

\*\*Yücesoy, Türker; Seker, Elif Dilara; Cenkci, Ebru; Yay, Arzu; Alkan, Alper. Histologic and biomechanical evaluation of osseointegrated miniscrew implants treated with ozone therapy and photobiomodulation at different loading times. *The International journal of oral & maxillofacial implants*, V. 34, Issue 6, pp. 1337-1345. 2019.



## ANEXO I – Tabela 1 Completa

**Table 1** - Summary of descriptive characteristics of included *in vitro* studies (n= 09).

Author, year Country	Sample size (specimens per group)	Type of specimen	Ozone surface treatment (concentration, formulation, vehicle)	Control or comparison group	Methods (describe adopted methodology)	Outcomes (specimens' surface topography, hydrophilic properties, and chemical composition)	Main Conclusions
<b>Harmankaya et al., 2012 Sweden / Japan (1)</b>	176 specimens 04 groups 44 per group	Machined Ti implants cylindrical, threaded screws 3.2 mm long ( $\varnothing$ = 2.0 mm) and a external quadrant head for screwing, with the following treatments:  1. Machined Ti with no additional treatment  2. Machined Ti coated with physical vapour deposited (PVD) Ti layer  3. Machined Ti coated with IgG  4. Machined Ti coated with PVD Ti with UVO treatment	<p>Illumination for 96 h in a UVO preparation chamber. The wavelengths of the emitted light were 253.7 nm (81%) and 184.9 nm (19%), respectively.</p> <p>PVD-coated samples were then placed within 2 cm of the lamp, with the UVO- chamber temperature 95° C (368 K).</p>	Machined Ti implants with no additional treatment	<p>Implant surface roughness evaluated by light profilometer (WYKO NT9100)  Data from the profilometer were filtered in SPIP6 (Image Metrology, Denmark). The analysis was carried out in secondary electron mode using acceleration voltages between 2 and 5 kV.</p> <p>Topography was evaluated by scanning electron microscopy (SEM),</p> <p>Surface chemistry was assessed by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS).</p>	<p>- Treatments did not cause significant changes in surface topography.</p> <p>- The relatively high carbon concentration on machined and PVD Ti coated implants indicates organic contamination.</p> <p>- The UVO treatment decreased the surface carbon concentration and increased de oxygen concentration.</p> <p>- The UVO treatment provides an additional oxidation. It means increase of surface energy and wettability</p>	Considering the photocatalytic effect of UVO illumination, both the oxide stoichiometry and surface wettability are of relevance.

<p><b>Hauser-Gerspach et al., 2011 – Switzerland (2)</b></p>	<p>Two analysis:  a. Microbiological experiments: to quantify the antibacterial efficacy of the ozone  04 material groups  03 testing groups + control group  N ≥ 4  *Total ≥ 64</p> <p>b. Cellular experiments: to determine potential surface alterations after application of gaseous ozone on zirconia and titanium.  04 surfaces  03 treatments  03 analysis (morphology, spreading and cell proliferation)  N= 5 (05 samples for each analysis)  04 surfaces X  03 treatments X  03 analyses X  5 repetitions = 180</p>	<p>Disks (5.0 mm in diameter) of titanium and zirconia in two surface qualities each.</p>	<p>The test specimens were treated with gaseous ozone (140 ppm; 33 mL/s) 140 ppm; 2 L/min for 6 and 24 s.</p>	<p>a. The samples were treated with chlorhexidine (2%, 30 s)</p> <p>b. Ozone was not applied to control samples</p>	<p>a. Analysis of the number bacteria presente on the samples surface after treatments with ozone for 6s, 24s and chlorhexidine 2% for 30s, compared with control group. Viable bacteria were determined by culturing appropriate dilutions. Colonies were counted after 2 days (S. sanguinis) and 10 days (P. gingivalis) of incubation and CFU was calculated per disk. Minimal CFU detectable was ≥30 CFU per disk.  b.Cell growth was determined by cell culture and compared to cell growth in the control group that received no treatment.</p> <p>Samples topographic surface analysis, after ozone exposure, was performed by SEM (scanning electrons microscopy).</p>	<p>- Adhesion of S. sanguinis and P. gingivalis cells occurred to a higher extent on the rougher surface of both dental materials than on the polished surfaces.</p> <p>- chlorhexidine treatment reduced viable S. sanguinis counts to below detection limits, gaseous ozone application only resulted in reductions of 0–91.7%. P. gingivalis was much more sensitive to ozone treatment, as gaseous ozone applied for 24 s was able to eliminate P. gingivalis cells to below detection limit from all surfaces.</p> <p>-The surfaces of titanium (SLA and polished) and zirconia (acid-etched and polished) showed no changes by the treatment with gaseous ozone as observed by SEM.</p> <p>-Ozone-treated surfaces tended to result in a higher cell spreading after 24 h especially on polished surfaces.</p>	<p>Application of gaseous ozone at 140 ppm for 24 s eliminated P.gingivalis but not S. sanguinis to below detection limit from all surfaces. This ozone treatment did not negatively affect adhesion and proliferation of osteoblast-like MG-63 cells on the titanium and zirconia surfaces tested. Material surfaces both, titanium and zirconia, did not change by the treatment.</p>
<p><b>Klonica et al., 2019 – Poland (3)</b></p>	<p>04 groups  01 sample per group  Total = 04 samples  For each test a small portion of the</p>	<p>25 mm _ 100 mm _ 1.6 mm Ti6Al4V titanium alloy samples were adhesively joined with the two-component epoxy adhesive, Loctite</p>	<p>50g O3/m3 for 10, 30 e 45 minutes in a constant flow of 0,9 dm<sup>3</sup> / min</p>	<p>Samples after machining prior to ozone treatment</p>	<p>1.The surface free energy (SFE) of the specimens was determined by means of the indirect method, based on the contact angle</p>	<p>- Ozone treatment of the titanium alloy results in the removal of carbon (about 35%)</p> <p>- Ozone treatment caused a 25% increase in the Ti element</p>	<p>Ozone treatment, if performed under appropriate conditions, can be used in bonding technologies to</p>

	samples was analysed	Hysol 9466, divided in 4 groups: 1- samples after machining prior to ozone treatment,  2- samples after machining and ozone treatment: 50g O3/m3 for 10 min,  3- samples after machining and ozone treatment: 50g O3/m3 for 30 min,  4- samples after machining and ozone treatment: 50g O3/m3 for 45 min.			measurement  2. The surface roughness was measured by means of optical profilometry using a Contour GT-K1 optical profilometer  3.SEM  4. XPS Photoelectron Spectroscopy	of the surface layer of the samples  - The surface layer of the samples was examined using a high-contrast scanning electron microscope  -Ozone treatment increase in the values of surface roughness parameters  - 13% increase in oxides after ozone treatment.  - Increase of surface free energy as a result of ozone treatment	shape surface micro-topography and free energy  Ozone increased Oxygen ions and decreased the Carbon ions concentration on the samples surfaces  Wettability – improved
<b>Krozer et al., 1999 – Sweden (4)</b>	03 groups  16 samples for group  Total: 48 samples	Two kinds of samples:  1. Screw-shaped Ti implants (nobel Biocare) 2. Ti studs 5mm diameter, 4mm length, machined from pure Ti	Samples were rinsed in running water for 2 minutes followed by exposure to UV-ozone for 15 minutes	Reference Samples based on the literature for XPS of Ti without contact with amino-alcohol solutions	XPS analysis	- Significant decrease of the amino-alcohol film thickness was observed after UVO exposure in the XPS spectra. The Carbon decreased from 45at% to approximately 15at%, below to level observed for the reference samples. This results suggested that the amino-alcohol is removed from the surface by UVO exposure.	- UV-Ozone treatment increased energy surface and wettability
<b>Linderbäck et al., 2010 – Sweden (5)</b>	100 silicon wafers  n =9 for TiO2-surface characterizations  n = 3 for CA-analysis	Spontaneously air oxidised silicon (1 0 0) wafers were cleaned in a basic peroxide solution of 5:1:1 parts of distilled water  UVO 72h	UVO 72 h UVO 92 h	Control samples – No treatment	- X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS), X-ray Diffraction (XRD) and fourier transform infra red spectroscopy (FT-IR) analysis	- annealing lead to somewhat smaller grain size, although the differences were not significant with respect to surface roughness parameters	Increased hydrophilicity, and the contact angle decreased to <3_ after 96 hours (n ¼ 9) of UVO illumination,

		UVO 92h 300°C 24h 400°C 24h 500°C 24h			-Changes in surface hydrophilicity prior and subsequent to UVO-illumination or annealing was characterized using an OCA 15 plus contact angle microscope (CAM) used in sessile drop mode	- Contact angle (CA) analysis of UVO-treated smooth PVD-titanium confirmed the increased hydrophilicity, and the contact angle decreased to <3_ after 96 hours of UVO illumination, compared to control PVD-Ti  - The decrease of 1selectrons is a result of a cleaning-effect of the UVO-light  - UVO-treatment of titanium surfaces result in a changed hydroxylation and decreased complement deposition from blood plasma. This effect is correlated to improved titanium dioxide stoichiometry, increased crystallinity, and increased tight OH-binding to oxide.	compared to w70_ for control PVD-Ti.
<b>Xingling et al, 2016 – China / Japan / Malaysia (6)</b>	4 groups Control H-TiN 100 H-TiN 120 O-TiN (n=5) Total = 20	Disk-shaped specimens with diameter of 14.5mm and thickness of 1 mm were prepared with commercially pure titanium (grade 2), divided in four groups:  i. control group: no treatment  ii. Samples were heated in a dry-heat oven at 100 °C for 24h.  iii. Samples were heated in a dry-heat oven at 120 °C for 24h.  iv. Samples were exposed to ozone	TiN coated specimens were transferred into a tailor-made glass vessel filled with 300 ml of ultrapure water. O3 gas was generated from O2 gas using an O3 generator (ED-OG-R4, Eco Design Co., Saitama, Japan) and then introduced into distilled water with a pressure of 0.05 MPa and a flow rate of 2.0 L/min. A tip with porous Teflon® filter was installed at the opening of glass tube below water level to	Samples with no treatment	SEM – for morphology surface  CA (contact angle) – for wettability  XPS – for surface chemical composition  Micro-Vickers hardness – for hardness  Ar+ ions etching at 1000 ev with chamber pressure of less than $7.0 \times 10^{-5}$ Pa – for depth profiles	Surface morphology: SEM images of TiN coated titanium specimen after HT and O3 treatment. Micro-scaled morphological change was not observed on O–TiN and H–TiN treated at 100 °C. By contrast, nano-scaled precipitations were observed all over surface of specimens treated at 120 °C.  Hardness: No difference was found between TiN, H– TiN (100 °C) and O–TiN groups. However, the H–TiN (120 °C) showed hardness significantly lower than untreated TiN  Wettability: Contact angle on	The ozone treatment improved the osteoconductivity, wettability, decreased the surface free energy and the surface contact angle and Increased roughness

		generated from O <sub>2</sub> gas using an O <sub>3</sub> generator and distilled water with a pressure of 0.05 MPa and a flow rate of 2.0 L/min. A tip with porous Teflon® filter was installed at the opening of glass tube below water level to generate O <sub>3</sub> bubbles continuously for 24h. During the treatment the water was kept setted at 40°C.	generate O <sub>3</sub> bubbles continuously during the treatment. The glass vessel was kept in a water bath set at 40 °C and the treatment lasted for 24 h.			<p>TiN coated titanium surface decreased and wettability of specimen was improved after HT treatment or O<sub>3</sub> treatment. Moreover, O<sub>3</sub> treatment seemed to be more efficient regarding improving the surface wettability.</p> <p>Chemical composition analysis: decrease of N1s intensity and increase of O1s intensity indicated that surface of TiN coated titanium after O<sub>3</sub> treatment was more oxidized compared to HT treatment at 100 °C. Titanium nitride-oxide (TiN<sub>x</sub>O<sub>y</sub>) was formed during both treatments</p> <p>Enhanced osteoblast attachment, spreading and proliferation: the ozone treatment increased these characteristics</p> <p>Promoted osteoblastic differentiation: surface oxidation by O<sub>3</sub> treatment enabled the increase of osteoblast proliferation without sacrificing differentiation</p> <p>Enhanced mineralizing capability of osteoblast: Increased</p>	
<b>Toita et al., 2020 – Japan / Indonesia (7)</b>	02 groups  1.UnTi – Acid etched Ti discs	Commercial pure Ti discs with a diameter of 10 mm and a thickness of 1 mm (Grade 2, The Niraco)	The samples were placed in a glass chamber connected to an ozone	Acid – etched Ti discs without Ozone exposure	1.The contact angles of water droplets (1.5 µL) on the samples were measured with a contact angle meter	1. UnTi showed a C1s peak mainly derived from the hydrocarbon contaminants accumulated on the surface	1.The O <sub>3</sub> -Ti surface was superhydrophilic. 2.Both samples had

	<p>2. O3 – Ti – Acid etched Ti discs, ozone gas - treatd</p>	<p>Co., Tokyo, Japan) were etched in a concentrated acid mixture containing 30% H<sub>2</sub>O, 20% HCl, and 50% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (all from Wako, Osaka, Japan) at 70°C for 30 min.</p>	<p>generator and then ozone gas was flowed into the glass chamber at room temperature for 24 h at a flow rate of 2 nL/min with current of 3.4 A (EcoDesign Inc., Saitama, Japan).</p>	<p>(DM500, Kyowa Interface Science, Saitama, Japan).</p> <p>2.Laser scanning microscopy (Violet Laser VK-9700, Keyence, Osaka, Japan) was performed to measure the mean surface roughness.</p> <p>3. The surface topography was observed by scanning electron microscopy (SEM; S-3100, Hitachi Co., Tokyo, Japan).</p> <p>4.The chemical composition was analyzed by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS; K-alpha, ThermoFisher Scientific, East Grinstead, UK).</p> <p>5. Fluorescence microscope (BZ-X710, Keyence) was then used to observe the cell morphologies.</p> <p>6. The number of viable cells was calculated after 4 and 8 days of culturing using Cell Counting Kit-8 (Dojindo) by measuring the absorbance at 450 nm with a microplate reader.</p> <p>7. The ALP activity was quantified using a Lab Assay ALP Kit (Wako).</p> <p>8.The bone-like nodule was stained using a bone nodule staining kit (Cosmo Bio Co., Ltd., Tokyo, Japan).</p>	<p>2. Ozone gas treatment significantly decreased the level of C1s</p> <p>3. increase in the O1s peak at 532 eV ascribed to hydrophilic –OH groups (TiOH) [17] was observed for O3-Ti compared with UnTi</p> <p>4. Removal of the hydrocarbon contaminants and introduction of –OH groups on the surface significantly decreased the water contact angle from 72.6° to 0.0°.</p> <p>5. O3-Ti exhibited significantly greater cell proliferation than UnTi.</p> <p>6. MSCs showed twice the ALP activity and a significantly larger amount of bone-like nodule formation on O3-Ti compared with UnTi.</p>	<p>similar mean surface roughness values and microstructures after ozone treatment.</p> <p>3. Superhydrophilic Ti facilitated MSC responses, such as cell proliferation, ALP activity, and bone-like nodule formation.</p> <p>4. Ozone-gas treatment has the possibility of improving osseointegration of Ti implants.</p>
--	--	--	---	---	--	--

					9.The positive area was quantified by Image J software		
<b>Toita et al 2016 – Japan (8)</b>	05 groups:  -Control -Ozone exposure in a constant flow of 2 mL/min for 3, 6, 12 e 24 hours and subjected to surface chemical analysis, topography analysis and cellular response	Machined pure titanium discs (10 mm in diameter and 1 mm in thickness) Untreated and functionalized specimens are denoted as unTi and O3–Ti, respectively	Discs were washed by acetone and ultrapure water before surface functionalization. The specimens were placed in a glass chamber connected to an ozone generator (EcoDesign Inc., Saitama, Japan). Ozone gas was flowed into the glass chamber at a rate of 2 nL/min at room temperature for 3, 6, 12, and 24 h	Untreated specimens denoted as unTi were used as control group	1) Implant surface characterization.  2)Cell culture  3)Cell attachment and proliferation  4)Cell morphology  5)ALP activity and mineralization  6)Cytokine measurement	1a) the water contact angle for various ozone treatment time diminishes with prolonged ozone treatment time  1b) Both unTi and O3–Ti exhibited similar topography and roughness (ozone gas functionalization did not alter original surface topography)  1c) the chemical composition of the surface was altered by ozone treatment. The proportion of carbon decreased and oxygen increased  2) MSCs attached to the O3–Ti exhibited filopodia-like formation and stretched to a greater extent. Cells on O3–Ti were clearly larger after ozone gas functionalization.  3) cell proliferation was found to be increased at day 4 on O3–Ti specimens compared with the unTi specimens  4) Cytomorphometric parameters (aspect ratio, size, cell perimeter attached on O3–Ti) were significantly higher than those on unTi  5) ALP activity was significantly higher on O3–Ti	Titanium treated by ozone gas produced a greater amount of hydrophilic OH groups and a lower amount of hydrophobic carbon contaminants, resulting in superhydrophilic property. Rat MSCs on superhydrophilic O3–Ti exhibited favorable cellular characteristics, including cell size, cell perimeter and cell proliferation. As a result, the differentiation and subsequent bone-like nodule formation of MSCs were largely facilitated on the O3–Ti surface. Moreover, MSC on O3–Ti produced lower level of proinflammatory cytokines. A superhydrophilic titanium implant having both excellent osteoconductivity and anti-inflammatory property would be a promising endosseous implant.

						<p>compared with that on unTi. O3-Ti generated a significantly greater stained area on its surface compared with unTi at both 14 and 21 days. At day 21, the stained area on O3-Ti and unTi was comparable</p> <p>6) A two-fold lower level of TNFa was measured on O3-Ti compared with that on unTi. After 48 h of LPS stimulation, a two-fold lower amount of IL-6 was detected on O3-Ti than on unTi.</p>	
<p><b>Yoshida et al., 2015 – Japan (9)</b></p>	<p>5 male SD rats (Japan SLC, Hamamatsu, Japan), used for cells culture</p> <p>O2 groups  a. rinsed in distilled water  b. rinsed in Ozonated water</p>	<p>Machined pure titanium disks (diameter 20 mm, thickness 1 mm, Grade 2</p>	<p>Samples were pre-treated for 10 min in ozonated water (O3 group)</p>	<p>Distilled water (control group)</p>	<p>1) Cell proliferation test  2) Measurement of ALP activity  3) Evaluation of calcification  4) Calcium determination test</p>	<p>1) In the 24 h culture, the number of cells in the O3 group was significantly greater than in the control group (*P&lt;0.05). No significant difference in the 48 h culture.</p> <p>2) On culture days 5 and 7, ALP activity was significantly higher in the O3 group than in the Control group (*P&lt;0.05).</p> <p>3) On culture days 7, 14, and 21, the staining area ratio was significantly higher in the O3 group compared to the control group. (*P&lt;0.05)</p> <p>4) On culture days 14 and 21, calcium quantity was significantly higher in the O3 group than in the control group (*P&lt;0.05).</p>	<p>The results showed that ozonated water treatment of the titanium surface promoted osteoblast-like cell proliferation and differentiation</p>

Legend: TG: teste group; CG: Control Group



## ANEXO II – Tabela 2 Completa

Table 2 - Summary of descriptive characteristics of *in vivo* (animals) included articles (n=2).

Author, year Country	Animal model	Sample size (animals per group)	Ozone surface treatment (concentration, formulation, vehicle)	Control or comparison group treatment	Methods (describe adopted methodology)	Outcomes (groups performance)	Main Conclusions
Harmankaya et al., 2012 Sweden / Japan (2)	Male Sprague–Dawley rats. Each rat received implants in both tibias, in proximal and distal positions,	44 rats. Each rat received two implants in each tibia, in proximal and distal positions. Each implant represents one of the four types of surface. So, 44 rats, four groups and 44 samples per group.	Machined Ti coated with PVD Ti with UVO treatment: illumination for 96 h in a UVO preparation chamber. The wavelengths of the emitted light were 253.7 nm (81%) and 184.9 nm (19%), respectively. PVD-coated samples were then placed within 2 cm of the lamp, with the UVO-chamber temperature 95° C (368 K). Illumination was programmed such that it ended shortly before surgery.	Machined Ti implants cylindrical, threaded screws 3.2 mm long (Ø = 2.0 mm) and an external quadrant head for screwing with the following treatments: 1. Machined Ti with no additional treatment 2. Machined Ti coated with physical vapour deposited (PVD) Ti layer 3. Machined Ti coated with IgG	The rats received four implants, two per tibia. The rats were sacrificed at 1, 7 and 28 days post surgery. The following tests and analysis were applied:  1. Reverse transcription and the design of primers for TNF- $\alpha$ , BMP-2, osteocalcin (OC), IL-1b, cathepsin K (CATK), PDGF and 18S. Quantitative PCR was performed in duplicate.  2. Histomorphometric and histological analysis  3. Surface characteristics with SEM (scanning electron microscopy).  4. Chemical surface	1-Gene expression analysis by qPCR: - The expression of BMP2 declined from day 1 to day 7 to day 28, except for the UVO-treated surface, where the BMP2 level was relatively high and constant from day 1 to day 7; - The mRNA data from surface-located cells, a large portion of which was of inflammatory origin and harvested from explanted implants, showed a strong expression of inflammatory markers IL-1b and TNF- $\alpha$ after 1 day of implantation. The only exception was the UVO-treated Ti, with significantly lower expression of IL-1b and TNF- $\alpha$ . - the CATK expression by implant-located cells was significantly lower at UVO-treated Ti and PVD-coated Ti and may be related to their lower activation of inflammation and the direct coupling between inflammation and osteoclastic activity.  2- Histomorphometric and histological analysis showed the UVO-treated surfaces showed at both time points a non-significantly higher BA (Bone Area) and BIC Bone Implant Contact) compared with the other surfaces.	UVO-treated titanium with low complement activation gives rise to lower early inflammatory activation in terms of mRNA expressions of IL-1b and TNF- $\alpha$ compared with complement activating titanium implants. The difference in inflammatory response resulted in improved osseointegration at 7 and 28 days of implantation in rat tibia, although no significant differences were obtained at the final period evaluated.

					<p>characterization by XPS (X-ray photoelectron spectroscopy).</p> <p>5. Removal Torque - RTQ value at break point.</p>	<p>3- as judged by optical profilometry and SEM the treatments did not cause significant changes in surface topography.</p> <p>4. Chemical surface characterization by XPS showed that additional oxidation was obtained upon UVO-treatment and increased concentrations of carbon (C1s) and nitrogen (N1s) were found on the IgG-coated implant. Besides that, the UVO treatment decreased the surface carbon concentration from 47% to 12% and increased oxygen concentration from 38 at.% to 54%.</p> <p>5- RTQ value was 25% higher for UVO-treated surfaces compared with machined ones</p>	
<b>Yoshido et al., 2015 Japan (2)</b>	Twenty-two 8-week old male SD rats	Cylindrical titanium implants (diameter 1 mm, length 2 mm, Grade 2; Nishimura Metal, Fukui, Japan)	Samples were pre-treated for 10 min in ozonated water (O3 group)	Samples were pre-treated for 10 min in distilled water (control group)	Mechanical testing of osseointegration	On day 14 after implantation, the maximum compressive load value was significantly higher in the O3 group compared with the control group (*P<0.05). However, at 28 days after implantation this value was higher in the O3 group but not significantly.	The results showed that ozonated water improved the mechanical strength and suggested promotion of osteogenesis

Legend: TG: teste group; CG: Control Group