



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

CAROLINE DINI

**FOTOFUNCIONALIZAÇÃO MEDIADA POR LUZ UV DE REVESTIMENTO
BIOFUNCIONAL MELHORA AS CARACTERÍSTICAS DE SUPERFÍCIE E
PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DO TITÂNIO**

**UV-MEDIATED PHOTOFUNCTIONALIZATION OF BIOFUNCTIONAL COATING
ENHANCES THE SURFACE CHARACTERISTICS AND BIOLOGICAL
PROPERTIES OF TITANIUM**

Piracicaba
2019

CAROLINE DINI

**FOTOFUNCIONALIZAÇÃO MEDIADA POR LUZ UV DE REVESTIMENTO
BIOFUNCIONAL MELHORA AS CARACTERÍSTICAS DE SUPERFÍCIE E
PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DO TITÂNIO**

**UV-MEDIATED PHOTOFUNCTIONALIZATION OF BIOFUNCTIONAL COATING
ENHANCES THE SURFACE CHARACTERISTICS AND BIOLOGICAL
PROPERTIES OF TITANIUM**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Clínica Odontológica, na Área de Prótese Dental.

Dissertation presented to the Piracicaba Dental School of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Dental Clinic, in Prosthodontics area.

Orientador: Prof. Dr. Valentim Adelino Ricardo Barão

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA
CAROLINE DINI, E ORIENTADA PELO Prof. Dr.
VALENTIM ADELINO RICARDO BARÃO.

Piracicaba

2019

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

D615u Dini, Caroline, 1995-
UV-mediated photofunctionalization of biofunctional coating enhances the surface characteristics and biological properties of titanium / Caroline Dini. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Valentim Adelino Ricardo Barão.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Titânio. 2. Raios ultravioleta. 3. Implantes dentários. I. Barão, Valentim Adelino Ricardo, 1983-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Fotofuncionalização mediada por luz UV de revestimento biofuncional melhora as características de superfície e propriedades biológicas do titânio

Palavras-chave em inglês:

Titanium

Ultraviolet rays

Dental implants

Área de concentração: Prótese Dental

Titulação: Mestra em Clínica Odontológica

Banca examinadora:

Valentim Adelino Ricardo Barão [Orientador]

Érica Dorigatti de Avila

Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

Data de defesa: 21-02-2019

Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-2587-3137>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/0726251804453658>



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 21 de Fevereiro de 2019, considerou a candidata CAROLINE DINI aprovada.

PROF. DR. VALENTIM ADELINO RICARDO BARÃO

PROF^a. DR^a. ÉRICA DORIGATTI DE AVILA

PROF^a. DR^a. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES

A Ata da defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

DEDICATÓRIA

A **Deus**, por Sua presença em todos momentos da minha vida, por ser meu apoio nos momentos difíceis e por proporcionar a realização dos meus sonhos. Obrigada, Senhor, pela vida, saúde, família, amigos e por todas as pessoas especiais que colocou em meu caminho.

Aos meus pais, **Carlos Alberto Dini e Lucimara Frasnelli Dini**, por todo amor, cuidado e apoio que sempre dedicaram a mim. Obrigada por nossa família, união, companheirismo e por tudo o que me ensinaram e me ensinam a cada dia. Agradeço ainda pela força e incentivo nos momentos difíceis e por estarem sempre ao meu lado na concretização deste sonho. Vocês são as pessoas mais importantes que tenho na vida e os grandes responsáveis por cada conquista durante minha trajetória.

Ao meu irmão, **Mateus Henrique Dini**, pelo amor, motivação, carinho e por nossa grande amizade.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP**, na pessoa do Magnífico Reitor, **Prof. Dr. Marcelo Knobel**, pelo meu mestrado nesta instituição.

À **Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP**, na pessoa do seu Diretor, **Prof. Dr. Francisco Haiter Neto**, pela oportunidade da realização do Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica.

À Coordenadora Geral da Pós-Graduação **Profa. Dra. Karina Gonzales Silvério Ruiz** e ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica **Prof. Dr. Valentim Adelino Ricardo Barão**.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Valentim Adelino Ricardo Barão**, pela oportunidade de ser sua orientada e por todo apoio e compreensão com que me recebeu. Muito obrigada por ser grande exemplo de competência e dedicação como professor, pesquisador e pessoa. Agradeço também pela atenção, suporte, disponibilidade, qualidade de orientação e por contribuir significativamente para o meu crescimento e amadurecimento.

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001**.

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, processo n° 2016/11470-6 e 2017/01320-0.

Ao **Laboratório de Plasmas Tecnológicos da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP (Campus de Sorocaba)**, representado pelo **Prof. Dr. Nilson Cristino da Cruz** e pela **Profa. Dra. Elidiane Cipriano Rangel** pela parceria no desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Laboratório de Bioquímica Oral da FOP – UNICAMP**, representado pela **Profa. Dra. Cinthia Pereira Machado Tabchoury** pela disponibilização da área de microbiologia.

Ao **Brazilian Nanotechnology National Laboratory – LNNano do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais - CNPEM**, pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores **Drs. Marcelo Ferraz Mesquita, Carolina Steiner Oliveira Alarcon e Ricardo Armini Caldas** pelas contribuições realizadas no Exame de Qualificação da dissertação de mestrado.

Às professoras **Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes e Dra. Érica Dorigatti de Avila** pela disponibilidade em participar e contribuir com o trabalho na Defesa da dissertação de mestrado.

Aos docentes **Prof. Dr. Marcelo Ferraz Mesquita, Prof. Dr. Antonio Pedro Ricomini Filho, Profa. Dra. Altair Del Bel Cury, Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia, Profa. Dra. Célia Rizzati Barbosa, Prof. Dr. Wander José da Silva, Prof. Dr. Mauro Antônio de Arruda Nóbilo, Prof. Dr. Frederico Andrade e Silva, Prof. Dr. Wilkens Aurélio Buarque e Silva e Prof. Dr. Rafael Leonardo Xediek Consani** por todo o conhecimento compartilhado.

Aos professores **Drs. Nilson Cristino da Cruz e Elidiane Cipriano Rangel** pela parceria no desenvolvimento deste trabalho, disponibilidade e ensinamentos compartilhados.

Aos técnicos do **Laboratório de Plasmas Tecnológicos da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP (Campus de Sorocaba), Jamille Altheman, Larissa Solano e Luan Augusto** por todo apoio e prestatividade na realização das análises necessárias para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos técnicos **Eduardo Pinez - Laboratório de Prótese Total da FOP-UNICAMP, José Alfredo da Silva – Laboratório de Bioquímica Oral da FOP-UNICAMP e Gislaine Regina Alves Piton – Laboratório de Prótese Parcial Removível da FOP-UNICAMP** pela solicitude e prontidão em ajudar sempre que necessário.

À secretária do **Departamento de Prótese e Periodontia da FOP - UNICAMP, Sra. Eliete Aparecida Ferreira Marin**, pela atenção, solicitude e gentileza.

A todos os meus amigos do **Laboratório de Prótese Parcial Removível, Ingrid Andrade Meira, Raíra de Brito Silva, Mayara Abreu Pinheiro, Rafael Soares Gomes,**

Victor Ricardo Manuel Muñoz Lora, Giancarlo de la Torre Canales, Louise Moraes Dornelas Bezerra, Raissa Micaella Marcello Machado, Bruna Ximenes, Olívia Maria Figueiredo e Mariana Barbosa Câmara de Souza por toda amizade, apoio e convívio durante o curso.

A todos os meus amigos do **Laboratório de Prótese Total, Bruna Egumi Nagay, Thaís Barbin, Heloísa Navarro Pantaroto, Jairo Matozinho Cordeiro, Letícia Del Rio, Raphael Cavalcante Costa, Guilherme Almeida Borges, Daniele Valente Veloso, Ricardo Armini Caldas, Anna Gabriella Camacho Presotto, João Gabriel Silva Souza, Thamara Beline e Adaías Oliveira Matos**, pela convivência, amizade e conhecimentos compartilhados.

Ao meu amigo **Jairo Matozinho Cordeiro**, aluno do Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da FOP-UNICAMP, por toda ajuda e disponibilidade em cada etapa do desenvolvimento deste trabalho.

À minha amiga **Bruna Egumi Nagay**, aluna do Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da FOP-UNICAMP, pela sincera amizade e ajuda nos momentos difíceis. Obrigada pela convivência diária, pela generosidade em ensinar e por ser exemplo de esforço, dedicação e perseverança. Sou eternamente grata por toda ajuda, disponibilidade, paciência e amizade.

À minha família, amigos e a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

Infecções nos tecidos circunjacentes aos implantes dentários são consideradas fatores de risco para a osseointegração na fase inicial de cicatrização, contribuindo para a maior ocorrência de falhas iniciais. Modificações topográficas e químicas da superfície do titânio (Ti) vem sendo estudadas com o objetivo de melhorar as propriedades biológicas e atividade antimicrobiana de implantes dentários. A fotofuncionalização mediada por raios ultravioleta (UV) modifica as características físico-químicas da superfície de Ti e melhora as propriedades biológicas dos implantes dentários. Entretanto, o papel da fotofuncionalização UV em superfícies biofuncionais de Ti na atividade antimicrobiana e fotocatalítica são desconhecidas e foram investigadas neste estudo. Discos de titânio comercialmente puro (Ticp) foram divididos em quatro grupos: (1) maquinado sem a aplicação de luz UV [Ticp UV-]; (2) tratado por plasma eletrolítico de oxidação (PEO) sem a aplicação de luz UV [PEO UV-]; (3) maquinado com a aplicação de luz UV [Ticp UV+]; (4) tratado por PEO com a aplicação de luz UV [PEO UV+]. As superfícies foram caracterizadas por meio de microscopia confocal a laser, microscopia eletrônica de varredura (MEV), perfilometria, difratometria de raios-X (DRX), espectroscopia de energia dispersiva (EDS), espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS) e molhabilidade. O teste de degradação do azul de metileno foi utilizado para a avaliação da atividade fotocatalítica. A adsorção da proteína albumina foi avaliada por meio do método do ácido bicinconínico. Para o ensaio microbiológico, a adesão de *Streptococcus sanguinis* desenvolvido na superfície dos discos por 1 h e 6 h foi avaliada por meio da contagem das unidades formadoras de colônia e a organização e estrutura dos microrganismos foi avaliada por meio da microscopia eletrônica de varredura. O tratamento com PEO aumentou a rugosidade e molhabilidade da superfície de Ti ($p < 0.05$). A fotofuncionalização reduziu a concentração de hidrocarbonetos e aumentou a adsorção de albumina, principalmente para a superfície tratada com PEO ($p < 0.05$). PEO UV+ também manteve os maiores valores de molhabilidade por um período de tempo maior e promoveu redução da colonização microbiana em 1 h de adesão bacteriana ($p = 0.012$ vs. PEO UV-). A fotofuncionalização de revestimentos biofuncionais parece ser uma alternativa promissora para implantes dentários, uma vez que aumenta a adsorção de proteína do soro sanguíneo e promove redução da colonização bacteriana inicial.

Palavras-chave: Titânio. Raios ultravioleta. Implantes dentários.

ABSTRACT

Infections of peri-implant surrounding tissues are considered risk factors for osseointegration in the early healing stage, as initial failures are more likely to occur. Topographical and chemical surface modifications of titanium (Ti) material have been studied to enhance the biological properties and antimicrobial activity of dental implants. Photofunctionalization mediated by ultraviolet (UV) rays changes the physico-chemical characteristics of Ti and improves the biological properties of dental implants. However, the role of UV-mediated photofunctionalization of biofunctional Ti surfaces on the antimicrobial and photocatalytic activity remains unknown and was investigated in this study. Commercially pure titanium (cpTi) discs were divided into four groups: (1) machined samples without UV light application [cpTi UV-]; (2) plasma electrolytic oxidation (PEO) treated samples without UV light application [PEO UV-]; (3) machined samples with UV light application [cpTi UV+]; and (4) PEO treated samples with UV light application [PEO UV+]. The surfaces were characterized by laser scanning confocal microscopy (LSCM), scanning electron microscopy (SEM), profilometry, X-ray diffraction (XRD), energy dispersive spectroscopy (EDS), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and wettability. The methylene blue degradation test was used for the photocatalytic activity evaluation. The albumin adsorption was measured by the bicinchoninic acid method. For the microbiological assay, adhesion of *Streptococcus sanguinis* developed on the disc surfaces for 1 h and 6 h was evaluated by colony forming units count and the microorganisms structure was evaluated by SEM. PEO treatment increased Ti surface roughness and wettability ($p < 0.05$). The photofunctionalization reduced the hydrocarbon concentration and enhanced albumin adsorption mainly for PEO treated surface ($p < 0.05$). PEO UV+ also maintained the higher wettability values for a longer period and provided bacterial adhesion reduction at 1 h of bacterial adhesion ($p = 0.012$ vs. PEO UV-). The photofunctionalization did not increase the photocatalytic activity of Ti ($p > 0.05$). The photofunctionalization of a biofunctional coating seems to be a promising alternative for dental implants as it increases blood plasma protein adsorption and provides reduction of initial bacterial adhesion.

Keywords: Titanium. Ultraviolet Rays. Dental implants.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 ARTIGO: UV-mediated photofunctionalization of biofunctional coating enhances the surface characteristics and biological properties of titanium	16
3 CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS	49
APÊNDICE 1: Metodologia detalhada	55
ANEXOS	67
ANEXO 1: Verificação de originalidade e prevenção de plágio	67
ANEXO 2: Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa.....	68
ANEXO 3: Comprovante de submissão do artigo científico.....	69

1 INTRODUÇÃO

Os implantes dentários são importantes ferramentas terapêuticas com elevadas taxas de sucesso clínico acima de 98%, demonstradas em estudos prospectivos, e que têm levado a uma grande aceitação e utilização de implantes dentários na reabilitação protética de pacientes edêntulos totais e parciais, podendo devolver-lhes satisfatoriamente função e estética (Naert et al., 2002; Kalle et al., 2009; Zygogiannis et al., 2010; Beschnidt et al., 2018). No entanto, a versatilidade de materiais e técnicas empregadas na reabilitação oral de pacientes com necessidade de próteses dentárias resulta em diferentes substratos passíveis de colonização microbiana na cavidade oral (Hannig e Hannig 2009; O'Donnell et al., 2015).

O titânio comercialmente puro (Ticp), assim como ligas de titânio binárias (TiZr) e terciárias (TiAlV) são biomateriais empregados na confecção de implantes por apresentarem biocompatibilidade, resistência à corrosão, habilidade de osseointegração, baixo módulo de elasticidade e estabilidade química (Liu et al., 2017). Entretanto, apesar das altas taxas de sucesso relacionadas à reabilitação com implantes dentários (Blanes et al., 2007), há evidências de processos inflamatórios nos tecidos circunjacentes aos implantes, uma vez que a complexa geometria na interface entre o implante dentário, o pilar protético e o tecido gengival favorecem a colonização microbiana (Pjetursson et al., 2004; Klinge et al., 2005; Jung et al., 2008; Schmidlin et al., 2013). A mucosite, definida como uma reação inflamatória do tecido mole ao redor do implante, possui prevalência de 46,83% (Lee et al., 2017) e seu desenvolvimento durante a fase de cicatrização inicial do implante dentário pode influenciar negativamente no processo de osseointegração, além de representar um fator de risco após a osseointegração com sua potencial progressão para a peri-implantite e perda de tecido de suporte ósseo (Costa et al., 2012; Mohajerani et al., 2017).

Durante a instalação dos implantes dentários e a exposição ao ambiente oral, forma-se sobre o titânio (Ti) a película adquirida (Fürst et al., 2007). A composição química, energia livre de superfície e a rugosidade das diferentes superfícies abióticas, como o Ti, influenciam a constituição da película adquirida e, consequentemente, afetam o processo de colonização microbiana (Teughels et al., 2006; Cavalcanti et al., 2014; Hahnel et al., 2015; Han et al., 2016). A influência das propriedades de superfície dos biomateriais na composição da película adquirida está correlacionada com a adsorção de proteínas salivares, as quais atuam como receptores para a adesão microbiana (Teughels et al., 2006; Cavalcanti et al., 2014; de Avila et al., 2015).

Os colonizadores iniciais incluem *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus sanguinis* e *Actinomyces naeslundii* (Kolenbrander et al., 2002). A partir do início da colonização, os colonizadores iniciais apresentam novos sítios para a adesão de colonizadores tardios e, assim, há a progressão na formação do biofilme (Kolenbrander et al., 2002; Dorkhan et al., 2014). *S. sanguinis* é um dos colonizadores iniciais que possui forte adesão à película salivar através de adesinas que se ligam às proteínas salivares (Pereira da Silva et al., 2005). Além disso, esse microorganismo induz a ligação de colonizadores tardios como *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*, consequentemente acarretando o desenvolvimento e amadurecimento do biofilme (Mayanagi et al., 2005; Hori et al., 2010; Jeong et al., 2017). Desse modo, inibir a adesão do *S. sanguinis* é um desafio a ser considerado para a prevenção de falhas iniciais de implantes dentários, uma vez que este microorganismo pode interferir na coagregação de colonizadores tardios (Puckett et al., 2010; Jepsen et al., 2015). Afinal, infecções pós-operatórias são fatores de risco e representam um desafio para a osseointegração no estágio inicial de cicatrização (Figueiredo et al., 2015). Embora as taxas de falhas iniciais sejam baixas, com incidência de 1% a 2%, o tratamento de complicações relacionadas a infecções pós-operatórias é complexo e pode persistir até a remoção do implante dentário (Chrcanovic et al., 2014).

Outro fator importante para a superfície de implantes dentários é a adsorção da proteína albumina, uma vez que a adsorção da mesma representa a primeira etapa para o início da osseointegração (Hori et al., 2010). A albumina é a principal proteína plasmática que regula as concentrações de cálcio no citoplasma das células, bem como a proliferação celular de osteoblastos, acelerando o processo de osseointegração (Sousa et al., 2008). A sua adsorção é influenciada pelas características de superfície dos implantes dentários como a rugosidade, topografia, concentração de carbono e propriedade eletrostática da superfície (Iwasa et al., 2010; Cordeiro et al., 2018; Mao et al., 2018).

Assim, sendo a colonização microbiana e a adsorção da proteína albumina fatores a serem considerados para a prevenção de falhas iniciais de implantes dentários, estudos têm proposto tratamentos de superfície a fim de modificar a composição química da superfície de Ti para aumentar as taxas de sucesso das reabilitações com implantes dentários (Larsen et al., 2017; Matos et al., 2017). O plasma eletrolítico de oxidação (PEO), conhecido também como oxidação por micro-arcos, é uma técnica de tratamento de superfície efetiva e que tem sido amplamente utilizada, pois promove a formação de uma superfície com melhores respostas biológicas, maior contato implante/osso e osseointegração (Marques et al., 2015). Esse

tratamento é realizado através de processos eletroquímicos de oxidação na interface de um eletrodo, no qual as amostras são imersas em uma solução eletrolítica aquosa, acompanhado por micro descargas de plasma na superfície do material (Walsh et al., 2009; Marques et al., 2015). Esse processo promove a formação de microporos na superfície do material, a incorporação de diferentes elementos químicos como o cálcio e fósforo e a criação de dióxido de titânio (TiO_2) com diferentes estruturas cristalinas como rutilo e anatase (Sul et al., 2006; Krupa et al., 2012; Zareidoost et al., 2012; Beline et al., 2016).

Outro tratamento de superfície estudado é a fotofuncionalização mediada por luz ultravioleta (UV) que possui influência no potencial de osteocondução e na capacidade de osseointegração (Hori et al., 2010; Minamikawa et al., 2014). Embora a aplicação direta da luz UV em implantes dentários já instalados possua efeitos nocivos às células do organismo humano (Cortat et al., 2013), o pré-tratamento de Ti (fotofuncionalização) tem sido proposto por diversos autores (Aita et al., 2009; Choi et al., 2009; Choi et al., 2017). A fotofuncionalização UV é definida como um fenômeno geral de modificação da superfície de Ti após tratamento com luz UV, incluindo alterações físico-químicas e melhora das propriedades biológicas (Ogawa et al., 2014). A fotofuncionalização com luz UV promove um aumento na adsorção e ligação de proteínas, proliferação, diferenciação e mineralização de células osteogênicas *in vitro* e também converte a superfície de Ti de hidrofóbica para superhidrofílica (Takeuchi et al., 2005; Aita et al., 2009; Att et al., 2009; de Avila et al., 2015) por meio da remoção de hidrocarbonetos da superfície e pela criação de vácuos de oxigênio através da redução de Ti^{4+} para Ti^{3+} (Aita et al., 2009; Ogawa et al., 2014). Em acréscimo, estudos clínicos têm demonstrado que a fotofuncionalização prévia é capaz de reduzir o tempo de cicatrização de implantes dentários em 50%, sem reduzir as taxas de sucesso, e de reduzir de 3 a 20 vezes o tempo para a estabilização dos implantes (Funato e Ogawa 2013; Suzuki et al., 2013).

As superfícies de Ti quando expostas de forma natural ao ar atmosférico formam espontaneamente um composto denominado dióxido de titânio (TiO_2). Entretanto, esse TiO_2 não apresenta estrutura cristalina, sendo considerado amorfo, com pobre propriedade tribológica e sem potencial para a fotocatalise (Dorkhan et al., 2014). Por outro lado, o mecanismo fotocatalítico de oxidação do TiO_2 em superfícies contendo a fase cristalina anatase, produzida pelo tratamento de superfície PEO, apresenta atividade antimicrobiana e descontaminante, envolvendo a formação de espécies reativas de oxigênio (Liou et al., 2012; Joost et al., 2015). Com a produção de espécies reativas de oxigênio, há formação de radicais

•OH, $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 responsáveis pela decomposição da membrana externa de microrganismos de diferentes classes como bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos e vírus (Wu et al., 2016). No entanto, há poucos estudos relacionados a atividade fotocatalítica em superfícies fotofuncionalizadas, as quais podem representar um meio para a formação de espécies reativas de oxigênio, uma vez que a fotofuncionalização envolve a aplicação de luz UV na superfície do implante (Gallardo-Moreno et al., 2010).

Assim, sabendo que o tratamento de superfície PEO promove a formação de um revestimento biomimético, cujo uso e resultados é bem estabelecido na literatura e que a fotofuncionalização também tem demonstrado resultados relevantes para aplicações em implantes dentários, a associação dos dois tratamentos de superfície representa uma estratégia com grande potencial para melhorar a terapia com implantes dentários. A hipótese de pesquisa é que a superfície do revestimento biofuncional depositado por PEO quando fotofuncionalizada apresentará resultados favoráveis em relação às características de superfície com menor concentração de carbono e uma superfície mais hidrofílica, promovendo boas respostas biológicas por meio de uma maior adsorção de proteína e redução da colonização bacteriana inicial. Dessa forma, considerando a importância e influência das características de superfície dos biomateriais no comportamento biológico dos mesmos, este trabalho objetivou desenvolver um revestimento biofuncional por meio do tratamento de superfície com PEO e investigar a influência da fotofuncionalização UV nas características físico-químicas, atividade fotocatalítica, adsorção da proteína albumina e função antimicrobiana de Ti.

2 ARTIGO[#]

UV-mediated photofunctionalization of biofunctional coating enhances the surface characteristics and biological properties of titanium

Caroline Dini^a, Bruna E Nagay^a, Jairo M Cordeiro^a, Nilson C da Cruz^b, Elidiane C Rangel^b, Antonio P Ricomini-Filho^c, Valentim A R Barão^{a,*}

^a Department of Prosthodontics and Periodontology, Piracicaba Dental School, University of Campinas (UNICAMP), Av. Limeira, 901, Piracicaba, São Paulo 13414-903, Brazil

^b Institute of Science and Technology, São Paulo State University (UNESP), Av. Três de Março, 511, Sorocaba, São Paulo 18087-180, Brazil

^c Department of Physiological Science, Piracicaba Dental School, University of Campinas (UNICAMP), Av. Limeira, 901, Piracicaba, São Paulo 13414-903, Brazil

***Corresponding author:**

Av. Limeira, 901, Piracicaba, SP, Brazil 13414-903, Tel.: + 55-19-2106 5719

E-mail: vbarao@unicamp.br

[#] O artigo foi submetido para o periódico *Dental Materials* ISSN: 0109-5641 (IF = 4,039), conforme o Anexo 2.

Abstract

Objective: Photofunctionalization mediated by ultraviolet (UV) rays changes the physico-chemical characteristics of titanium (Ti) and improves the biological properties of dental implants. However, the role of UV-mediated photofunctionalization of biofunctional Ti surfaces on the antimicrobial and photocatalytic activity remains unknown and was investigated in this study.

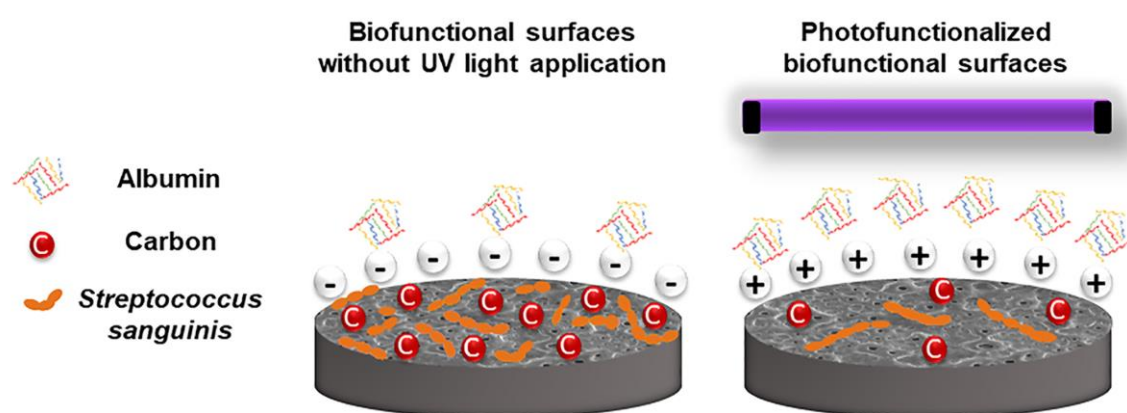
Methods: Commercially pure titanium (cpTi) discs were divided into four groups: (1) machined samples without UV light application [cpTi UV-]; (2) plasma electrolytic oxidation (PEO) treated samples without UV light application [PEO UV-]; (3) machined samples with UV light application [cpTi UV+]; and (4) PEO-treated samples with UV light application [PEO UV+]. The surfaces were characterized according to their morphology, roughness, crystalline phase, chemical composition and wettability. The photocatalytic activity and albumin adsorption were measured. For the microbiological assay, *Streptococcus sanguinis* adhesion was developed on the disc surfaces for 1 h and 6 h, and the colony forming units and bacterial organization were evaluated.

Results: PEO treatment increased the Ti surface roughness and wettability ($p < 0.05$). Photofunctionalization reduced the hydrocarbon concentration and enhanced albumin adsorption mainly for the PEO-treated surface ($p < 0.05$). PEO UV+ also maintained higher wettability values for a longer period and provided reduction of bacterial initial adhesion at 1 h ($p = 0.012$ vs. PEO UV-). Photofunctionalization did not increase the photocatalytic activity of Ti ($p > 0.05$).

Significance: The photofunctionalization of a biofunctional PEO coating seems to be a promising alternative for dental implants as it increases blood plasma protein adsorption and reduces initial bacterial adhesion.

Keywords: Titanium, Ultraviolet rays, Dental implants.

Graphical abstract



Highlights

- ✓ Photofunctionalization improved albumin adsorption for titanium-treated samples.
- ✓ Reduction of initial bacterial adhesion was provided by photofunctionalization.
- ✓ Photofunctionalization of the PEO coating is a promising alternative for implants.
- ✓ Early failures of dental implants can be reduced by PEO photofunctionalization.

Introduction

Dental implant rehabilitation has been widespread due to its high survival rate predictability of up to 98% [1]. These results are related to the use of titanium (Ti) and its alloys, which are the main biomaterials used for dental implant manufacturing considering their biocompatibility, corrosion resistance and osseointegration ability [2]. However, infections of peri-implant surrounding soft tissues, defined as mucositis, can occur and have become a challenge, mainly in the early healing stage of dental implants, with a prevalence of 46.83% [3-5]. The development of infections during the early healing stage is considered a risk factor for the osseointegration process, inducing higher rates of dental implant early failures [6,7].

The early failures due to bacterial infections are influenced by the surface properties of the biomaterials, such as the chemical composition, wettability and surface roughness, which are important determinants of biofilm formation on dental implants [8]. Moreover, the surface properties influence the acquired pellicle formation, which acts as a receptor for bacterial adhesion [9–11]. *Streptococcus* spp. are initial colonizers that are capable of providing additional sites for secondary colonizer adhesion, favoring biofilm development [12,13]. Approaches to prevent the initial attachment of early colonizers in the initial healing stage are important strategies to obtain a more reliable treatment with dental implants [11].

Another important factor for the dental implants surface is the ability to promote osseointegration. Albumin is a major blood plasma protein, and its adsorption is the first critical step for the establishment of osseointegration, since this protein provides the attachment of functional cells [13]. Albumin regulates cytoplasmatic calcium and cellular proliferation of osteoblasts, accelerating the osseointegration process [14]. The albumin adsorption is also influenced by dental implants surface characteristics such as roughness, topography, carbon amounts, covalent bonds and electrostatic status [8,15–17].

For this reason, topographical and chemical surface modifications of Ti material have been studied to enhance the biological properties and antimicrobial activity of dental implants. Plasma electrolytic oxidation (PEO) is a technique that is used to improve the bioactivity, osseointegration and corrosion resistance of dental implants [18]. PEO is an electrochemical process in which the samples are immersed in an electrolytic solution with

micro plasma discharges on the metal surface [18,19]. PEO coatings allow the formation of micropores, the incorporation of chemical elements such as calcium (Ca) and phosphorous (P) [20] and the creation of titanium dioxide (TiO_2) in different crystalline structures as anatase and rutile [21].

The photofunctionalization treatment of dental implants surfaces with ultraviolet (UV) light has also been successfully used because it induces physico-chemical modifications and improves the biological properties of Ti surfaces [22]. Although direct exposure to UV radiation on dental implants after placement has harmful effects [23], pretreatment before implant placement (i.e., photofunctionalization) is an alternative to UV light application that avoids damaging human cells [24,25]. The UV photofunctionalization increases protein adsorption and adhesion, as well as the proliferation, differentiation and mineralization of osteogenic cells *in vitro* [26,27]. In addition to being hydrophobic after aging, because of hydrocarbon accumulation, Ti becomes superhydrophilic after UV photofunctionalization by the removal of hydrocarbons from the surface, favoring water adsorption by the creation of oxygen vacancies as a result of the reduction of Ti^{4+} to Ti^{3+} [24].

When TiO_2 surfaces containing crystalline structures are exposed to UV light, a photocatalytic activity can be produced that promotes antimicrobial function [28,29]. The mechanism of the photocatalytic activity comprises the generation of reactive oxygen species $\bullet\text{OH}$, $\text{O}_2^{\bullet-}$ and H_2O_2 , which are responsible for the outer membrane decomposition of microorganisms [30, 31]. Nevertheless, there are few reports regarding the photocatalytic activity on photofunctionalized surfaces, which is a possible strategy to generate reactive oxygen species since the photofunctionalization includes UV light application on dental implant surfaces [28].

Therefore, surface modifications and improvements of biological properties are relevant approaches for the success of dental implant therapy. The bone biomimetic coating obtained by PEO is a well-established surface treatment. Likewise, photofunctionalization has demonstrated relevant results for dental implant applications. However, the photocatalytic and antimicrobial activities of photofunctionalized biofunctional surfaces have not been previously tested. Thus, in this study, a biofunctional PEO coating for dental implants was developed, and the influence of UV-mediated photofunctionalization on the physico-chemical characteristics, photocatalytic activity, albumin adsorption and antimicrobial function of coated Ti material was investigated. It was hypothesized that photofunctionalization of the

biofunctional PEO coating would improve the surface characteristics by reducing the hydrocarbon concentration and increasing the surface wettability, which would enhance albumin adsorption and the reduce initial bacterial adhesion.

Materials and methods

2.1. Experimental design

Commercially pure titanium (cpTi) discs were randomly divided into four different groups: (1) machined samples without UV light application [cpTi UV-]; (2) PEO-treated samples without UV light application [PEO UV-]; (3) machined samples with UV light application [cpTi UV+]; and (4) PEO-treated samples with UV light application [PEO UV+]. The surface roughness ($n = 5$), surface morphology ($n = 1$) and crystalline phase ($n = 1$) were assessed only for the control groups (cpTi UV- and PEO UV-), since these parameters are not influenced by photofunctionalization. The control (UV-) and experimental groups (UV+) were evaluated by means of wettability ($n = 5$), chemical composition ($n = 1$), albumin adsorption ($n = 5$), photocatalytic activity ($n = 3$) and microbiological assay ($n = 6$ in triplicate with two independent biological repetitions). For the microbiological assay, a one-species biofilm of *Streptococcus sanguinis* was developed onto the disc surfaces for 1 h and 6 h in brain heart infusion medium (BHI). The number of colony forming units (CFU) and the microorganisms organization were assessed.

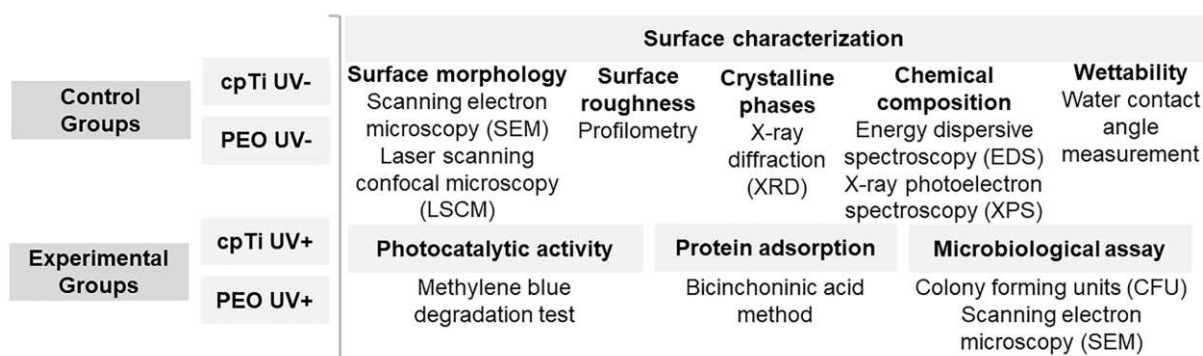


Figure 1. Schematic diagram of the experimental design. The surface morphology, surface roughness and crystalline phases were assessed only for the control groups cpTi UV- and PEO UV-.

2.2. Preparation of titanium discs and surface treatment

CpTi discs [American Society for Testing and Materials (ASTM)—Grade II]

(Realum Indústria de Metais Puros e Ligas Ltda, São Paulo, SP, Brazil), with a diameter of 10 mm and a thickness of 2 mm, were used. Discs were polished by means of an automatic polisher (EcoMet/AutoMet 250 Pro, Buehler, Lake Bluff, IL, USA) at 250 rpm for 1 min each with SiC abrasive papers (Nos. #320 and #400) (CarbiMet 2, Buehler, Lake Bluff, IL, USA). Then, the discs were cleaned and degreased with alternate ultrasonic baths in distilled water and 70% propanol for 10 min each and air-dried [18,21,32]. This procedure characterized the machined surface.

PEO surface treatment was carried out using a pulsed DC power supply (Plasma Technology, Ltd, Kowloon, Hong Kong, China). The treatment was performed in a steel tank with a cooling system consisting of the temperature of the electrolytic solution maintained at 20 °C. The electrolytic solution was prepared by the dissolution of calcium acetate [$\text{Ca}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$] (Dinâmica Ltda, Diadema, SP, Brazil) and glycerophosphate disodium ($\text{C}_3\text{H}_7\text{Na}_2\text{O}_6\text{P}$) (Dinâmica, Ltda, Diadema, SP, Brazil) in distilled water at a proportion of 0.3 M/0.02 M, respectively. A voltage of 290 V, frequency of 250 Hz and duty cycle of 60% were set, and the treatment was carried out for 10 min. Samples were completely submerged in the electrolytic solution. After being submitted to the PEO treatment, the discs were rinsed in distilled water [18,21].

The UV-mediated photofunctionalization was carried out under ambient conditions for 96 h in a customized apparatus immediately before each analysis [33]. The light source used was UV-C 2×15 W ($\lambda = 253.7$ nm) (Moran Light, São Paulo, SP, Brazil), which was fixed 7 cm perpendicularly to the discs with an intensity of 2.34 mW/cm² to achieve disc surface. The light intensity was measured using a photometer (Ophir Optronics Solution Ltd, Jerusalem, Israel) [34,35].

2.3. Surface analyses

Profilometry, scanning electron microscopy (SEM), laser scanning confocal microscopy (LSCM) and X-ray diffraction (XRD) were used to better understand the differences between the surfaces, but only for the UV- groups since the morphological, roughness and topographic features are not changed by UV light application [26]. Contact angle, energy dispersive spectroscopy (EDS) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) were also performed to characterize the surface in all groups. For these analyses, the UV+ experimental groups were used immediately after the UV light treatment.

2.3.1. Scanning electron microscopy (SEM)

To observe the topography and morphology of the discs, scanning electron micrographs were acquired in a JEOL JSM-6010LA system (Peabody, Massachusetts, USA) using the secondary electrons detector and 4 kV of beam energy (2,000× of magnification) [15].

2.3.2. Laser scanning confocal microscopy (LSCM)

A noncontact 3D Laser Scanning Microscope (LSCM, Keyence model VK-X200 series, Osaka, Osaka, Japan) was used to characterize the 2D and 3D surface topography of samples (150× of magnification). The image processing and average surface area measurements were assessed using VK-Analyzer software (Keyence v 3.3.0.0, Osaka, Osaka, Japan) [15].

2.3.3. Profilometry

The surface roughness was analyzed by means of a profilometer (Dektak 150-d; Veeco, Plainview, NY, USA). The arithmetic (R_a), maximum height (R_t), average peak-to-valley height (R_z), and root mean square average (R_q) were measured at a cut-off of 0.25 mm and speed of 0.05 mm/s for 12 s. Three measurements were performed at different areas of each sample and then averaged [36].

2.3.4. X-ray diffraction (XRD)

The oxide crystalline phases were analyzed with an X-ray diffractometer (XRD; X'Pert PRO MRD, PANalytical, Almelo, Overijssel, The Netherlands) using $\text{CuK}\alpha$ radiation ($\lambda=1,540598 \text{ \AA}$) at 45 kV and 40 mA, a speed of $0.02^\circ/\text{s}$, a fixed angle of 2.5° and variation of 20° to 90° [37].

2.3.5. Energy dispersive spectroscopy (EDS)

The chemical composition of the surface was evaluated by energy dispersive spectroscopy (EDS) (JEOL JSM-6010LA, Peabody, Massachusetts, USA) operating at 5 kV and 2,000× of magnification. Three randomly regions were selected to perform the EDS in small volumes, in the order of $1 \mu\text{m}^3$ [37].

2.3.6. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS)

The chemical composition of the outmost oxide layer was evaluated by X-ray

photoelectron spectroscopy (XPS) (K-alpha X-ray XPS, Thermo Scientific™, Vantaa, Helsinki, Finland) with a spot size of 400 µm and 1,000 eV of energy step size [15,26].

2.3.7. Wettability

The wettability properties of the Ti discs were measured by the contact angle approach using 2-µL drops of distilled water and a goniometer (Rame-Hart 100-00; Rame-Hart Instrument Co., Succasunna, NJ, USA) associated with software (DROPImage Standard, Ramé-Hart Instrument Co., Succasunna, NJ, USA). The sessile drop method was used, and 10 measurements were performed for each sample. The image obtained was immediately captured by the device, and the contact angle formed by the liquid on the sample surface was automatically measured [18]. The contact angle was evaluated for the UV- and UV+ groups immediately after termination of the 96 h UV light application. For analysis of the hydrophilic status degradation, the cpTi and PEO-treated surfaces were maintained in dark and dry conditions after the 96 h photofunctionalization, and the contact angle was measured for 6 h at 1-h intervals.

2.4. Photocatalytic activity assay

The photocatalytic potential was measured by the methylene blue (MB) ISO technique [38,39] to understand the photocatalytic activity on photofunctionalized surfaces. The samples in the experimental groups were previously photofunctionalized. The control groups were not exposed to UV light. The specimens were soaked in 2 mL of standard MB solution (P.A.C.I. 52.015, Synth, Diadema, SP, Brazil) and maintained in dark conditions (foil wrapped) for 30 min prior to the test for the pre-adsorption measurement [40]. Afterwards, the discs were transferred to 24-well plates with 2 mL of fresh MB solution (10 µmol/L) in each well. The MB degradation was analyzed in different periods (15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h and 6 h) to observe the survival of the photocatalytic potential. MB degradation was measured spectrophotometrically (DU 800 – Beckman Coulter, Brea, CA, USA) by sampling the solution and returning the sample after measurement of the solution's absorbance at 664 nm [38]. The photocatalytic activity was calculated using the following equation: Photocatalytic activity (%) = $[(c_0 - c)/c_0] \times [c_1/c_0] \times 100$. The concentration of the test solution of MB is represented by c_0 , where c is the concentration of MB in the control and test samples previously photofunctionalized and c_1 is the concentration of MB after the pre-adsorption test [29,39].

2.5. Protein adsorption assay

Bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used as the protein model, and the adsorption was measured by the bicinchoninic acid method (BCA Kit, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) [21,41]. Photofunctionalized and nonphotofunctionalized discs were incubated in 24-well culture plates containing 100 µg/mL of albumin in phosphate-buffered saline (PBS) (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) with horizontal stirring (75 rpm) at 37 °C. After 2 h of incubation, the protein solution was aspirated, and the discs were washed three times in PBS to remove nonadherent proteins [21]. The discs were transferred to cryogenic tubes containing 1 mL of PBS and sonicated in a Cup Horn (5.5 in. cup, Q500, Qsonica, Newtown, Connecticut, USA) at an amplitude of 80% for 60 s. The discs were then vortexed for 60 s to remove the absorbed protein from the disc surface. In a 96-well microtiter plate, 150 µL of the sonicated suspension was added to 150 µL of a mixture of reagents A and B. The microplate was incubated at 60 °C for 1 h, after which the absorbance of the solution was measured in a microplate spectrophotometer reader (Multiskan, Thermo Scientific, Vantaa, Helsinki, Finland) at a wavelength of 562 nm, according to the manufacturer's recommendations. The protein concentration was calculated based on a standard curve prepared with bovine serum albumin (0.5–30 µg/mL of protein) [21].

2.6. Microbiological assay

2.6.1. Colony forming units (CFU)

Streptococcus sanguinis strains (IAL 1832) were grown in brain heart infusion (BHI) agar plates (Difco Laboratories, Becton, Dickinson and Company, Le Pont-de-Claix, Auvérnia-Rhône-Alpes, France) under 10% CO₂ at 37 °C. Afterwards, the bacterial suspensions were cultured in sterile tubes containing 9 mL of fresh BHI broth overnight under 10% CO₂ at 37 °C for the exponential growth phase. Prior to the optical density measurements, the tubes were centrifuged (6000 g for 5 min at 4° C), and the precipitate was resuspended in 0.9% NaCl. The optical density was adjusted to OD = 1.00 ± 0.02 at 600 nm using a spectrophotometer (DU800 Beckman Coulter, Brea, CA, USA), and a final suspension of 10⁷ cells/mL was obtained [15].

This study was approved by the Local Research and Ethics Committee (80684517.1.0000.5418/2017). For the acquired pellicle formation, whole human saliva stimulated by chewing a flexible film (Parafilm M, American Can Co., Neenah, WI, USA)

was collected from two volunteers, at least 1.5 h after eating or drinking, after providing their informed consent [42]. The collected saliva was centrifuged (10000 g for 10 min at 4 °C), and the supernatant was filtered through a 0.22- μ m membrane filter (K15-1500, Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brazil) and used immediately [15]. Before the acquired pellicle formation, discs were sterilized by gamma irradiation (14.5 ± 0.05 kGy; Cobalt-60, Gammacell 220, Atomic Energy of Canada Ltd., Ottawa, ON, Canada) [43]. For the UV+ experimental groups, after gamma irradiation, the discs were photofunctionalized for 96 h prior to the beginning of the microbiological assay. Immediately after photofunctionalization, the discs were transferred individually to a well of a sterile 24-well polystyrene cell culture plate, covered with 1 mL of saliva and incubated under agitation for 30 min at 37 °C [44].

After pellicle formation, the discs were transferred to new wells and covered with 200 μ L of *S. sanguinis* cell suspension and 1800 μ L of BHI broth. Then, the discs were incubated under 10% CO₂ at 37 °C for 1 h and 6 h. For removal of non-adherent cells, discs were washed twice in 0.9% NaCl and then transferred to cryogenic tubes containing 3 mL of 0.9% NaCl. The tube was then sonicated (7 W for 30 s) to disaggregate the bacterial cells, and an aliquot of 0.1 mL was 5-fold serially diluted in 0.9% NaCl and plated in BHI agar. Then, the plates were incubated (10% CO₂, at 37 °C for 48 h). After obtaining the counts of colony forming units (CFU), data were expressed as the log of the colony forming units per mL (log CFU/mL) [15].

2.6.2. Scanning electron microscopy (SEM)

The microorganisms structure and organization for each time of incubation (1 h and 6 h) was evaluated by SEM (JEOL-JSM-5600LV, Peabody, Massachusetts, USA) operating at 15 kV with 5000 \times magnification. Prior to the SEM analysis, the adhered bacterial on the surface was fixed in Karnovsky solution (PBS, pH 7.2) for 2 h and serially dehydrated with ethanol washes (50%, 60%, 70%, 90% and three washes in 100% solution for 5 min each). Then, the discs were dried aseptically and gold-sputtered before SEM imaging [44].

2.7. Statistical analyses

Statistical analyses were performed with statistical software (IBM SPSS Statistics for Windows, v. 21.0, IBM Corp., Armonk, NY, USA). The Shapiro-Wilk method was applied to test the normality of all response variables. An independent T test was used to verify the influence of the surface treatment on the surface roughness. Two-way ANOVA was

used to test the influence of the surface treatment and photofunctionalization on the wettability, albumin adsorption, photocatalytic activity and colony forming unit counts. To verify the influence of time on the wettability of samples, one-way repeated measures ANOVA was performed. The Tukey HSD test was used as a post hoc technique for multiple comparisons when necessary. A mean difference significant at the 0.05 level was used for all tests.

Results

3.1. Surface characteristics

Fig. 2 shows the SEM micrographs of the cpTi and PEO-treated surfaces. The machined surfaces presented longitudinal grooves and a more homogeneous surface due to the polishing process. In contrast, the surfaces treated with PEO were patently modified and exhibited a volcanic appearance and pores. These characteristics can also be observed in the 2D and 3D images obtained by LSCM (Fig. 2). Additionally, the average area (Fig. 2) and surface roughness (Fig. 3) of the PEO-treated surfaces were higher than those observed for the machined surface ($p < 0.001$) as a result of the microdischarges that occurred in the PEO treatment and the modification of the Ti surface.

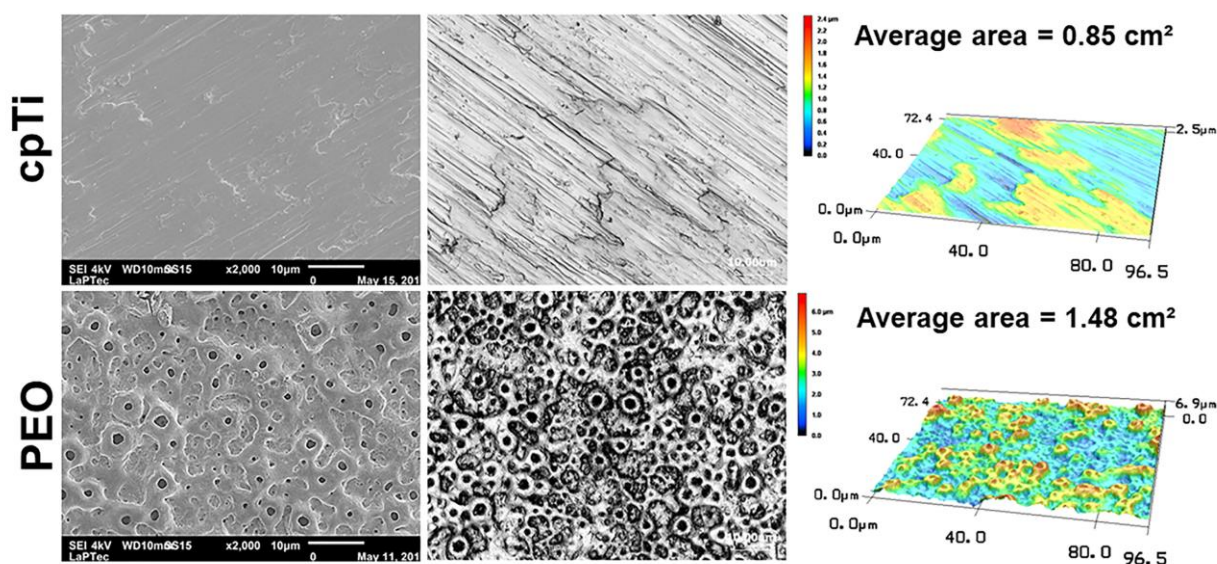


Figure 2. SEM micrographs (2,000× magnification, 4 kV, WD = 10 mm, scale bar = 10 μm) and two- and three-dimensional laser scanning confocal microscopy images (150× magnification, scale bar = 10 μm) of the cpTi and PEO-treated surfaces.

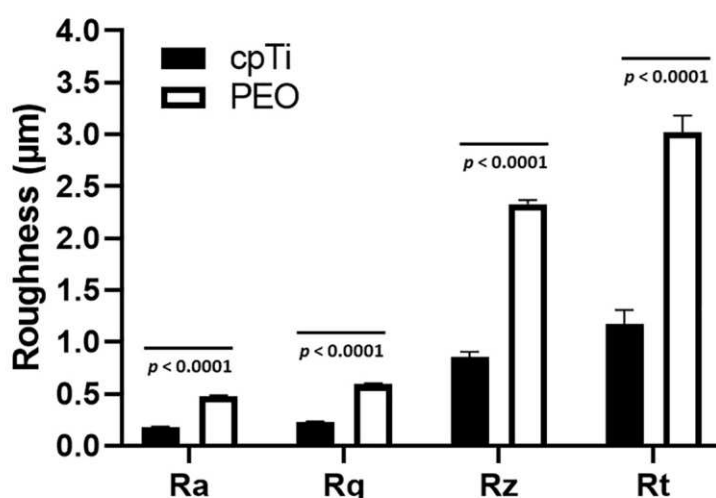


Figure 3. Roughness data ($n = 5$) for the cpTi and PEO-treated surfaces. Ra (arithmetic roughness), Rq (root mean square average), Rz (average peak-to-valley height), Rt (maximum height). Bars indicate significant differences between the cpTi and PEO groups for each roughness parameter ($p < 0.05$; Tukey HSD test).

The X-ray diffraction patterns showed peaks of amorphous Ti for the cpTi group. In contrast, crystalline phases of the anatase (101) peak at 25° and rutile (110) peak at 27° were observed for the PEO-treated group (Fig. 4). The machined and PEO surfaces presented a chemical composition consisting of Ti, O and C. Additionally, the PEO surfaces presented Ca and P incorporation by the surface treatment (Fig. 5). Notably, the UV-mediated photofunctionalized groups (cpTi UV+ and PEO UV+) showed a reduction of the C atomic concentration (Table 1). These results observed in the EDS were confirmed by XPS analysis (Fig. 6). The XPS spectrum showed the expected compounds, including the presence of Ti2p, O1s, C1s bands for all groups and Ca2p and P2p for the PEO-treated groups. A decrease in the metallic peaks of Ti2p was observed for the PEO-treated groups due to the deposition of the coating layer and incorporation of Ca and P. The presence of Ti suboxides was identified in the cpTi groups, but it was not observed in PEO-treated surfaces, indicating complete element oxidation by the surface treatment. Despite the reduction of the C concentration, an increase in the peak of the covalent bond between C and O (O-C=O) was observed for the photofunctionalized groups. The detailed relative atomic concentration of each element obtained by XPS analysis is shown in Table 1.

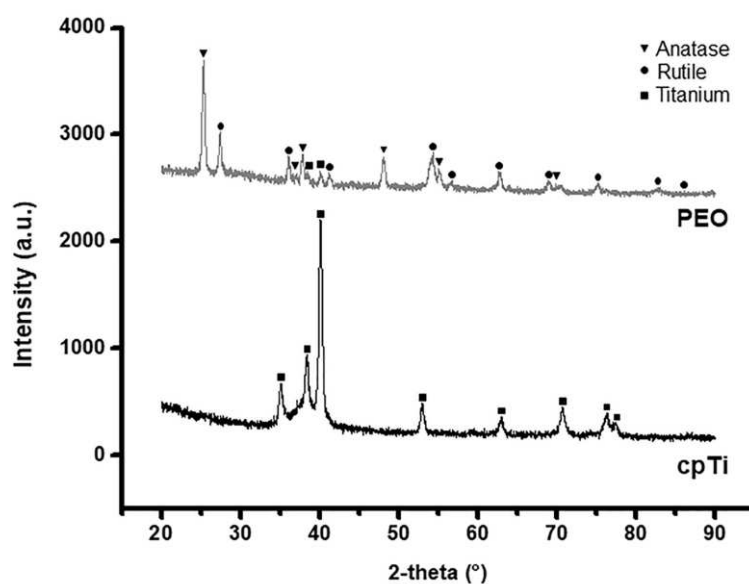


Figure 4. X-ray diffraction patterns of the cpTi and PEO-treated surfaces.

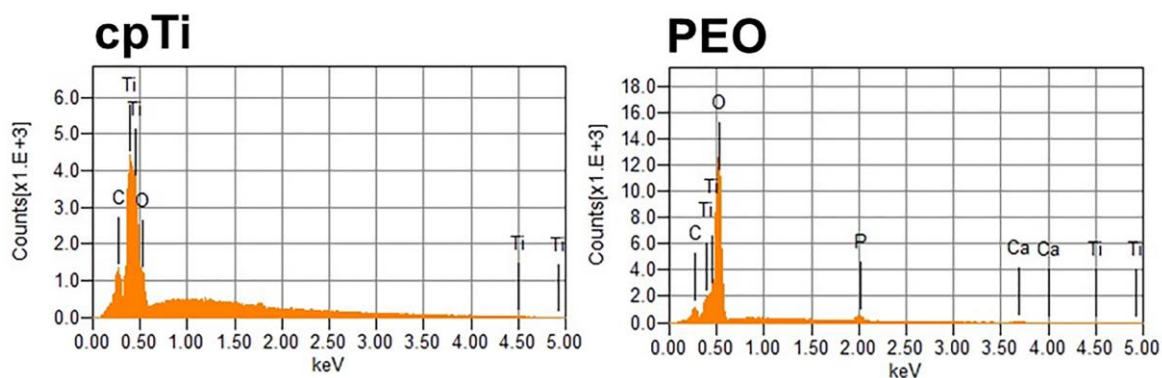


Figure 5. Element peaks obtained by energy dispersive spectroscopy analysis for the cpTi and PEO-treated surfaces.

Table 1. Results of the atomic concentration (%) obtained by energy dispersive spectroscopy (EDS) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS).

EDS atomic concentration (%)					XPS atomic concentration (%)				
Element	cpTi UV-	cpTi UV+	PEO UV-	PEO UV+	Peak	cpTi UV-	cpTi UV+	PEO UV-	PEO UV+
Ti	90.57	92.66	4.75	8.64	Ti2p	19.25	23.54	7.66	7.47
O	4.41	4.03	68.94	70.91	O1s	48.03	60.20	51.33	53.93
C	5.02	3.31	8.62	4.91	C1s	30.63	15.71	20.02	14.67
Ca	-	-	10.45	9.00	Ca2p	-	-	13.40	12.95
P	-	-	12.00	6.55	P2p	-	-	9.46	10.15

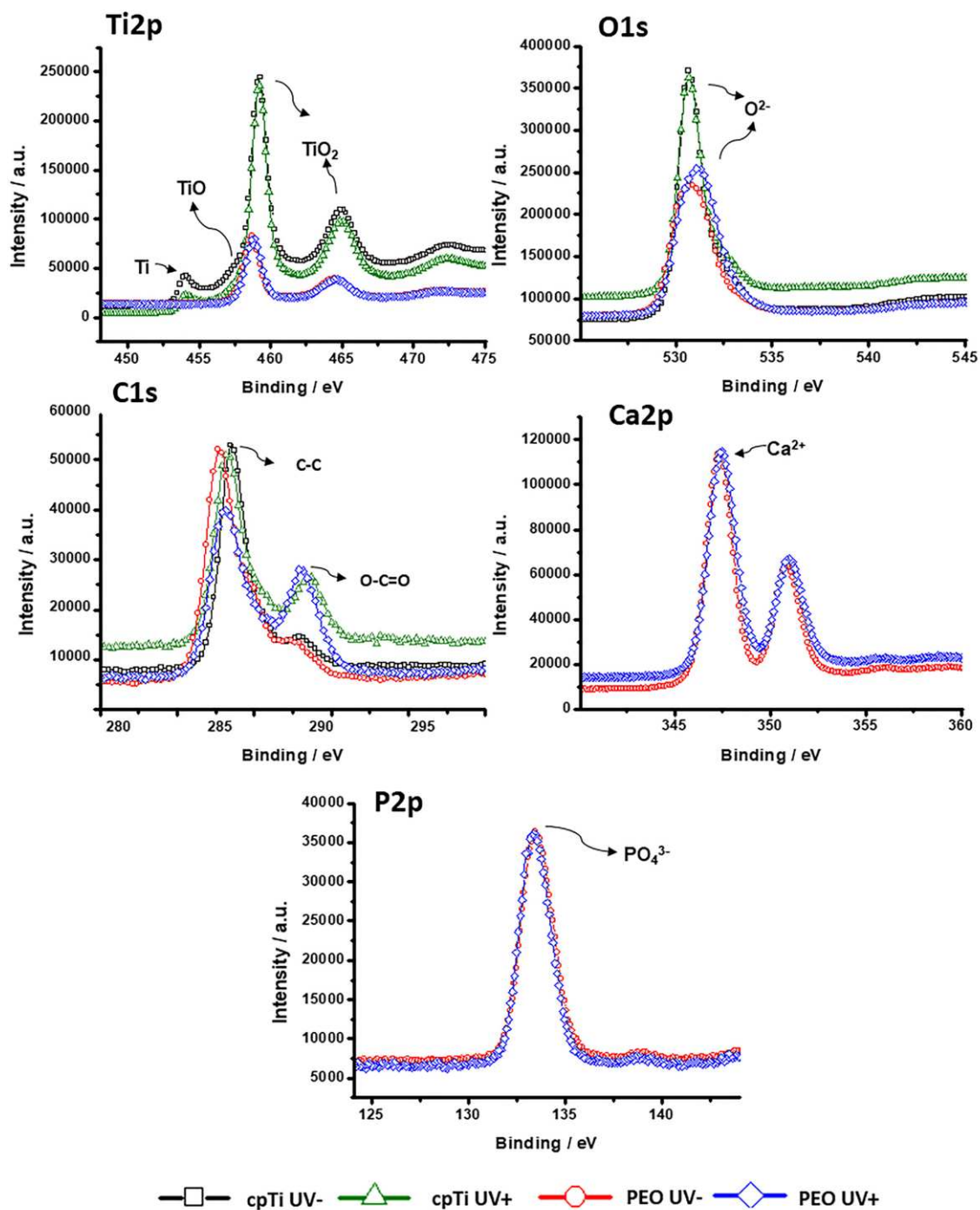


Figure 6. XPS spectra of cpTi and PEO-treated surfaces without UV treatment (UV-) and photofunctionalized (UV+).

The contact angle of the cpTi UV- was higher than the angle observed in the PEO UV- ($p < 0.0001$), indicating a lower wettability of the nontreated surface. After photofunctionalization (cpTi UV+ and PEO UV+), a decrease in the contact angle and an

increase in the surface hydrophilicity ($p < 0.0001$) were noted, mainly for cpTi UV+ where contact angle reduction was expressive. No significant difference was observed between cpTi UV+ and PEO UV+ after photofunctionalization ($p = 0.230$) (Fig. 7).

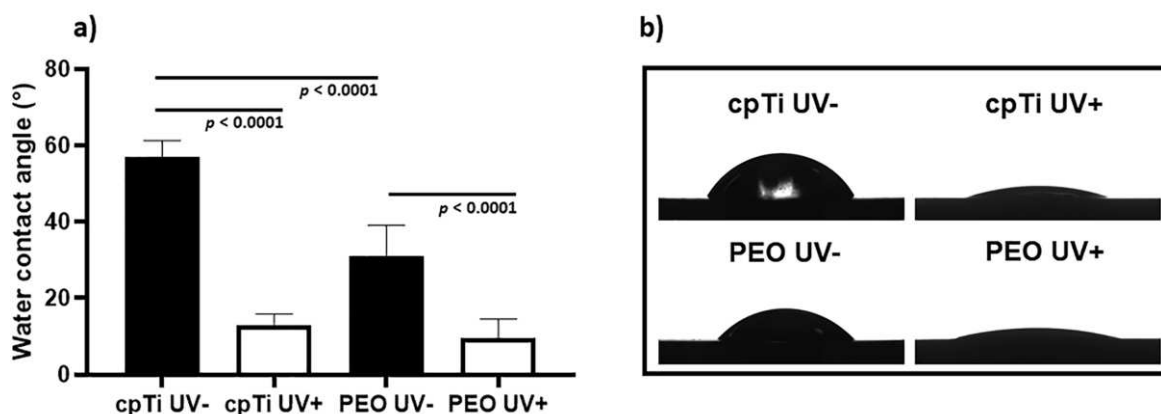


Figure 7. a) Contact angle ($n = 5$) of cpTi and PEO-treated surfaces without UV treatment (UV-) and photofunctionalized (UV+); b) representative images of contact angle. Bars indicate significant differences between groups ($p < 0.05$; Tukey HSD test).

After photofunctionalization, the hydrophilic status of the surfaces was evaluated over time to analyze the wettability degradation of the UV light effect. A significant increase in the contact angle for cpTi was observed 2 h after photofunctionalization. However, up to 6 h of aging, the contact angle of the cpTi surfaces remained lower than the initial values before photofunctionalization. Conversely, the PEO-treated surface maintained a lower contact angle, but at 4 h after photofunctionalization, the contact angle was the same as before UV light application (Fig. 8). In addition, at 6 h after photofunctionalization, the contact angle was similar for both cpTi and PEO-treated surfaces ($p = 0.817$).

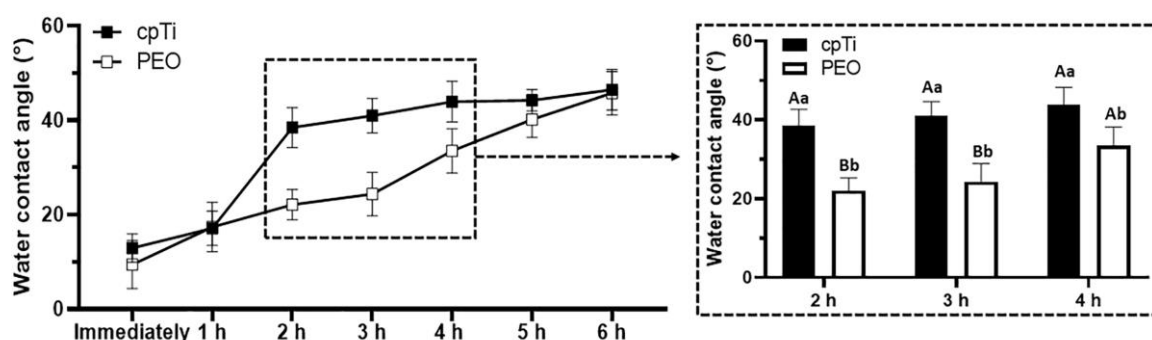


Figure 8. Degradation of the hydrophilic status of cpTi and PEO-treated surfaces in dark and dry conditions after 96 h of UV light exposure. The time line “immediately” means the

contact angle measured immediately after the 96 h of UV light application. Different capital letters indicate statistically significant differences among the evaluation periods within each surface type ($p < 0.05$; Tukey HSD test). Different lowercase letters indicate statistically significant differences between cpTi and PEO within each period of evaluation ($p < 0.05$; Tukey HSD test).

3.2 Photocatalytic activity

Fig. 9 shows the photocatalytic activity for all groups. The cpTi UV- and cpTi UV+ groups presented no photocatalytic activity. Moreover, although the PEO groups presented the crystalline phases anatase and rutile, no photocatalytic activity was observed even for the PEO UV+ group. Although the PEO UV+ treated groups showed a slight increase in photocatalytic activity, no statistically significant difference was observed compared with cpTi even at the maximum values of 2 h ($p = 0.198$).

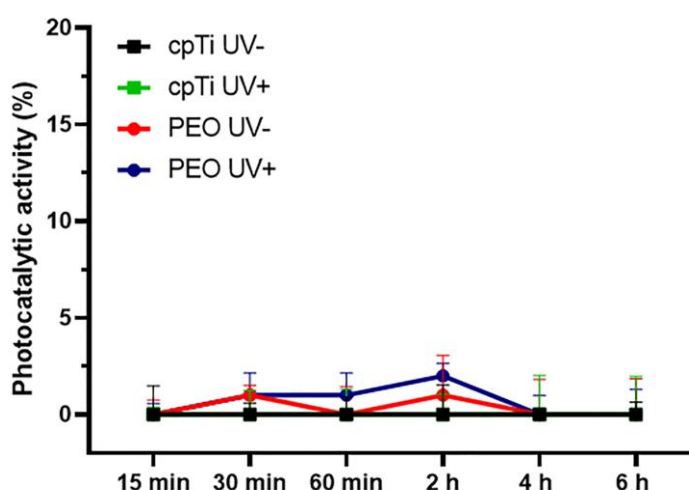


Figure 9. Photocatalytic activity ($n = 3$) of cpTi and PEO-treated surfaces without UV treatment (UV-) and photofunctionalized (UV+).

3.3 Protein adsorption

The PEO UV- treated group showed greater protein adsorption than the cpTi UV- group ($p < 0.0001$) (Fig. 10). In addition, when photofunctionalized, the PEO UV+ group presented a considerable rise in albumin adsorption with a statistically significant difference when compared to PEO UV- ($p = 0.001$). Although cpTi UV+ showed a slight increase in albumin adsorption when compared to cpTi UV-, no statistically significant difference was noted between them ($p = 0.636$).

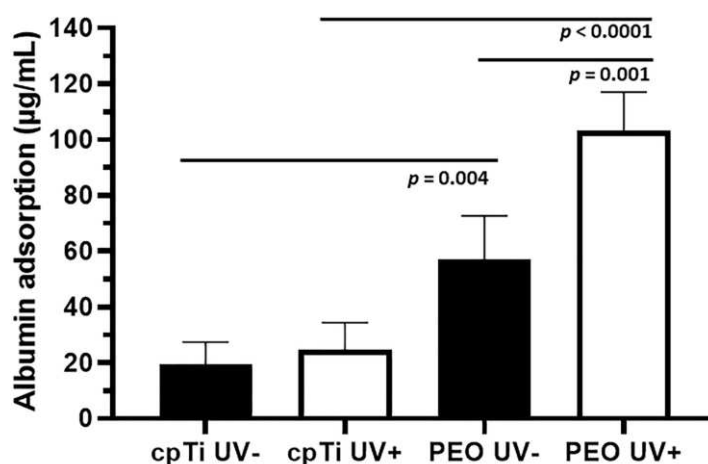


Figure 10. Albumin adsorption ($n = 5$) of cpTi and PEO-treated surfaces without UV treatment (UV-) and photofunctionalized (UV+). Bars indicate significant differences between groups ($p < 0.05$; Tukey HSD test).

3.4 Microbiological assay

Fig. 11 shows a significant decrease in the CFU counts for PEO UV+ surfaces when compared to PEO UV- ($p = 0.012$) after 1 h of bacterial adhesion. Although the photofunctionalization reduced the CFU counts for the cpTi UV+ surface, there was no statistically significant difference compared with cpTi UV- ($p = 0.269$). The PEO-treated surface exhibited greater bacterial adhesion at 1 h than cpTi under both nonphotofunctionalized ($p < 0.001$) and photofunctionalized ($p = 0.02$) conditions. After 6 h of adhesion, no difference was observed between the cpTi and PEO surfaces ($p = 0.493$), nor between nonphotofunctionalized and photofunctionalized surfaces ($p = 0.538$). The SEM micrographs (Fig. 12) showed the bacterial adhesion for all surfaces and the arrangement of *S. sanguinis* as streptococcus chains.

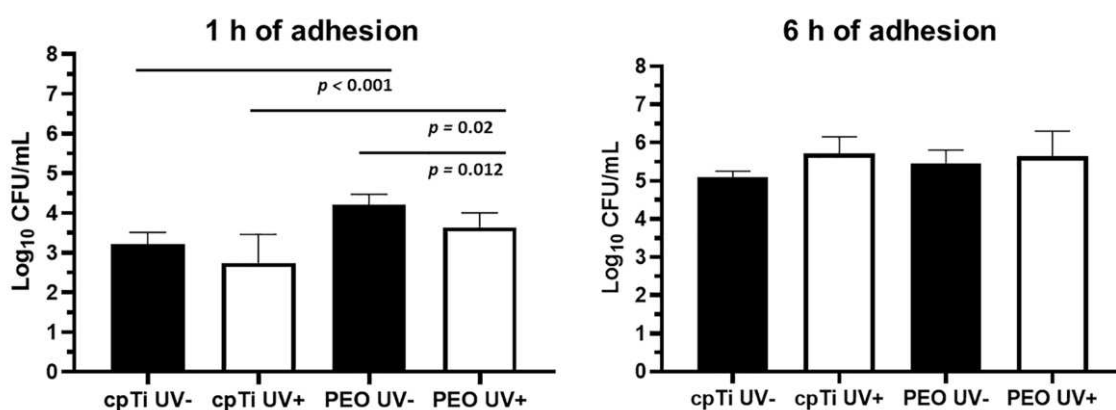


Figure 11. Colony forming units (\log_{10} CFU/mL) of *S. sanguinis* that developed on surfaces

after 1 h and 6 h of adhesion. The bar indicates a significant difference between groups ($p < 0.05$; Tukey HSD test).

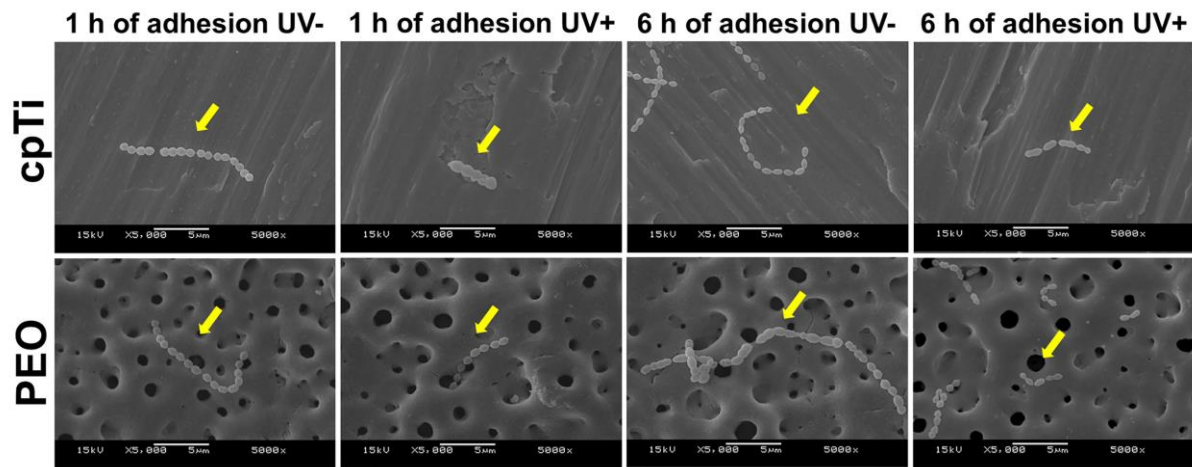


Figure 12. SEM micrographs of bacterial adhered on cpTi and PEO-treated surfaces without UV treatment (UV-) and photofunctionalized (UV+) at 5000 \times magnification (scale bar = 5 μ m, 15 kV). The arrows indicate *S. sanguinis* cells arranged as chains.

Discussion

In this study, we have shown an enhancement of the surface characteristics and biological properties of Ti material when PEO treatment is associated with the UV photofunctionalization; these results support the study hypothesis. PEO treatment provides a rougher surface and higher wettability than the machined condition. Furthermore, the UV photofunctionalization enhances the albumin adsorption and hydrophilicity on PEO-treated surfaces, in addition to inducing a reduction of bacterial adhesion at the early stage of biofilm formation.

The surface modifications obtained by PEO and UV-mediated photofunctionalization have an important role for improvement of the surface characteristics of dental implants. Regarding wettability, PEO-treated surfaces present a more hydrophilic surface due to the presence of calcium acetate [45]. In addition, photofunctionalization enhances the wettability by hydrocarbon removal and favorable water adsorption (Fig. 13) through the excitement of electrons from the valence band to the conduction band, conversion of the negatively charged surfaces to an electropositive state and the creation of oxygen vacancies as a result of the reduction of Ti^{4+} to Ti^{3+} [24]. Our findings also demonstrate a maintenance of the hydrophilic status for PEO-treated surfaces up to 4 h of aging, but it was

lost rapidly for machined surfaces when compared to the biofunctional PEO coating. However, at 6 h after photofunctionalization, the contact angle was the same for both machined and PEO-treated surfaces. According to the wettability status, while the surface remained hydrophilic, lower CFU counts of *S. sanguinis* were observed after 1 h of adhesion when compared to 6 h. These results may be due to the hydrophobic properties of *S. sanguinis*, which adheres in higher numbers to hydrophobic surfaces [46,47]. Furthermore, microorganisms with hydrophobic properties can bind to hydrocarbons via hydrophobic molecules [48]. Therefore, reduction of the hydrocarbon concentration in this study for photofunctionalized surfaces might also be a factor influencing the reduction of the initial bacterial adhesion.

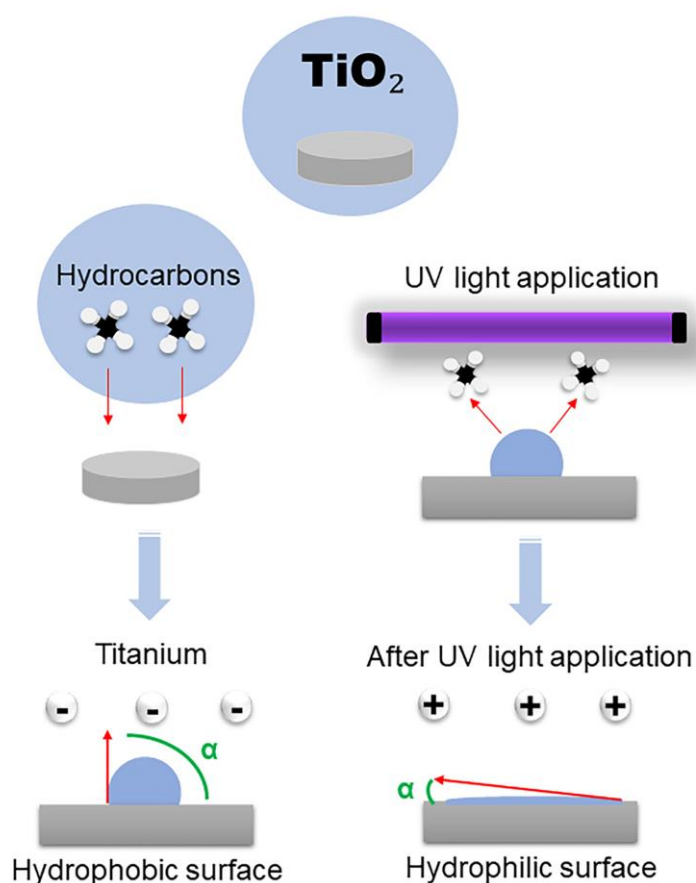


Figure 13. Schematic process of the physico-chemical changes in the Ti surface after photofunctionalization. UV-mediated photofunctionalization induces a conversion of the surface wettability to a more hydrophilic status and a modification of the surface electrostatic properties by hydrocarbon removal. The excitement of electrons from the valence band to the conduction band leads to the decomposition of hydrocarbon contaminants, conversion of the negatively charged surfaces to an electropositive state and the creation of oxygen vacancies that favor water adsorption.

It is interesting to note that the acceleration of bone formation and inhibition of bacterial adhesion are important strategies to be acquired in the biomedical materials field [49]. Despite the higher wettability of the PEO-treated surfaces, the higher CFU counts of PEO-treated surfaces when compared to the machined condition after 1 h of adhesion can be explained by the increased surface roughness obtained by the surface treatment, which provides a larger surface area for bacterial adhesion [8]. In contrast, the rougher surface may be a factor in the improvement of protein adsorption and the osseointegration process [15]. The photofunctionalization was able to reduce the initial bacterial adhesion of PEO-treated surfaces, and the combination of this biomimetic surface with reduced bacterial adhesion could be a promising strategy for dental implants.

The degradation of methylene blue (which measures the photocatalytic activity) and the generation of reactive oxygen species that create radicals ($\bullet\text{OH}$, $\text{O}_2\bullet^-$ and H_2O_2) are known to have antimicrobial activity by their ability to decompose the outermost membrane of microorganisms [50]. However, our data show that the degradation of methylene blue can be neglected. The absence of photocatalytic activity suggests that the antimicrobial activity during initial bacterial adhesion is related to the physico-chemical modifications of the surface after photofunctionalization, but not to the possible remaining photocatalytic activity on the Ti surface. Our results corroborate the findings of a previous study that reported the absence of a photocatalytic effect on the Ti6Al4V photofunctionalized surface [28]. Apart from this finding, the short lifetime of the reactive oxygen species, which present the longest lifetime of 2.7 μs , may explain the absence of photocatalytic activity on photofunctionalized surfaces [51].

In addition to the antimicrobial activity, the biofunctional PEO coating, when photofunctionalized, also presented an enhancement of surface properties. Importantly, the photofunctionalization was able to increase albumin adsorption. The presence of pores and the rougher surface obtained by the PEO treatment promotes a large number of anchorage sites [15]. In addition, the Ca incorporated by the PEO treatment is known to attract negatively charged proteins, encouraging adsorption [17]. The photofunctionalization has a positive role in albumin adsorption, increasing adsorption on PEO-treated surfaces. The greater protein adsorption on PEO UV+ can also be attributed to the hydrophilicity obtained after photofunctionalization, as shown in a previous study [13]. The lower hydrocarbon concentration associated with an electropositively charged surface obtained by photofunctionalization also improve albumin adsorption [16,22]. Moreover, the increase in

covalent bonds between carbon and oxygen on photofunctionalized groups impacts protein adsorption [8].

Overall, our findings suggest the presence of important surface modifications of Ti material, which directly influence the biological properties of the surfaces in terms of albumin adsorption and bacterial colonization. Concerning the protein adsorption to biomaterials, it is the first step in the attachment of functional cells [13]. Albumin is an important blood serum protein that regulates cytoplasmatic Ca and the cellular proliferation of osteoblasts [14]. Consequently, the greater protein adsorption acts to accelerate the osseointegration process. Indeed, the lower counts of bacteria when PEO-treated surfaces are photofunctionalized represent a valuable finding. For instance, bacterial colonization may occur at any time during implant rehabilitation, but it is crucial to avoid microorganism proliferation in the early healing stage [3,11], which can diminish early implant failures due to peri-implant infections. Mucositis represents a risk factor for the osseointegration process in early healing stage, and its progression can contribute to the development of peri-implantitis [5, 7].

Based on these findings, the physical-chemical surface modifications and enhancement of the biological properties obtained by the association of PEO treatment and photofunctionalization are important findings of our study. Additionally, the greater albumin adsorption and lower CFU counts could ensure the prevention of early implant loss, as a result of the increased potential for implant bone contact. Moreover, the initial establishment of bone contact has an imperative role for osseointegration and increased success rates of dental implants. However, the current study has some limitations and the acquired pellicle formation after the photofunctionalization and before the bacterial adhesion may have influenced the results. Further studies are needed to better understand and to improve the applicability of photofunctionalized surfaces with respect to antimicrobial activity. The clinical behavior of photofunctionalized implants regarding the rates of infection and diseases associated with the biofilm presence must also be assessed, as well as further investigations regarding the influence of UV light intensity, wavelength and exposure time on the antimicrobial effect.

Conclusion

Photofunctionalization modifies the physico-chemical characteristics of titanium material, and when associated with biofunctional titanium-treated surfaces, it induces greater albumin adsorption and lower initial bacterial colonization. From a clinical perspective, UV-

mediated photofunctionalization of the titanium biofunctional coating is a promising strategy to improve the implant-host interaction and to reduce oral biofilm-associated disease.

Acknowledgments

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 and by the São Paulo State Research Foundation (FAPESP), Brazil (grant numbers 2016/11470-6 and 2017/01320-0). The authors also thank the Oral Biochemistry Laboratory at Piracicaba Dental School at the University of Campinas (UNICAMP) for the microbiology facility, the Laboratory of Technological Plasmas at the São Paulo State University (UNESP) for the PEO facility and the Brazilian Nanotechnology National Laboratory (LNNano) at the Brazilian Center of Research in Energy and Materials (CNPEM) for the LSCM, XPS and XRD facilities.

References

- [1] Beschmidt SM, Cacaci C, Dedeoglu K, Hildebrand D, Hulla H, Iglhaut G, et al. Implant success and survival rates in daily dental practice: 5-year results of a non-interventional study using CAMLOG SCREW-LINE implants with or without platform-switching abutments. *Int J Implant Dent* 2018;4:33. <https://doi.org/10.1186/s40729-018-0145-3>.
- [2] Liu X, Chen S, Tsoi JKH, Matinlinna JP. Binary titanium alloys as dental implant materials-a review. *Regen Biomater* 2017;4:315–23. <https://doi.org/10.1093/rb/rbx027>.
- [3] Mohajerani H, Roozbayani R, Taherian S, Tabrizi R. The Risk Factors in Early Failure of Dental Implants: a Retrospective Study. *J Dent (Shiraz, Iran)* 2017;18:298–303.
- [4] Lee CT, Huang YW, Zhu L, Weltman R. Prevalences of peri-implantitis and peri-implant mucositis: systematic review and meta-analysis. *J Dent* 2017;62:1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2017.04.011>.
- [5] Costa FO, Takenaka-Martinez S, Cota LOM, Ferreira SD, Silva GLM, Costa JE. Peri-implant disease in subjects with and without preventive maintenance: A 5-year follow-up. *J Clin Periodontol* 2012;39:173–81. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2011.01819.x>.
- [6] Figueiredo R, Camps-Font O, Valmaseda-Castellon E, Gay-Escoda C. Risk Factors for Postoperative Infections After Dental Implant Placement: A Case-Control Study. *J Oral Maxillofac Surg* 2015;73:2312–8. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2015.07.025>.
- [7] Mohajerani H, Roozbayani R, Taherian S, Tabrizi R. The Risk Factors in Early Failure of Dental Implants: a Retrospective Study. *J Dent (Shiraz, Iran)* 2017;18:298–303.
- [8] Hannig C, Hannig M. The oral cavity--a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clin Oral Investig* 2009;13:123–39. doi: 10.1007/s00784-008-0243-3.
- [9] Fürst MM, Salvi GE, Lang NP, Persson GR. Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants. *Clin Oral Implants Res* 2007;18:501–8.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2007.01381.x>.

[10] Cavalcanti IMG, Filho APR, Lucena-ferreira SC, Silva WJ, Leme AFP, Senna PM, et al. ScienceDirect Salivary pellicle composition and multispecies biofilm developed on titanium nitrided by cold plasma. *Arch Oral Biol* 2014;59:695–703. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.04.001>.

[11] de Avila ED, Lima BP, Sekiya T, Torii Y, Ogawa T, et al. Biomaterials Effect of UV-photofunctionalization on oral bacterial attachment and biofilm formation to titanium implant material. *Biomaterials* 2015;67:84–92. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.07.030>.

[12] Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Egland PG, Foster JS, Palmer RJ. Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002;66:486–505, table of contents. doi: 10.1128/MMBR.66.3.486-505.2002.

[13] Hori N, Ueno T, Minamikawa H, Iwasa F, Yoshino F, Kimoto K, et al. Electrostatic control of protein adsorption on UV-photofunctionalized titanium. *Acta Biomater* 2010;6:4175–80. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.05.006>.

[14] Sousa SR, Lamghari M, Sampaio P, Moradas-Ferreira P, Barbosa MA. Osteoblast adhesion and morphology on TiO₂ depends on the competitive preadsorption of albumin and fibronectin. *J Biomed Mater Res A* 2008;84:281–90. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31201>.

[15] Cordeiro JM, Pantaroto HN, Paschoaleto EM, Rangel EC, Cruz NC d., Sukotjo C, et al. Synthesis of biofunctional coating for a TiZr alloy: Surface, electrochemical, and biological characterizations. *Appl Surf Sci* 2018;452:268–78. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.05.044>.

[16] Iwasa F, Hori N, Ueno T, Minamikawa H, Yamada M, Ogawa T. Enhancement of osteoblast adhesion to UV-photofunctionalized titanium via an electrostatic mechanism. *Biomaterials* 2010;31:2717–27. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.12.024>.

[17] Mao Y, Yan J, Wang L, Dong W, Jia Y, Hu X, et al. Formation and properties of

bioactive barium titanate coatings produced by plasma electrolytic oxidation. *Ceram Int* 2018;44:12978–86. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.04.115>.

[18] Marques I da SV, Barão VAR, da Cruz NC, Yuan JC, Mesquita MF, Ricomini-Filho AP, et al. Electrochemical behavior of bioactive coatings on cp-Ti surface for dental application. *Corros Sci* 2015;100:133–46. <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2015.07.019>.

[19] Walsh FC, Wood R, Walsh FC, Low CTJ, Wood RJK, Stevens KT, et al. Plasma electrolytic oxidation (PEO) for production of anodised coatings on lightweight metal (Al, Mg, Ti) alloys. *Trans Inst Met Finish* 2009;87:122–35. doi: 10.1179/174591908X372482.

[20] Krupa D, Baszkiewicz J, Zdunek J, Sobczak JW, Lisowski W, Smolik J, et al. Effect of plasma electrolytic oxidation in the solutions containing Ca, P, Si, Na on the properties of titanium. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2012;100:2156–66. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.32781>.

[21] Beline T, Marques I da SV, Matos AO, Ogawa ES, Ricomini-Filho AP, Rangel EC, et al. Production of a biofunctional titanium surface using plasma electrolytic oxidation and glow-discharge plasma for biomedical applications. *Biointerphases* 2016;11:011013. <https://doi.org/10.1116/1.4944061>.

[22] Ogawa T. Ultraviolet photofunctionalization of titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2014;29:e95-102. doi: 10.11607/jomi.te47.

[23] Cortat B, Garcia CCM, Quinet A, Schuch AP, de Lima-Bessa KM, Menck CFM. The relative roles of DNA damage induced by UVA irradiation in human cells. *Photochem Photobiol Sci* 2013;12:1483–95. <http://dx.doi.org/10.1039/c3pp50023c>.

[24] 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;30:1015–25. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.11.004>.

[25] Minamikawa H, Ikeda T, Att W, Hagiwara Y, Hirota M, Tabuchi M, et al.

Photofunctionalization increases the bioactivity and osteoconductivity of the titanium alloy Ti6Al4V. *J Biomed Mater Res A* 2014;102:3618–30. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35030>.

[26] Takeuchi M, Sakamoto K, Martra G, Coluccia S, Anpo M. Mechanism of photoinduced superhydrophilicity on the TiO₂ photocatalyst surface. *J Phys Chem B* 2005;109:15422–8. doi: 10.1021/jp058075i.

[27] Att W, Hori N, Iwasa F, Yamada M, Ueno T, Ogawa T. The effect of UV-photofunctionalization on the time-related bioactivity of titanium and chromium – cobalt alloys. *Biomaterials* 2009;30:4268–76. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.04.048>.

[28] Gallardo-Moreno AM, Pacha-Olivenza MA, Fernández-Calderón M-C, Pérez-Giraldo C, Bruque JM, González-Martín M-L. Bactericidal behaviour of Ti6Al4V surfaces after exposure to UV-C light. *Biomaterials* 2010;31:5159–68. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.03.005>.

[29] Pantaroto HN, Ricomini-Filho AP, Bertolini MM, Dias da Silva JH, Azevedo Neto NF, Sukotjo C, et al. Antibacterial photocatalytic activity of different crystalline TiO₂ phases in oral multispecies biofilm. *Dent Mater* 2018;34:e182–95. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.03.011>.

[30] Liou J-W, Chang H-H. Bactericidal effects and mechanisms of visible light-responsive titanium dioxide photocatalysts on pathogenic bacteria. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2012;60:267–75. doi: 10.1007/s00005-012-0178-x.

[31] Joost U, Juganson K, Visnapuu M, Mortimer M, Kahru A, Nõmmiste E, et al. Photocatalytic antibacterial activity of nano-TiO₂ (anatase)-based thin films: effects on *Escherichia coli* cells and fatty acids. *J Photochem Photobiol B* 2015;142:178–85. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.12.010>.

[32] Barão VA, Mathew MT, Assunção WG, Yuan JC, Wimmer MA, Sukotjo C. The role of lipopolysaccharide on the electrochemical behavior of titanium. *J Dent Res* 2011;90:613–8.

<https://doi.org/10.1177/0022034510396880>.

[33] Harmankaya N, Igawa K, Stenlund P, Palmquist A, Tengvall P. Healing of complement activating Ti implants compared with non-activating Ti in rat tibia. *Acta Biomater* 2012;8:3532–40. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.05.017>.

[34] Park K-H, Koak J-Y, Kim S-K, Han C-H, Heo S-J. The Effect of Ultraviolet-C Irradiation Via a Bactericidal Ultraviolet Sterilizer on an Anodized Titanium Implant: A Study in Rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2013;28:57–66. doi: 10.11607/jomi.2638.

[35] Pleskova SN, Golubeva IS, Verevkin YK. Bactericidal activity of titanium dioxide ultraviolet-induced films. *Mater Sci Eng C* 2016;59:807–17. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.10.021>.

[36] Faverani LP, Assunção WG, de Carvalho PSP, Yuan JC, Sukotjo C, Mathew MT, et al. Effects of dextrose and lipopolysaccharide on the corrosion behavior of a Ti-6Al-4V alloy with a smooth surface or treated with double-acid-etching. *PLoS One* 2014;9:e93377. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093377>.

[37] Matos AO, Ricomini-filho AP, Beline T, Ogawa ES, Costa-oliveira BE, Almeida AB De, et al. Three-species biofilm model onto plasma-treated titanium implant surface. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2017;152:354–66. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.01.035>.

[38] Mills A. Environmental An overview of the methylene blue ISO test for assessing the activities of photocatalytic films. *Applied Catal B, Environ* 2012;128:144–9. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2012.01.019>.

[39] Loncar ES, Radeka MM, Petrovi SB, Skapin AS. Determination of the photocatalytic activity of TiO₂ coatings on clay roofing tile substrates - Methylene Blue as model pollutant. *Acta Period Technol* 2009;220:125–33. <https://doi.org/10.2298/APT0940125L>.

[40] Shiraishi K, Koseki H, Tsurumoto T, Baba K, Naito M, Shindo H. Antibacterial metal implant with a TiO₂-conferred photocatalytic bactericidal effect against *Staphylococcus*

aureus. *Surf Interface Anal* 2009;41:17–22. <https://doi.org/10.1002/sia.2965>.

[41] Choi S, Jeong W, Cha J, Lee J, Lee K-J, Yu H-S, et al. Effect of the ultraviolet light treatment and storage methods on the biological activity of a titanium implant surface. *Dent Mater* 2017;33:1426–35. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2017.09.017>.

[42] Guggenheim B, Giertsen E, Schüpbach P, Shapiro S. Validation of an in vitro biofilm model of supragingival plaque. *J Dent Res* 2001;80:363–70. doi:10.1177/00220345010800011201.

[43] Soriano I, Martín AY, Evora C, Sánchez E. Biodegradable implantable fluconazole delivery rods designed for the treatment of fungal osteomyelitis: influence of gamma sterilization. *J Biomed Mater Res A* 2006;77:632–8. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30657>.

[44] Pereira-Cenci T, Deng DM, Kraneveld EA, Manders EMM, Del Bel Cury AA, Ten Cate JM, et al. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. *Arch Oral Biol* 2008;53:755–64. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2008.02.015>.

[45] Shi X ling, Wang Q liang, Wang F shun, Ge S rong. Effects of electrolytic concentration on properties of micro-arc film on Ti6Al4V alloy. *Min Sci Technol* 2009;19:220–4. [https://doi.org/10.1016/S1674-5264\(09\)60042-9](https://doi.org/10.1016/S1674-5264(09)60042-9).

[46] Jain S, Williamson RS, Marquart M, Janorkar A V, Griggs JA, Roach MD. Photofunctionalization of anodized titanium surfaces using UVA or UVC light and its effects against *Streptococcus sanguinis*. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2018;106:2284–94. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34033>.

[47] Gittens RA, Scheideler L, Rupp F, Hyzy SL, Geis-Gerstorfer J, Schwartz Z, et al. A review on the wettability of dental implant surfaces II: Biological and clinical aspects. *Acta Biomater* 2014;10:2907–18. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.03.032>.

[48] Rosenberg M. Microbial adhesion to hydrocarbons: Twenty-five years of doing

MATH. FEMS Microbiol Lett 2006;262:129–34. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00291.x>.

[49] Hanawa T. Surface treatment and modification of metals to add biofunction. Dent Mater J. 2017;36(5):533–8. <https://doi.org/10.4012/dmj.2017-154>.

[50] Wu X, Huang Y, Kushida Y, Bhayana B, Hamblin MR. Broad-spectrum antimicrobial photocatalysis mediated by titanium dioxide and UVA is potentiated by addition of bromide ion via formation of hypobromite. Free Radic Biol Med 2016;95:74–81. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.012>.

[51] Attri P, Kim YH, Park DH, Park JH, Hong YJ, Uhm HS, et al. Generation mechanism of hydroxyl radical species and its lifetime prediction during the plasma-initiated ultraviolet (UV) photolysis. Sci Rep 2015;5:1–8. doi: 10.1038/srep09332.

3 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos no presente estudo pode-se concluir que a fotofuncionalização de revestimentos biofuncionais apesar de não apresentar atividade fotocatalítica, promove modificações físico-químicas da superfície do titânio e induz a uma maior adsorção da proteína albumina e a uma menor adesão bacteriana inicial. Do ponto de vista clínico, a fotofuncionalização mediada pela luz UV de superfícies com revestimentos biofuncionais representa uma estratégia promissora para melhorar as interações entre o implante e o hospedeiro e reduzir doenças associadas ao biofilme.

REFERÊNCIAS*

- Aita H, Att W, Ueno T, Yamada M, Hori N, Iwasa F, et al. Ultraviolet light-mediated photofunctionalization of titanium to promote human mesenchymal stem cell migration, attachment, proliferation and differentiation. *Acta Biomater.* 2009 Oct;5(8):3247–57.
- Att W, Hori N, Iwasa F, Yamada M, Ueno T, Ogawa T. The effect of UV-photofunctionalization on the time-related bioactivity of titanium and chromium – cobalt alloys. *Biomaterials.* 2009 Sep;30(26):4268–76.
- Beline T, Marques I da SV, Matos AO, Ogawa ES, Ricomini-Filho APAP, Rangel EC, et al. Production of a biofunctional titanium surface using plasma electrolytic oxidation and glow-discharge plasma for biomedical applications. *Biointerphases.* 2016 Mar;11(1):11013.
- Beschmidt SM, Cacaci C, Dedeoglu K, Hildebrand D, Hulla H, Iglhaut G, et al. Implant success and survival rates in daily dental practice: 5-year results of a non-interventional study using CAMLOG SCREW-LINE implants with or without platform-switching abutments. *Int J Implant Dent.* 2018 Nov;4(1):33.
- Blanes RJ, Bernard JP, Blanes ZM, Belser UC. A 10-year prospective study of ITI dental implants placed in the posterior region. II: Influence of the crown-to-implant ratio and different prosthetic treatment modalities on crestal bone loss. *Clin Oral Implants Res.* 2007 Dec;18(6):707–14.
- Cavalcanti IMG, Filho APR, Lucena-ferreira SC, Silva WJ, Leme AFP, Senna PM, et al. Salivary pellicle composition and multispecies biofilm developed on titanium nitrided by cold plasma. *Arch Oral Biol.* 2014 Jul;59(7):695–703.
- Choi J-Y, Chung CJ, Oh K, Choi Y, Kim K. Photocatalytic antibacterial effect of TiO₂ film of TiAg on *Streptococcus mutans*. *Angle Orthod.* 2009 May;79(3):528–32.
- Choi S, Jeong W, Cha J, Lee J, Lee K-J, Yu H-S, et al. Effect of the ultraviolet light treatment and storage methods on the biological activity of a titanium implant surface. *Dent Mater.* 2017 Dec;33(12):1426–35.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Chrcanovic BR, Albrektsson T, Wennerberg A. Reasons for failures of oral implants. *J Oral Rehabil*. 2014 Jun;41(6):443–76.

Cordeiro JM, Pantaroto HN, Paschoaleto EM, Rangel EC, Cruz NC da, Sukotjo C, et al. Synthesis of biofunctional coating for a TiZr alloy: Surface, electrochemical, and biological characterizations. *Appl Surf Sci*. 2018 Sep;452:268–78.

Cortat B, Garcia CCM, Quinet A, Schuch AP, de Lima-Bessa KM, Menck CFM. The relative roles of DNA damage induced by UVA irradiation in human cells. *Photochem Photobiol Sci*. 2013 Aug;12(8):1483–95.

Costa FO, Takenaka-Martinez S, Cota LOM, Ferreira SD, Silva GLM, Costa JE. Peri-implant disease in subjects with and without preventive maintenance: A 5-year follow-up. *J Clin Periodontol*. 2012 Feb;39(2):173–81.

de Avila ED, Lima BP, Sekiya T, Torii Y, Ogawa T, et al. Effect of UV-photofunctionalization on oral bacterial attachment and bio film formation to titanium implant material. *Biomaterials*. 2015 Oct;67:84–92.

Dorkhan M, Hall J, Uvdal P, Sandell A, Svensäter G, Davies JR, et al. Crystalline anatase-rich titanium can reduce adherence of oral streptococci. *Biofouling*. 2014 Jun;30(6):759–66.

Figueiredo R, Camps-Font O, Valmaseda-Castellon E, Gay-Escoda C. Risk Factors for Postoperative Infections After Dental Implant Placement: A Case-Control Study. *J Oral Maxillofac Surg*. 2015 Dec;73(12):2312–8.

Funato A, Ogawa T. Photofunctionalized dental implants: a case series in compromised bone. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2013 Nov-Dec;28(6):1589–601.

Fürst MM, Salvi GE, Lang NP, Persson GR. Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants. *Clin Oral Implants Res*. 2007 Aug;18(4):501–8.

Gallardo-Moreno AM, Pacha-Olivenza MA, Fernández-Calderón M-C, Pérez-Giraldo C, Bruque JM, González-Martín M-L. Bactericidal behaviour of Ti6Al4V surfaces after exposure to UV-C light. *Biomaterials*. 2010 Jul;31(19):5159–68.

Hahnel S, Wieser A, Lang R, Rosentritt M. Biofilm formation on the surface of modern implant abutment materials. *Clin Oral Implants Res*. 2015 Nov;26(11):1297–301.

- Han A, Tsoi JKH, Pires F, Leprince JG, Palin WM. Bacterial adhesion mechanisms on dental implant surfaces and the influencing factors. *Int J Adhes Adhes*. 2016 Sep;69:1–14.
- Hannig C, Hannig M. The oral cavity--a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clin Oral Investig*. 2009 Jun;13(2):123–39.
- Hori K, Matsumoto S. Bacterial adhesion : From mechanism to control. *Biochem Eng J*. 2010 Feb;48:424–34.
- Hori N, Ueno T, Minamikawa H, Iwasa F, Yoshino F, Kimoto K, et al. Electrostatic control of protein adsorption on UV-photofunctionalized titanium. *Acta Biomater*. 2010 Oct;6(10):4175–80.
- Hori N, Ueno T, Suzuki T, Iwasa F, Yamada M, Att W, et al. Ultraviolet light treatment for the restoration of age-related degradation of titanium bioactivity. *Int J Oral Maxillofac Implant*. 2010 Jan-Feb;25(1):49–62.
- Iwasa F, Hori N, Ueno T, Minamikawa H, Yamada M, Ogawa T. Enhancement of osteoblast adhesion to UV-photofunctionalized titanium via an electrostatic mechanism. *Biomaterials*. 2010 Apr;31(10):2717–27.
- Jeong W, Kwon J, Lee J, Uhm S, Ha Choi E, Kim K-M. Bacterial attachment on titanium surfaces is dependent on topography and chemical changes induced by nonthermal atmospheric pressure plasma. *Biomed Mater*. 2017 Jul;12(4):045015.
- Jepsen S, Berglundh T, Genco R, Aass AM, Demirel K, Derks J, et al. Primary prevention of peri-implantitis: managing peri-implant mucositis. *J Clin Periodontol*. 2015 Apr;42 Suppl 1:S152-7.
- Joost U, Juganson K, Visnapuu M, Mortimer M, Kahru A, Nõmmiste E, et al. Photocatalytic antibacterial activity of nano-TiO₂ (anatase)-based thin films: Effects on *Escherichia coli* cells and fatty acids. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2015 Jan;142:178–85.
- Jung RE, Pjetursson BE, Glauser R, Zembic A, Zwahlen M, Lang NP. A systematic review of the 5-year survival and complication rates of implant-supported single crowns. *Clin Oral Implants Res*. 2008 Feb;19(2):119–30.
- Kalle M, Karthik MS, Hegde C, Shetty SN, Raghotham K. Enhancement of support for

mandibular complete denture prosthesis : A preprosthetic ridge augmentation procedure by distraction osteogenesis Clinical Report. *J Indian Prosthodont Soc.* 2009 Aug;9(2):2–5.

Klinge B, Hultin M, Berglundh T. Peri-implantitis. *Dent Clin North Am.* 2005 Jul;49(3):661–76, vii–viii.

Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer RJ. Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002 Sep;66(3):486–505.

Krupa D, Baszkiewicz J, Zdunek J, Sobczak JW, Lisowski W, Smolik J, et al. Effect of plasma electrolytic oxidation in the solutions containing Ca, P, Si, Na on the properties of titanium. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2012 Nov;100(8):2156–66.

Larsen OI, Enersen M, Kristoffersen AK, Wennerberg A, Bunæs DF, Lie SA, et al. Antimicrobial Effects of Three Different Treatment Modalities on Dental Implant Surfaces. *J Oral Implantol.* 2017 Dec;43(6):429–36.

Lee CT, Huang YW, Zhu L, Weltman R. Prevalences of peri-implantitis and peri-implant mucositis: systematic review and meta-analysis. *J Dent.* 2017 Dec;62:1–12.

Liou J-W, Chang H-H. Bactericidal effects and mechanisms of visible light-responsive titanium dioxide photocatalysts on pathogenic bacteria. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2012 Aug;60(4):267–75.

Liu X, Chen S, Tsoi JKH, Matinlinna JP. Binary titanium alloys as dental implant materials-a review. *Regen Biomater.* 2017 Oct;4(5):315–23.

Mao Y, Yan J, Wang L, Dong W, Jia Y, Hu X, et al. Formation and properties of bioactive barium titanate coatings produced by plasma electrolytic oxidation. *Ceram Int.* 2018 Apr; 44(11):12978–86.

Marques I da SV, Barão VAR, Cruz NC da, Yuan JC, Mesquita MF, Ricomini-Filho AP, et al. Electrochemical behavior of bioactive coatings on cp-Ti surface for dental application. *Corros Sci.* 2015 Nov;100:133–46.

Matos AO, Ricomini-Filho AP, Beline T, Ogawa ES, Costa-Oliveira BE, de Almeida AB, et al. Three-species biofilm model onto plasma-treated titanium implant surface. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2017 Apr;152:354–66.

Mayanagi G, Sato T, Shimauchi H, Takahashi N. Microflora profiling of subgingival and supragingival plaque of healthy and periodontitis subjects by nested PCR. *Int Congr Ser.* 2005 Sep;1284:195–6.

Minamikawa H, Ikeda T, Att W, Hagiwara Y, Hirota M, Tabuchi M, et al. Photofunctionalization increases the bioactivity and osteoconductivity of the titanium alloy Ti6Al4V. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2014 Oct;102(10):3618–30.

Mohajerani H, Roozbayani R, Taherian S, Tabrizi R. The Risk Factors in Early Failure of Dental Implants: a Retrospective Study. *J Dent (Shiraz, Iran).* 2017 Dec;18(4):298–303.

Naert I, Koutsikakis G, Duyck J, Quirynen M, Jacobs R, van Steenberghe D. Biologic outcome of implant-supported restorations in the treatment of partial edentulism. part I: a longitudinal clinical evaluation. *Clin Oral Implants Res.* 2002 Aug;13(4):381–9.

O'Donnell LE, Robertson D, Nile CJ, Cross LJ, Riggio M, Sherriff A, et al. The Oral Microbiome of Denture Wearers Is Influenced by Levels of Natural Dentition. *PLoS One.* 2015 Sep;10(9):e0137717.

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

Pereira da Silva CHF, Vidigal GMJ, de Uzeda M, de Almeida Soares G. Influence of titanium surface roughness on attachment of *Streptococcus sanguis*: an in vitro study. *Implant Dent.* 2005 Mar;14(1):88–93.

Pjetursson BE, Tan K, Lang NP, Brägger U, Egger M, Zwahlen M. A systematic review of the survival and complication rates of fixed partial dentures (FPDs) after an observation period of at least 5 years. *Clin Oral Implants Res.* 2004 Dec;15(6):625–42.

Puckett SD, Taylor E, Raimondo T, Webster TJ. The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment. *Biomaterials.* 2010 Feb;31(4):706–13.

Schmidlin PR, Müller P, Attin T, Wieland M, Hofer D, Guggenheim B. Polyspecies biofilm formation on implant surfaces with different surface characteristics. *J Appl Oral Sci.* 2013 Jan;21(1):48–55.

Sousa SR, Lamghari M, Sampaio P, Moradas-Ferreira P, Barbosa MA. Osteoblast adhesion

and morphology on TiO₂ depends on the competitive preadsorption of albumin and fibronectin. *J Biomed Mater Res A*. 2008 Feb;84(2):281–90.

Sul Y-T, Jeong Y, Johansson C, Albrektsson T. Oxidized, bioactive implants are rapidly and strongly integrated in bone. Part 1--experimental implants. *Clin Oral Implants Res*. 2006 Oct;17(5):521–6.

Suzuki S, Kobayashi H, Ogawa T. Implant stability change and osseointegration speed of immediately loaded photofunctionalized implants. *Implant Dent*. 2013 Oct;22(5):481–90.

Takeuchi M, Sakamoto K, Martra G, Coluccia S, Anpo M. Mechanism of photoinduced superhydrophilicity on the TiO₂ photocatalyst surface. *J Phys Chem B*. 2005 Aug;109(32):15422–8.

Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res*. 2006 Oct;17(S2):68–81.

Walsh FC, Wood R, Walsh FC, Low CTJ, Wood RJK, Stevens KT, et al. Plasma electrolytic oxidation (PEO) for production of anodised coatings on lightweight metal (Al , Mg , Ti) alloys. *Trans Inst Met Finish*. 2009 May;87:122–35.

Wu X, Huang Y, Kushida Y, Bhayana B, Hamblin MR. Broad-spectrum antimicrobial photocatalysis mediated by titanium dioxide and UVA is potentiated by addition of bromide ion via formation of hypobromite. *Free Radic Biol Med*. 2016 Jun;95:74–81.

Zareidoost A, Yousefpour M, Ghaseme B, Amanzadeh A. The relationship of surface roughness and cell response of chemical surface modification of titanium. *J Mater Sci Mater Med*. 2012 Jun;23(6):1479–88.

Zygogiannis K, Aartman IH, Parsa A, Tahmaseb A, Wismeijer D. Implant Mandibular Overdentures Retained by Immediately Loaded Implants: A 1-Year Randomized Trial Comparing the Clinical and Radiographic Outcomes Between Mini Dental Implants and Standard-Sized Implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2010 Nov-Dec;32(6):1377–88.

APÊNDICE 1 – METODOLOGIA DETALHADA

Com o objetivo de detalhar as metodologias empregadas para o desenvolvimento deste trabalho o apêndice 1 apresentará para cada metodologia realizada os materiais utilizados, bem como os métodos e etapas executadas a fim de permitir a reprodutibilidade do estudo e o possível uso das metodologias em estudos futuros.

1. Preparação dos discos de titânio e tratamento de superfície

Discos de Ticp [American Society for Testing and Materials (ASTM)—Grade II] (Realum Ind e Com de Metais Puros e Ligas Ltd, São Paulo, SP, Brazil), foram obtidos com 10 mm de diâmetro e 2 mm de espessura. Os discos foram polidos em politriz automática (EcoMet/AutoMet 250 Pro, Buehler, Lake Bluff, IL, USA) com a finalidade de padronizar a rugosidade de superfície dos discos. Para isso, os discos foram incluídos em resina acrílica termopolimerizável, utilizando uma matriz e o polimento foi realizado sob irrigação constante a 250 rpm de velocidade durante 1 min para cada lixa metalográfica utilizada nas granulações de #320 e #400 (CarbiMet 2, Buehler, Lake Bluff, IL, USA), sendo em seguida cada disco desincluído e incluído novamente para o polimento do outro lado do disco. Os discos passaram por um processo de limpeza por meio de banhos ultrassônicos em água destilada e propanol a 70% durante 10 min cada. Após a limpeza, foi utilizado um soprador térmico para a secagem das amostras com jatos de ar quente (Barão et al., 2011; Marques et al., 2015; Beline et al., 2016).

Para o tratamento de superfície com o plasma eletrolítico de oxidação (PEO) foi utilizada uma fonte de alimentação de corrente contínua (DC power supply, Plasma Technology, Ltd, Kowloon, Hong Kong, China), a qual se encontra no Laboratório de Plasmas Tecnológicos da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Sorocaba sob a responsabilidade do Prof. Dr. Nilson Cristino da Cruz. O tratamento com o PEO foi realizado em uma cuba eletrolítica que possui um sistema de refrigeração, mantendo a temperatura da solução eletrolítica em 20 °C. A solução eletrolítica foi preparada por meio da dissolução de acetato de cálcio [$\text{Ca}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$] (Dinâmica Ltd, Diadema, SP, Brazil) e glicerofosfato dissódico ($\text{C}_3\text{H}_7\text{Na}_2\text{O}_6\text{P}$) (Dinâmica, Ltd, Diadema, SP, Brazil) em água destilada, utilizando as concentrações de 0,3 M de acetato de cálcio e 0,02 M de glicerofosfato dissódico. Os parâmetros empregados no tratamento de superfície foram baseados em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa (Marques et al., 2015), sendo 290 V de voltagem, 250 Hz de

frequência, ciclo de trabalho de 60% e 10 min de tratamento de superfície. Para o tratamento, a solução eletrolítica preparada foi colocada na cuba eletrolítica, em seguida os discos foram submersos na solução eletrolítica com o auxílio de pinças e o tratamento de superfície foi iniciado, utilizando os parâmetros previamente descritos. O reservatório com a solução eletrolítica foi utilizado como cátodo e os discos de Ticp colocados na célula eletrolítica foram utilizados como ânodo. Após serem submetidas ao tratamento com PEO, as amostras foram lavadas com água deionizada e secas com jatos de ar quente (Marques et al., 2015; Beline et al., 2016).

A fotofuncionalização mediada pela luz ultravioleta (UV) foi realizada em condições ambiente, utilizando uma caixa de luz customizada nas dimensões de 50,0 cm de comprimento, 20,0 cm de altura e 15,5 cm de profundidade, com duas fontes de luz UV-C com potência de $2 \times 15 \text{ W}$ ($\lambda = 253,7 \text{ nm}$) (Moran Light, São Paulo, SP, Brazil). A fotofuncionalização foi realizada por 96 h, sendo as amostras posicionadas perpendicularmente a 7 cm de distância das fontes de luz com uma intensidade de $2,34 \text{ mW/cm}^2$. A intensidade da luz foi mensurada utilizando um fotômetro (Ophir Optronics Solution Ltd, Jerusalem, Israel) (Harmankaya et al., 2012; Park et al., 2013; Pleskova et al., 2016).

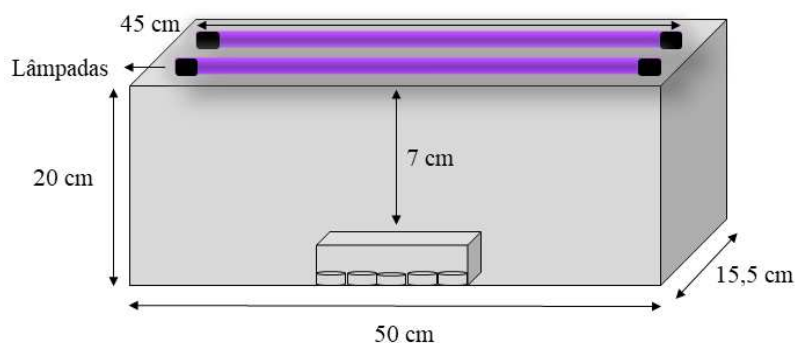


Figura 1. Esquema representativo da caixa de luz customizada.

2. Caracterizações de superfície

As análises de perfilometria, microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia confocal a laser e difratometria de raios-X (DRX) foram realizadas para as superfícies controle do estudo para a análise das características das diferentes superfícies. As superfícies experimentais fotofuncionalizadas não foram avaliadas por essas metodologias, uma vez que a fotofuncionalização não altera essas propriedades de morfologia, rugosidade e topografia da superfície (Takeuchi et al., 2005). As caracterizações de superfície por meio do

ângulo de contato, espectroscopia de energia dispersiva (EDS) e espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X foram realizadas para todos os grupos tanto experimentais quanto controle. Para os grupos experimentais fotofuncionalizados cada análise foi realizada imediatamente após o término da fotofuncionalização.

2.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para caracterizar a topografia e morfologia dos discos foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6010LA (Peabody, Massachusetts, USA). A microscopia eletrônica de varredura consiste em um feixe de elétrons de pequeno diâmetro que passam por um filamento capilar de tungstênio que representa o eletrodo negativo e que é gerado por meio da aplicação de uma diferença de potencial que pode variar de 0,5 a 30 Kv. A interação do feixe de elétrons incidente com a superfície da amostra gera sinais de imagem. A incidência do feixe primário de elétrons na amostra permite a dispersão dos elétrons na superfície e o volume da interação depende principalmente da tensão de aceleração e do número atômico da amostra. Em função do volume de interação, os elétrons e as ondas eletromagnéticas produzidas são utilizados para gerar as imagens e avaliar a composição química da superfície. Assim, a microscopia eletrônica de varredura proporciona informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos presentes na superfície das amostras por meio da espectroscopia de energia dispersiva associada a ele (Dedavid et al., 2007).

Os metais são materiais adequados para a observação em MEV e não possuem a necessidade de preparação específica, uma vez que são resistentes ao feixe de elétrons mesmo em tensões de aceleração acima de 50 Kv. Para a observação da topografia e morfologia das diferentes superfícies avaliadas neste estudo, a microscopia eletrônica de varredura foi realizada, utilizando o microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6010LA system (Peabody, Massachusetts, USA), como o parâmetro de 4 Kv e 2,000× de magnificação (Cordeiro et al., 2018).

2.2. Microscopia confocal a laser

A microscopia confocal a laser permite a caracterização da topografia da superfície das amostras através de imagens bi e tridimensionais por meio da iluminação por varredura a laser. A luz refletida pela amostra atravessa uma abertura mecânica ou íris que bloqueia feixes provenientes de pontos acima ou abaixo do plano focal. Dessa forma, ao chegar ao detector apenas a luz originada em um único plano focal é observada, permitindo a

aquisição de imagens digitalizadas dos diferentes planos focais da amostra. A obtenção de galerias ou séries de imagens (no plano z) possibilita a reconstrução tridimensional da estrutura observada. Para esta análise um microscópio de varredura confocal a laser 3D (LSCM, Keyence model VK-X200 series, Osaka, Osaka, Japan) foi utilizado para a caracterização das amostras com as imagens em 2D e 3D da superfície com a magnificação de 150x. O processamento das imagens e a mensuração dos valores médios da área da superfície foram realizados com o software VK-Analyzer (Keyence v 3.3.0.0, Osaka, Osaka, Japan) (Mortara et al., 2015; Cordeiro et al., 2018).

2.3. *Perfilometria*

A rugosidade da superfície foi avaliada por meio de um perfilômetro (Dektak 150-d; Veeco, Plainview, NY, USA). A média aritmética da rugosidade de superfície (R_a); a distância vertical entre o pico mais alto e o vale mais profundo (R_t); a altura entre os pontos máximo e mínimo do perfil - no comprimento de amostragem (R_z) e a rugosidade quadrática média (R_q) foram avaliadas utilizando um cut-off 0,25 mm e velocidade de 0,005 mm/s, durante 12 s. Três mensurações em diferentes áreas de cada amostra (centro, direita e esquerda) foram realizadas para a obtenção do valor da média (Faverani et al., 2014). A caracterização da topografia em relação a rugosidade justifica-se uma vez que representa uma propriedade importante da superfície para se prever sua resposta biológica (Chen et al., 2008).

2.4. *Difratometria de raios-X (DRX)*

As fases cristalinas foram avaliadas por difratometria de raios-X (DRX) (XRD; X'Pert PRO MRD, PANalytical, Almelo, Overijssel, The Netherlands), utilizando radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1,540598 \text{ \AA}$) a 45 kV e 40 mA, velocidade de 0.02 s, angulação fixa de 2.5° e variação de 20° a 90° (Matos et al., 2017). A análise por meio da difratometria de raios-X consiste no fenômeno da difração a partir da incidência de um feixe monocromático de raios-X sobre um material cristalino. A incidência dos raios-X leva a uma excitação e vibração dos elétrons dos átomos na mesma frequência. A vibração destes elétrons causa uma difração de raios-X e essa informação é utilizada para a determinação dos constituintes microestruturais. A lei de Bragg estabelece as relações necessárias para o surgimento de um pico de difração, que relaciona os parâmetros do cristal e da radiação incidente, segundo a equação: $n\lambda = d \sin\theta$, onde $n = 1, 2, 3, \dots$ λ é comprimento de onda do raios-X em Angstrom (\AA), d é distância interplanar, θ é o ângulo de incidência ou reflexão do feixe incidente (Lima et al., 2006).

2.5. Espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

A identificação de elementos químicos e a porcentagem da concentração atômica dos elementos presentes na superfície das amostras são análises possíveis de serem realizadas através do microscópio eletrônico de varredura (MEV) JEOL JSM-6010LA system (Dedavid et al., 2007). Dessa forma, a composição química das diferentes superfícies dos grupos que compõem o estudo foi avaliada por meio da espectroscopia de energia dispersiva (EDS) (JEOL JSM-6010LA, Peabody, Massachusetts, USA) que é ligado ao MEV. Para a análise em EDS, três regiões diferentes de cada amostra foram avaliadas na ordem de $1\ \mu\text{m}^3$, utilizando os parâmetros de 5 Kv e 2,000× de magnificação (Matos et al., 2017). O EDS permite a caracterização semiquantitativa da composição química da amostra, por meio da mensuração da energia dos picos dos elementos, que é proporcional à quantidade de átomos. Quando o feixe de elétrons incide na amostra, há uma excitação dos átomos na superfície e, ao voltarem ao estado fundamental, há a emissão de fótons com energias características de cada átomo. Dessa forma, a identificação dos fótons em termos de energia e a contagem dos mesmos no detector de raios-X, localizado dentro da câmara de vácuo, permitem a identificação dos elementos, uma vez que o conjunto hardware e software do sistema adquire e gera o espectro relativo ao número de contagens em função da energia, em KeV, identificando os elementos químicos presentes nas amostras (Dedavid et al., 2007).

2.6. Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS)

A composição química da camada de óxido mais externa da superfície das amostras foi avaliada por meio da espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS) (K-alpha X-ray XPS, Thermo Scientific™, Vantaa, Helsíque, Finland), utilizando os parâmetros de 400 μm de spot size e 1,000 eV de step size (Takeuchi et al., 2005; Cordeiro et al., 2018). Para a análise em XPS, elétrons são ejetados na amostra por meio de uma fonte de radiação eletromagnética (elétrons de baixa energia [$E < 1,5\ \text{keV}$]). A distribuição de energia cinética dos fotoelétrons é baseada em picos determinados a partir das camadas eletrônicas dos átomos da superfície das amostras fotoionizadas. A energia de ligação dos picos fotoelétricos permite a identificação dos elementos presentes na superfície, sendo a intensidade, definida pela área do pico fotoelétrico, proporcional ao número de átomos, viabilizando essa identificação da composição química da amostra (Nascente, 1998).

2.7. Molhabilidade

A molhabilidade das diferentes superfícies avaliadas foi mensurada por meio do

ângulo de contato da água destilada, utilizando um goniômetro (Rame-Hart 100-00; Rame-Hart Instrument Co., Succasunna, NJ, USA) associado a um software (DROPImage Standard, Ramé-Hart Instrument Co., Succasunna, NJ, USA). O método da gota séssil foi utilizado e 10 mensurações foram realizadas para cada amostra após a deposição da gota séssil com o volume de 2 μ L. Para cada amostra foi feita a captura da imagem imediatamente após a deposição da gota séssil na superfície da amostra e obtido automaticamente por meio do software DROPImage Standard o ângulo de contato formado entre o líquido e a superfície avaliada. Neste estudo, o ângulo de contato das superfícies foi avaliado antes (UV-) e após a fotofuncionalização (UV+) (Marques et al., 2015). Em acréscimo, foi realizada a avaliação do ângulo de contato após a fotofuncionalização por um período total de 6 horas, com avaliações em intervalos de 1 hora de modo a analisar a degradação do status hidrofílico obtido após a fotofuncionalização. Para a análise da degradação do status hidrofílico as amostras foram mantidas no escuro em condições ambiente nos intervalos de 1 hora das avaliações.

3. Atividade fotocatalítica

Com o objetivo de avaliar o potencial de atividade fotocatalítica das superfícies de Ticp e tratadas por meio do PEO antes e após a fotofuncionalização foi realizado o teste da degradação do azul de metileno (AM) com base na técnica ISO (Loncar et al., 2009; Mills, 2012). A curva de calibração para o uso do espectrofotômetro foi realizada, utilizando (1) blank 1,5 mL (apenas água milli-Q), (2) 150 μ L de AM adicionados a 1,35 mL água milli-Q, (3) 375 μ L de AM adicionados a 1,125 mL água milli-Q, (4) 750 μ L de AM adicionados a 750 μ L água milli-Q, (5) 1,125 mL de AM adicionados a 375 μ L água milli-Q e (6) 1,5 mL de AM. Cada uma das soluções foi transferida para tubos eppendorfs, vortexada por 30 s e em seguida, 400 μ L de cada eppendorf foram transferidos para cubetas e realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro (DU 800 – Beckman Coulter, Brea, CA, USA) a 664 nm. Para a análise propriamente dita, as amostras do grupo controle não foram expostas à luz UV e as amostras experimentais foram previamente fotofuncionalizadas por 96 h. Imediatamente após o término da fotofuncionalização as amostras foram colocadas em placas de 24 poços contendo 2 mL da solução de trabalho de azul de metileno (P.A.C.I. 52.015, Synth, Diadema, SP, Brazil) e mantidas no escuro por 30 min previamente ao teste da pré-adsorção, no qual 400 μ L de cada poço foram transferidos para cubetas para a mensuração da absorbância em espectrofotômetro (DU 800 – Beckman Coulter, Brea, CA, USA) a 664 nm (Shiraishi et al., 2009). Em seguida, os discos foram transferidos para novas placas de 24 poços contendo 2 mL de solução de AM na concentração de 10 μ mol/L em cada poço. A degradação do AM foi

mensurada após os tempos de avaliação de 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h e 6 h para a observação da sobrevivência do potencial fotocatalítico de cada superfície, sendo as placas mantidas no escuro entre os intervalos de avaliação. Após cada tempo de avaliação a absorbância de 400 µL de cada poço foi mensurada por meio de espectrofotômetro (DU 800 – Beckman Coulter, Brea, CA, USA) a 664 nm, sendo a solução de cada cubeta recolocada em seu respectivo poço após a mensuração da absorbância (Mills, 2012). O cálculo da atividade fotocatalítica foi realizado de acordo com a equação:

$$\text{Atividade fotocatalítica (\%)} = [(c_0 - c)/c_0] \times [c_1/c_0] \times$$

A concentração da solução de AM é representada por c_0 , c é a concentração de AM em cada poço das amostras controle (UV-) e experimentais (UV+) e c_1 é a concentração de AM após o teste da pré-adsorção (Loncar et al., 2009; Pantaroto et al., 2018).

4. Adsorção da proteína albumina

Albumina do soro bovino (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foi utilizada como proteína modelo e sua adsorção nas diferentes superfícies avaliadas foi mensurada por meio do método do ácido bicinonínico (BCA Kit, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (Beline et al., 2016; Choi et al., 2017). As amostras controle não fotofuncionalizadas (UV-) e experimentais fotofuncionalizadas (UV+) foram incubadas em placas de 24 poços contendo 100 µg/mL de albumina em PBS (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) sob agitação horizontal a 75 rpm a 37°C por 2 h. Em seguida, as amostras foram lavadas em 1 mL de PBS três vezes para a remoção das proteínas não aderidas (Beline et al., 2016). As amostras foram transferidas para tubos criogênicos contendo 1 mL de PBS e sonicadas (Cup Horn 5.5 in. cup, Q500, Qsonica, Newtown, Connecticut, USA) a uma amplitude de 80% por 60 s. Os discos foram então vortexados por 60 s para a remoção das proteínas adsorvidas na superfície dos discos. Em seguida, em uma placa de 96 poços 150 µL da solução sonicada foi adicionada a 150 µL da mistura dos reagentes A e B do kit BCA. A placa foi então incubada por 1 h a 60 °C e posteriormente foi realizada a mensuração da absorbância em espectrofotômetro de placas a 562 nm (Multiskan, Thermo Scientific, Vantaa, Helsíque, Finland) de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração da proteína albumina foi calculada de acordo com a curva padrão preparada com a albumina do soro bovino (0,5–30 µg/mL de proteína) (Beline et al., 2016).

5. Ensaio microbiológico

5.1. Unidades formadoras de colônia (UFC)

Cepas de *Streptococcus sanguinis* (IAL 1832) foram crescidas em placas de brain heart infusion (BHI) ágar (Difco Laboratories, Becton, Dickinson and Company, Le Pont-de-Claix, Auvérnia-Ródano-Alpes, France) sob incubação a 10% CO₂ a 37°C. Em seguida, as bactérias foram inoculadas em tubos estéreis contendo 9 mL de BHI caldo e incubadas em período de overnight a 10% CO₂ a 37°C. Após o período de overnight, os tubos foram centrifugados (6000 g por 5 min a 4° C) e o precipitado foi ressuspendido em NaCl a 0,9% e centrifugado novamente (6000 g por 5 min a 4° C), sendo este processo repetido por mais duas vezes. A densidade óptica foi ajustada em OD = 1.00 ± 0.02 a 600 nm utilizando o espectrofotômetro (DU800 Beckman Coulter, Brea, CA, USA) para a obtenção da suspensão final de 10⁷ células/mL (Cordeiro et al., 2018).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba sob o número de protocolo 80684517.1.0000.5418/2017. Para a formação da película adquirida, saliva total humana estimulada por Parafilm M (Parafilm M, American Can Co., Neenah, WI, USA) foi coletada de dois voluntários saudáveis sem a predeterminação de sexo e faixa etária. A abordagem dos voluntários foi realizada na Faculdade de Odontologia de Piracicaba FOP/UNICAMP e desse modo houve a participação de grupo vulnerável. Os voluntários foram informados sobre os objetivos e a metodologia do estudo e os que aceitaram participar do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Os voluntários selecionados deveriam estar em jejum pelo período de 1,5 h antes da coleta da saliva e não poderiam ter feito uso de antibióticos, antissépticos bucais, antifúngicos ou qualquer medicamento que possa ter influenciado o fluxo salivar nos 3 meses prévios à realização da coleta das amostras de saliva (Cavalcanti et al., 2014). A saliva coletada foi centrifugada a 10000 g por 10 min a 4 °C e o sobrenadante foi filtrado em filtro com membrana de 0,22 µm (K15-1500, Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brazil). A saliva foi utilizada imediatamente após a coleta e a formação da película foi feita em placas de 24 poços contendo os discos em seus respectivos poços e 1 mL de saliva em cada poço que foram incubados por 30 min a 37°C sob agitação a 60 rpm (Pereira-Cenci et al., 2008). As amostras controle (UV-) e experimentais (UV+) foram previamente esterilizadas por radiação gama (14.5± 0.05 kGy; Cobalt-60, Gammacell 220, Atomic Energy of Canada Ltd., Ottawa, ON, Canada) (Soriano et al., 2006) e as amostras experimentais (UV+) passaram adicionalmente pela fotofuncionalização por 96 h antes do início do ensaio microbiológico.

Após a formação da película adquirida, os discos foram transferidos para nova placa de 24 poços e recobertos com 200 μL do inóculo de *Streptococcus sanguinis* e 1800 μL de BHI caldo e incubados a 10% CO_2 a 37°C por 1 h e 6 h. Após cada tempo de adesão, as amostras foram lavadas duas vezes em NaCl a 0,9% para a remoção das bactérias não aderidas e transferidas para tubos criogênicos contendo 3 mL de NaCl a 0,9%. Em seguida, os tubos criogênicos foram sonicados (7 W por 30 s) para a desagregação das bactérias da superfície dos discos e foi realizada a diluição, sendo uma alíquota de 0,1 mL de cada tubo criogênico diluído serialmente 5 vezes em NaCl 0,9% em tubos eppendorf. Após a diluição, uma alíquota de 20 μL de cada diluição foram plaqueados em duplicata em placas de BHI ágar e incubados a 10% CO_2 a 37 °C por 48 h. Em seguida foi feita a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) e os dados foram expressos em unidades formadoras de colônia por mL (\log_{10} UFC/mL) (Cordeiro et al., 2018).

5.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A estrutura e organização do biofilme após cada tempo de adesão 1 h e 6 h foi avaliada por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) (JEOL-JSM-5600LV, Peabody, Massachusetts, USA), utilizando os parâmetros de 15 kV e 5000 \times de magnificação. Previamente a análise em MEV, após os tempos de adesão de 1 h e 6 h, os discos foram lavados duas vezes em NaCl 0,9% e em seguida o biofilme foi fixado por meio da imersão em 1 mL de solução de Karnovsky (PBS, pH 7,2) durante 2 h. Após a fixação, o biofilme foi desidratado em banhos de etanol com concentrações crescentes (50%, 60%, 70%, 90% e três banhos em etanol a 100% durante 5 min cada banho). Os discos foram secos e pulverizados com ouro previamente a análise em microscopia eletrônica de varredura (Pereira-Cenci et al., 2006).

REFERÊNCIAS – APÊNDICE 1 METODOLOGIA DETALHADA*

- Barão VA, Mathew MT, Assunção WG, Yuan JC, Wimmer MA, Sukotjo C. The role of lipopolysaccharide on the electrochemical behavior of titanium. *J Dent Res*. 2011 May;90(5):613–8.
- Beline T, Marques I da SV, Matos AO, Ogawa ES, Ricomini-Filho APAP, Rangel EC, et al. Production of a biofunctional titanium surface using plasma electrolytic oxidation and glow-discharge plasma for biomedical applications. *Biointerphases*. 2016 Mar;11(1):11013.
- Cavalcanti IMG, Filho APR, Lucena-ferreira SC, Silva WJ, Leme AFP, Senna PM, et al. Salivary pellicle composition and multispecies biofilm developed on titanium nitrided by cold plasma. *Arch Oral Biol*. 2014 Jul;59(7):695–703.
- Chen X, Nouri A, Li Y, Lin J, Hodgson PD, Wen C. Effect of surface roughness of Ti, Zr, and TiZr on apatite precipitation from simulated body fluid. *Biotechnol Bioeng*. 2008 Oct;101(2):378–87.
- Choi S, Jeong W, Cha J, Lee J, Lee K-J, Yu H-S, et al. Effect of the ultraviolet light treatment and storage methods on the biological activity of a titanium implant surface. *Dent Mater*. 2017 Dec;33(12):1426–35.
- Cordeiro JM, Pantaroto HN, Paschoaleto EM, Rangel EC, Cruz NC d., Sukotjo C, et al. Synthesis of biofunctional coating for a TiZr alloy: Surface, electrochemical, and biological characterizations. *Appl Surf Sci*. 2018 Sep;452:268–78.
- Dedavid B, Gomes C, Machado G. *Microscopia Eletrônica de Varredura: aplicações e preparação de amostras - materiais poliméricos, metálicos e semicondutores*. Porto Alegre: EDIPUCRS; 2007.
- Faverani LP, Assunção WG, de Carvalho PSP, Yuan JC, Sukotjo C, Mathew MT, et al. Effects of dextrose and lipopolysaccharide on the corrosion behavior of a Ti-6Al-4V alloy with a smooth surface or treated with double-acid-etching. *PLoS One*. 2014 Mar;9(3):e93377.
- Harmankaya N, Igawa K, Stenlund P, Palmquist A, Tengvall P. Healing of complement

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

activating Ti implants compared with non-activating Ti in rat tibia. *Acta Biomater.* 2012 Sep;8(9):3532–40.

Lima S. Estudo da técnica de difração de raios X [trabalho de conclusão de curso – graduação]. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana; 2006.

Loncar ES, Radeka MM, Petrovi SB, Skapin AS. Determination of the photocatalytic activity of TiO₂ coatings on clay roofing tile substrates - Methylene Blue as model pollutant. *Acta Period Technol.* 2009 Jan;220:125–33.

Marques I da SV, Barão VAR, Cruz NC da, Yuan JC, Mesquita MF, Ricomini-Filho AP, et al. Electrochemical behavior of bioactive coatings on cp-Ti surface for dental application. *Corros Sci* . 2015 Nov;100:133–46.

Matos AO, Ricomini-filho AP, Beline T, Ogawa ES, Costa-oliveira BE, Almeida AB De, et al. Three-species biofilm model onto plasma-treated titanium implant surface. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2017. Apr;152:354–66.

Mills A. Environmental An overview of the methylene blue ISO test for assessing the activities of photocatalytic films. *Applied Catal B, Environ* 2012 Nov;128:144–9.

Mortara RA, Bonfim-Melo A, Lima BR, Pessoa CC, Toqueiro CMO, Bahia D, et al. Microscopia confocal por varredura a laser: fundamentos e métodos. *Biotecnologia aplicada à saúde.* 2015 Apr; 221-47.

Nascente PAP. Análise de Superfícies por espectroscopia de Elétrons. *Rev Bras Aplic Vácuo.* 1998;17(15):15-22.

Pantaroto HN, Ricomini-Filho AP, Bertolini MM, Dias da Silva JH, Azevedo Neto NF, Sukotjo C, et al. Antibacterial photocatalytic activity of different crystalline TiO₂ phases in oral multispecies biofilm. *Dent Mater.* 2018 Jul;34(7):e182–95.

Park K-H, Koak J-Y, Kim S-K, Han C-H, Heo S-J. The Effect of Ultraviolet-C Irradiation Via a Bactericidal Ultraviolet Sterilizer on an Anodized Titanium Implant: A Study in Rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2013 Jan-Feb;28(1):57–66.

Pereira-Cenci T, Deng DM, Kraneveld EA, Manders EMM, Del Bel Cury AA, Ten Cate JM, et al. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms

formed on different surfaces. Arch Oral Biol. 2008 Aug;53(8):755–64.

Pleskova SN, Golubeva IS, Verevkin YK. Bactericidal activity of titanium dioxide ultraviolet-induced films. Mater Sci Eng C. 2016 Feb;59:807–17.

Shiraishi K, Koseki H, Tsurumoto T, Baba K, Naito M, Shindo H. Antibacterial metal implant with a TiO₂-conferred photocatalytic bactericidal effect against Staphylococcus aureus. Surf Interface Anal. 2009 Nov;41(1):17–22.

Soriano I, Martín AY, Evora C, Sánchez E. Biodegradable implantable fluconazole delivery rods designed for the treatment of fungal osteomyelitis: influence of gamma sterilization. J Biomed Mater Res A. 2006 Jun;77(3):632–8.

Takeuchi M, Sakamoto K, Martra G, Coluccia S, Anpo M. Mechanism of photoinduced superhydrophilicity on the TiO₂ photocatalyst surface. J Phys Chem B. 2005 Aug;109(32):15422–8.

ANEXOS

ANEXO 1: Verificação de originalidade e prevenção de plágio

Dissertacao_CarolineDini			
RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE			
26%	16%	23%	4%
ÍNDICE DE SEMELHANÇA	FONTES DA INTERNET	PUBLICAÇÕES	DOCUMENTOS DOS ALUNOS
FONTES PRIMÁRIAS			
1	Jairo M. Cordeiro, Heloisa N. Pantaroto, Emanuella M. Paschoaleto, Elidiane C. Rangel et al. "Synthesis of biofunctional coating for a TiZr alloy: Surface, electrochemical, and biological characterizations", Applied Surface Science, 2018 Publicação		4%
2	repositorio.unicamp.br Fonte da Internet		2%
3	Heloisa N. Pantaroto, Antonio P. Ricomini-Filho, Martinna M. Bertolini, José H.D. Silva et al. "Antibacterial photocatalytic activity of different crystalline TiO ₂ phases in oral multispecies biofilm", Dental Materials, 2018 Publicação		2%
4	Thamara Beline, Isabella da Silva Vieira Marques, Adaias O. Matos, Erika S. Ogawa et al. "Production of a biofunctional titanium surface using plasma electrolytic oxidation and glow-discharge plasma for biomedical		2%

ANEXO 2: Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Papel da fotofuncionalização UVA na atividade fotocatalítica e antibacteriana do dióxido de titânio cristalino para aplicações em implantes dentários", CAAE 80684517.1.0000.5418, dos pesquisadores Caroline Dini e Valentim Adelino Ricardo Barão, satisfaz as exigências das resoluções específicas sobre ética em pesquisa com seres humanos do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde e foi aprovado por este comitê em 15/12/2017.

The Research Ethics Committee of the Piracicaba Dental School of the University of Campinas (FOP-UNICAMP) certifies that research project "The role of UVA-photofunctionalization in the photocatalytic and antibacterial activity of crystalline titanium dioxide for dental implant applications", CAAE 80684517.1.0000.5418, of the researcher's Caroline Dini and Valentim Adelino Ricardo Barão, meets the requirements of the specific resolutions on ethics in research with human beings of the National Health Council - Ministry of Health, and was approved by this committee on December, 15 2017.

Profa. Fernanda Miori Pascon

Vice Coordenador
 CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Jacks Jorge Junior

Coordenador
 CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo e a lista de autores aparecem como fornecidos pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
 Notice: The title and the list of researchers of the project appears as provided by the authors, without editing.

ANEXO 3: Comprovante de submissão do artigo científico

Dear Ms Dini,

Submission no: DEMA_2019_17

Submission title: UV-mediated photofunctionalization of biofunctional coating enhances the surface characteristics and biological properties of titanium

Corresponding author: Professor Valentim Barao

Listed co-author(s): Ms Caroline Dini, Professor Nilson Cruz, Dr Bruna Nagay, Dr. Antônio Pedro Ricomini Filho, Mr Jairo Cordeiro, Professor Elidiane Rangel

Professor Barao has submitted a manuscript to Dental Materials and listed you as a co-author. This email is to let you know we will be in contact with updates at each decision stage of the submission process.

The link below takes you to a webpage where you can sign in to our submission system using your existing Elsevier profile credentials or register to create a new profile. You will then have the opportunity to tailor these updates and view reviewer and editor comments once they become available.

http://www.evise.com/profile/api/navigate/DEMA?resourceUrl=%2Fco-author%2F%3Fdgcid%3Dinvite_email_coauthoroutreach01095641%23%2FDEMA%2Fsubmission%2FDEMA_2019_17&email=caroldini_odonto@hotmail.com&firstName=Caroline&surname=Dini&country=Brazil&institution=University+of+Campinas+%28UNICAMP%29&title=Ms

If you are not a co-author of this manuscript, please contact Researcher Support at: <https://service.elsevier.com>

Thank you very much for your submission and we will be in touch as soon as we have any news to share.

Dental Materials