



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE CTBMF E PERIODONTIA

RAFAELLA DA CRUZ POLIZELLI SCANNAVINO

Funcionalização de nanotopografia de titânio com extrato de bagaço de uva:  
caracterização de superfície e efeitos sobre a diferenciação osteogênica *in vitro*

Ribeirão Preto/SP

2021

RAFAELLA DA CRUZ POLIZELLI SCANNAVINO

**Funcionalização de nanotopografia de titânio com extrato de bagaço de uva: caracterização de superfície e efeitos sobre a diferenciação osteogênica *in vitro***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como requisito para obtenção do título de Mestre em Periodontia.

Área de concentração: Periodontia  
Orientador: Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira

Ribeirão Preto/SP

2021

## FICHA CATALOGRÁFICA

Scannavino, Rafaella da Cruz Polizelli

Funcionalização de nanotopografia de titânio com extrato de bagaço de uva: caracterização de superfície e efeitos sobre a diferenciação osteogênica *in vitro*

Ribeirão Preto – São Paulo, 2021.

**71p.**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Periodontia.

Orientador: Paulo Tambasco de Oliveira

1. Titânio; 2. Nanotopografia; 3. Funcionalização de superfície;  
4. Polifenóis; 5. Uva; 6. Osteoblastos

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Scannavino, Rafaella da Cruz Polizelli

**Funcionalização de nanotopografia de titânio com extrato de bagaço de uva: caracterização de superfície e efeitos sobre a diferenciação osteogênica *in vitro***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como requisito para obtenção do título de Mestre em Periodontia.

Aprovada em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / 2021

### **Banca Examinadora**

Prof. (a). Dr. (a).

\_\_\_\_\_  
Instituição:

\_\_\_\_\_  
Julgamento:

\_\_\_\_\_  
Assinatura:

Prof. (a). Dr. (a).

---

Instituição:

---

Julgamento:

Assinatura:

Prof. (a). Dr. (a).

---

Instituição:

---

Julgamento:

Assinatura:

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a Deus, por ser essencial em minha vida, autor do meu destino e guia. Aos meus pais e meus irmãos por estarem comigo em todos os momentos de minha vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, pela força e coragem durante toda esta caminhada.

Aos meus pais, por serem pilares da minha educação, guias da minha vida e por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos.

Aos meus irmãos, por sempre apoiarem meus sonhos e serem grandes incentivadores.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira, por toda a orientação e conhecimentos transmitidos nesse período.

Ao grupo de pesquisa do Politécnico de Torino, que me recebeu com muito profissionalismo e acolhimento. Em especial, professora Silvia Spriano e sua equipe em nome de Sarah Ferraris e Giacomo Riccucci pela orientação e parceria neste trabalho.

Ao Gabriel Lucio Calazans Duarte, pelo companheirismo, amizade e amor compartilhado no último ano deste trabalho. Por me incentivar a dar o meu melhor e por não me deixar desistir em nenhuma situação.

À minha grande amiga Diana Ramos, por ser minha companheira de apartamento durante o mestrado e por toda amizade, carinho e ajuda nos momentos bons e ruins.

À minha amiga Ligia Duarte, por ter sido minha companheira neste último ano. Na distância, me orientando e mandando energias positivas sempre.

Ao meu grande amigo Rodrigo Abuna, por sempre acreditar em mim, pela ajuda mútua em todos os momentos e pelo companheirismo.

À Daniela Ferreira Baquete, pela amizade, irmandade e confiança. Pela presença mesmo à distância e acolhimento em sua casa e coração com amor e sinceridade.

Aos meus colegas de mestrado: Diana, Larissa, Mariana, Lúcia, Ytalo e Rafael pelo companheirismo, amizade e incentivo.

Às minhas queridas amigas Amanda, Bruna e Isabele por estarem sempre comigo, vivendo os meus sonhos e compreendendo minhas ausências.

À Maria Isabel Gobbo Simonetti, pessoa mais que especial, que por todo esse tempo foi paciente e amiga em todos os momentos dentro da Universidade.

À família Ramadan, minha gratidão por terem acompanhado grande parte da minha vida profissional.

Às minhas tias Marli, Marcia, Maraiza e Marlene, por me acompanharem em toda vida, me dando amor, amizade, carinho e sempre torcendo pelo meu sucesso. Obrigada por cada oração direcionada a mim.

Aos professores e funcionários do Departamento de Cirurgia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da FORP- USP e do Laboratório de Cultura de Células, por toda ajuda durante o período de pós-graduação.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo,  
pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

Ao CNPq, pela bolsa de mestrado e pelo auxílio financeiro ao meu orientador  
(processo 308981/2016- 2).

À FAPESP, pelo auxílio à pesquisa regular ao meu orientador (processo  
2016/50298-4).

## RESUMO

A funcionalização de superfícies nanoestruturadas de implantes metálicos com moléculas orgânicas vem se destacando como estratégia importante para o controle de eventos biológicos que ocorrem na região interfacial durante o reparo ósseo. O objetivo do presente estudo foi avaliar, *in vitro*, a diferenciação osteogênica sobre titânio com nanotopografia (Ti-nano) funcionalizada com polifenóis (PPHE) obtidos de extrato de bagaço de uva. Superfícies de Ti-nano funcionalizadas com PPHE e seus controles foram caracterizadas por métodos de microscopia de fluorescência e eletrônica, conteúdo fenólico total, atividade antioxidante, molhabilidade e potencial zeta, e a diferenciação osteogênica, por imunofluorescência, viabilidade celular, expressão de marcadores chaves da diferenciação osteoblástica e mineralização da matriz extracelular. A nanotopografia de Ti foi obtida por meio de condicionamento químico de solução de ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio a 30 volumes (1:1). Células osteoblásticas da linhagem UMR-106 foram utilizadas para os experimentos com culturas de células. Os resultados mostraram que a funcionalização de Ti-nano com solução de extrato de bagaço de uva a 1 mg/mL permite a disponibilização de PPHE sobre sua superfície nanotopográfica de  $TiO_2$ , em quantidade e distribuição variadas na dependência do solvente utilizado, sendo mais abundante e menos inhomogênea com o meio de cultura. A presença de conteúdo orgânico rico em PPHE sobre Ti-nano foi confirmada por autofluorescência vermelha e MEV, atenuando os aspectos nanotopográficos da superfície do metal, e reduzindo a sua alta molhabilidade, como também por espectroscopia no UV-vis e atividade antioxidante. A análise do potencial zeta indicou que os PPHE eram estáveis sobre a superfície de Ti-nano, com a qual exibiam ligações eletrostáticas fracas. A interação de células UMR-106 com Ti-nano funcionalizado com solução de extrato de bagaço de uva a 0,01  $\mu\text{g/mL}$ , 1  $\mu\text{g/mL}$  ou 1 mg/mL resultou em tendência à maior atividade osteogênica para a maior concentração (1mg/mL), com valores menores de viabilidade celular, maiores de expressão de *Alp*, *Bsp* e *Col*, e menores de *Opn*. Em conclusão, a funcionalização de PPHE sobre nanotopografia de Ti pode favorecer a atividade osteogênica em sua superfície, com potencial para aplicações no desenvolvimento de implantes osseointegráveis.

**Palavras-chaves:** titânio, nanotopografia, funcionalização de superfície, polifenóis, uva, osteoblastos.

## ABSTRACT

The functionalization of organic molecules on nanostructured surfaces of metallic implants has been considered an important strategy for controlling biological events that occur at the interface during bone repair. The aim of the present study was to evaluate, *in vitro*, the osteogenic differentiation on a nanostructured titanium (Ti-nano) surface functionalized with polyphenols (PPHE) obtained from grape pomace extract. The PPHE-functionalized Ti-nano surface and its controls were characterized by fluorescence and electron microscopy methods, total phenolic content, antioxidant activity, wettability and zeta potential. The osteogenic differentiation was assessed by immunofluorescence, cell viability, mRNA expression of key osteoblast markers and extracellular matrix mineralization. The Ti-nano surface was obtained by etching with a mixture of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1:1). The UMR-106 osteoblastic cell line was used for the cell culture experiments. The results showed that the functionalization of Ti-nano with grape pomace extract solution at 1 mg/mL allows the availability of PPHE on its TiO<sub>2</sub> nanotopographic surface, in varying quantity and distribution depending on the solvent used, being more abundant and less inhomogeneous with the culture medium. The presence of organic content rich in PPHE on Ti-nano was confirmed by its red autofluorescence and SEM imaging, attenuating the nanotopographic features of the metal surface, and reducing its high wettability, as well as by UV-vis spectroscopy and antioxidant activity. The analysis of the zeta potential indicated that the PPHE were stable on the Ti-nano surface, with which they formed weak electrostatic bonds. The interaction of UMR-106 cells with the Ti-nano surface functionalized with grape pomace extract solution at 0.01 µg/mL, 1 µg/mL or 1 mg/mL resulted in a tendency towards greater osteogenic activity for the highest concentration (1mg/mL), with lower values of cell viability, higher expression of *Alp*, *Bsp* and *Col*, and lower of *Opn*. In conclusion, the functionalization of PPHE on Ti nanotopography can favor osteogenic activity on its surface, with potential for applications in the development of osseointegrated implants.

**Keywords:** titanium, nanotopography, surface functionalization, polyphenols, grape, osteoblasts.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de superfícies de Ti-polido (A-C), Ti-nano (D-F), Ti-nano/PPHE (G-I) e Ti-nano/meio/PPHE (J-L). Os aspectos micro e nanotopográficos das superfícies de Ti estão atenuados e/ou totalmente encobertos com a funcionalização com extrato de bagaço de uva, com deposição em maior quantidade sobre Ti-nano quando se utiliza o meio de cultura para diluição do extrato.

**Figura 2:** Microscopia de fluorescência de superfícies de Ti-nano (A), funcionalizadas com extrato de bagaço de uva diluído em meio de cultura destituído de vermelho de fenol (Ti-nano/meio/PPHE) (B) ou em solução inorgânica de TRIS/HCl + CaCl<sub>2</sub> [Ti-nano/PPHE (TRIS/HCl + CaCl<sub>2</sub>)] (C). Notem-se em (B) múltiplos agregados na microescala, coalescentes, com intensa autofluorescência vermelha. Filtro de excitação de 540 nm.

**Figura 3:** Curvas de reflectância de superfícies de Ti-nano funcionalizadas com extrato de bagaço de uva, utilizando-se como solvente, meio de cultura D-MEM.

**Figura 4:** Espectro de reflectância difusa de nanopartículas de dióxido de titânio.

**Figura 5:** Curvas de reflectância de superfícies de Ti-nano funcionalizadas com extrato de bagaço de uva, utilizando-se como solvente, meio de cultura D-MEM destituído de vermelho de fenol.

**Figura 6:** Curvas de reflectância de superfícies de Ti-nano funcionalizadas com extrato de bagaço de uva, utilizando-se como solvente, solução aquosa de TRIS/HCl + CaCl<sub>2</sub>.

**Figura 7:** Espectroscopia por energia dispersiva (EDS) das superfícies de Ti-polido, Ti-nano, Ti-nano/PPHE e Ti-nano/meio/PPHE.

**Figura 8:** Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) de superfícies de Ti-polido, Ti-nano, Ti-nano/meio e Ti-nano/meio/PPHE.

**Figura 9:** Curvas de potencial zeta em função do pH para superfícies de Ti-polido, Ti-nano e Ti-nano/PPHE.

**Figura 10:** Epifluorescência de células UMR-106 crescidas sobre superfícies de Ti-nano funcionalizadas com 0,01 µg/mL, 1 µg/mL e 1 mg/mL do extrato de bagaço de uva (PPHE), nos tempos de 3 e 7 dias de cultura. A fluorescência verde indica marcação do citoesqueleto de actina; a fluorescência vermelha, a de sialoproteína óssea (BSP); a fluorescência azul, a de núcleos celulares. Notem-se focos de matriz mineralizada BSP-positivos em I-L.

**Figura 11:** Viabilidade celular (MTT, densidade óptica) nos dias 3, 7 e 10 de culturas de células UMR-106 crescidas sobre superfícies de Ti-nano

funcionalizadas com solução do extrato de bagaço de uva a 0,01 µg/mL, 1 µg/mL e 1 mg/mL. As barras que compartilham a mesma letra não são significativamente diferentes entre si ( $p>0,05$ ).

**Figura 12:** Expressão relativa de RNA mensageiro para *Runx2* (A), *Alp* (B), *Bsp* (C), *Col* (D), *Oc* (E) e *Opn* (F) de células UMR-106 crescidas sobre superfícies de Ti-nano funcionalizadas com 0,01 µg/mL, 1 µg/mL e 1 mg/mL de PPHE no dia 5 de cultura. Os dados foram normalizados pelo GAPDH e o valor 1, atribuído ao grupo controle. As barras que compartilham a mesma letra não são significativamente diferentes entre si ( $p>0,05$ ).

**Figura 13:** Imagens macroscópicas de culturas de células UMR-106 crescidas sobre superfícies de Ti-nano funcionalizadas com 0,01 µg/mL, 1 µg/mL e 1 mg/mL de PPHE, nos dias 7 e 10 de cultura. As culturas foram coradas com vermelho de Alizarina para a detecção de depósitos de cálcio em áreas de formação de matriz mineralizada, distribuídas aleatoriamente pela superfície dos discos. Barra de escala = 3 mm.

**Figura 14:** Extração de vermelho de Alizarina em culturas de células UMR-106 crescidas sobre superfícies de Ti-nano funcionalizadas com 0,01 µg/mL, 1 µg/mL e 1 mg/mL de PPHE, nos dias 7 e 10 de cultura. Observa-se no dia 7 uma tendência de maior marcação pelo corante em culturas crescidas sobre superfícies funcionalizadas com a concentração de 1 mg/mL do extrato de bagaço de uva. As barras que compartilham a mesma letra não são significativamente diferentes entre si ( $p> 0,05$ ). As comparações entre períodos não foram realizadas.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Primers TaqMan para RT-qPCR

**Tabela 2:** Descrição e codificação das amostras avaliadas

**Tabela 3:** Conteúdo fenólico total sobre superfícies de Ti com nanotopografia funcionalizadas com extrato de bagaço de uva

**Tabela 4:** Medições dos ângulos de contato pelo método da gota séssil para as diferentes superfícies de Ti

**Tabela 5:** Atividade antioxidante em porcentagem

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ti- titânio

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>- ácido sulfúrico

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- peróxido de hidrogênio

PPHE- polifenóis

EDS- espectroscopia por energia dispersiva

FTIR- espectroscopia infravermelha por transformada de Fourier

DPPH- 1,1-defenil-2-picrilhidrozil

KCl- cloreto de potássio

%- porcentagem

µg- micrograma

µL- microlitro

µm- micrometro

ALP- fosfatase alcalina

A- ampère

ARS- vermelho de Alizarina S

BSP- sialoproteína óssea

cDNA- DNA complementar

cm<sup>2</sup>- centímetro quadrado

CO<sub>2</sub>- gás carbônico

DEPC- água tratada com dietil pirocarbonato

D-MEM- meio de Eagle Modificado por Dulbecco

DNA- ácido desoxirribonucleico

EDTA- ácido etilenodiamino tetra-acético

g- grama

GAPDH- gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

h- hora

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- peróxido de hidrogênio

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>- ácido sulfúrico

L- litro

M- molar

MEV- microscopia eletrônica de varredura

mg- miligrama

mg/kg- miligrama por quilograma

mg/mL- miligrama por mililitro

min- minuto

mL- mililitro

mm- milímetro

mM- milimolar

Ti-nano- titânio com nanotopografia

ng/mL- nanograma por mililitro

nm- nanometro

°C- grau Celsius

OC- osteocalcina

OPN- osteopontina

PB- tampão fosfato

PBS- tampão fosfato salina

PCR- reação em cadeia da polimerase

pH- potencial hidrogeniônico

RIN- número de integridade do RNA

RNA- ácido ribonucleico

RNA<sub>m</sub>- ácido ribonucleico mensageiro

RUNX2- fator de transcrição 2 relacionado ao Runt

s- segundo

T.A.- temperatura ambiente

COL- colágeno

# Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>2 PROPOSIÇÃO</b> .....	25
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	26
<b>3.1 Preparação e caracterização das superfícies de titânio</b> .....	26
3.1.1 Preparação das superfícies de titânio .....	26
3.1.2 Preparação das soluções para funcionalização das superfícies de Ti com nanotopografia .....	26
3.1.3 Conteúdo fenólico total .....	27
3.1.4 Microscopia e refletância por espectrofotometria .....	28
3.1.5 Molhabilidade .....	29
3.1.6 Atividade de eliminação de radicais livres .....	29
3.1.7 Potencial zeta.....	30
<b>3.2 Experimentos biológicos</b> .....	30
3.2.1 Cultura de células osteogênicas .....	30
3.2.2 Morfologia celular por microscopia de fluorescência .....	31
3.2.3 Avaliação da atividade mitocondrial/proliferação celular.....	32
3.2.4 Análise da expressão gênica de fosfatase alcalina ( <i>Alp</i> ), sialoproteína óssea ( <i>Bsp</i> ), colágeno ( <i>Col</i> ), osteocalcina ( <i>Oc</i> ), osteopontina ( <i>Opn</i> ), fator de transcrição relacionado ao <i>runx2</i> ( <i>Runx2</i> ) por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.....	33
3.2.5 Detecção e quantificação das formações de matriz mineralizada .....	36
3.2.6 Análise estatística .....	37
<b>4 RESULTADOS</b> .....	38
<b>4.1 Caracterização das superfícies de Ti</b> .....	38
4.1.1 Conteúdo fenólico total .....	38
4.1.2 Análises microscópicas e de reflectância por espectrofotometria .....	39
4.1.3 Molhabilidade .....	49
4.1.4 Atividade de eliminação de radicais livres .....	50
4.1.5 Potencial zeta.....	51
<b>4.2 Experimentos biológicos</b> .....	53
4.2.1 Morfologia celular por microscopia de fluorescência .....	53
4.2.2 Avaliação da atividade mitocondrial/proliferação celular.....	54
4.2.3 Expressão de <i>Runx2</i> , <i>Alp</i> , <i>Bsp</i> , <i>Col</i> , <i>Oc</i> e <i>Opn</i> por PCR em tempo real.....	55
4.2.4 Detecção e quantificação de formações de matriz mineralizada .....	56
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	58

<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	63
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	64
<b>8 APÊNDICES</b> .....	71
<i>APÊNDICE A - Cultura de células UMR-106 sobre poliestireno, expostas a diluições seriadas de extrato de bagaço de uva: aspectos macroscópicos de coloração com vermelho de Alizarina S, para detecção de depósitos de cálcio</i> .....	71
<i>APÊNDICE B - Cultura de células UMR-106 sobre poliestireno, expostas a diluições seriadas de extrato de bagaço de uva: extração bioquímica de vermelho de Alizarina S, para análise semiquantitativa de depósitos de cálcio</i> .....	71

## 1 INTRODUÇÃO

Os biomateriais metálicos são amplamente utilizados em aplicações médico-odontológicas devido à sua alta performance mecânica e resistência à corrosão. O principal material utilizado na engenharia biomédica é o titânio (Ti), puro ou em ligas. Algumas excelentes características como biocompatibilidade, osseointegração, propriedades mecânicas adequadas e alta resistência ao desgaste e corrosão fazem com que as recentes pesquisas na área sejam direcionadas ao desenvolvimento desses materiais e de suas superfícies.

Considerando a interação que existe entre os elementos teciduais e a superfície do biomaterial, algumas modificações em sua estrutura química e física com a finalidade de melhorar a sua biocompatibilidade e diminuir os riscos de reações inflamatórias peri-implantares vindo sendo propostas. Destacam-se, nessa estratégia, os revestimentos biofuncionais, constituídos de fatores de crescimento, proteínas e peptídeos da matriz extracelular e medicamentos (SMEETS *et al.*, 2016; FERRARIS *et al.*, 2020).

Entre as modificações físicas, a topografia de superfície dos implantes dentários, nas escalas macro-, micro- e nanométrica, é uma característica crucial para os fenômenos de adesão e diferenciação de osteoblastos durante a fase inicial da osseointegração, com efeitos também sobre outros tipos celulares que participam do reparo tecidual, bem como para a remodelação óssea a longo prazo (JUNKER *et al.*, 2009; VARIOLA *et al.*, 2011).

A rugosidade da superfície tem um papel vital na osseointegração, além de potencializar as propriedades biomecânicas, aumentando a retenção mecânica e proporcionando uma boa distribuição de tensões advindas da mastigação. A rugosidade ou topografia da superfície pode ser dividida em três

níveis/escalas: macro (em torno de 10  $\mu\text{m}$ ), micro (em torno de 1  $\mu\text{m}$ ) e nano (<200 nm) (DAMIATI *et al.*, 2018).

A macrotopografia é determinada pela geometria visível e design cônico de um implante, sendo considerada uma característica fundamental para um adequado desempenho clínico (COELHO *et al.*, 2015). Apesar disso, nos últimos anos, estudos têm priorizado o desenvolvimento de micro- e nanotopografias.

A microtopografia de Ti pode ser obtida por meio de tratamentos de superfície seguindo métodos de fabricação como usinagem, condicionamento ácido, anodização, jateamento de areia e diferentes procedimentos de revestimento. A presença de micro-rugosidades na superfície do implante permite a adesão, proliferação e diferenciação de células osteogênicas que são responsáveis pela produção de matriz óssea mineralizada, estabelecendo uma interface com a superfície do implante e, conseqüentemente, um maior contato osso-implante (BIC) (COELHO *et al.*, 2015).

Modificações topográficas na escala nanométrica são realizadas com o objetivo de aperfeiçoar a interação de moléculas e células com a superfície do implante, visando a obter desempenhos biomecânicos superiores. Os efeitos específicos da nanotopografia sobre diferentes funções celulares foram demonstrados em células epiteliais, fibroblastos, mastócitos, macrófagos, osteoblastos e células musculares (MENDONÇA *et al.*, 2008; MAXIMIANO *et al.*, 2018; ARIGANELLO *et al.*, 2018). Por exemplo, alterações na interação inicial proteína-superfície determinadas pela nanotopografia de um biomaterial modulam a adesão de osteoblastos a esta superfície, o que se constitui em aspecto fundamental no processo de osseointegração (BALASUNDARAM *et*

*al.*, 2006). Outra característica interessante de topografias em nanoescala é a seletividade da adesão celular. Pesquisadores já demonstraram a diminuição relativa da adesão de fibroblastos em comparação à de osteoblastos sobre superfícies estruturadas em micro- e nanoescala (VETRONE *et al.*, 2009). Adicionalmente, a literatura mostra que topografias na submicro- e nanoescala limitam a adesão bacteriana (QUIRYNEN; BOLLEN, 2005; VARIOLA *et al.*, 2014), ainda que o aumento da rugosidade de superfície pode estar associado ao maior potencial de formação de biofilmes (AL-RADHA *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, alguns tratamentos de superfície foram desenvolvidos e utilizados para o controle das respostas celulares e teciduais. De Oliveira e Nanci (2004) propuseram um tratamento de superfície de Ti por condicionamento com uma mistura de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) a 30 volumes à temperatura ambiente (TA), com subsequentes lavagens ultrassônicas com água destilada. Por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução, observou-se que este tratamento químico resultava na formação de uma textura única caracterizada por nanocavidades com diâmetro médio da ordem de 10-20 nm (YI *et al.*, 2006), com efeitos positivos em diversos aspectos relacionados à sinalização, diferenciação e função de osteoblastos, resultando em estímulos à formação de matriz óssea (DE OLIVEIRA *et al.*, 2007; ROSA *et al.*, 2014; KATO *et al.*, 2014; CASTRO-RAUCCI *et al.*, 2016; ABUNA *et al.*, 2019; BELLO *et al.*, 2020).

Estudos que buscam entender o processo da osseointegração obtiveram achados de que a aceleração deste processo pode estar associada a uma exacerbação do processo inflamatório. Assim, as pesquisas com biomateriais para implantação óssea buscam estimular o processo regenerativo/cicatrizal

de uma forma mais próxima à fisiológica. A funcionalização de superfícies com moléculas que atuam no controle dos processos imunoinflamatórios e de formação óssea surge como estratégia relevante. Nesse contexto, os polifenóis (PPHE) são moléculas candidatas importantes, considerando-se que estudos recentes mostram que exibem efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, antibacterianos e osteogênicos (SHAVANDI *et al.*, 2018). Ainda que os efeitos dos PPHE sobre a atividade de macrófagos têm sido amplamente estudados (DA CUNHA *et al.*, 2019), são relativamente limitados os estudos que avaliam seus efeitos sobre osteoblastos e a atividade osteogênica, particularmente quando disponibilizados sobre a superfície de biomateriais (TORRE *et al.*, 2020). Compostos orgânicos exógenos que possam induzir e estimular a sobrevivência, a proliferação, a diferenciação e a função de osteoblastos são importantes para a engenharia óssea, contribuindo para o processo de remodelação óssea mais próximo ao fisiológico nos períodos subsequentes ao reparo (PAPOUTSI *et al.*, 2008; SINGH *et al.*, 2012).

A uva apresenta um histórico importante e é apreciada de várias formas, como fruta, passas, suco e vinho. Contém vários nutrientes, como vitaminas, minerais, carboidratos, fibras comestíveis e fitoquímicos. Os PPHE são os fitoquímicos mais importantes na uva, por possuírem atividades biológicas e benefícios para a promoção da saúde (DA SILVA *et al.*, 1991; BRAVO, 1998; SHRIKHANDE, 2000; WADA *et al.*, 2007). Esses fitoquímicos são uma classe de compostos químicos constituídos de várias unidades de fenóis ( $C_6H_6O$ ), principalmente biossintetizados naturalmente por plantas e organismos marinhos dos quais são comumente extraídos. São divididos em quatro grupos principais, com base no número e na estrutura de ligação das unidades

fenólicas: flavonóides, estilbenos, lignanos e ácidos fenólicos, que possuem diferentes propriedades físicas, químicas e biológicas (NEVEU *et al.*, 2010). Os benefícios dos PPHE dietéticos na saúde humana são amplamente documentados, particularmente as propriedades antioxidantes e seu positivo efeito na prevenção de doenças, como as degenerativas, cardiovasculares, o diabetes e as neoplasias malignas (SUREDA *et al.*, 2014; AIRES; DELMAS, 2015; SILVA; POGAČNIK, 2020).

Pela possibilidade de obtenção de PPHE do bagaço de uva, com potenciais impactos acadêmicos, econômicos e sociais, um grupo multidisciplinar de pesquisadores europeus, com a colaboração de nosso grupo, vem desenvolvendo estratégias bem-sucedidas de disponibilização desses compostos orgânicos em superfícies de biomateriais bioativos clássicos para o tecido ósseo, visando primordialmente ao controle do processo imunoinflamatório e ao estímulo da atividade osteogênica durante o período de reparo, assim como ao de atividades antineoplásicas (SPRIANO *et al.*, 2019). Os resultados iniciais são promissores, indicando que os PPHE funcionalizados mantêm-se com atividade antioxidante e sua presença não altera a bioatividade do material sobre o qual é depositado.

## **2 PROPOSIÇÃO**

O objetivo do presente estudo foi avaliar, *in vitro*, os efeitos da funcionalização de nanotopografia de Ti com polifenóis obtidos de extrato de bagaço de uva sobre a diferenciação osteogênica. Mais especificamente, 1) caracterizar as superfícies de Ti nanoestruturadas e funcionalizadas com polifenóis em relação a seus aspectos microscópicos, conteúdo fenólico total, atividade antioxidante, molhabilidade e potencial zeta, e 2) avaliar a diferenciação osteogênica por análises microscópicas, de viabilidade celular, de expressão de marcadores chaves da diferenciação osteoblástica e de mineralização da matriz extracelular.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Preparação e caracterização das superfícies de titânio**

##### **3.1.1 Preparação das superfícies de titânio**

Discos de Ti comercialmente puro, grau 2, de 13 mm de diâmetro por 2 mm de altura (Realum, São Paulo, SP, Brasil), foram usinados, lixados em lixas de gramatura 320 e 600, lavados em ultrassom, tolueno e, em seguida, submetidos a condicionamento em solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 10 N e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30 volumes por 4 horas à T.A., sob agitação constante, para a obtenção de superfície com nanotopografia (YI *et al.*, 2006; DE OLIVEIRA *et al.*, 2007; VETRONE *et al.*, 2009). Em seguida, foram lavados em água destilada, autoclavados e secos ao ar, tornando-se adequados para os procedimentos de funcionalização de superfície.

##### **3.1.2 Preparação das soluções para funcionalização das superfícies de Ti com nanotopografia**

No dia anterior ao início dos experimentos com cultura de células, realizou-se a manipulação das solvências por meio de diluições seriadas para a funcionalização dos discos de Ti com superfície nanotopográfica. Partindo-se de uma solução estoque do extrato do bagaço de uva preparado pelo Conselho de Pesquisa Agropecuária e Análise da Economia Agrícola (CREA), em parceria com o Instituto Politécnico de Turim (POLITO), na concentração de 100 mg/mL, foram elaboradas soluções diluídas em meio de cultura constituído de D-MEM (Invitrogen) e penicilina-estreptomicina a 1% (Sigma-Aldrich), utilizadas para a funcionalização da nanotopografia de Ti nas concentrações de 0,01 µg/mL, 1 µg/mL e 1 mg/mL. Essas concentrações foram definidas com

base nos resultados de estudo piloto, que mostrou estímulo à diferenciação osteogênica quando as células cresciam na presença do extrato diluído em meio de cultura na concentração de 0,01 µg/mL (Apêndice A). Para o grupo controle, utilizou-se meio de cultura D-MEM e penicilina-estreptomicina a 1%. Os discos de Ti foram submersos em 1 mL de cada solução e mantidos *overnight* a 37 °C em atmosfera umidificada, contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico. Ao final desse período, os discos de Ti foram lavados com PBS a 37 °C (BUENO *et al.*, 2011).

Para as análises de caracterização de superfície, inclui-se um grupo em que o extrato de bagaço de uva era diluído em solução inorgânica de TRIS/HCl + CaCl<sub>2</sub>, selecionada porque atua como um tampão em pH 7,4. Nesse pH, os PPHE têm grupos OH desprotonados e exibem carga negativa. Na presença de íons cálcio, os PPHE desprotonados formam compostos orgânicos complexos, o que pode facilitar sua adsorção na superfície de Ti.

### **3.1.3 Conteúdo fenólico total**

A análise quantitativa da funcionalização dos PPHE nas superfícies de Ti foi realizada pelo método de estimativa de conteúdo fenólico total, utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu; o uso padrão deste reagente é para avaliação de amostras líquidas, porém foi desenvolvido um protocolo específico para avaliar amostras sólidas.

As amostras foram funcionalizadas por meio de 3 protocolos diferentes: em solução inorgânica TRIS/HCl + CaCl<sub>2</sub> (Ti-nano/PHHE), em meio de cultura de células com vermelho de fenol (D-MEM) e em meio de cultura de células sem vermelho de fenol (Ti-nano/meio/PPHE) para confirmar a eficácia da

adsorção de PPHE por meio de diferentes processos de funcionalização, principalmente com e sem a presença de aminoácidos. As amostras não funcionalizadas (Ti-nano) foram usadas como superfície controle para Ti-nano/PPHE, enquanto que o substrato embebido nos dois meios de cultura de células diferentes foi usado como referência para Ti-nano/meio/PPHE.

As amostras foram protegidas da luz e colocadas em frascos escuros, submersas em solução de 8 mL de água bidestilada, 0,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich), 1,5 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , por 2 horas à T.A. Após esse período, a solução foi transferida para um tubo apropriado e analisada em espectrofotômetro (UV-visible Spectrophotometer UV-2600, Shimadzu, Japão) com absorvância de 760 nm.

### **3.1.4 Microscopia e refletância por espectrofotometria**

A topografia de superfície dos discos de Ti foi observada e analisada por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FESEM, na sigla em inglês), utilizando-se microscópio GeminiSEM (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). O teste de refletância das amostras foi realizado em espectrofotômetro (UV-visible Spectrophotometer UV-2600, Shimadzu). As análises de espectroscopia por energia dispersiva de raios x (EDS) foram utilizadas para microanálise qualitativa e semiquantitativa de elementos químicos presentes na amostra. Para detecção por fluorescência dos PPHE funcionalizados sobre as superfícies de Ti, as amostras foram examinadas em microscópio confocal a laser (Axio Imager 2, Carl Zeiss) e as imagens adquiridas, processadas no software Zen (Carl Zeiss). Medições de espectroscopia infravermelha por transformada de Fourier (FTIR) (FT-IR, IR

Hyperion 2000, Alpha, Bruker Optics) foram realizadas para uma caracterização adicional da composição química da superfície e do grau de hidroxilação. Os espectros foram registrados nos comprimentos de onda de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ , no modo de reflexão.

### 3.1.5 Molhabilidade

As superfícies de Ti foram submetidas ao teste de molhabilidade estática, por meio da medição do ângulo de contato estático pelo método da gota séssil. Uma gota de água bidestilada ( $\gamma = 72 \text{ mN/m}$ ) era depositada sobre cada superfície em análise e sua forma, registrada por uma câmera (Misura, Expert System Solutions, Modena, Itália). As medidas de ângulo de contato foram determinadas pelo software Image J (versão 1.47).

### 3.1.6 Atividade de eliminação de radicais livres

A atividade antioxidante dos PPHE derivados do extrato do bagaço de uva foi avaliada, *in vitro*, pelo método de eliminação de radicais livres de uma solução contendo DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil). Os discos de Ti com nanotopografia não funcionalizados e funcionalizados com 1 mg/mL do extrato foram colocados em frascos escuros contendo 3 mL de solução DPPH a 0,1 mM e etanol por 4 horas à T.A., e a absorbância das soluções, medida a 515 nm. O ácido gálico foi usado como controle positivo.

A porcentagem de eliminação do radical DPPH (% RSA, *Radical Scavenging Activity*) foi calculada utilizando-se a fórmula:

$$\% \text{ RSA} \% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

em que  $A_0$  é a absorbância da solução DPPH sem as amostras, que é um valor de referência para o cálculo da absorbância máxima, e  $A_1$  é a absorbância obtida com as amostras.

### **3.1.7 Potencial zeta**

O potencial zeta é gerado quando um líquido é forçado a fluir diretamente através de um pequeno espaço formado por duas superfícies de amostra com pressão. O portador de carga anexado à camada dupla será removido. O potencial pode ser medido entre dois eletrodos. A medição do potencial zeta foi realizada usando um analisador eletrocinético comercial (Electrokinetic Analyzer/EKA, Anton Paar GmbH, Graz, Áustria). Para cada amostra, duas funções de valor potencial zeta/pH foram medidas em solução de KCl a 0,001M. Por razões estatísticas, quatro potenciais de fluxo foram medidos em cada valor de pH. O valor médio desses dados foi usado para calcular a função potencial zeta/pH.

## **3.2 Experimentos biológicos**

### **3.2.1 Cultura de células osteogênicas**

Células da linhagem UMR-106 (ATCC<sup>®</sup> CRL1661<sup>™</sup>, American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA), armazenadas em tubos criogênicos de 2 mL submersos em nitrogênio líquido, foram descongeladas e cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup> (Corning Inc. EUA), com 20 mL de meio de cultura Dubelcco's Modified Eagle Medium (D-MEM, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 10% de soro fetal bovino (Invitrogen) e 1% de penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Durante todo o tempo de cultivo, as

células eram mantidas a 37 °C em atmosfera umidificada, contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico, e os meios de cultura, trocados a cada 2 dias. Após a confluência de 80%, as células eram removidas dos frascos de cultura por meio de tratamento com EDTA a 1 mM (Gibco, Grand Island, NY, EUA) e tripsina a 0,25% (Gibco) e contadas em um contador de células automático (Countess™ Automated Cell Counter, Invitrogen). As células eram plaqueadas diretamente sobre uma das superfícies dos discos de titânio previamente posicionados em placas de 24 poços (Corning Inc.), na densidade de 10.000 células/poço, e cultivadas em meio osteogênico constituído por D-MEM (Invitrogen), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen), 2,2 mL de penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich), 5 µg/mL de ácido ascórbico e 7 mM de beta-glicerofosfato, e mantidas em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico. O crescimento das células sobre o poliestireno das placas era avaliado por observação no microscópio de fase invertido Axiovert 25 (Zeiss Inc., Göttingen, Alemanha).

### **3.2.2 Morfologia celular por microscopia de fluorescência**

Nos dias 3 e 7 de cultura, as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato (PB) a 0,1 M, em pH 7,2, por 10 minutos à T.A. Em seguida, as amostras foram processadas para imunofluorescência indireta como descrito por de Oliveira e Nanci (2004). A permeabilização foi realizada com solução de Triton X-100 a 0,5% em PB por 10 minutos, seguida de bloqueio com leite desnatado a 5% em PB por 30 minutos. Para a marcação das células osteoblásticas, utilizou-se anticorpo primário para sialoproteína óssea (BSP, na sigla em inglês) (1:200, WVID1-9C5, Developmental Studies

Hybridoma Bank – DSHB, Iowa City, IA, EUA), seguido de anticorpo secundário conjugado com fluoróforo Alexa Fluor 594 (fluorescência vermelha; 1:200, Molecular Probes, EUA) em mesma solução de faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (fluorescência verde; 1:200, Molecular Probes), usada para visualização do citoesqueleto de actina. As incubações foram realizadas em atmosfera úmida por 60 minutos à T.A. Entre as incubações, as amostras foram lavadas 3 vezes em PB, por 5 minutos cada. Antes da montagem para observação microscópica, os núcleos celulares foram marcados com DAPI (Molecular Probes) a 300 nM por 5 minutos e as amostras, em seguida, lavadas rapidamente com água deionizada. Os discos de Ti foram montados em lâminas de vidro Fisherbrand e sobre os discos, colocadas lamínulas de vidro de 12 mm (Fisher Scientific) com meio de montagem anti-fade Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA). As amostras foram examinadas utilizando microscópio de fluorescência Leica modelo DMLB (Leica, Bensheim, Alemanha), acoplado a uma câmera digital Leica DC 300F e as imagens adquiridas, processadas com o programa Adobe Photoshop CS5.1 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, EUA).

### **3.2.3 Avaliação da atividade mitocondrial/proliferação celular**

Aos 3, 7 e 10 dias de cultura, a proliferação celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico MTT {brometo de [3-(4,5-dimetilitiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolol]} (Sigma), que é baseado na clivagem de sal de tetrazólio, reduzido por proteinases mitocondriais ativas apenas em células viáveis (Mosman, 1983). Após remoção do meio de cultura, as células foram incubadas com meio osteogênico + MTT a 10 % por 4 horas a 37 °C, em

atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico. Decorrido este período, o meio de cultura foi removido dos poços e, em seguida, adicionado 1 mL de solução de isopropanol ácido (Merck, Darmstadt, Alemanha) em cada poço sob agitação de 5 minutos, para a solubilização completa do precipitado formado. Alíquotas de 150 µL foram transportadas para uma placa de 96 poços para leitura em espectrofotômetro (µQuant, BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, EUA) em comprimento de onda de 570 nm.

#### **3.2.4 Análise da expressão gênica de fosfatase alcalina (*Alp*), sialoproteína óssea (*Bsp*), colágeno (*Col*), osteocalcina (*Oc*), osteopontina (*Opn*), fator de transcrição relacionado ao *runt* (*Runx2*) por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real**

A expressão dos genes *Alp*, *Bsp*, *Col*, *Oc*, *Opn* e *Runx2* foi avaliada por PCR em tempo real no dia 5 de cultura. O meio de cultura foi removido de todos os poços da placa contendo os discos de Ti e, posteriormente, foi adicionado 1 mL do reagente Trizol (Invitrogen) no primeiro poço e efetuou-se a homogeneização para propiciar a lise celular. Essa mistura foi deslocada para o poço seguinte até o último poço de cada grupo avaliado. As amostras foram mantidas à T.A. durante 15 minutos e armazenadas no freezer a -20 °C por, no mínimo, 24 horas. Passado esse período, para cada suspensão de Trizol foram adicionados 200 µL de clorofórmio (Merck, Darmstadt, HE, Alemanha). Os tubos foram agitados manualmente por 30 segundos e mantidos no gelo durante 5 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 4 °C a 10.500 rpm (AccuSpin Micro R, Fisher Scientific, Pittsburgh,

PA, EUA) e a fase aquosa (superior), coletada em novos tubos de 1,5 mL. Foram adicionados, às amostras, 250 µL de etanol a 96% (Merck) e, em seguida, centrifugadas em colunas de sílica gel presentes no kit SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, EUA). A solução amostra/etanol foi agitada cuidadosamente e transferida para uma nova coluna de sílica gel. Foram adicionados tampões específicos, intercalados por centrifugações breves de 15 segundos a 10.500 rpm cada. Após várias lavagens com diferentes tampões, as amostras de ácido ribonucleico (RNA) foram eluídas em água livre de RNase e armazenadas a -80 °C, até a confecção do DNA complementar (cDNA). Em seguida, o RNA total foi quantificado em diferentes comprimentos de onda (260, 280, 230 e 320 nm) em espectrofotômetro GeneQuant 1300 (GE Healthcare, Fairfield, CT, EUA). Sua integridade foi avaliada por meio do aparelho Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). A integridade do RNA foi verificada a partir de 100 ng do RNA total, seguindo as instruções do fabricante, sendo que valores de RIN (sigla em inglês para *RNA integrity number*) superiores a 8 foram considerados adequados (FLEIGE; PFAFFL, 2006; SCHROEDER *et al.*, 2006). Para confecção do cDNA, foi utilizado 1 µg de RNA total por reação de transcrição reversa utilizando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Em um tubo de 200 µL foram adicionados 1 µg de RNA total diluído em um volume final de 10 µL livre de RNases, 2 µL de *reverse transcriptase buffer*, 0,8 µL de deoxinucleotídeo (dNTP), 2 µL de *random primer*, 1 µL de *MultiScribe™ reverse transcriptase*, 1 µL de *RNAse inhibitor* e 3,2 µL de água DEPC (Acros Organics, Waltham, MA, EUA), para um volume final de 20 µL/reação. Em

seguida, as amostras foram incubadas em termociclador Master Cycler Gradiente (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha) a 25 °C por 10 minutos, 37 °C por 120 minutos, 85 °C por 5 minutos e, posteriormente, resfriadas a 4°C. Ao final da reação de transcrição reversa, as amostras de cDNA foram estocadas em freezer a -20 °C. Para a reação de PCR em tempo real, foram utilizadas sondas TaqMan<sup>®</sup> (Applied Biosystems) para os genes *Alp*, *Bsp*, *Col*, *Oc*, *Opn* e *Runx2* (Tabela 1), sendo as reações feitas no aparelho StepOne Plus (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA). As reações foram realizadas em triplicata, utilizando 5 µL de Taqman<sup>®</sup> Gene Expression Master Mix, 0,5 µL de Taqman<sup>®</sup> Gene Expression Master Mix (Sondas + Primers) e 4,5 µL de cDNA (11,25 ng), para um volume final de 10 µL/reação. As reações de amplificação consistiram em 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C, quarenta ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C (desnaturação e extensão). Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (*cicle threshold* ou ciclo limiar), sendo esse o ponto correspondente ao número de ciclos em que a amplificação das amostras atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras) que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. Como controle endógeno, foi avaliada a expressão do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH, na sigla em inglês). Uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada sonda Taqman<sup>®</sup> utilizada. O método comparativo de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  foi utilizado para comparar a expressão gênica das células dos diferentes grupos experimentais (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

**Tabela 1.** Primers TaqMan para RT-qPCR

<b>Gene</b>	<b>Gene name</b>	<b>Identification</b>
<i>Runx2</i>	Runt-related transcription factor 2 ( <i>Runx2</i> )	Rn01512298_m1
<i>Alpl</i>	Alkaline phosphatase ( <i>Alp</i> )	Rn01516028_m1
<i>Ibsp</i>	Integrin binding sialoprotein (Bone sialoprotein, <i>Bsp</i> )	Rn00561414_m1
<i>Spp1</i>	Secreted phosphoprotein 1 (Osteopontin, <i>Opn</i> )	Rn00681031_m1
<i>Bglap</i>	Bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein (Osteocalcin, <i>Oc</i> )	Rn00566386_g1
<i>Col1a1</i>	Collagen type 1 alpha 1 ( <i>Col</i> )	Rn01523366_m1
<i>Gapdh</i>	Glyceraldeyde-3-phosphaste dehydrogenase ( <i>Gapdh</i> )	Rn01775763_g1

### 3.2.5 Detecção e quantificação das formações de matriz mineralizada

Para a análise da formação de matriz mineralizada, nos dias 7 e 10 de cultivo celular, as culturas foram lavadas em solução de Hanks, fixadas em etanol a 70% a 4 °C por 1 hora e, em seguida, lavadas em PBS e água deionizada. As culturas foram, então, coradas com vermelho de Alizarina a 2%, pH 4,2, à T.A. por 15 minutos, lavadas em PBS e água deionizada e levadas a secar à T.A. As imagens foram obtidas digitalmente com câmera Canon EOS Digital Rebel, sensor de 6.3 Megapixel CMOS, com lentes macro Canon EF 100 mm f/2.8 (Canon, Lake Success, NY, EUA). A análise quantitativa do acúmulo de cálcio foi realizada pelo método descrito por Gregory *et al.* (2004). Em cada poço, adicionaram-se 280 µL de ácido acético a 10%, e as placas de cultura foram agitadas por 30 minutos. A camada de células foi raspada e a solução, transferida para tubos de 1,5 mL para, prontamente, serem agitadas em vortex por 30 segundos. As amostras foram aquecidas a 85 °C por 10 minutos, resfriadas em gelo por 5 minutos e centrifugadas a 13.000 rpm

durante 20 minutos. Em seguida, foram transferidos 100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante de cada amostra, para cada poço da placa de 96 poços e adicionados 40  $\mu\text{L}$  de hidróxido de amônio a 10%. A leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro ( $\mu\text{Quanti}$ ), em comprimento de onda de 405 nm.

### **3.2.6 Análise estatística**

Os dados quantitativos obtidos com os experimentos de cultura de células foram submetidos aos testes de aderência à curva normal e homogeneidade de variâncias. Constatada a normalidade da distribuição amostral, foi aplicada a análise de variância (ANOVA), a um ou dois fatores de variação, seguida de pós-teste de Tukey. O nível de significância foi estabelecido em 5%.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização das superfícies de Ti

Os resultados de caracterização das superfícies de Ti com nanotopografia funcionalizadas com extrato de bagaço de uva estão apresentados sequencialmente nos itens 4.1.1 a 4.1.5. A Tabela 2 apresenta os grupos avaliados.

**Tabela 2.** Descrição e codificação das amostras avaliadas

N	Material				Nomenclatura
	Titânio-Polido	Titânio-Nanotopografia	PPHE	Meio de Cultura	
1	X				Ti-polido
2		X			Ti-nano
3		X	X		Ti-nano/PPHE (TRIS/HCl+CaCl <sub>2</sub> )
4		X		X	Ti-nano/meio
5		X	X	X	Ti-nano/meio/PPHE

#### 4.1.1 Conteúdo fenólico total

A Tabela 3 mostra a concentração de PPHE em unidades GAE (mg/mL), o que representa que uma atividade redox análoga foi detectada em solução com essa concentração de ácido gálico, um polifenol simples frequentemente usado como molécula modelo. Nota-se que a concentração de PPHE é maior após o processo de funcionalização em todos grupos. Os PPHE estão presentes na nanotopografia de Ti e são capazes de manter sua atividade após a adsorção. Além disso, é evidente que a diluição do extrato de bagaço de uva em meio de cultura aumenta a precipitação de PPHE sobre a superfície de Ti, e esse fenômeno se potencializa na ausência de vermelho de fenol.

**Tabela 3.** Conteúdo fenólico total sobre superfícies de Ti com nanotopografia funcionalizadas com extrato de bagaço de uva

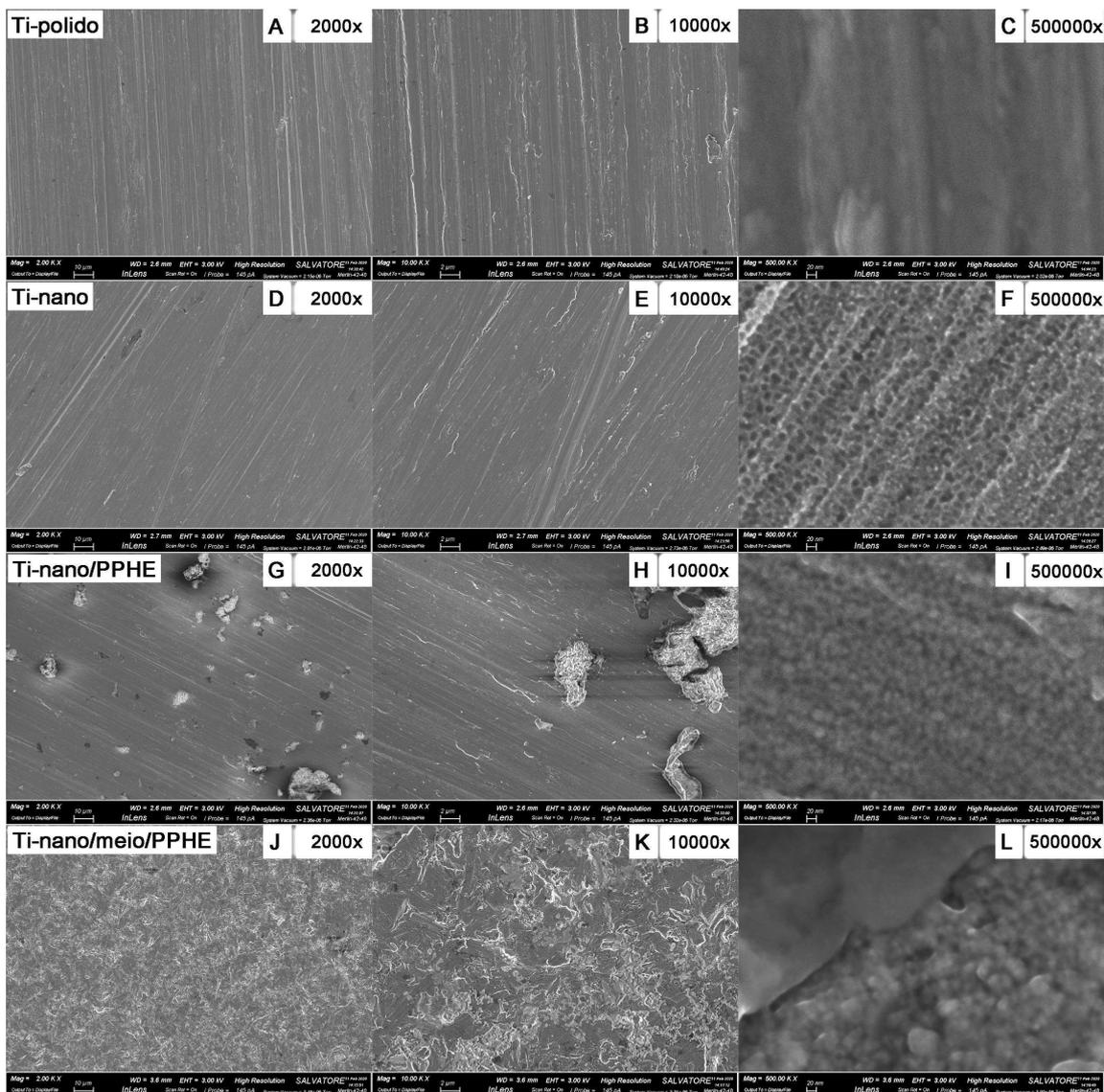
Amostras	Unidades de GAE	Desvio Padrão
Ti-nano	0 <sup>§</sup>	-
Ti-nano/PPHE (TRIS/HCl+CaCl <sub>2</sub> )	0.0020	0.0008
Ti-nano/meio (sem vermelho de fenol)	0 <sup>§</sup>	-
Ti-nano/meio/PPHE (sem vermelho de fenol)	0.0136 <sup>§§</sup>	0.0005
Ti-nano/meio (com vermelho de fenol)	0.0011 <sup>§</sup>	-
Ti-nano/meio/PPHE (com vermelho de fenol)	0.0082	0.0025

<sup>§</sup> Apenas uma amostra avaliada

<sup>§§</sup> O resultado de uma amostra não foi considerado, por estar fora do intervalo

#### 4.1.2 Análises microscópicas e de reflectância por espectrofotometria

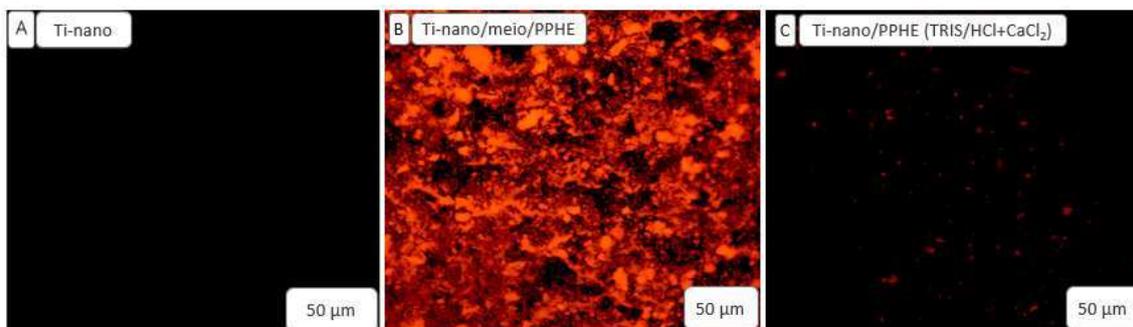
A MEV revelou que as superfícies de Ti-polido apresentavam-se com riscos lineares contínuos e paralelos entre si, decorrentes do tratamento de polimento, sem aspectos adicionais relevantes na nanoescala (Figura 1, A-C). Para as superfícies de Ti-nano, as ranhuras lineares se mantinham, mas com aspectos adicionais característicos de concavidades na nanoescala que as diferiam das superfícies de Ti-polido (Figura 1, D-F). Após o processo de funcionalização de Ti-nano com extrato de bagaço de uva, em meio aquoso inorgânico de TRIS/HCl+CaCl<sub>2</sub> (Ti-nano/PPHE) (Figura 1, G-I) ou em meio de cultura (Ti-nano/meio/PPHE) (Figura 1, J-L), notaram-se alterações topográficas na micro e na nanoescala, caracterizadas pela deposição de aglomerados de PPHE, de dimensões variando entre 1 e 8 µm, e por um preenchimento parcial das nanocavidades, respectivamente. Os aglomerados de PPHE apresentavam-se em maior quantidade quando a funcionalização ocorria em meio de cultura.



**Figura 1.** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de superfícies de Ti-polido (A-C), Ti-nano (D-F), Ti-nano/PPHE (G-I) e Ti-nano/meio/PPHE (J-L). Os aspectos micro e nanotopográficos das superfícies de Ti estão atenuados e/ou totalmente encobertos com a funcionalização com extrato de bagaço de uva, com deposição em maior quantidade sobre Ti-nano quando se utiliza o meio de cultura para diluição do extrato.

Os resultados da análise por microscopia de fluorescência são apresentados na Figura 2. Notou-se intensa autofluorescência vermelha sobre superfícies de Ti-nano quando o extrato de bagaço de uva era funcionalizado por diluição em meio de cultura destituído de vermelho de fenol (Ti-nano/meio/PPHE). O sinal de fluorescência nesse grupo, associado a múltiplos agregados na microescala, era bem mais intenso se comparado ao de Ti-

nano/PPHE (TRIS/HCl + CaCl<sub>2</sub>), com agregados de PPHE apenas ocasionais. Superfícies de Ti-nano não funcionalizadas não exibiram sinais de autofluorescência detectáveis.



**Figura 2.** Microscopia de fluorescência de superfícies de Ti-nano (A), funcionalizadas com extrato de bagaço de uva diluído em meio de cultura destituído de vermelho de fenol (Ti-nano/meio/PPHE) (B) ou em solução inorgânica de TRIS/HCl + CaCl<sub>2</sub> [Ti-nano/PPHE (TRIS/HCl + CaCl<sub>2</sub>)] (C). Notem-se em (B) múltiplos agregados na microescala, coalescentes, com intensa autofluorescência vermelha. Filtro de excitação de 540 nm.

A presença de biomoléculas adsorvidas nas superfícies de Ti-nano foi avaliada por espectroscopia de UV-vis (Figura 3). Uma esfera integradora foi usada para obter espectro de reflectância difuso, uma vez que as amostras testadas não são planas e refletem a luz em diferentes direções. O Ti-polido possui, como esperado, uma alta reflectância, no UV entre 200-380 nm e, de forma maior, nas faixas de comprimento de onda visível (380-780 nm). Uma ampla absorção, evidenciada como uma região com menor reflectância, ocorre na faixa próxima do UV. Quando a superfície do metal é coberta por compostos orgânicos, como proteínas e/ou PPHE, espera-se que a reflectância seja reduzida em todas as faixas exploradas de comprimentos de onda. Além disso, uma absorção específica (menor reflectância) pode ser esperada no comprimento de onda correspondente às transições eletrônicas específicas dos

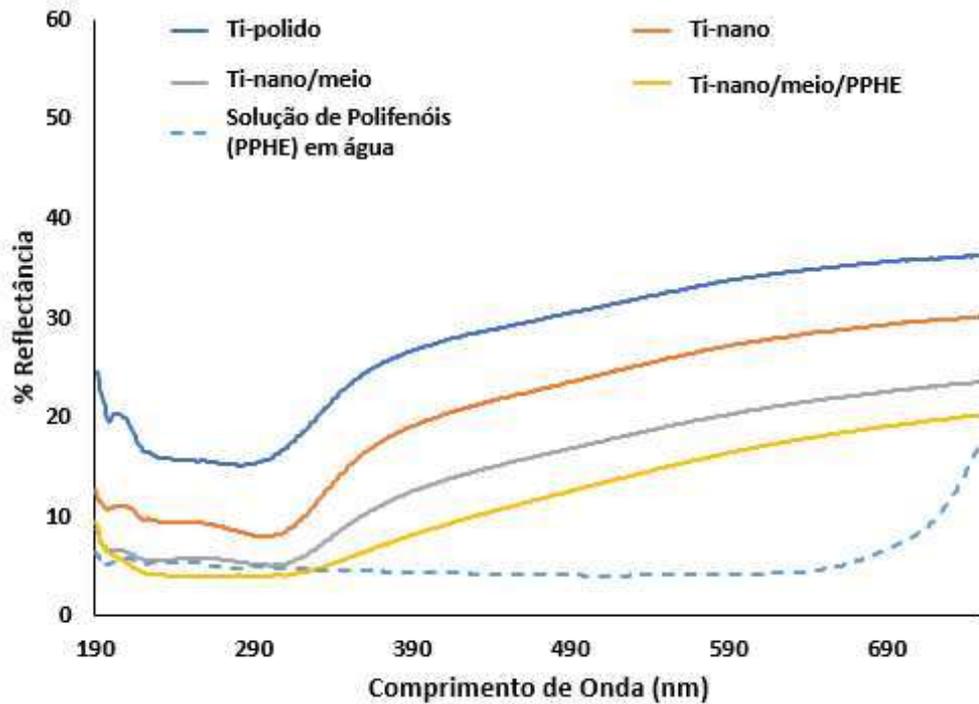
grupos funcionais típicos dos compostos orgânicos adsorvidos por causa de um efeito de absorção.

Com o objetivo de verificar os efeitos dos diferentes processos de funcionalização dos PPHE (Figura 3), as seguintes amostras foram comparadas: superfície de Ti-nano funcionalizada com PPHE usando D-MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), superfície de Ti-nano apenas embebida em D-MEM e superfície de Ti-polido. A curva obtida para os PPHE dissolvidos em água foi utilizada como referência. Uma comparação análoga foi realizada entre as amostras funcionalizadas com PPHE ou apenas embebidas em DMEM destituído de vermelho de fenol. Nesse caso, o uso de meio com vermelho de fenol não interfere na medida.

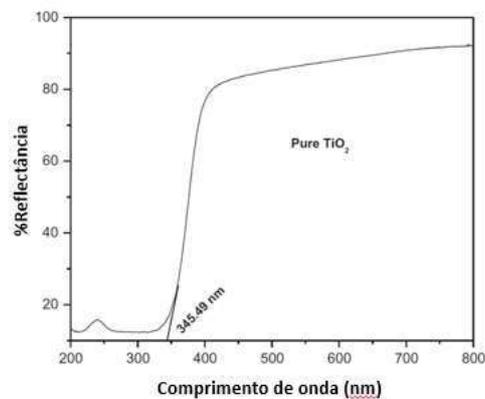
Avaliando a Figura 4, o espectro detectado foi próximo ao relatado na literatura para dióxido de Ti ( $\text{TiO}_2$ ) por PRAVEEN *et al.* (2014), porque até mesmo a superfície de Ti polida é coberta por uma fina camada de titânia. Como esperado, Ti-nano apresentou uma reflectância mais baixa do que a superfície polida em toda a faixa de comprimentos de onda. Isso ocorre devido à formação de uma camada de óxido fina e nanotexturizada na superfície de Ti durante o tratamento químico para a obtenção de Ti-nano. A superfície Ti-nano/meio apresentou um espectro com reflectância ainda mais baixa do que a de Ti-nano devido à presença de compostos orgânicos adsorvidos na camada de óxido superficial por imersão da amostra em meio de cultura.

Os resultados mostraram que o espectro de Ti-nano/meio/PPHE não se sobrepõe ao espectro de Ti-nano/meio. O Ti-nano/meio/PPHE tem uma reflectância ainda mais baixa e um formato de curva diferente, o que confirma a presença de PPHE na superfície. Além disso, deve-se notar que os ácidos

fenólicos e flavonóides têm uma absorção específica na faixa de 270-330 nm. O platô da curva de Ti-nano/meio/PPHE na faixa de 200 a 330 nm pode ser atribuído, portanto, à absorção específica de PPHE nesta faixa.

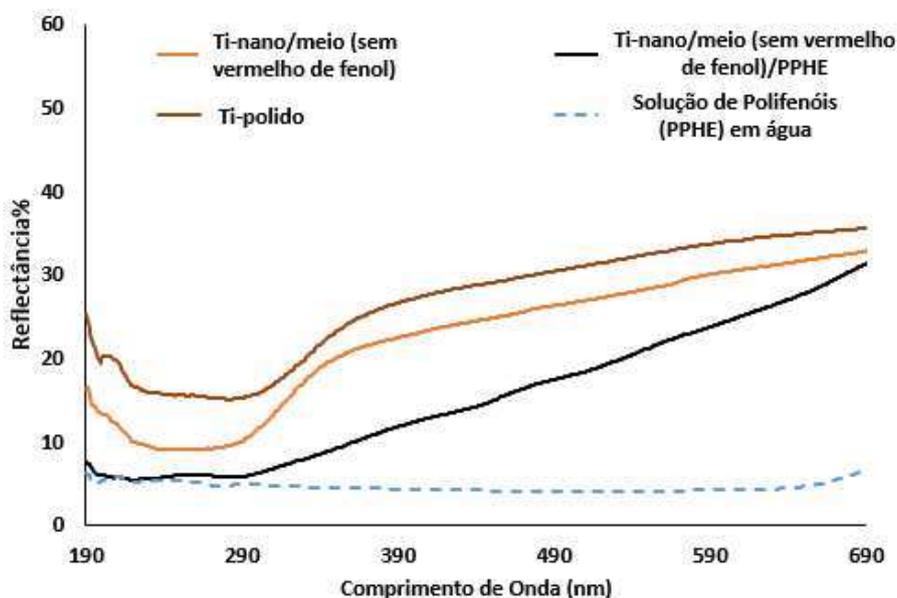


**Figura 3.** Curvas de reflectância de superfícies de Ti-nano funcionalizadas com extrato de bagaço de uva, utilizando-se como solvente, meio de cultura D-MEM.



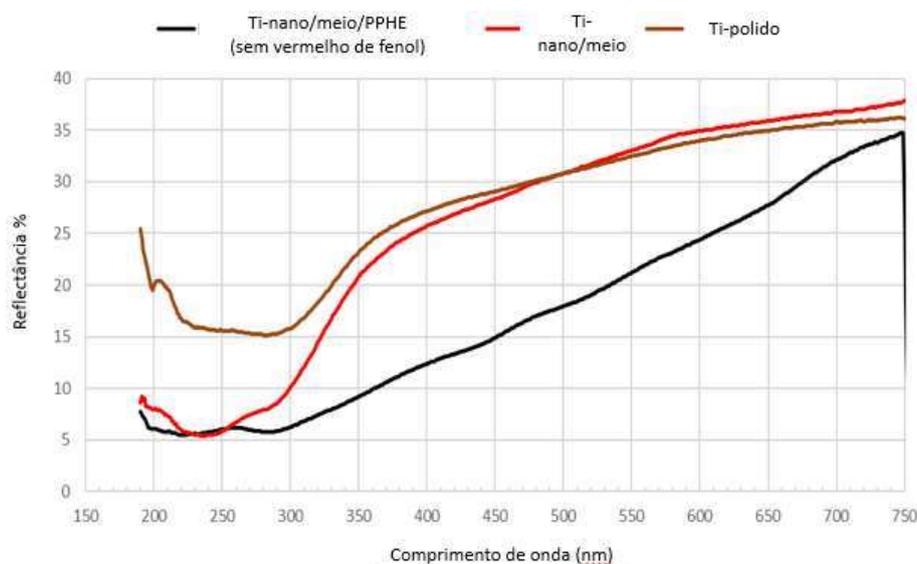
**Figura 4.** Espectro de reflectância difusa de nanopartículas de dióxido de titânio.

Uma comparação semelhante utilizando amostras funcionalizadas ou embebidas em meio de cultura destituído de vermelho de fenol foi realizada e é apresentada na Figura 5. A tendência é semelhante, mesmo que a reflectância da amostra embebida no meio sem vermelho de fenol seja ligeiramente maior do que a amostra correspondente embebida no meio com vermelho de fenol (Ti-nano/meio, relatado na Figura 3) pelo motivo da adsorção diminuída de compostos orgânicos do meio de cultura na ausência de vermelho de fenol. Além disso, a forma das curvas, na região próxima do UV, das amostras de Ti-nano/meio, respectivamente relatadas nas Figuras 3 e 5, é discretamente diferente. Ao se analisar a curva de Ti-nano/meio/PPHE, novamente a presença dos PPHE é confirmada pela alteração do espectro em relação à amostra apenas embebida no mesmo meio, com algumas pequenas diferenças em relação à amostra Ti-nano/meio/PPHE relatada na Figura 3 (meio com vermelho de fenol).



**Figura 5.** Curvas de reflectância de superfícies de Ti-nano funcionalizadas com extrato de bagaço de uva, utilizando-se como solvente, meio de cultura D-MEM destituído de vermelho de fenol.

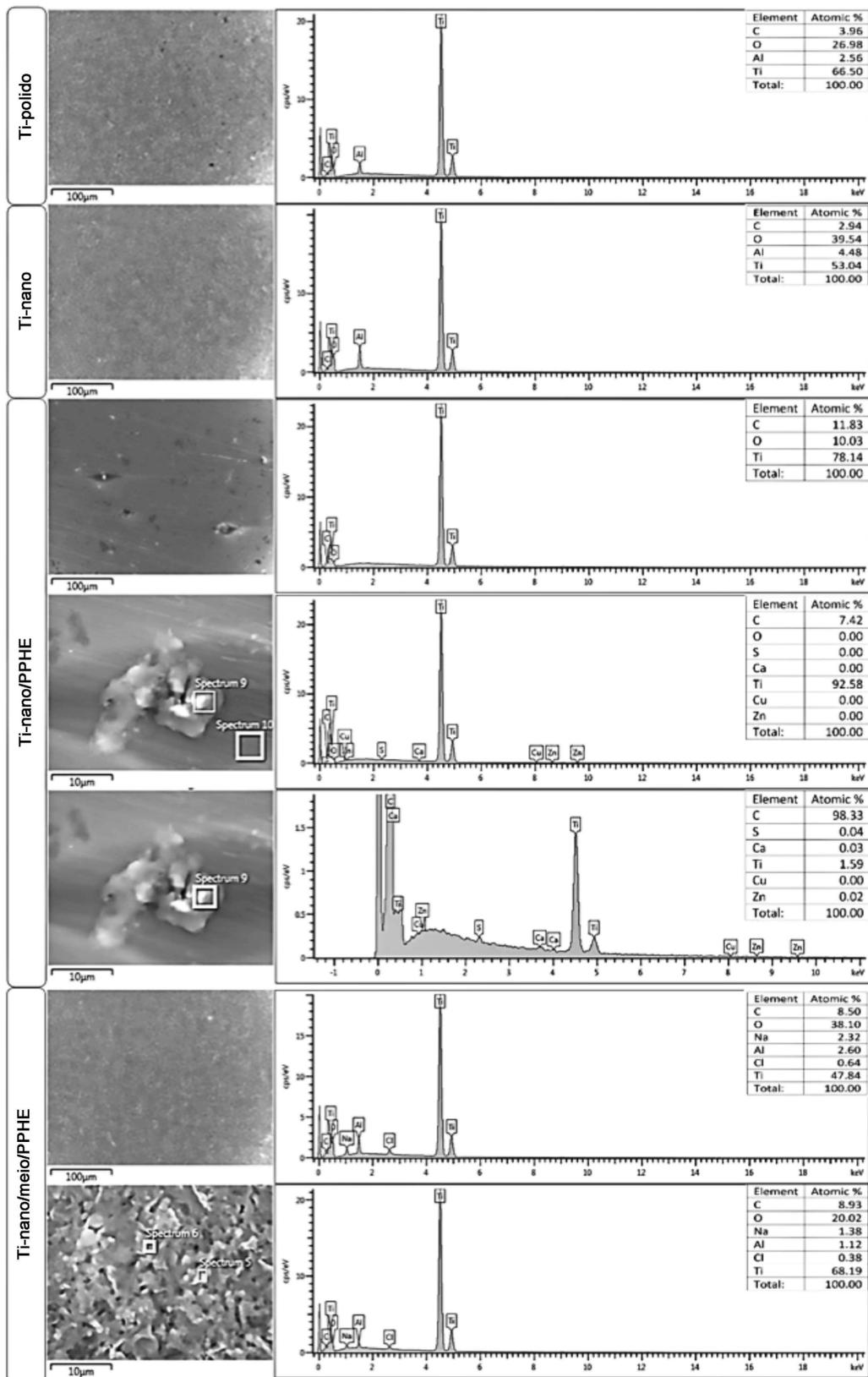
Um último espectro foi obtido de superfície de Ti-nano funcionalizada em solução aquosa de TRIS/HCl + CaCl<sub>2</sub> (Ti-nano/PPHE) (Figura 6). Nota-se que o espectro é diferente do obtido de Ti-polido na região próxima do UV, mas tornam-se semelhantes na faixa de luz visível. Este efeito ocorre porque, na ausência de compostos orgânicos na solução funcionalizante, os PPHE são depositados na superfície de Ti-nano como agregados, sem resultar na formação de uma camada de compostos adsorvidos cobrindo quase a totalidade da superfície; a alta reflectância da luz visível é, assim, mantida.



**Figura 6.** Curvas de reflectância de superfícies de Ti-nano funcionalizadas com extrato de bagaço de uva, utilizando-se como solvente, solução aquosa de TRIS/HCl + CaCl<sub>2</sub>.

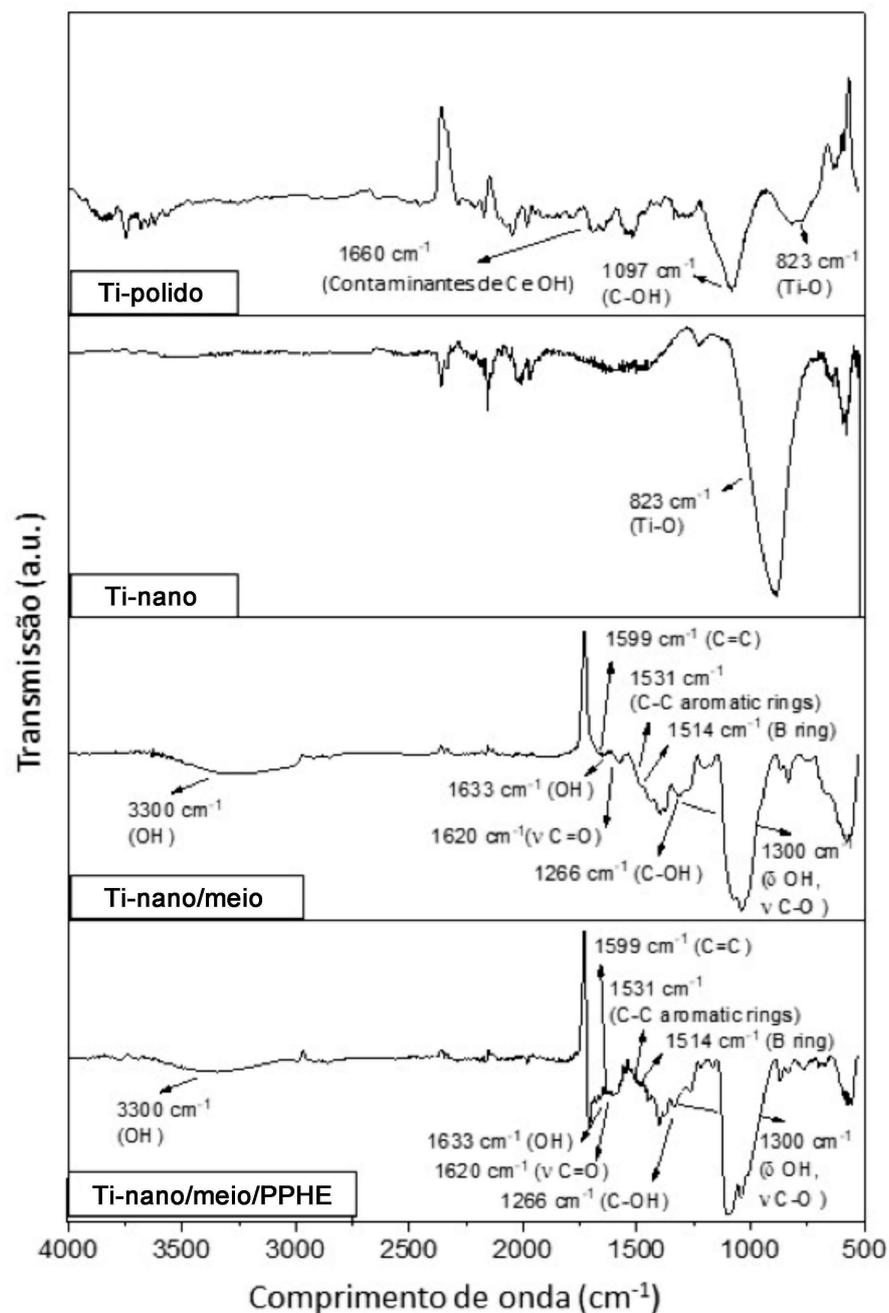
Os resultados de espectroscopia por energia dispersiva (EDS) revelaram que as superfícies de Ti-polido e Ti-nano são compostas por apenas três elementos: carbono, oxigênio e hidrogênio (Figura 7). Em relação à diferença entre a composição química da superfície de Ti-polido e Ti-nano, quase nenhuma alteração foi observada, com exceção para o aumento do conteúdo

de oxigênio, de 0 para 1,89%, respectivamente. Em contraste, quando é feita a mesma comparação entre as superfícies de Ti-nano e Ti-nano/meio/PPHE ou Ti-nano/PPHE (funcionalizada em solução aquosa de PPHE em TRIS/HCl+CaCl<sub>2</sub>), observam-se aumento consistente de carbono e diminuição de oxigênio. A presença de outros elementos, como cálcio, enxofre, cobre e zinco, não pode ser considerada relevante, por ser inferior ao limite de quantificação. A presença de quantidades detectáveis de cloro sugere que alguns sais presentes no meio de cultura são depositados sobre a superfície de Ti. Nota-se, ainda, a ocorrência de agregados com alto conteúdo de carbono sobre a superfície de Ti-nano, em quantidades maiores sobre aquelas funcionalizadas com PPHE diluídos em meio de cultura. Sobre Ti-nano/PPHE, o carbono é também detectável fora dos precipitados.



**Figura 7.** Espectroscopia por energia dispersiva (EDS) das superfícies de Ti-polido, Ti-nano, Ti-nano/PPHE e Ti-nano/meio/PPHE.

Os espectros de FTIR das superfícies de Ti-nano funcionalizadas ou não com PPHE são apresentados na Figura 8. O espectro da superfície de Ti-polido é caracterizado por uma banda larga de  $823\text{ cm}^{-1}$  aproximadamente, e é atribuída às ligações Ti-O (NAKAMURA *et al.*, 2001; WATSON *et al.*, 2004). Bandas em torno de  $1097\text{ cm}^{-1}$  (ligações C-OH) e  $1660\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas a contaminantes relacionados a carbono e água adsorvida, respectivamente (DAVIS *et al.*, 1996; URLAUB *et al.*, 2000). O espectro FTIR de Ti-nano exibe mudanças nos picos devido à formação de uma camada superficial fina de óxido. Nota-se ausência de pico largo na região em torno de  $3500\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ . A superfície de Ti-nano embebida em meio de cultura e a funcionalizada com PPHE diluídos em meio de cultura apresentam espectros muito semelhantes: pico em  $1633\text{ cm}^{-1}$  podem ser referidos à flexão de OH a  $1620\text{ cm}^{-1}$  (alongamento C=O),  $1531\text{ cm}^{-1}$  (atribuído a anéis aromáticos C-C),  $1599\text{ cm}^{-1}$  (C=C),  $1514\text{ cm}^{-1}$  (anel B) e  $1263\text{ cm}^{-1}$  (grupo oxidrilo fenólico C-OH) (CHEN *et al.*, 2013; YU *et al.*, 2019). Além dessas bandas, é possível identificar uma banda larga composta na região em torno de  $3300\text{ cm}^{-1}$ , atribuída às vibrações O-H alongadas (BULUT *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2010), e outra banda na região em torno de  $1300\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde a uma combinação de vibrações O-H deformadas e vibrações C-O alongadas (SOCRATES, 2004).



**Figura 8.** Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) de superfícies de Ti-polido, Ti-nano, Ti-nano/meio e Ti-nano/meio/PPHE.

#### 4.1.3 Molhabilidade

O tratamento químico para a obtenção da superfície de Ti-nano diminuiu significativamente os ângulos de contato com a água (de  $108,3^\circ \pm 3,7^\circ$  em Ti-polido para  $31,4^\circ \pm 1,4^\circ$  em Ti-nano), aumentando sua molhabilidade. A

presença de aminoácidos e compostos no meio de cultura, depositados sobre Ti, resulta em redução adicional do ângulo de contato para  $10,2^{\circ} \pm 6^{\circ}$ . Por outro lado, a presença de PPHE tem um efeito hidrofóbico, tanto se a funcionalização for realizada em meio de cultura para dissolver os PPHE quanto se eles forem dissolvidos em TRIS (HCl + CaCl<sub>2</sub>). Os resultados dessa análise estão sumariados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Medições dos ângulos de contato pelo método da gota séssil para as diferentes superfícies de Ti

Amostras	Valores médios (°)	Desvio Padrão
Ti-polido	108,3	3,7
Ti-nano	31,4	1,4
Ti-nano/meio	10,2	6
Ti-nano/meio/PPHE	36,9	1,6
Ti-nano/PPHE (TRIS/HCl+CaCl <sub>2</sub> )	40,4	3,2

#### 4.1.4 Atividade de eliminação de radicais livres

A Tabela 5 resume a atividade antioxidante da superfície de Ti-nano antes e após a funcionalização, representadas por controle e Ti-nano/meio/PHHE, respectivamente; neste caso, foi utilizado o meio DMEM com vermelho de fenol. Como esperado, a amostra controle é ineficiente na eliminação de radicais, apresentando baixa atividade. Por outro lado, a atividade de eliminação de radicais do Ti-nano/meio/PHHE aumentou, mostrando que as propriedades antioxidantes dos PPHE livres foram transferidas com sucesso para a superfície de Ti-nano com a sua funcionalização; o vermelho de fenol presente no meio D-MEM pode também gerar um sinal positivo.

**Tabela 5.** Atividade antioxidante em porcentagem (%) das amostras de Ti-nano e Ti-nano/meio/PHHE

Amostras	Atividade redutora de radicais livres (%) – 4h
Ti-nano	10,86
Ti-nano/meio/PHHE	40,19±1,31

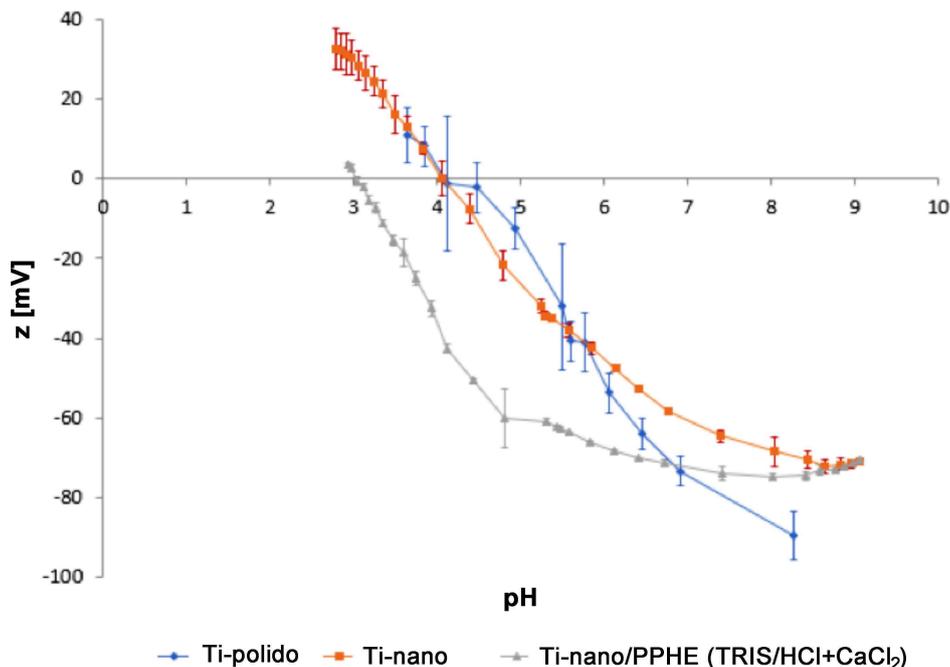
#### 4.1.5 Potencial zeta

O potencial zeta das superfícies não tratadas e modificadas foi medido para obter informações sobre as mudanças eventuais da carga de superfície após o procedimento de funcionalização, e para determinar a estabilidade química dos PPHE adsorvidos. As curvas de titulação de potencial zeta em função do pH para as amostras avaliadas são mostradas na Figura 9.

As curvas obtidas de Ti-polido e Ti-nano são muito semelhantes com a diferença limitada à região básica, que pode ser atribuída à formação de uma camada de óxido durante o tratamento químico das amostras de Ti-nano. Esse óxido tem maior hidrofiliabilidade do que o Ti-polido, e isso induz uma inclinação diferente (inferior) da curva e apresenta alguns grupos OH ácidos, dando a presença de um pequeno platô no pH superior a 8: eles agem como ácidos muito fracos e são completamente desprotonados apenas em pH alto. Isso significa que eles não são dissociados em pH fisiológico e não são capazes de ter interação eletrostática forte com as biomoléculas adsorvidas. Nota-se também que o valor de desvio padrão obtido para Ti-nano é geralmente baixo, indicando que a camada de óxido é estável na faixa de pH considerada na titulação.

As amostras de Ti-nano e Ti-nano/PPHE apresentaram curvas de titulação de potencial zeta significativamente diferentes, como mostrado na

Figura 9. Ambas as amostras de Ti e Ti-nano mostram um ponto isoelétrico, em que a curva cruza o eixo X (CAI *et al.*, 2006), em pH 4,06, semelhante com os dados reportados na literatura de superfícies de Ti não tratadas (ROESSLER *et al.*, 2002; KULKARNI *et al.*, 2015), as quais apresentam, ocasionalmente, grupos funcionais fracos com comportamento ácido-base na superfície. A funcionalização de Ti-nano com PPHE muda o ponto isoelétrico para valores mais ácidos (pH 3,04), o que pode ser devido à presença de PPHE com grupos funcionais OH ácido. O ponto isoelétrico dos PPHE é próximo a pH 2,21. A inclinação da curva próxima ao ponto isoelétrico não é alterada significativamente pela funcionalização, mas é alterada (mais inferior) acima de pH 5 e se move em direção a um platô amplo. Isso está de acordo com a presença de PPHE que possuem grupos OH com comportamento ácido mais forte, desprotonados em pH superior a 4 (grupos carboxílicos) ou 7 (grupos fenólicos). Deve ser notado que os valores do desvio padrão das amostras Ti-nano/PPHE são muito baixos, indicando que os PPHE adsorvidos em Ti-nano são estáveis na superfície na faixa de pH testada.

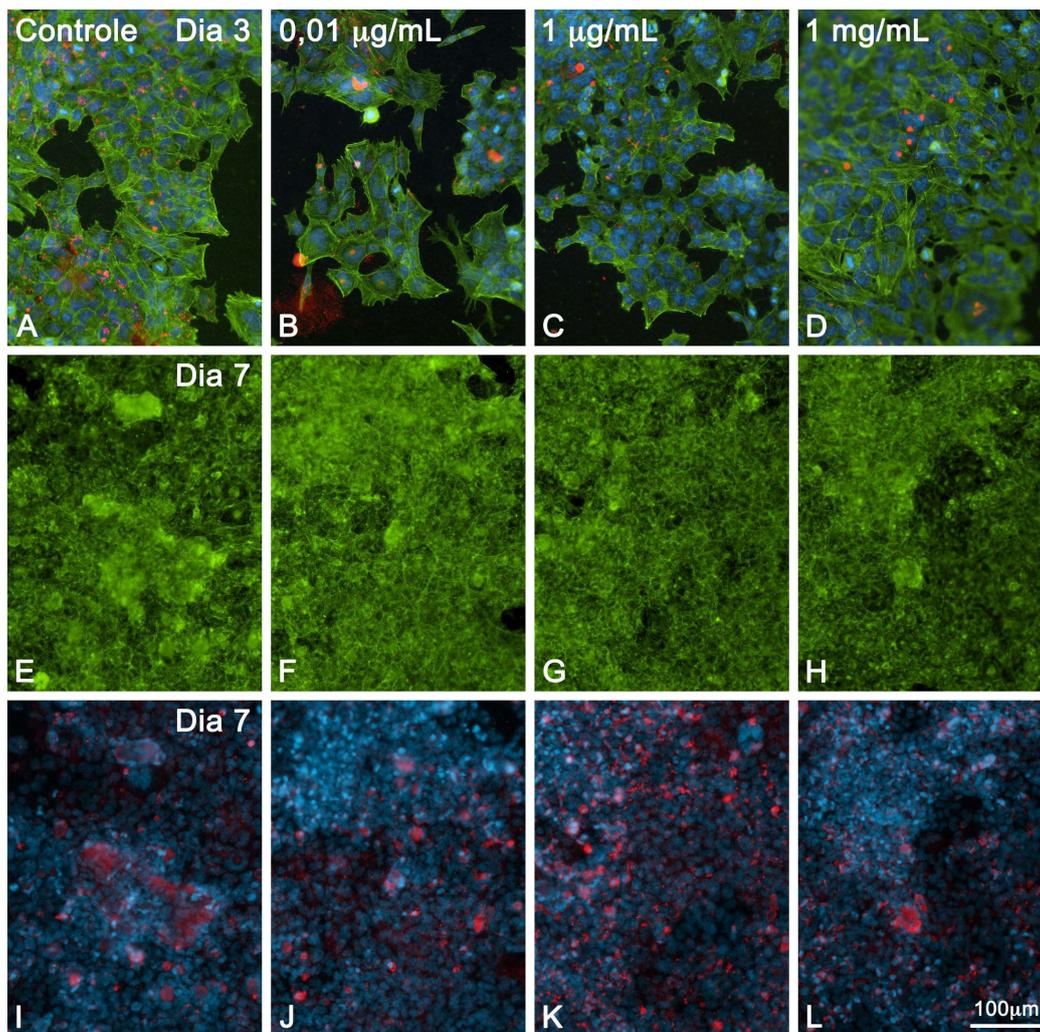


**Figura 9.** Curvas de potencial zeta em função do pH para superfícies de Ti-polido, Ti-nano e Ti-nano/PPHE.

## 4.2 Experimentos biológicos

### 4.2.1 Morfologia celular por microscopia de fluorescência

A análise de epifluorescência (Figura 10) revelou que as células UMR-106 aderiram e espraíram nas diferentes superfícies de Ti-nano funcionalizadas com PPHE, assim como no controle, exibindo no dia 3 de cultura morfologias poligonais e interações célula-célula por toda a monocamada (Figura 10, A-D); a maioria das células apresentou marcação para BSP perinuclear e, ocasionalmente, no meio extracelular adjacente (Figura 10B). Com a progressão da cultura até o dia 7, as células atingiram a confluência (Figura 10, E-H) e áreas positivas para BSP revelavam a formação de nódulos de mineralização (Figura 10, I-L). Não foram observadas diferenças importantes entre os grupos.

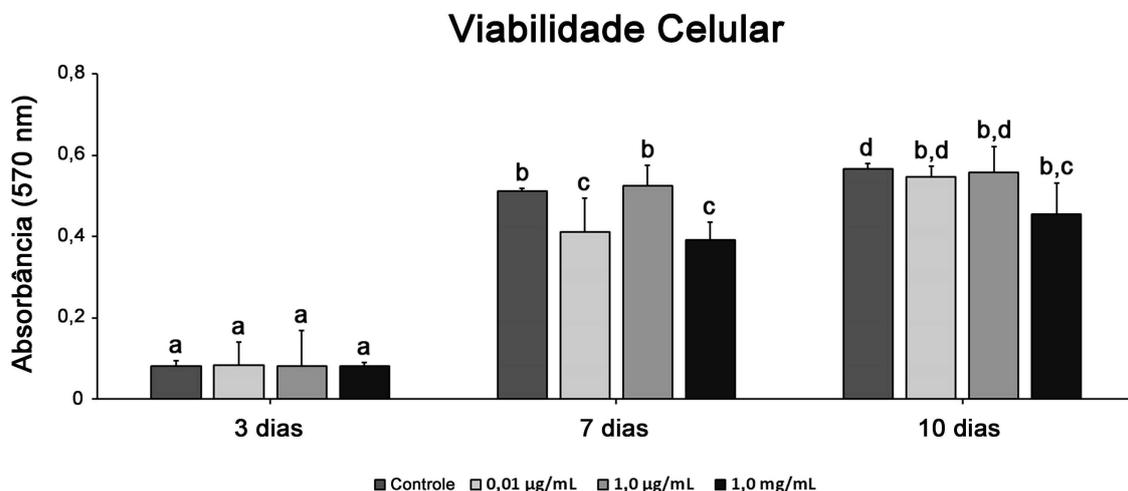


**Figura 10.** Epifluorescência de células UMR-106 crescidas sobre superfícies de Ti-nano funcionalizadas com 0,01 µg/mL, 1 µg/mL e 1 mg/mL do extrato de bagaço de uva (PPHE), nos tempos de 3 e 7 dias de cultura. A fluorescência verde indica marcação do citoesqueleto de actina; a fluorescência vermelha, a de sialoproteína óssea (BSP); a fluorescência azul, a de núcleos celulares. Notem-se focos de matriz mineralizada BSP-positivos em I-L.

#### 4.2.2 Avaliação da atividade mitocondrial/proliferação celular

O ensaio de MTT foi realizado nos dias 3, 7 e 10 de cultura (Figura 11). Os valores mais altos de viabilidade celular foram detectados no dia 7 quando comparados ao dia 3 (pelo menos 2 vezes maiores), sendo mantidos constantes durante a fase de mineralização até o dia 10 de cultura. Enquanto que no dia 3 não foram detectadas diferenças entre os grupos, nos dias 7 e 10 as células UMR-106 cultivadas sobre as superfícies funcionalizadas com 1

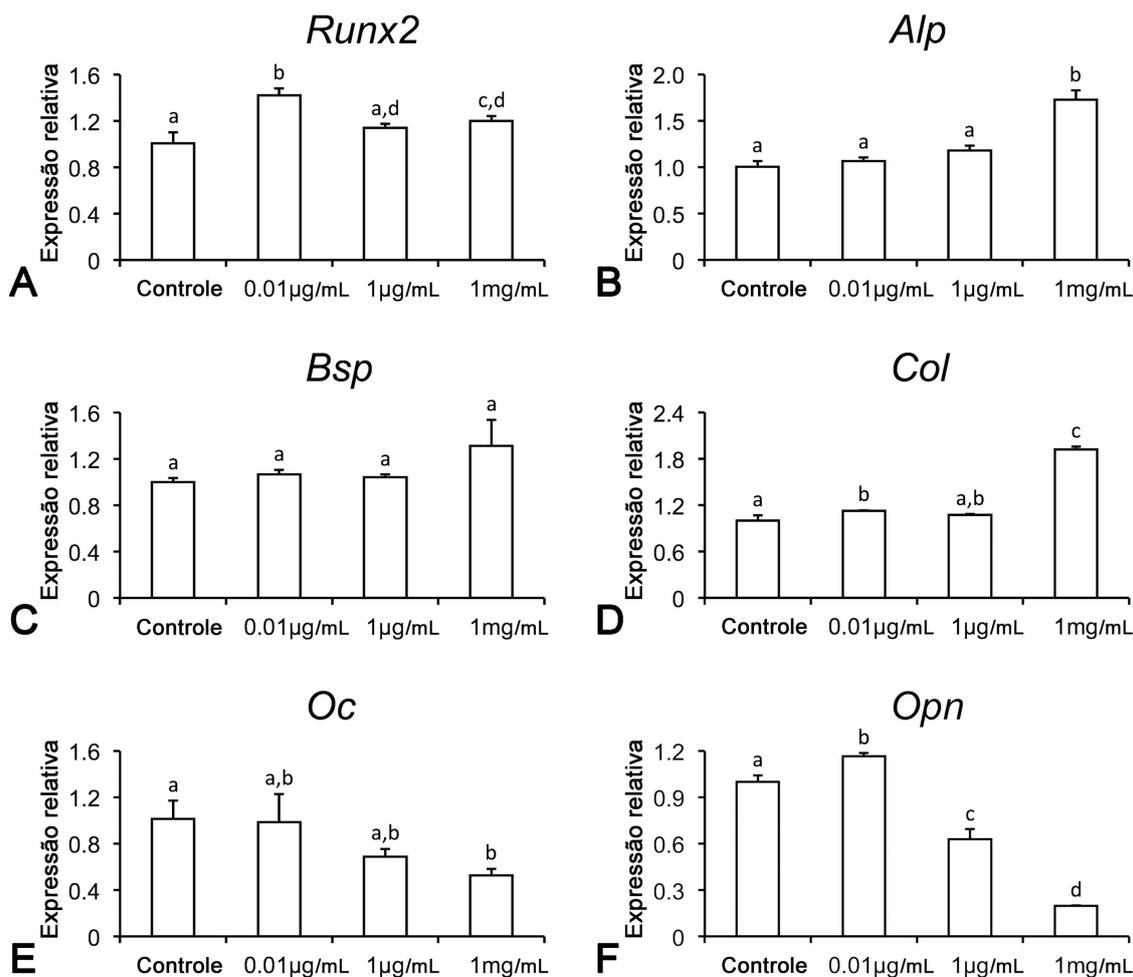
mg/mL de PPHE exibiram os menores valores de MTT, ainda que semelhantes estatisticamente a alguns dos outros grupos.



**Figura 11.** Viabilidade celular (MTT, densidade óptica) nos dias 3, 7 e 10 de culturas de células UMR-106 crescidas sobre superfícies de Ti-nano funcionalizadas com solução do extrato de bagaço de uva a 0,01 µg/mL, 1 µg/mL e 1 mg/mL. As barras que compartilham a mesma letra não são significativamente diferentes entre si ( $p > 0,05$ ).

#### 4.2.3 Expressão de *Runx2*, *Alp*, *Bsp*, *Col*, *Oc* e *Opn* por PCR em tempo real

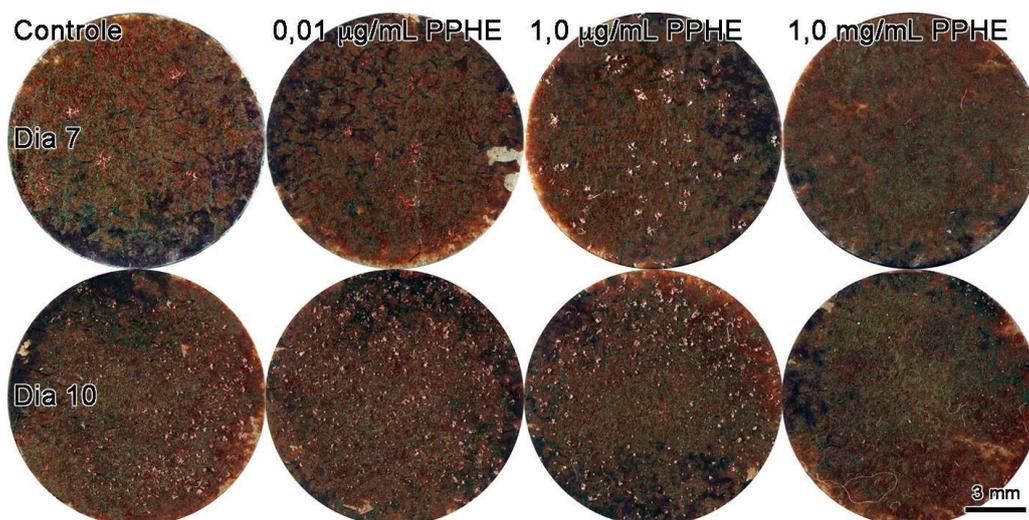
Os resultados mostraram que as expressões de *Alp*, *Bsp* e *Col* aumentaram significativamente nas células UMR-106 cultivadas sobre superfícies de Ti-nano funcionalizadas com 1 mg/mL de PPHE, enquanto que as de *Oc* e *Opn* foram menores. Os níveis de *Runx2* foram maiores para as culturas crescidas sobre superfícies funcionalizadas (Figura 12).



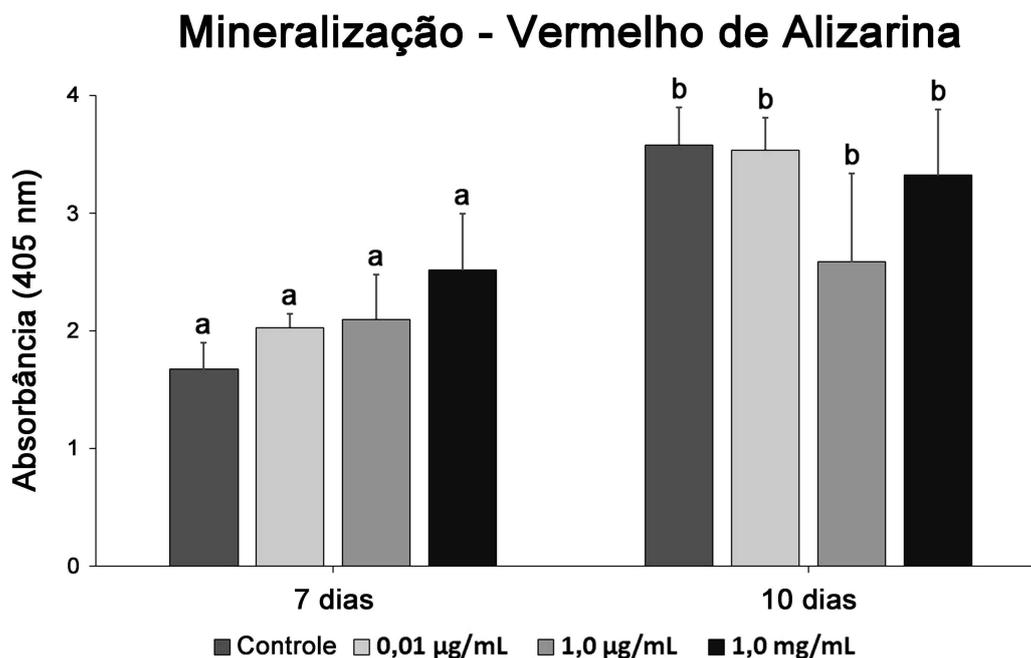
**Figura 12.** Expressão relativa de RNA mensageiro para *Runx2* (A), *Alp* (B), *Bsp* (C), *Col* (D), *Oc* (E) e *Opn* (F) de células UMR-106 crescidas sobre superfícies de Ti-nano funcionalizadas com 0,01 µg/mL, 1 µg/mL e 1 mg/mL de PPHE no dia 5 de cultura. Os dados foram normalizados pelo GAPDH e o valor 1, atribuído ao grupo controle. As barras que compartilham a mesma letra não são significativamente diferentes entre si ( $p > 0,05$ ).

#### 4.2.4 Detecção e quantificação de formações de matriz mineralizada

A coloração com vermelho de alizarina revelou que as culturas de células UMR-106 crescidas sobre Ti-nano de todos os grupos exibiram fenótipo osteogênico aos 7 e 10 dias de cultura (Figura 13), sem diferenças significativas entre os grupos por período (Figura 14); as culturas sobre superfície de Ti-nano funcionalizada com 1 mg/mL de PPHE apresentaram tendência a maiores acúmulos de cálcio em 7 dias (Figura 14).



**Figura 13.** Imagens macroscópicas de culturas de células UMR-106 crescidas sobre superfícies de Ti-nano funcionalizadas com 0,01 µg/mL, 1 µg/mL e 1 mg/mL de PPHE, nos dias 7 e 10 de cultura. As culturas foram coradas com vermelho de Alizarina para a detecção de depósitos de cálcio em áreas de formação de matriz mineralizada, distribuídas aleatoriamente pela superfície dos discos. Barra de escala = 3 mm.



**Figura 14.** Extração de vermelho de Alizarina em culturas de células UMR-106 crescidas sobre superfícies de Ti-nano funcionalizadas com 0,01 µg/mL, 1 µg/mL e 1 mg/mL de PPHE, nos dias 7 e 10 de cultura. Observa-se no dia 7 uma tendência de maior marcação pelo corante em culturas crescidas sobre superfícies funcionalizadas com a concentração de 1 mg/mL do extrato de bagaço de uva. As barras que compartilham a mesma letra não são significativamente diferentes entre si ( $p > 0,05$ ). As comparações entre períodos não foram realizadas.

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que a funcionalização de Ti-nano com solução de extrato de bagaço de uva a 1 mg/mL permite a disponibilização de PPHE sobre sua superfície nanotopográfica de TiO<sub>2</sub>, em quantidade e distribuição variadas na dependência do solvente utilizado, sendo mais abundante e menos inhomogênea com o meio de cultura. A presença de conteúdo orgânico rico em PPHE sobre Ti-nano foi confirmada por sua autofluorescência vermelha e por MEV, atenuando os aspectos nanotopográficos da superfície do metal, e reduzindo a sua alta molhabilidade, como também por espectroscopia no UV-vis e atividade antioxidante. A análise do potencial zeta indicou que os PPHE eram estáveis sobre a superfície de Ti-nano, com a qual exibiam ligações eletrostáticas fracas. A interação *in vitro* de células osteoblásticas com Ti-nano funcionalizado com solução de extrato de bagaço de uva a 0,01 µg/mL, 1 µg/mL ou 1 mg/mL resultou em tendência à maior atividade osteogênica para a maior concentração, com valores menores de viabilidade celular, maiores de expressão de *Alp*, *Bsp* e *Col*, e menores de *Opn*.

Ainda que diferentes estratégias de modificação de superfícies de implantes metálicos venham sendo desenvolvidas e aplicadas ao longo das últimas décadas, com resultados pré-clínicos e clínicos bastante satisfatórios, especialmente em sítios anatômicos de baixa qualidade óssea (JEMAT *et al.*, 2015; SMEETS *et al.*, 2016), estudos mais recentes vêm explorando adicionalmente ajustes finos – a sua estruturação na nanoescala –, alterando características topográficas, químicas e de energia, que exercem, *per se*, efeitos biológicos sobre diferentes tipos celulares durante o reparo tecidual, e

proporcionam condições mais adequadas, por exemplo, com o aumento da área superficial, para a funcionalização de molécula(s) bioativa(s), visando ao controle e/ou à modulação de diferentes processos biológicos (SALOU *et al.*, 2015; FERRARIS *et al.*, 2020). Nesse contexto, optamos por utilizar a nanotopografia de Ti obtida por condicionamento com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (NANCI *et al.*, 1998) – cujos efeitos estimuladores sobre células ósseas e o reparo ósseo vêm sendo objeto de estudos *in vitro* e *in vivo*, exploratórios e mecanísticos (CASTRO-RAUCCI *et al.*, 2016; ABUNA *et al.*, 2019; DE BARROS E LIMA BUENO *et al.*, 2020) –, com o objetivo de disponibilizar em sua superfície, solução de extrato de bagaço de uva caracterizado por exibir alta concentração de PPHE e, particularmente, de epicatequina (SPRIANO *et al.*, 2019).

Apesar de em estudo piloto terem sido observados efeitos osteogênicos mais expressivos quando as culturas cresciam sobre poliestireno em meio de cultura com extrato de bagaço de uva entre 0,001 e 0,1 µg/mL, para a funcionalização de Ti-nano por simples adsorção optou-se por utilizar soluções a 0,01 µg/mL, 1 µg/mL e 1 mg/mL, e para a caracterização do recobrimento orgânico sobre Ti, a superfície obtida por meio da solução mais concentrada, o que poderia garantir a detectabilidade do recobrimento orgânico. Ainda que a quantidade de componentes orgânicos efetivamente adsorvida a partir da solução de 1 mg/mL do extrato não tenha sido determinada no presente estudo, os resultados de caracterização de superfície mostraram que ela varia na dependência do solvente utilizado, orgânico ou inorgânico, sendo mais abundante quando o extrato é diluído em meio de cultura. Uma possível explicação para esse fenômeno é a presença de aminoácidos na composição do meio de cultura, que atuam na formação de agregados de PPHE de

dimensões maiores (YI *et al.*, 2020), atenuando e/ou mascarando os aspectos nanotopográficos de superfície. Com a presença de soro fetal bovino nos experimentos com células osteogênicas, a deposição de conteúdo orgânico sobre Ti-nano funcionalizado com PPHE poderia ser ainda potencializada, uma vez que proteínas estabelecem interações não covalentes múltiplas estabilizantes com os PPHE, resultando em formações tridimensionais na escala de nanopartículas (HAN *et al.*, 2020). Associados à redução da alta hidrofobicidade de Ti-nano detectada com a presença do recobrimento orgânico, esses fenômenos devem exercer efeitos sobre os mecanismos descritos de interação de células osteoblásticas com os aspectos nanotopográficos de superfície (DE OLIVEIRA; NANJI, 2004; BELLO *et al.*, 2017; BELLO *et al.*, 2020).

Os resultados de caracterização de superfície mostraram que os PPHE apresentaram-se estáveis e mantiveram sua capacidade antioxidante sobre a superfície de Ti-nano, em distribuição inhomogênea, com a qual provavelmente estabeleciam ligações eletrostáticas fracas; de fato, era reduzida a presença de grupos hidroxila na nanotopografia, impedindo que ligações covalentes, mais fortes, ocorressem (FERRARIS *et al.*, 2011). Esses aspectos são relevantes para a atividade celular na região interfacial. Enquanto que a presença de PPHE com atividade antioxidante deve limitar a apoptose de células osteoblásticas induzida por estresse oxidativo (DAI *et al.*, 2017) e favorecer a diferenciação osteoblástica pela via do fator de transcrição Runx2 (BYUN *et al.*, 2014), sua fraca interação com a camada nanotopográfica de TiO<sub>2</sub> pode resultar em importante *burst release* inicial na dependência dos componentes do fluido presente na região interfacial, com potencial impacto sobre o processo

de dessorção sustentada. Se esses fenômenos efetivamente ocorreram nas condições experimentais de nosso estudo, a disponibilização de PPHE no meio extracelular em um ambiente de cultivo celular estático promoveu benefícios a alguns aspectos da diferenciação e da atividade de osteoblastos.

Os resultados biológicos mostraram que apesar de se observar diferenciação osteogênica expressiva em todos os grupos avaliados, os valores menores de viabilidade celular, maiores de expressão de *Alp*, *Bsp* e *Col*, e menores de *Opn* detectados nas culturas crescidas sobre Ti-nano funcionalizado com solução de extrato de bagaço de uva a 1 mg/mL são sugestivos de um maior estímulo e/ou de aceleração da atividade osteoblástica sobre essa superfície, o que poderia estar relacionado à concentração maior de PPHE no meio extracelular disponível às células. Com efeito, os PPHE exercem efeitos estimuladores da diferenciação de osteoblastos e de sua função, promovendo a expressão de *Runx2* por diferentes vias de sinalização e por induzir a expressão de genes relacionados à formação de matriz óssea, como a *Bsp* (discutido em TORRE *et al.*, 2020). Apesar disso, os efeitos fenotípicos na formação de matriz mineralizada pela presença de PPHE não foram exuberantes, com apenas uma tendência a valores maiores de extração de vermelho de Alizarina/conteúdo de cálcio.

Considerando-se a importância da presença de macrófagos no processo de reparo na região interfacial de biomateriais com o tecido ósseo (NIU *et al.*, 2021) e a modulação de suas funções por PPHE (DA CUNHA *et al.*, 2019), a efetiva relevância de se funcionalizarem superfícies nanoestruturadas de Ti com o extrato de bagaço de uva deveria ser oportunamente avaliada por meio

de estratégias para a observação das interações recíprocas entre osteoblastos e macrófagos, em modelos *in vitro* e *in vivo*.

## 6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

1. A funcionalização de Ti-nano com solução de extrato de bagaço de uva a 1 mg/mL permite a disponibilização de PPHE em quantidade e distribuição variadas na dependência do solvente utilizado, sendo mais abundante e menos inhomogênea com o meio de cultura utilizado para o crescimento de células osteoblásticas; os PPHE funcionalizados sobre Ti-nano mantêm-se estáveis, com atividade antioxidante e interagem com a nanotopografia de TiO<sub>2</sub> por meio de ligações eletrostáticas fracas;

2. A interação *in vitro* de células osteoblásticas com Ti-nano funcionalizado com solução de extrato de bagaço de uva a 0,01 µg/mL, 1 µg/mL ou 1 mg/mL permite a formação exuberante de matriz mineralizada no modelo de células UMR-106, com tendência à maior atividade osteogênica para a concentração de 1 mg/mL, em que as culturas exibem valores menores de viabilidade celular, maiores de expressão de *Alp*, *Bsp* e *Col*, e menores de *Opn*.

## 7 REFERÊNCIAS

- ABUNA, R.P.F. *et al.* The Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway is regulated by titanium with nanotopography to induce osteoblast differentiation. **Colloids Surf B Biointerfaces.**, v. 184, p. 110513, 2019.
- AIRES, V.; DELMAS, D. Common pathways in health benefit properties of RSV in cardiovascular diseases, cancers and degenerative pathologies. **Curr. Pharm.**, v. 16, n. 3, p. 219–244, 2015.
- AL-RADHA, A. S. D. *et al.* Surface properties of titanium and zirconia dental implant materials and their effect on bacterial adhesion. **J Dent.**, v. 40, n. 2, p. 146–153, 2012.
- ARIGANELLO M.B. *et al.* Surface nanocavitation of titanium modulates macrophage activity. **Int J Nanomedicine**, v.13, p. 8297–8308, 2018.
- BALASUNDARAM, G.; SATO, M.; WEBSTER, T.J. Using hydroxyapatite nanoparticles and decreased crystallinity to promote osteoblast adhesion similar to functionalizing with RGD. **Biomaterials**, v. 27, n. 14, p. 2798–2805, 2006.
- BELLO, D.G. *et al.* A nanoporous titanium surface promotes the maturation of focal adhesions and formation of filopodia with distinctive nanoscale protrusions by osteogenic cells. **Acta Biomater.**, v. 60, p. 339–349, 2017.
- BELLO, D.G. *et al.* Nanoporosity Stimulates Cell Spreading and Focal Adhesion Formation in Cells with Mutated Paxillin. **ACS Appl Mater Interfaces**, v. 12, n. 13, p. 14924–14932, 2020.
- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutr Rev.**, v. 56, n. 11, p. 317–333, 1998.
- BULUT, E.; OZACAR, M. Rapid, facile synthesis of silver nanostructure using hydrolyzable tannin. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v.48, p. 5686–5690, 2009.
- BYUN, M.R. *et al.* (-)-Epicatechin gallate (ECG) stimulates osteoblast differentiation via Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) and

transcriptional coactivator with PDZ-binding motif (TAZ)-mediated transcriptional activation. **J Biol Chem.**, v. 289, n. 14, p. 9926–9935, 2014.

CAI, K. *et al.* Surface functionalized titanium thin films: zeta-potential, protein adsorption and cell proliferation. **Colloids Surf. B: Biointerf.**, v. 50, p. 1–8, 2006.

CASTRO-RAUCCI, L.M.S *et al.* Titanium With Nanotopography Induces Osteoblast Differentiation by Regulating Endogenous Bone Morphogenetic Protein Expression and Signaling Pathway. **J Cell Biochem.**, v. 117, n. 7, p. 1718–1726, 2016.

CHEN, Z. *et al.* Biocompatible, functional spheres based on oxidative coupling assembly of green tea polyphenols. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 135, p. 4179–4182, 2013.

COELHO, P.G. *et al.* Osseointegration: hierarchical designing encompassing the macrometer, micrometer, and nanometer length scales. **Dent Mater.**, v. 31, n. 1, p. 37–52, 2015.

DA CUNHA, L.R.; MUNIZ-JUNQUEIRA, M.I.; DOS SANTOS BORGES, T.K. Impact of polyphenols in phagocyte functions. **J. Inflamm. Res.**, v. 12, p. 205–217, 2019.

DA SILVA, J. M. R. *et al.* Procyanidin dimers and trimers from grape seeds. **Phytochem.**, v. 30, n. 4, p. 1259–1264, 1991.

DAI, P. *et al.* Attenuation of oxidative stress-induced osteoblast apoptosis by curcumin is associated with preservation of mitochondrial functions and increased Akt-GSK3 $\beta$  signaling. **Cell Physiol Biochem.**, v. 41, n. 2, p. 661–677, 2017.

DAMIATI, L. *et al.* Impact of surface topography and coating on osteogenesis and bacterial attachment on titanium implants. **J. Tissue Eng.**, v. 9, p. 1–16, 2018.

DAVIS, K.M.; TOMOZAWA, M. An infrared spectroscopic study of water-related

- species in silica glasses. **J. Non. Cryst. Solids**, v. 201, p. 177–198, 1996.
- DE BARROS E LIMA BUENO, R. *et al.* Influence of Nanotopography on Early Bone Healing during Controlled Implant Loading. **Nanomaterials**, v. 10, n. 11, p. 2191, 2020.
- DE BARROS E LIMA BUENO, R. *et al.* Oxidative nanopatterning of titanium surfaces promotes production and extracellular accumulation of osteopontin. **Braz Dent J.**, v. 22, n.3, p.179–184, 2011.
- DE OLIVEIRA, P.T. *et al.* Enhancement of in vitro osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography. **J. Biomed. Mater. Res. A**, v. 80, n. 3, p. 554–564, 2007.
- DE OLIVEIRA, P.T.; NANJI, A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. **Biomaterials.**, v. 25, n. 3, p. 403–413, 2004.
- ELISA, T. *et al.* Polyphenols from grape pomace induce osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells. **Int J Mol Med.**, v. 45, n. 6, p.1721–1734, 2020.
- FERRARIS, S. *et al.* Metal nanoscale systems functionalized with organic compounds. **Nanostructured Biomaterials for Regenerative Medicine**, p. 407–436, 2020.
- FERRARIS, S. *et al.* Surface modification of Ti–6Al–4V alloy for biomineralization and specific biological response: Part I, inorganic modification. **J Mater Sci Mater Med.**, v. 22, p. 533–545, 2011.
- FLEIGE, S.; PFAFFL, M.W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. **Mol. Asp. Med.**, v. 27, n. 2-3, p. 126–139, 2006.
- HAN, Y. *et al.* Polyphenol-Mediated Assembly of Proteins for Engineering Functional Materials. **Angewandte Chemie**, v. 132, n. 36, p. 15748–15755, 2020.
- HUANG, X. *et al.* One-step, size-controlled synthesis of gold nanoparticles at

room temperature using plant tannin. **Green Chem.**, v. 12, p. 395–399, 2010.

JEMAT, A. *et al.* Surface Modifications and Their Effects on Titanium Dental Implants. **Biomed Res Int.**, v. 2015, p. 1–12, 2015.

JUNKER, R. *et al.* Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 20, p. 185–206, 2009.

KATO, R.B. *et al.* Nanotopography directs mesenchymal stem cells to osteoblast lineage through regulation of microRNA-SMAD-BMP-2 circuit. **J Cell Physiol.**, v. 229, n. 11, p. 1690–1696, 2014.

KULKARNI, M. *et al.* Wettability studies of topologically distinct titanium surfaces. **Colloids Surf. B: Biointerf.**, v. 129, p. 47–53, 2015.

MAXIMIANO, W.M.A. *et al.* Mast Cell Mediators Inhibit Osteoblastic Differentiation and Extracellular Matrix Mineralization. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 65, n. 12, p. 723–741, 2017.

MAXIMIANO, W.M.A. *et al.* Nanotextured titanium surfaces stimulate spreading, migration, and growth of rat mast cells. **J Biomed Mater Res A**, v. 105, n.8 p. 2150–2161, 2017.

MENDONÇA, G. *et al.* Advancing dental implant surface technology—from micron-to nanotopography. **Biomaterials**, v. 29, n. 28, p. 3822–3835, 2008.

NAKAMURA, M. *et al.* Comparison of hydrophilic properties of amorphous TiO<sub>2</sub> films obtained by radio frequency sputtering and plasma-enhanced chemical vapor deposition. **J. Mater. Res.**, v. 16, p. 621–626, 2001.

NANCI, A. *et al.* Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules. **J Biomed Mater Res.**, v. 40, n. 2, p. 324–335, 1998.

NEVEU, V. *et al.*: um banco de dados abrangente on-line sobre o conteúdo de polifenóis em alimentos. **Database (Oxford)**, 2010.

NIU, Y. *et al.* Modulating macrophage activities to promote endogenous bone regeneration: Biological mechanisms and engineering approaches. **Bioact Mater.**, v. 6, n. 1, p. 244–261, 2021.

PAPOUTSI, Z. *et al.* Walnut extract ( *Juglans regia* L.) and its component ellagic acid exhibit anti-inflammatory activity in human aorta endothelial cells and osteoblastic activity in the cell line KS483. **BJN.**, v. 99, n. 4, p. 715–722, 2008.

QUIRYNEN, M.; BOLLEN, C.M.L. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. **J. Clin. Periodontol.**, v. 22, n. 1, p. 1–14, 2005.

ROESSLER, S. *et al.* Characterization of oxide layers on Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V and titanium by streaming potential and streaming current measurements. **Colloids Surf. B: Biointerf.**, v. 26, p. 387–395, 2002.

ROSA, A.L. *et al.* Nanotopography drives stem cell fate toward osteoblast differentiation through  $\alpha 1\beta 1$  integrin signaling pathway. **J Cell Biochem.**, v. 115, n. 3, p. 540–548, 2014.

SALOU, L. *et al.* Enhanced osseointegration of titanium implants with nanostructured surfaces: an experimental study in rabbits. **Acta Biomater.**, v.11, p. 494–502, 2015.

SCHROEDER, A. *et al.* The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. **BMC Mol Biol.**, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2006.

SHAVANDI, A. *et al.* Polyphenol uses in biomaterials engineering. **Biomaterials**, v. 167, p. 91–106, 2018.

SHRIKHANDE, A. J. Wine by-products with health benefits. **Food Res Int.**, v. 33, n. 6, p. 469–474, 2000.

SILVA, R.F.M.; POGAČNIK, L. Polyphenols from Food and Natural Products: Neuroprotection and Safety. **Antioxidants**, v. 9, n.1, p. 61, 2020.

SINGH, A. *et al.* Immunoregulation of bone remodelling. **Int J Crit Illn Inj Sci.**, v. 2, n. 2, p. 75–81, 2012.

SMEETS, R. *et al.* Impact of dental implant surface modifications on osseointegration. **Biomed Res Int.**, v. 2016, p. 1–16, 2016.

SOCRATES, G. Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts. **John Wiley & Sons**, 2004.

SPRIANO, S. *et al.* Grafting of polyphenols from grape pomace to implantable biomaterials: a chemical and biological characterization. *In: 13th World Congress on Polyphenols Applications*, Malta. Sept. 2019.

SUREDA, A. *et al.* Polyphenols: Well Beyond The Antioxidant Capacity: Polyphenol Supplementation and Exercise-Induced Oxidative Stress and Inflammation. **Curr. Pharm.**, v. 15, n. 4, p. 373–379, 2014.

URLAUB, R.; POSSET, U.; THULL, R. FT-IR spectroscopic investigations on sol-gel-derived coatings from acid-modified titanium alkoxides. **J. Non. Cryst. Solids**, v. 265, p. 276–284, 2000.

VARIOLA, F. *et al.* Oxidative nanopatterning of titanium generates mesoporous surfaces with antimicrobial properties. **Int J Nanomedicine**, v.9, p. 2319–2325, 2014.

VETRONE, F. *et al.* Nanoscale oxidative patterning of metallic surfaces to modulate cell activity and fate. **Nano Lett.**, v. 9, p. 659–665, 2009.

WADA, M. *et al.* Chemiluminescent screening of quenching effects of natural colorants against reactive oxygen species: Evaluation of grape seed, monascus, gardenia and red radish extracts as multi-functional food additives. **Food Chem.**, v. 101, n. 3, p. 980–986, 2007.

WATSON, S. *et al.* Preparation of nanosized crystalline TiO<sub>2</sub> particles at low temperature for photocatalysis. **J. Nanoparticle Res.**, v. 6, p. 193–207, 2004.

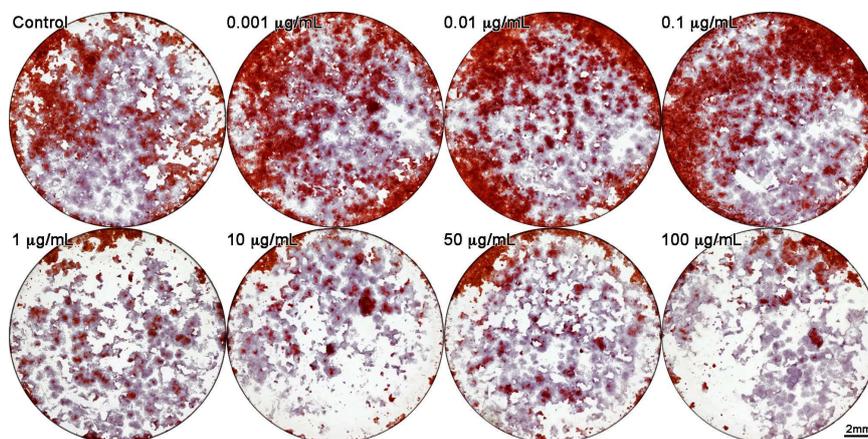
YI, J-H. *et al.* Characterization of a bioactive nanotextured surface created by controlled chemical oxidation of titanium. **Surf Sci.**, v. 60, p. 4613–4621, 2006.

YI, Z. *et al.* Preparation of strong antioxidative, therapeutic nanoparticles based on amino acid-induced ultrafast assembly of tea polyphenols. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, v. 12, n. 30, p. 33550–33563, 2020.

YU, H. *et al.* Fabrication of hybrid materials from titanium dioxide and natural phenols for efficient radical scavenging against oxidative stress. **ACS Biomater. Sci. Eng.**, v. 5, p. 2778–2785, 2019.

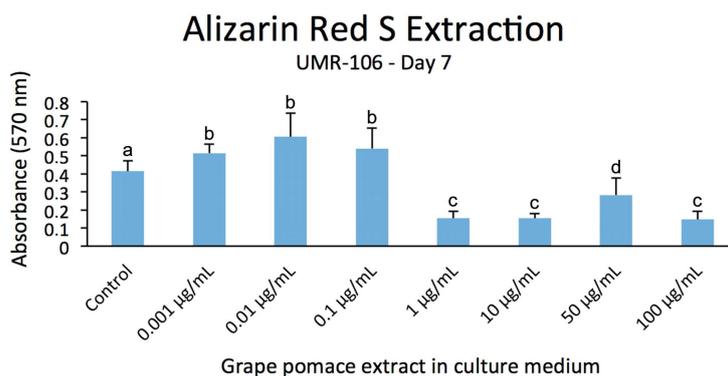
## 8 APÊNDICES

### APÊNDICE A - *Cultura de células UMR-106 sobre poliestireno, expostas a diluições seriadas de extrato de bagaço de uva: aspectos macroscópicos de coloração com vermelho de Alizarina S, para detecção de depósitos de cálcio*



**Figure 15.** Macroscopic imaging of UMR-106 osteogenic cell cultures grown on 24-well polystyrene plates at day 7 of culture, exposed from day 2 to day 5 to serial dilutions of the grape pomace extract in the culture medium. The cultures were stained with Alizarin Red S (ARS) to detect calcium deposits; the red dots indicate ARS-stained bone-like nodules.

### APÊNDICE B - *Cultura de células UMR-106 sobre poliestireno, expostas a diluições seriadas de extrato de bagaço de uva: extração bioquímica de vermelho de Alizarina S, para análise semiquantitativa de depósitos de cálcio*



**Figure 16.** Quantitative analysis of Alizarin Red S (ARS)-stained UMR-106 osteogenic cell cultures grown on 24-well polystyrene plates at day 7 of culture, exposed from day 2 to day 5 to serial dilutions of the grape pomace extract in the culture medium. Notice the higher values of ARS in the cultures exposed to the extract in 0.001 to 0.1 µg/mL dilutions. Bars that share the same letter are not significantly ( $p > 0.05$ ) different from each other.