

**UNIVERSIDADE BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA
CAMPUS ITAQUERA**

DANIEL MUSSURI DE GOUVEIA

**NANOCOMPÓSITOS À BASE DE HIDROXIAPATITA E NANOTUBOS DE
CARBONO COMO REFORÇO EM BIOPOLIMERO HETERÓLOGO DE
FIBRINA DERIVADO DO VENENO DE SERPENTE PARA REGENERAÇÃO
ÓSSEA**

**NANOCOMPOSITES BASED ON HYDROXIAPATITE AND CARBON NANOTUBE
AS REINFORCEMENT IN FIBRIN SEALANT DERIVED FROM SNAKE VENOM
FOR BONE REGENERATION**

São Paulo – SP

2021

DANIEL MUSSURI DE GOUVEIA

**NANOCOMPÓSITOS À BASE DE HIDROXIAPATITA E NANOTUBOS DE
CARBONO COMO REFORÇO EM BIOPOLIMERO HETERÓLOGO DE
FIBRINA DERIVADO DO VENENO DE SERPENTE PARA REGENERAÇÃO
ÓSSEA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica.

Prof. Dr. Jose Carlos Cogo
Orientador

Prof. Dr. Hueliton Wilian Kido
Coorientador

São Paulo – SP
2021

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil,
com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

G738n GOUVEIA, Daniel Mussuri de.

Nanocompósitos à base de Hidróxiapatita e Nanotubos de carbono como reforço em Biopolímero heterólogo de fibrina derivado de veneno de serpente para regeneração óssea / Daniel Mussuri de Gouveia. -- São Paulo: Universidade Brasil, 2021.
67 f.: il. color.

Tese de Doutorado defendida no Programa de Pós-graduação do Curso de Engenharia Biomédica da Universidade Brasil.

Orientação: Prof. Dr. Prof. José Carlos Cogo.

Coorientador: Prof. Dr. Hueliton Wilian Kido.

1. *Crotalus dirissus terrificus*. 2. Biopolímero de fibrina. 3. Nanocompósitos hidroxiapatita. 4. Nanotubulos de carbono. 5. Reparo ósseo. I. Cogo, José Carlos. II. Kido, Hueliton Wilian. III. Título.

CDD 620.82



UNIVERSIDADE
BRASIL

Termo de Autorização

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respetivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: "NANOCOMPÓSITOS A BASE DE HIDROXIAPATITA E NANOTUBOS DE CARBONO COMO REFORÇO EM BIOPOLÍMERO HETERÓLOGO DE FIBRINA DERIVADO DO VENENO DE SERPENTE PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA"

Autor(es):

Discente: **Daniel Mussuri de Gouveia,**

Assinatura: _____

Orientador(a): **Prof.(a) Dr.(a) José Carlos Cogo**

Assinatura: _____

Coorientador(a): **Prof.(a) Dr.(a) HUELTON WILIAN KIDO**

Assinatura: _____

Houve alteração do Título: sim () não (X):

Data: 14/12/2021



UNIVERSIDADE
BRASIL

TERMO DE APROVAÇÃO

DANIEL MUSSURI DE GOUVEIA

"NANOCOMPÓSITOS À BASE DE HIDROXIAPATITA E NANOTUBOS DE CARBONO COMO REFORÇO EM BIOPOLÍMERO HETERÓLOGO DE FIBRINA DERIVADO DO VENENO DE SERPENTE PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA".

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:

Prof(a). Dr(a) José Carlos Cogo (presidente-orientador)

Prof(a). Dr(a) Livia Assis Garcia (UNIVERSIDADE BRASIL)

Prof(a). Dr(a) Luciana Estevam Simonato (UNIVERSIDADE BRASIL)

Prof(a). Dr(a) Vania Maria de Araújo Giaretta (UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ)

Prof(a). Dr(a) Enéas de Freitas Dutra Junior (CENTRO UNIVERSITÁRIO UNNOVAFAP)

São Paulo, 24 de dezembro de 2021.

Presidente da Banca Prof(a) Dr(a) José Carlos Cogo

Houve alteração do Título: sim () não :

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus, Pois sem ele nada serei, aos familiares e a todos que contribuíram com esse estudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, força maior, luz de todos, fonte de esperança e fé. Senhor tu és o meu pastor.

Ao Prof. Dr. José Carlos Cogo meu orientador científico, pelo grande incentivo, pelas palavras de apoio, pelos momentos difíceis durante este processo, pelas alegrias compartilhadas, o meu obrigado.

Agradeço ao meu co-orientador Dr. Hueliton Wilian Kido, por todo apoio, suporte e conhecimento que me proporcionou para que pudesse chegar até aqui e contribuir com este projeto tão importante em minha caminhada profissional.

Ao Prof. Dr. Daniel Magalhães que, com grande profissionalismo, esteve sempre buscando os melhores caminhos a serem trilhados;

A minha esposa, namorada, amiga, companheira Michelle Athan Jorge, pela sua paciência e entendimento diante de tantas ausências. Também por sua sabedoria e profissionalismo quando decidiu estar junto neste trabalho, colaborando como pesquisadora.

Aos meus amados filhos, pelos melhores momentos de minha vida, pelos sorrisos, carinhos, olhares do dia a dia e pela paciência exercida por cada um a cada dia.

Aos meus irmãos, sobrinhos, sobrinhas e cunhadas que entenderam a minha ausência durante este período de busca incansável pelo conhecimento.

Aos meus pais Daniel Benedito de Gouveia (*in memoriam*) e Maria Glória Mussuri de Gouveia, que foram sempre meus maiores incentivadores.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da UNIBRASIL pela competência, amizade e conhecimentos transmitidos ao longo desta jornada.

Aos professores do Centro Universitário Uninove que gentilmente colaboraram de uma forma ou de outra com a minha formação.

A FAPESP, incentivo e fomento deste processo de doutoramento. Aos técnicos e monitores do laboratório de cirurgia experimental e a todos os meus alunos do curso de Biomedicina que fizeram parte deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que este momento se concretizasse: o meu muito obrigado. momento se concretizasse: o meu muito obrigado.

“Já que este é o desejo de seu coração e você não pediu riquezas, nem bens, nem honra, nem a morte dos seus inimigos, nem vida longa, mas sabedoria e conhecimento para prestar assistência ao meu povo, EU o farei” (BIBLIA SAGRADA, 1 Reis 3:11)

RESUMO

O biopolímero de fibrina (BHF) desenvolvido a partir do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (cascavel) é um derivado heterólogo semelhante à trombina que converte fibrinogênio em fibrina. É um produto natural, em forma de gel, biodegradável, bioabsorvente, não tóxico e não imunogênico. Por outro lado, nanocompósitos de hidroxiapatita (nHAp) e nanotubos de carbono (NTCs) apresentam bioatividade, não são citotóxicos e possuem efeito bactericida. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a mistura de nHAp e NTCs com o BHF no processo de aceleração do reparo ósseo. A produção dos nanocompósitos consistiu, primeiramente, na síntese dos NTCs de múltiplas paredes, seguido de sua funcionalização ao plasma de O₂ e purificação com banho ácido. Com esse material pronto, produziu-se o compósito de nHAp com NTC. Em seguida esse material foi adicionado no BHF derivado do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* (cascavel) e realizada a caracterização físico-química desta mistura. As pastilhas formadas por essas misturas foram analisadas e fotografadas em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foram também testados em cultura de células osteoblásticas para verificar a sua citotoxicidade. Para tal, células da linhagem MC3T3-E1 foram cultivadas e verificados a viabilidade celular utilizando as técnicas de AlamarBlue[®] e LIVE/DEAD[®] Viability/Cytotoxicity. Foi realizada também experimentos em ratos induzindo o defeito ósseo em tíbias e verificando a reparação óssea utilizando técnicas de histologia. Todos os dados foram analisados por meio do teste de normalidade, sendo os resultados paramétricos submetidos ao teste de variância two way ANOVA (tempo xs amostras) complementado pelo pós-teste de Tukey a fim de verificar as diferenças estatísticas entre grupos. Foi utilizado o software GraphPad Prism 5.01 (San Diego, CA, USA). Os resultados foram apresentados como média desvio ± padrão (p≤0,05). Os resultados mostraram que houve uma boa distribuição homogênea das misturas, não houve mudança no pH e massa das amostras e que a mistura mais adequada para os testes *in vitro* é a de BHF+nHAp com nanotubos de carbono 1 e 2%. A mistura não é citotóxica para células da linhagem MC3T3-E1. O BHF assim como sua associação com nHAp e NTCs promoveram o tecido ósseo neoformado na área da fratura, mostrando potencial osteogênico em fraturas ósseas.

Palavras-chaves: *Crotalus dirissus terrificus*. Biopolímero de fibrina. Nanocompósitos hidroxiapatita. Nanotubulos de carbono. Reparo ósseo.

ABSTRACT

Fibrin sealants (BHF), developed from human hematological derivatives, mimic physiological clots, being widely used in general, cosmetic and postoperative surgeries due to their hemostatic and adhesive action. BHF developed from the venom of *Crotalus durissus terrificus* (rattlesnake) is a heterologous thrombin-like derivative that converts fibrinogen into fibrin. As it is a natural product, in gel form, biodegradable, bioabsorbent, non-toxic and non-immunogenic. On the other hand, hydroxyapatite nanocomposites (nHAp) and carbon nanotubes (NTCs), produced by chemical synthesis assisted by the ultrasound technique, present bioactivity, are not cytotoxic and have a bactericidal effect. The aim of the present work is to evaluate the mixture of hydroxyapatite-based nanocomposites and carbon nanotubes with fibrin sealant as agents in the process of accelerating bone regeneration. The production of the nanocomposites consisted, firstly, in the synthesis of NTCs with multiple walls, followed by their functionalization to the O₂ plasma and purification with an acid bath. With this material ready, the composite of nHAp with NTC was produced. Then, this material was added to the BHF and the physicochemical characterization of this mixture was carried out. The pellets formed by these mixtures were analyzed and photographed under scanning electron microscopy (SEM). These mixtures were also tested in MC3T3-E1 cell cultures to verify their toxicity. For this purpose, osteoblast cells were cultured and cell viability was verified using the alamarBlue® e LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity technique. Experiments were also carried out in rats, inducing bone defect in tibias and verifying bone repair. All data were analyzed using the normality test, and the parametric results were submitted to the two-way ANOVA complemented by Tukey's post-test ($p \leq 0,05$). The results showed that there was a good homogeneous distribution of the mixtures and that the most suitable mixture for in vitro tests is that of BFH+nHAp and 1% and 2% carbon nanotubes. The mixture is not cytotoxic and promoted neoformation in the fracture area, demonstrating osteogenic potential in bone fractures.

Keywords: *Crotaçus dirissus terrificus*. Fibrin sealant. Hydroxyapatite nanocomposites. Carbon nanotubes. Bone regeneration.

DIVULGAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTO

Esta pesquisa teve como objetivo verificar o efeito do biopolímero heterólogo de fibrina associado ao biomaterial hidroxiapatita e nanotubos de carbono no processo de reparo ósseo.

Os resultados mostraram que a associação desses biomateriais promove o reparo ósseo em tíbias de ratos após 14 dias de realizado o defeito ósseo e colocado o biomaterial.

Concluimos que os resultados são positivos indicando que essa técnica e a união desse material poderá ser importante para futuros estudos em reparo ósseo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Células do tecido ósseo: osteoblastos, osteoclastos e osteócitos.....	24
Figura 2 -	Estrutura de um nanotubo.....	28
Figura 3 -	Componentes do biopolímero heterólogo de fibrina.....	31
Figura 4 -	Confecção das pastilhas usando como molde a placa de teflon.....	34
Figura 5 -	Exemplo da análise das fotos obtidas no MEV.....	36
Figura 6 -	Processo de realização do defeito ósseo.....	42
Figura 7 -	Avaliação de pH e massa das amostras.....	45
Figura 8 -	Imagens das amostras analisadas através do MEV.....	46
Figura 9 -	Intensidade dos pixels.....	47
Figura 10 -	Gráfico de redução de alamarBlue dos grupos Controle.....	48
Figura 11 -	Imagens de fluorescência do ensaio de viabilidade celular.....	50
Figura 12 -	Fotomicrografias representativas da análise histopatológica do reparo ósseo.....	52

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise da Variância
BHF	biopolímero heterólogo de fibrina
CA	Califórnia
CAQI	Central de Análises Químicas
CEUA	Comissão de ética e Uso de Animais
CEVAP	Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos
CON	Grupo controle
CV	Cristal Violeta
CVD	Chemical Vapor Deposition
DMSO	Dimethyl Sulfoxide - Sigma-Aldrich
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HAp	Hidroxiapatita
IFN-γ	interferon- γ
INPE	Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
IQSC	Instrumentais do Instituto de Química de São Carlos
LAS	Laboratório Associado de Sensores e Materiais
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT	(3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-brometo de difeniltetrazólio)
MWCNT	– de carbono de múltiplas paredes com óxido de grafeno.
GO	
MWCNTs	Nanotubos de carbono de múltiplas paredes em inglês multi-walled carbon nanotube
nHAp	Nano hidroxihapatita
nHApB	Nano hidroxihapatita com biopolímetro de fibrina
nHApS	Nano hidroxihapatita com selante de fibrina
NK	Natural killers
NTCPM	Nanotubos de paredes múltiplas
NTCPS	Nanotubos de paredes únicas ou simples
OMS	Organização Mundial da Saúde

PBS	Solução salina tamponada
Ph	Potencial hidrogeniônico
SF	Selante de fibrina
SP	São Paulo
St	Saint
UNESP	Universidade do Estado de São Paulo
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

Nm/s	Newton metro por segundo [Nm/s]
nm/s	Nanômetro por segundo [nm/s]
Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	Hidroxiapatita
CO ₃	Carbon trioxide
HPO ₄	Hidrogenofosfato
F	Fluor
Cl	Cloreto
Mg	Magnésio
Na	Sódio
H ₂ SO ₄ :	Acido sulfurico
HNO ₃	Acido nítrico
K.	Potássio
C ₁₀ H ₁₆ O	Cânfora
N ₂	Nitrogenio
H ₂ O	Água
(NH ₄)H ₂ PO ₄	Fosfato de amônio
Ca (NO ₃) ₂ 4H ₂ O	Nitrato de cálcio tetra hidratado
VO ₂	Volume de oxigênio
°C	Grau Celsius
KF	Constante de capacidade de adsorção de Freundlich
pKa	Constante de dissociação
Q	Vazão
%	Por cento
W	Watts
nm	Nanômetros
V	Volts
mTorr	Millitorr Pressure Unit.
µL	Microlitro
mm	Milímetro
pA	Pressão atmosférica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVO	21
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3 REVISÃO DA LITERATURA	22
3.1 O TECIDO ÓSSEO.....	22
3.2 O REPARO ÓSSEO	23
3.3 BIOENGENHARIA TECIDUAL	25
3.4 BIOMATERIAIS À BASE DE FOSFATO DE CÁLCIO.....	25
3.5 HIDROXIAPATITA	26
3.6 NANOTUBOS DE CARBONOS.....	26
3.7 BIOPOLÍMERO HETERÓLOGO DE FIBRINA.....	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 MATERIAL	30
4.2 SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICO DAS AMOSTRAS	30
4.2.1 Produção dos NTCs	31
4.2.2 Purificação dos NTCs	31
4.2.3 Funcionalização dos NTCs	31
4.2.4 Produção dos nanocompósitos de hidroxiapatita (nHAp) e NTCs utilizando síntese química assistida por ultrassom	32
4.3 FORMAÇÃO DOS GRUPOS.....	33
4.4 CARACTERIZAÇÃO DA MASSA E PH DAS AMOSTRAS	34
4.5 OBSERVAÇÃO E ANÁLISE EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	34
4.6 ANÁLISE DAS IMAGENS OBTIDAS NO MEV - ANÁLISE DE UNIFORMIDADE DE SUPERFÍCIE	34
4.7 EXPERIMENTO <i>IN VITRO</i>	35
4.7.1 Comitê de Ética	35
4.7.2 Síntese das amostras	35
4.7.3 Delineamento experimental	36
4.7.4 Formação dos grupos	36
4.7.5 Viabilidade celular pelo ensaio de alamarBlue®	37
4.7.6 Viabilidade celular pelo Kit LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity	37

4.8 EXPERIMENTO <i>IN VIVO</i>	38
4.8.1 Síntese das amostras	38
4.8.2 Comitê de Ética:	38
4.8.3 Animais	38
4.8.4 Formação dos grupos	38
4.8.5 Anestesia	39
4.8.6 Cirurgia	39
4.8.7 Fixação e descalcificação	40
4.8.8 Análise histológica	41
4.8.9 Análise estatística	41
5 RESULTADOS	42
5.1 ANÁLISE DA MASSA E PH	42
5.2 ANÁLISE DAS IMAGENS OBTIDAS NO MEV E INTENSIDADE DE BRILHO DOS PIXELS	44
5.3 ESTUDO <i>IN VITRO</i>	45
5.3.1 Viabilidade celular pelo ensaio de alamarBlue®	45
5.3.2 Viabilidade celular pelo Kit LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity	46
5.4 ESTUDO <i>IN VIVO</i>	48
5.4.1 Observações clínicas pós-cirúrgicas dos animais experimentais	48
5.4.2 Análise histológica	49
6 DISCUSSÃO	50
7 CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS	56
ANEXO I	61

1 INTRODUÇÃO

De acordo com dados colhidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2020) sabe-se que a quantidade de pessoas idosas no mundo até o ano de 2050 poderá alcançar a marca de aproximadamente 2 bilhões, o que evidencia em número algo próximo a 20% da população. Dentro do território nacional até meados de 2025, segundo o IBGE (2021), o Brasil será o sexto país no mundo com maior número de pessoas nessa faixa etária.

Neste cenário, os idosos tendem a apresentar problemas ósseos cada vez mais frequentes, tais como fraturas e quebras nos ossos que são geradas por diversos fatores que podem ser endógenos ou exógenos. Sobre os fatores endógenos é sabido que eles se relacionam com carência nutricional, déficit no metabolismo, baixa nos suprimentos sanguíneos, aumento das doenças degenerativas dos ossos. A respeito dos fatores exógenos, por sua vez, se evidencia na queda da própria altura, traumas, sinistros, amputações dentre outros fatores que provocam a descontinuidade do tecido ósseo (SALOMÃO; SIQUEIRA, 2010).

Para converter essa situação causada pelos fatores supracitados, o reparo ósseo para ser consolidado, precisa de ter influência de algumas variáveis, tais como exemplo: amplo suprimento sanguíneo, estabilidade mecânica, presença de um arcabouço tridimensional e o tamanho do sítio lesionado, idade aceitação ao tratamento e tempo de consolidação (MILANETTI, 2010).

Para ajudar nesse problema de saúde pública, a nanobiotecnologia se apresenta como um ramo da engenharia tecidual, que tem como objetivo desenvolver novos produtos, materiais e substâncias a nível molecular e em microescala, para que possam ser aplicados em processos biológicos como no reparo ósseo (GUASTALDI e HERRERA, 2010).

A bioengenharia tecidual é um campo multidisciplinar, que envolve a aplicação de princípios e métodos da engenharia e das ciências da saúde, para assistir e acelerar a regeneração e o reparo de tecidos (MOREIRA, 2013).

A hidroxiapatita é um biomaterial que é atualmente bem estudado. Existem estudos avançados que têm agregado a hidroxiapatita a outros compostos para dar a resistência e a firmeza necessária à estrutura, sendo um

material bastante estudado na forma de Grafeno e de Nanotubos de Carbono (LI et al., 2014; HAMILTON et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2019).

Outro material promissor na reconstituição de tecidos é o biopolímero de fibrina, que possui a propriedade de adsorver e/ou absorver, tornando-se um excelente suporte para ação e para a potencialização de drogas anticancerígenas no tratamento de tumores ósseos (COSTA et al., 2009).

Assim, sabendo dos benefícios da hidroxiapatita, dos nanotubos de carbono e do biopolímero heterólogo de fibrina, o presente estudo propõe associar esses 3 componentes e verificar os seus efeitos no reparo ósseo.

Ao melhor de nosso conhecimento, não existem na literatura, artigos que estudou o reparo ósseo utilizando o biopolímero heterólogo de fibrina derivado de veneno de serpente associado a hidroxiapatita com nanotubos de carbono.

2 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a utilização de nanocompósitos à base de hidroxiapatita e nanotubos de carbono como reforço em biopolímero heterólogo de fibrina derivado do veneno de serpente para utilização na regeneração óssea.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização físico-química das amostras para verificar a sua homogeneização e concentração adequada para estudos in "*in vivo*".
- Avaliar a capacidade do biopolímero heterólogo de fibrina associado à hidroxiapatita e nanotubos em promover a proliferação e adesão celular.
- Avaliar a viabilidade celular pelo ensaio de alamarBlue® e pelo Kit LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity.
- Avaliar as características físico-químicas das amostras pelo MEV.
- Verificar a reparação tecidual óssea em tíbias de ratos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é um tipo específico de tecido conjuntivo que tem como principal função dar sustentação ao corpo e é responsável pela formação dos ossos. É composto por células especializadas (osteoblastos, osteoclastos e osteócitos), uma matriz chamada de matriz óssea onde encontramos colágeno Tipo I e material inorgânico principalmente fosfato de cálcio. Devido à grande quantidade de fosfato de cálcio encontrado no tecido ósseo, isto o torna um depósito desse íon no organismo (HENRIKSEN et al., 2009; STANDRING, 2009).

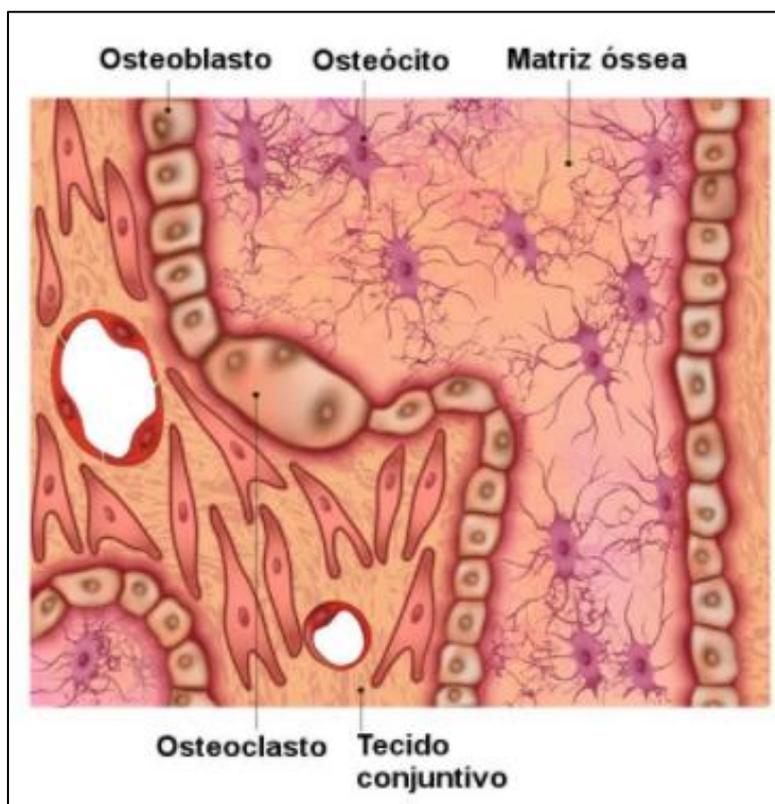
A composição do material encontrado no osso é de 8% de água e 92% de material sólido, podendo haver variações entre estas proporções. O material sólido possui cerca de 21% de material orgânico e 71% de material inorgânico propiciando propriedades mecânicas de elasticidade do tecido, resistência e rigidez, inerentes a este tecido (PARK et al., 2010).

O fosfato de cálcio forma cristais nanométricos de hidroxiapatita, cuja fórmula química é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. O tecido ósseo não é formado inteiramente por esses componentes, mas sim também composto por íons incluindo CO_3 , HPO_4 , F, Cl, Mg, Na, íons de K (CUNHA; FIGUEIRA, 2011; CUNHA et al., 2014).

Os osteoblastos são células responsáveis pela construção do tecido ósseo e por reduzir os elementos da matriz orgânica, além de executar o controle da mineralização. Representam cerca de 5% das células do tecido ósseo. O formato dessas células é levemente parecido com um cubo. Elas desempenham outras atividades tais como auxiliar o processo de cicatrização, uma vez que são procedentes do perióstio, endóstio e células mesenquimais indiferenciadas circulantes. Os osteoclastos representam cerca de 1% do tecido ósseo e tem como principal função reabsorção óssea, essencial para manter a estrutura óssea. Já os osteócitos são as células mais abundantes nos ossos constituindo mais de 90% do conteúdo celular. Possuem o citoplasma alongado cujo arranjo os possibilita realizar um controle de homeostasia do cálcio plasmático. Ficam presas dentro da matriz óssea no decorrer do processo de mineralização tendo suas atividades, sintéticas e secretora e normalmente tem aparência achatada. As funções dos osteócitos são variadas, mas a principal está em fazer parte em

processos de sinalização na síntese e reabsorção óssea (Figura 1) (FALONI, 2006).

Figura 1 – Células do tecido ósseo: o tecido ósseo é formado por várias células como os osteoblastos, osteoclastos e osteócitos, mergulhadas na matriz óssea.



Fonte: (FALONI, 2006)

3.2 O REPARO ÓSSEO

Quando acontece a lesão ou danos no tecido ósseo o mesmo é capaz de realizar sua regeneração. Neste sentido, a regeneração óssea consiste em um processo biológico do próprio tecido onde ele se recupera quando acontece a ruptura ou lesão do mesmo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; MILLANETTI, 2010; SALOMÃO, 2010).

O processo de regeneração do osso pode ser resumido em três etapas que são:

- A fase inflamatória

Esta etapa tem como característica a formação de um coágulo

sanguíneo que engloba a parte externa do osso na área em que a lesão ocorreu, ampliando-se através do periósteo e cavidades medulares mais próximas. Assim, é instalado um processo inflamatório profundo e agudo tendo uma movimentação grande de neutrófilos e macrófagos, culminados pela liberação de substâncias quimiotáticas, quando a partir disso a fase reparadora é iniciada (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; MILLANETTI, 2010; SALOMÃO, 2010).

- A fase reparadora

O surgimento de uma gama de fibroblastos fabricantes de colágenos forma um calo fibroso onde as fibras do colágeno possam cobrir a área lesada. Consiste na parte mais importante e envolvem a região lesionada. Conforme a ação dos macrófagos avança, uma nova conexão capilar reconstruída derivada das células endoteliais excedentes dos vasos dilacerados e das células mesenquimais indiferenciadas. Elas invadem a área do coágulo, acompanhadas dos fibroblastos e osteoblastos, visando realizar de forma rápida a formação de um novo tecido ósseo na região. Assim, através do processo de ossificação intramembranosa ou endoconjuntiva, ocorre a formação de um osso imaturo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; MILLANETTI, 2010; SALOMÃO, 2010).

- A fase remodeladora

A região afetada pela lesão precisa, após a fase reparadora, executar as mesmas funções (morfológicas, biomecânicas e funcionais) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; MILLANETTI, 2010; SALOMÃO, 2010).

Neste sentido, a matriz osteoide (constituída de osteoblastos) apresenta uma capacidade restrita de migração e reprodução para que a formação óssea ocorra na região determinada. As células progenitoras mesenquimais indiferenciadas (células osteoprogenitoras) realizam a migração até a região e diferenciam-se em osteoblastos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; MILLANETTI, 2010; SALOMÃO, 2010).

Contudo, o calo ósseo será, com o tempo (normalmente um ano ou mais de acordo com o quadro clínico do paciente), substituído por um osso compacto.

Neste processo de troca pode haver a criação excessiva de um outro osso na área da fratura, sendo esse excesso posteriormente reabsorvido. Esse processo é denominado de remodelação (BORGES et al., 2009; SALOMÃO, 2010).

Por fim, o processo de cicatrização de um osso depende de diversos fatores, dentre os quais o tipo do osso lesado, área onde foi danificado, além da faixa etária do paciente, fator importantíssimo neste processo (TOMERA, 2009).

3.3 BIOENGENHARIA TECIDUAL

A bioengenharia consiste em uma área de atuação multidisciplinar que busca realizar uma união entre a área biológica e física. Uma das áreas de estudos é a exploração de materiais que sejam compatíveis com sistemas biológicos.

Os biomateriais são materiais que podem substituir sistemas biológicos e pra tal, precisam ser biocompatíveis e funcionais, não provocando reações alérgicas e inflamatórias.

No caso de regeneração óssea, os biomateriais tem que, necessariamente atuar no sentido de promover uma melhora nesse processo, principalmente quando esta não ocorre de forma espontânea. Assim, o uso dos biomateriais necessita ser previamente testado, sendo necessário determinar através de experimentos suas características físico-químicas e biológicas. Isso tem importância vital, buscando a devolução da função do tecido, melhorando a qualidade de vida dos pacientes (SERVERINO et al., 2011; TAVARES, 2011).

Neste sentido, pode-se dizer que os biomateriais consistem em materiais que têm a possibilidade de serem implantados para permutar ou realizar a reparação dos tecidos biológicos em falta, podendo ter características naturais ou sintéticas (SMITH; HASHEMI, 2012; RATNER, 2013).

3.4 BIOMATERIAIS À BASE DE FOSFATO DE CÁLCIO

Existem diferentes tipos de biomateriais que podem ser utilizados, mas o mais aplicado no processo clínico são aqueles com base de fosfato de cálcio, já que atuam como um biomaterial regenerativo e são utilizados como substitutos do enxerto ósseo autógeno. Desta forma, as bases de fosfatos de cálcio têm sua modelação facilitada e, portanto, adaptáveis a área de implantação (GUASTALDI, 2010).

Nesse contexto, as biocerâmicas sintéticas à base de fosfato de cálcio

têm importância cada vez maior, pois são indicadas por atuar como uma matriz tridimensional ou estrutural na reparação óssea (OLIVEIRA, 2010).

3.5 HIDROXIAPATITA

O principal componente dos ossos é a hidroxiapatita que faz parte de 95% da massa óssea e, portanto, fazendo parte da parte mineral do osso natural. É um material inorgânico e induz o crescimento ósseo na região em que se encontra (AOKI, 1991; MOSSAAD et al., 2010).

A hidroxiapatita sintetizada em laboratório tem as mesmas características que as encontradas no tecido ósseo, ou seja, é biocompatível com sistemas biológicos, sendo aceita pelos tecidos vivos, não é carcinogênica e nem alergênica, e possuem capacidade de ligação ao tecido ósseo. Assim, pode-se dizer que ela é consideravelmente segura e clinicamente aceitável, dando assim sua contribuição do processo de formação óssea (BERNI-NETO, 2010; DELFINO et al., 2010; BONAN et al., 2014; YELTEN; YILMAZ, 2017).

Entretanto, Berni-Neto (2010) alegou que existem alguns malefícios e desvantagens particulares, fatores estes que acabam por limitar a utilização da hidroxiapatita cerâmica para a troca de tecidos rígidos, tais como sua minimizada resistência mecânica, ou os possíveis conflitos entre porosidade e resistência mecânica.

Sobre o processo de reabsorção da hidroxiapatita Caliman (2011) afirmou que ela pode revestir a lesão das partículas na medida em que a formação do novo osso é envolvida no interior dos poros formados no interior do biomaterial. O pH consiste em um dos fatores importantes para que haja a dissolução do biomaterial *in vitro*, além do tipo e forma de concentração e do nível de saturação da mistura na qual é testada, bem como a constituição e cristalinidade dos fosfatos de cálcio.

3.6 NANOTUBOS DE CARBONOS

Os nanotubos de carbono (NTCs) consistem em nanoestruturas com formato cilíndrico tendo seu diâmetro na sequência de poucos nanômetros, cujo comprimento é de micrômetros, ou seja, estruturas pequenínimas (SILVA et

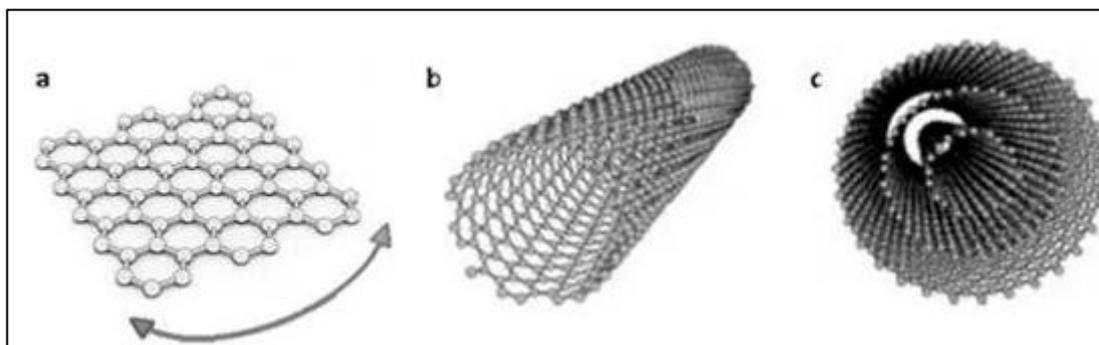
al., 2011).

Sua estrutura é composta por uma ou diversas folhas de grafite arroladas ao redor de um mesmo centro, tendo sua classificação feita em dois tipos (Figura 2) (CARVALHO et al., 2018).

São estruturados como:

- Nanotubos de paredes únicas ou simples (NTCPS¹): Dispõem de somente uma faixa de grafite em sua composição como o próprio nome já diz, podendo ter tamanho de 0,7 e 2,0 nm.
- Nanotubos de paredes múltiplas (NTCPM²): Constituídos de diversos cilindros concêntricos de grafite apresentam um tamanho que pode atingir os 100 nm.

Figura 2 – Estrutura de um nanotubo: sua estrutura é como uma folha (A) arrolhada sobre si mesma, podendo ser de parede única (B) ou paredes múltiplas (C).



Fonte: (CARVALHO et al., 2018)

O potencial do uso dos NTCs nas aplicações tecnológicas é muito grande, tendo em vista os elementos térmicos, elétricos e mecânicos como, por exemplo, para o desenvolvimento e evolução dos sensores e também na construção de novos materiais biológicos, tais como compósitos na engenharia de reconstrução de tecidos ósseos (OLIVEIRA et al., 2019).

Existem algumas vantagens no uso dos nanotubos de carbono no processo de remodelação óssea, visto que os NTCs mostram uma resistência mecânica muito alta em decorrência da forte ligação covalente de seus átomos

¹ Podendo ser chamada também de Single-wall carbon nanotubes (SWCNT) na versão em inglês.

² Chamado também de multi-wall carbon nanotubes (MWCNT) na versão em inglês.

aliados a uma ótima condução térmica e elétrica em virtude das suas características. Dessa forma, a falta de ligações pendentes proporciona a este material uma alta inércia química, o que é essencial para a sua utilização nos processos de biotecnológicas e bioquímicas (SANTOS, 2016).

Na regeneração óssea, promove o encapsulamento de enzimas, no controle e divisão de drogas e tendem a realizar a nucleação de cristais e o aumento dos elementos inorgânicos da matriz óssea, além de dar suporte ao desenvolvimento e aumento dos osteoblastos e agilizar a formação óssea (VAN-NOORDEN, 2011).

3.7 BIOPOLÍMERO HETERÓLOGO DE FIBRINA

Os biopolímeros fibrínicos são produtos que têm em sua gênese nas proteínas do plasma, pois atuam na etapa final da coagulação. Sendo assim, podem ser utilizados para minimizar a perda de sangue na fase pós-operatória (especialmente), assim como os agentes hemostáticos, que atuam como gerador da técnica de cicatrização e restauração do tecido, dentre outros aspectos (BUCHATA et al., 2004; FERGUNSON et al., 2010).

Os biopolímeros fibrínicos derivados de plasma humano têm tido êxito em sua aplicação quando usado como arcabouço (*scaffolds*) e adesivos visando assim aprimorar a regeneração e recuperação dos tecidos (BARBOSA et al., 2008; BARROS et al., 2009; DE BARROS et al., 2015).

Este produto começou a ser utilizado na década de 60 do século XX, e com a evolução das técnicas laboratoriais, aliada as melhorias da produção dos biopolímeros fibrínicos, bem como nos procedimentos técnicos de aplicação possibilitaram que esses adesivos fossem muito bem usados em várias especialidades cirúrgicas (FERGUNSON et al., 2010).

Os adesivos fibrínicos tem sido de grande valia nos procedimentos cirúrgicos uma vez que estes elementos dispõem de compatibilidade biológica e é biodegradável (ROBERTS et al., 2011).

Recentemente, Pomini et al. (2019) utilizaram o biopolímero de fibrina derivado do sangue humano testando como *scaffold* associado com a fotobiomodulação na regeneração óssea. Verificou que o grupo que recebeu a fotobiomodulação houve melhor organização de deposição das fibras de

colágeno dando homogeneidade à formação do osso.

Embora os selantes derivados de sangue humano mostrem bons resultados, existe a possibilidade de risco de transmitir doenças infecciosas como a hepatite, HIV e papiloma vírus (EDER et al., 1986; KAWAMURA et al., 2002; FERREIRA 2014; FERREIRA et al., 2017; POMINI et al., 2019).

Para contornar essa situação, na década de 1980 pesquisadores do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) da Universidade do Estado de São Paulo (UNESP), em Botucatu desenvolveram uma nova fibrina derivada do veneno de serpentes (*Crotalus Durissus Terrificus*) e que juntamente com o fibrinogênio retirado a partir do sangue de animal de alto porte (búfalo) poderia ser utilizado sem riscos de contaminação (BARBOSA et al., 2008; ALVES et al., 2014; FERREIRA et al., 2017).

Assim, pesquisas utilizando essa nova ferramenta foram realizadas mostrando a efetividade do seu uso em diversos campos de pesquisas. Orsi et al. (2017) verificaram a citotoxicidade do biopolímero heterólogo de fibrina em células ósseas através da técnica de cultura de células utilizando teste de MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) e análise em Microscópio eletrônico de varredura o MEV. Em seguida promovendo defeito ósseo em ratos e aplicado o composto. Os resultados mostraram que não há efeito citotóxico e que ocorre uma boa resposta na formação de novo osso após 14 dias.

Ferreira et al. (2017) publicaram uma extensiva revisão sobre o uso do biopolímero de fibrina em várias situações patológicas e de reparo, como por exemplo, em úlceras venosas crônicas, cirurgias periodontais, cirurgias plásticas, reparo em pele, em nervos periféricos e sistema musculoesquelético.

Gasparotto et al. (2014) relataram em seus estudos que o uso dos selantes heterólogo de fibrina (SF) possui resultados extremamente positivos em cultura de células mesenquimais e em cultura de células.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

O BHF foi gentilmente cedido pelo CEVAP, cujos componentes e fórmula de aplicação constam em seus pedidos de patentes (Números do registro: BR1020140114327 e BR1020140114360). O BHF é composto por 2 componentes: o componente A (fração 1 e diluente) e o componente B (fração 2), que devem ser descongelados e misturados somente no momento do uso (Figura 3).

Primeiramente foi realizada a produção dos nanocompósitos de hidroxiapatita (nHAp), dos nanotubos de carbono (NTCs), sua purificação e sua funcionalização e, posteriormente, a mistura dos 2 componentes.

Em seguida esse composto foi misturado com o BHF e realizada a análise do pH, a perda de massa e ainda a análise da homogeneização dessa mistura no microscópio eletrônico de varredura (MEV).

Figura 3 – Componentes do BHF: A fração 1 deve ser diluída pela solução diluente e misturada com a fração 2 no momento do uso.



Fonte: Autoria própria

4.2 SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICO DAS AMOSTRAS

A produção dos nanocompósitos consistiu, primeiramente, na síntese dos NTCs de múltiplas paredes, seguido de sua funcionalização ao plasma de

O₂ e purificação com banho ácido. Com esse material pronto, produziu-se o compósito de nHAp com NTC. Em seguida esse material foi adicionado no selante de fibrina derivado do veneno da serpente *Crotalus durissus terríficus* (cascavel) e realizada a caracterização físico-química desta mistura (LOBO et al., 2013).

4.2.1 Produção dos NTCs

Todo o processo de produção dos NTCs foi realizado no Laboratório Associado de Sensores e Materiais (LAS) do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE). Os NTCs de múltiplas paredes foram depositados na parede do tubo de quartzo por vapor químico (método CVD térmico) à pressão atmosférica em 850°C. Fontes de carbono (cânfora, C₁₀H₁₆O, 84% da massa total), e o catalisador de Fe (ferroceno, Fe (C₅H₅)₂, 16%) foram evaporados a 200°C e transportados para dentro do tubo de quartzo por um fluxo de N₂ de 1,5 litros/minuto. Após 5 minutos de reação, os vapores foram cortados e o forno arrefecido até a temperatura ambiente sob N₂. Os NTCs foram produzidos utilizando cânfora/ferroceno e purificados por recozimento a alta temperatura numa atmosfera livre de oxigênio (N₂) (LOBO et al., 2013).

4.2.2 Purificação dos NTCs

O método de purificação dos NTCs para retirada de Fe⁺² do interior dos nanotubos foi realizado utilizando banho ácido com solução de H₂SO₄: HNO₃ (3: 1). Os NTCs foram misturados nesta solução e sonicados durante 5h utilizando aparelho da marca Elmasonic modelo S10H, depois a solução foi filtrada com uma membrana Millipore (0,45 µm poros) para obtenção dos NTCs purificados, e estes foram lavados com água deionizada até atingir pH neutro. Por fim, o pó de NTCs foi seco em estufa a 100°C durante 12h (LOBO et al., 2013).

4.2.3 Funcionalização dos NTCs

O método de funcionalização dos NTCs para a incorporação de

grupos contendo oxigênio foi realizado num reator de plasma pulsado de corrente contínua, com uma taxa de fluxo de oxigênio de 1 sccm, com uma pressão de 85mTorr, -700V e com uma frequência de pulsos de 20kHz a 50% ciclo de trabalho durante 40 minutos (LOBO et al., 2013).

4.2.4 Produção dos nanocompósitos de hidroxiapatita (nHAp) e NTCs utilizando síntese química assistida por ultrassom

Para a produção dos nHAp com as diferentes concentrações de NTCs, nitrato de cálcio tetra hidratado ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e fosfato de amônio monobásico $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$, foram dissolvidos em 50mL de água deionizada separadamente.

Para produção de cada um dos grupos, o pó de NTCs funcionalizado (1%, 2% em peso), foi dissolvido na solução de $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ e $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, utilizando uma sonda ultrassônica (Vibracell Sonics, 500 W) por 30 minutos. O controle do pH foi realizado inserindo-se solução de NH_4OH (hidróxido de amônio) (25%) gota à gota, visando a manutenção do pH da mesma em torno de 10 durante todo o processo.

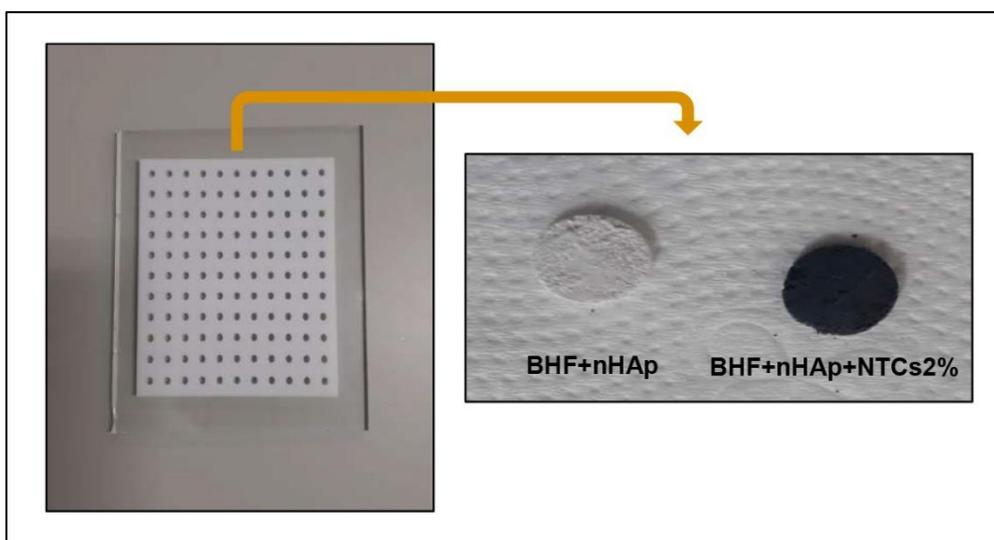
O precipitado foi deixado em repouso durante 120 horas, correspondendo ao tempo de maturação. O precipitado resultante foi filtrado, lavado com água destilada e colocado em estufa durante 48 horas a 60°C, após seco o material foi triturado utilizando moinho analítico modelo A11, marca IKA, com velocidade do motor de 28000 rpm, obtendo o grupo de nHAp/NTCs. Como grupo controle utilizou-se a nHAp sem adição de NTC e o próprio pó de NTCs (LOBO et al., 2013).

4.2.5 Síntese das amostras para estudo de caracterização dos materiais

Para a síntese das amostras, os materiais (nHAp e nHAP com as diferentes concentrações de NTCs) foram misturados com solução de tampão fosfato (PBS; apenas para o grupo com nHAp) ou com BHF de acordo com cada grupo experimental. Para a síntese das amostras com BHF, primeiramente os materiais foram misturados no componente A (fração 1 e diluente) do BHF, e em seguida realizada a mistura com o componente B (utilizadas as concentrações

de 0.5 g das amostras e 250 μ L do selante). Todas as amostras (com PBS ou BHF) foram homogeneizadas em um misturador odontológico por 20 segundos. Após homogeneização, a massa resultante foi adicionada em um molde de teflon com 6 mm de diâmetro e 2 mm de espessura, prensado por placas de vidro e levado a estufa a 37°C até a secagem do material durante 3 dias. Após período de secagem, foi observado que as pastilhas estavam íntegras, coesas e não se degradavam com a manipulação (Figura 4).

Figura 4 – Confeção das pastilhas usando como molde a placa de teflon. As pastilhas produzidas mostraram-se prontas para serem analisadas no MEV.



Fonte: Autoria própria

4.3 FORMAÇÃO DOS GRUPOS

Para o estudo físico-químico das amostras foram formados os seguintes grupos:

- **nHAp** – Solução salina (PBS – NaCl 0,9%) e nanocompósitos de hidroxiapatita.
- **BHF+nHAp** – Biopolímero heterólogo de fibrina e nanocompósitos de hidroxiapatita.
- **BHF+nHAp+NTCs1%** – Biopolímero heterólogo de fibrina e nanocompósitos de hidroxiapatita com 1% de nanotubos de carbono.
- **BHF+nHAp+NTCs2%** – Biopolímero heterólogo de fibrina e nanocompósitos de hidroxiapatita com 2% de nanotubos de carbono

4.4 CARACTERIZAÇÃO DA MASSA E PH DAS AMOSTRAS

Para avaliar a perda de massa e o pH, as amostras referentes aos respectivos grupos foram pesadas imersas em 3 ml de PBS (10 mM, pH 7) e incubados a 37°C e analisadas 7, 14 e 21 dias de imersão. A cada período, as amostras foram removidas e as massas mensuradas. Os materiais foram pesados e a percentagem da perda de massa calculada pela diferença dos valores iniciais e finais. O pH da solução onde as pastilhas estavam mergulhadas foi mensurado utilizando pHmetro marca Thermo Fisher (SP- Brasil). Após, as amostras foram submetidas a análise de MEV para a realização da avaliação morfológica e uniformidade de superfície dos materiais.

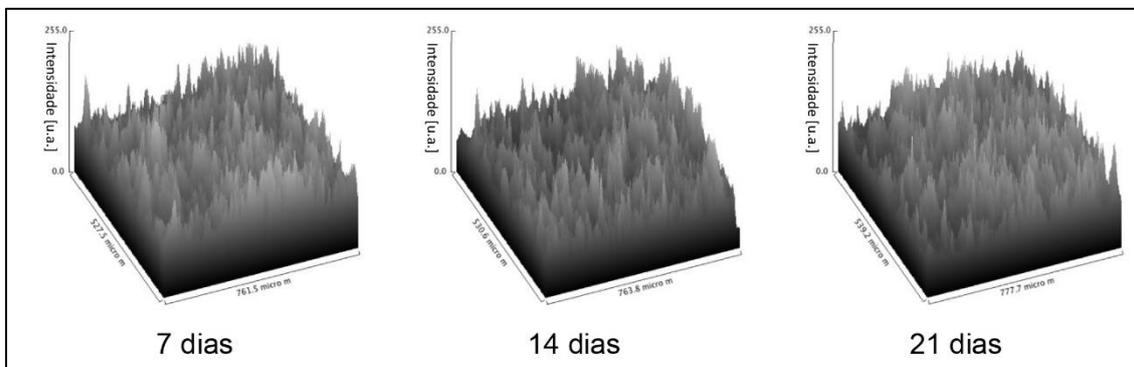
4.5 OBSERVAÇÃO E ANÁLISE EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Após o estudo de perda de massa e pH, as amostras incubadas em PBS por 7, 14 e 21 dias foram preparadas para serem observadas em MEV. As imagens de MEV foram obtidas na Central de Análises Químicas Instrumentais do Instituto de Química de São Carlos (CAQI/IQSC/USP) em um equipamento ZEISS LEO 440 (Cambridge, England) com detector OXFORD (model 7060), operando com feixe de elétrons de 20kV, corrente de 2,82A e I probe de 200pA. As amostras foram recobertas com 6 nm de ouro em um metalizador Coating System BAL-TEC MED 020 (BAL-TEC, Liechtenstein) e mantidas em dessecador até o momento de análise. Condições de metalização: pressão na câmara = $2,00 \times 10^{-2}$ mbar; corrente = 60mA; taxa de deposição 0,60 nm/s).

4.6 ANÁLISE DAS IMAGENS OBTIDAS NO MEV - ANÁLISE DE UNIFORMIDADE DE SUPERFÍCIE

Após a análise morfológica das amostras, as imagens de MEV foram utilizadas para a análise de uniformidade da superfície pela verificação do desvio padrão da intensidade de brilho dos pixels pelo software Image J (Figura 5).

A Figura 5 – Exemplo da análise das fotos obtidas no MEV considerando a intensidade de brilho dos pixels. Foram selecionadas como exemplo de análise realizada a mistura nHAp+BHF+NTCs2% em 7, 14 e 21 dias.



Fonte: Autoria própria

4.7 EXPERIMENTO *IN VITRO*

4.7.1 Comitê de Ética

Os experimentos realizados neste estudo na cultura de células (experimentos *in vitro*) não necessitaram da aprovação do Comitê de Ética em Uso de Animais. As células utilizadas foram adquiridas comercialmente por meio do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), linhagem celular MC3T3-E1 subclone 14 pré-osteoblastos provenientes de camundongos (NF 1882) em 26/11/2020.

Devido ao uso de animais na realização dos experimentos *in vivo*, o projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Nove de Julho - (UNINOVE) tendo sido aprovado sob nº 6675311018 (Anexo I).

4.7.2 Síntese das amostras

Para realizar os experimentos *in vitro* e *in vivo*, as amostras foram preparadas através da mistura de 40ul de BHF (20ul da fração 1, 12ul do diluente e 8ul da fração 2) juntamente com 3 a 3,5mg dos materiais (nHAp e nHAp com os NTCs 1 e 2%). Antes da preparação das amostras, os materiais foram

pesados individualmente e esterilizados em luz ultravioleta (UV) em cabine de fluxo laminar vertical por 3 horas.

Foi realizado primeiramente a mistura da fração 1 com o diluente e em seguida com o pó de cada material. Após ter certeza que a mistura estava homogênea, foi adicionado a fração 2. Quando se adiciona a fração 2, forma o coágulo semelhante a um coágulo sanguíneo. Esses materiais foram utilizados nos estudos *in vitro* por meio dos ensaios de viabilidade pelo reagente alamarBlue® (Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brasil) e pelo kit LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit (Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brasil).

4.7.3 Delineamento experimental

Foram utilizadas células da linhagem MC3T3-E1 SUBCLONE 14 (pré-osteoblastos), provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Rio de Janeiro, Brasil). As células foram cultivadas em frascos de cultura (com área de crescimento de 75 cm²) (TPP, Biosystems, Curitiba, Brasil) com meio de cultura MEM Alfa (Vitrocell, Brasil), suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SFB) (Vitrocell, Brasil), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL), incubadas em estufa à temperatura de 37°C e em atmosfera contendo 5% de CO₂.

O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias e o desenvolvimento das células avaliado por Microscopia de fase invertida (Microscópio Carl Zeiss, Microlimaging GmbH – Axiovert 40C, Germany) até que as células atingissem a confluência de 80% do frasco.

Após atingir a confluência desejada, as células foram retiradas da garrafa e utilizadas nos ensaios de viabilidade celular.

4.7.4 Formação dos grupos

Para o estudo em cultura de células das amostras foram formados os seguintes grupos:

- **Controle:** células cultivadas apenas com meio de cultura celular.
- **BHF:** células cultivadas com biopolímero heterólogo de fibrina.
- **BHF+nHAp:** células cultivadas com biopolímero heterólogo de fibrina e

nanocompósitos de hidroxiapatita.

- **BHF+nHAp+NTCs1%:** células cultivadas com biopolímero heterólogo de fibrina e nanocompósitos de hidroxiapatita com 1% de nanotubos de carbono.
- **BHF+nHAp+NTCs2%:** células cultivadas com biopolímero heterólogo de fibrina e nanocompósitos de hidroxiapatita com 2% de nanotubos de carbono.

4.7.5 Viabilidade celular pelo ensaio de alamarBlue®

Para esta análise, as células foram transferidas para placas de 96 poços (4.500 células por cm^2) e cultivadas em contato com os materiais (BHF, BHF+nHAp, BHF+nHAp+NTCs1% e BHF+nHAp+NTCs2%) em uma incubadora a 37°C com 5% de CO_2 pelo período de 3, 7 e 14 dias. Para o grupo controle, os poços foram preenchidos com células e meio de cultura e analisados nos mesmos períodos dos demais grupos. Para o cultivo das células, foram utilizados meio de cultura osteogênico (meio alfa MEM com 1% de b-Glicerofosfato, 1% de sal trissódico de ácido 2-fosfo-L-ascórbico e 0,1% de dexametasona) para todos os grupos. Após cada período experimental, os poços das placas de cultura foram lavados com PBS e uma solução de alamarBlue® a 10% (Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brasil) foi então adicionada e mantida com as células a 37° por um período de 3 h. Em seguida, uma alíquota da solução resultante de cada poço foi transferida para uma nova placa de 96 poços para serem lidos por um leitor de placas espectrofotométrico a 570 e 600 nm. A partir dos valores obtidos, foi realizado um cálculo para verificar a porcentagem de redução de alamarBlue® (de acordo com instruções do fabricante).

4.7.6 Viabilidade celular pelo Kit LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity

A viabilidade celular também foi avaliada pelo ensaio com o LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit (Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brasil) após 3, 7 e 14 dias de incubação das células (4.500 células por cm^2) com as diferentes amostras em meio de cultura osteogênico. Após os períodos de incubação, as células foram lavadas com PBS e tratadas com uma solução de

calceína-AM e homodímero de etídio-1 (EthD-1) de acordo com as instruções do fabricante.

O kit permite a rápida discriminação de células vivas e mortas pela coloração simultânea com calceína-AM (verde fluorescente) para indicar a atividade intracelular da esterase e o homodímero de etídio-1 (vermelho fluorescente) para indicar a perda da integridade da membrana plasmática. Para a obtenção das imagens, as células foram analisadas em microscópio óptico invertido equipado com sistema de fluorescência.

4.8 EXPERIMENTO *IN VIVO*

4.8.1 Síntese das amostras

Para realização do experimento *in vivo*, os materiais foram confeccionados seguindo o mesmo protocolo de síntese utilizado no estudo de cultura celular.

4.8.2 Comitê de Ética

O projeto foi submetido ao CEUA - UNINOVE tendo sido aprovado sob nº 6675311018 (Anexo I).

4.8.3 Animais

Foram utilizados 39 ratos machos (idade de 3 meses), *Rattus norvegicus albinus*; Wistar), pesando entre 350 e 410g. Os animais foram alocados em caixas plásticas padrão (41×34×17 cm) contendo cinco ratos em cada, com alimento e água *ad libitum*. Foram mantidos no Biotério com controle de temperatura (22 a 26°C) e ciclos de 12 horas alternados entre claro e escuro.

4.8.4 Formação dos grupos

Para verificar o efeito dos diferentes materiais, os animais experimentais foram submetidos a confecção de defeito ósseo tibial e tratados

de acordo com os seguintes grupos:

- **Controle:** defeito ósseo não tratados sem nenhum material (n= 6).
- **BHF:** defeito ósseo preenchido com BHF (n=6).
- **BHF+nHAp:** defeito ósseo preenchido com BHF e nHAp (n=9).
- **BHF+nHAp+NTCs1%:** defeito ósseo preenchido com BHF, nHAp e 1% de NTCs (n=9).
- **BHF+nHAp+NTCs2%:** defeito ósseo preenchido com BHF, nHAp e 2% de NTCs (n=9).

4.8.5 Anestesia

Nos experimentos *in vivo*, os animais foram pesados e em seguida anestesiados via intraperitoneal (i.p.) utilizando Cloreto de Xilazina (10 mg/kg, Anasedan, Bayer, SP, Brazil) e Cloreto de Cetamina (80 mg/kg, Dopalen, Agribands do Brazil Ltda, SP, Brazil) conforme citado no projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais.

4.8.6 Cirurgia

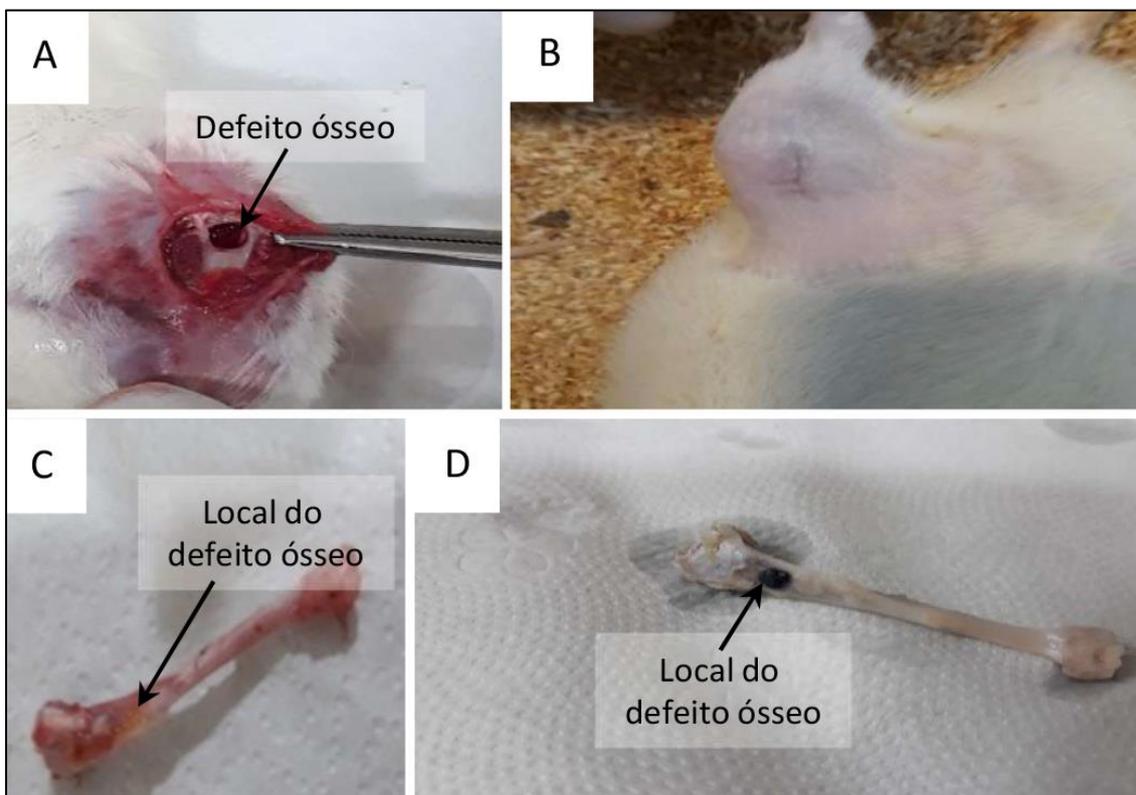
Após a confirmação que os animais estavam anestesiados, houve a tricotomia e incisão linear na pele de aproximadamente 1,5cm permitindo a realização do defeito ósseo na região superior da tíbia. Para fazer o defeito ósseo foi utilizada uma broca trefina contra ângulo de baixa rotação de 2,5mm de diâmetro (OK Dental) utilizado um motor rotativo (AEU707Av2, Aseptico, Washington, USA). Durante o uso da broca, houve irrigação constante com solução salina estéril 0,9% para evitar o superaquecimento. Após, foram realizada o preenchimento do defeito nos grupos que receberam tratamento, os tecidos suturados com fios de sutura de Nylon 4/0 AG 0,2cm (Ethicon/Johnson & Johnson) e higienizados utilizando álcool iodado. Após a cirurgia os animais foram colocados em sala aquecida, onde foram acompanhados durante a etapa de recuperação.

Os ratos foram inspecionados diariamente para avaliação de possíveis reações adversas que possam ocorrer. Foi aplicado cloridrato de

cloridrato de tramadol (1mg / kg) e dipirona sódica como analgésicos de 8 em 8 horas durante os 3 primeiros dias (Figura 6).

Após 14 dias da cirurgia, os animais foram eutanasiados com sobredose de anestésicos (3 vezes a dose recomendada para a anestesia) e as tíbias foram dissecadas e destinadas para a análise histológica (Figura 6)

Figura 6 – Processo de realização do defeito ósseo: A – Defeito ósseo realizado conforme citado acima sem nenhum material preenchido. B – Demonstra cicatrização do local da incisão cirúrgica após 14 dias. C - Tíbia já retirada após 14 dias preenchida com nHAp. D – Tíbia já retirada após 14 dias preenchida com nHAp+BHF+NTCs



Fonte: Autoria própria

4.8.7 Fixação e descalcificação

As tíbias coletadas foram fixadas em formaldeído a 10% durante 24 horas. Após, foram lavadas por 24 horas em água corrente e colocadas em ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) a 10%. A solução de EDTA foi trocada a cada 2 dias até ocorrer a total descalcificação do osso (etapa que ocorreu após

aproximadamente 3 meses).

4.8.8 Análise histológica

Após a descalcificação, houve o processamento de rotina para confecção das lâminas. As peças foram emblocadas em parafina e as lâminas histológicas confeccionadas (cortes semiseriados com espessura de 5 µm). O plano de secção do corte foi transversal em relação a tibia. Em seguida as lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (H.E.) para a análise morfológica. A análise histológica qualitativa descritiva foi realizada considerando a presença de achados histopatológicos como presença de tecido de granulação, presença de tecido ósseo neoformado e organização tecidual.

A análise histológica foi realizada nas lâminas coradas com H.E. Para a realização desta análise, foi utilizado um microscópio Nikon E 20000 e o programa de imagem Motic Imagens Plus versão 2.0 para a obtenção de fotomicrografias e análise das imagens, respectivamente. Foram selecionados 5 campos pré-determinados da região da lesão de cada lâmina: campo 1 (próximo da margem superior do defeito ósseo), campo 2 (próximo da margem direita do defeito ósseo), campo 3 (próximo da margem inferior do defeito ósseo), campo 4 (próximo da margem esquerda defeito ósseo) e campo 5 (no centro do defeito ósseo). Cada campo foi fotografado com a objetiva de 10 ou 40x.

4.8.9 Analise estatística

Todos os dados foram analisados por meio do teste de normalidade, sendo os resultados paramétricos submetidos ao teste de variância two way ANOVA (tempo xs amostras) complementado pelo pós-teste de Tukey a fim de verificar as diferenças estatísticas entre grupos. Foi utilizado o software GraphPad Prism 5.01 (San Diego, CA, USA). Os resultados foram apresentados como média e desvio-padrão e foi adotado nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DA MASSA E PH

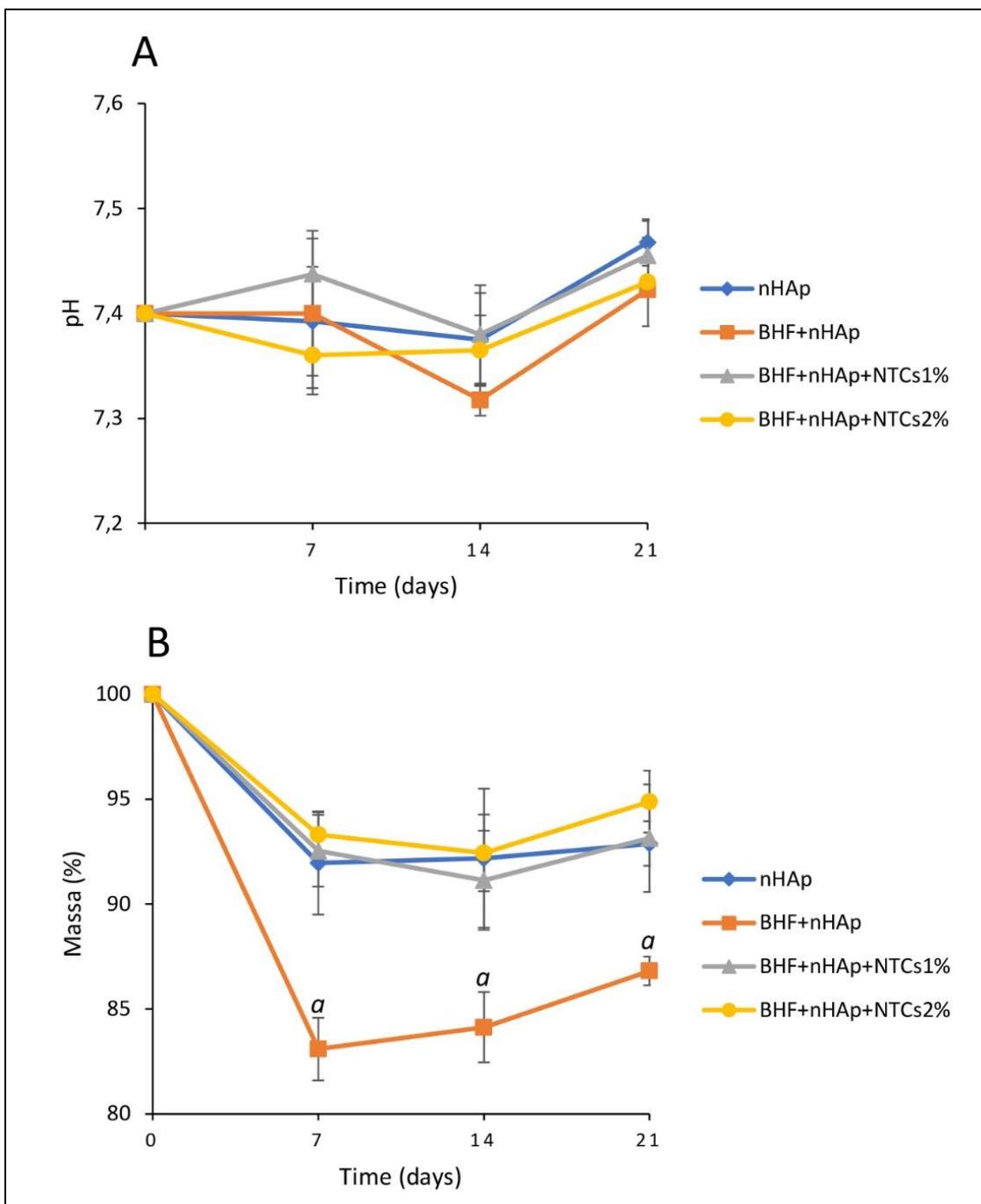
A análise do pH e massa dos componentes foi realizada para verificar se no processo houve perda de massa e variação do pH na solução de incubação.

Verificamos que o pH das amostras permaneceram constante em torno de pH 7,4 não havendo diferença estatística entre os grupos (Figura 7A).

Em relação a análise de perda de massa, os grupos nHAp, BHF+nHAp+NTCs1% e BHF+nHAp+NTCs2% apresentaram uma perda de massa de 8%, 7,5% e 6,7% após 7 dias, respectivamente (Figura 7B). Curiosamente, no mesmo período, o grupo BHF+nHAp exibiu uma redução de massa de 16,9%, apresentando uma diferença estatística significativa quando comparados aos demais grupos ($p < 0,05$) (Figura 7B).

Após 14 e 21 dias, os grupos nHAp, BHF+nHAp+NTCs1% e BHF+nHAp+NTCs2 % mantiveram os valores de perda de massa próximos aos encontrados no período anterior (Figura 7B). Entre estes grupos, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas nos períodos avaliados. Já o grupo BHF+nHAp apresentou valores de perda de massa de 15,87% em 14 dias e 13,19% em 21 dias, apresentando diferenças estatísticas significativas quando comparados aos demais grupos em ambos os períodos (Figura 7B).

Figura 7 – Avaliação de pH e massa das amostras: A – O pH das amostras não variou não havendo diferença estatística. B – Verificou-se perda de massa na amostra nHAp. Quando adicionados os NTCs 1 e 2% foi observado menor perda de massa (^anHAp+BHF comparado aos grupos nHAp, nHAp+BHF+NTCs1% e nHAp+BHF+NTCs2%)

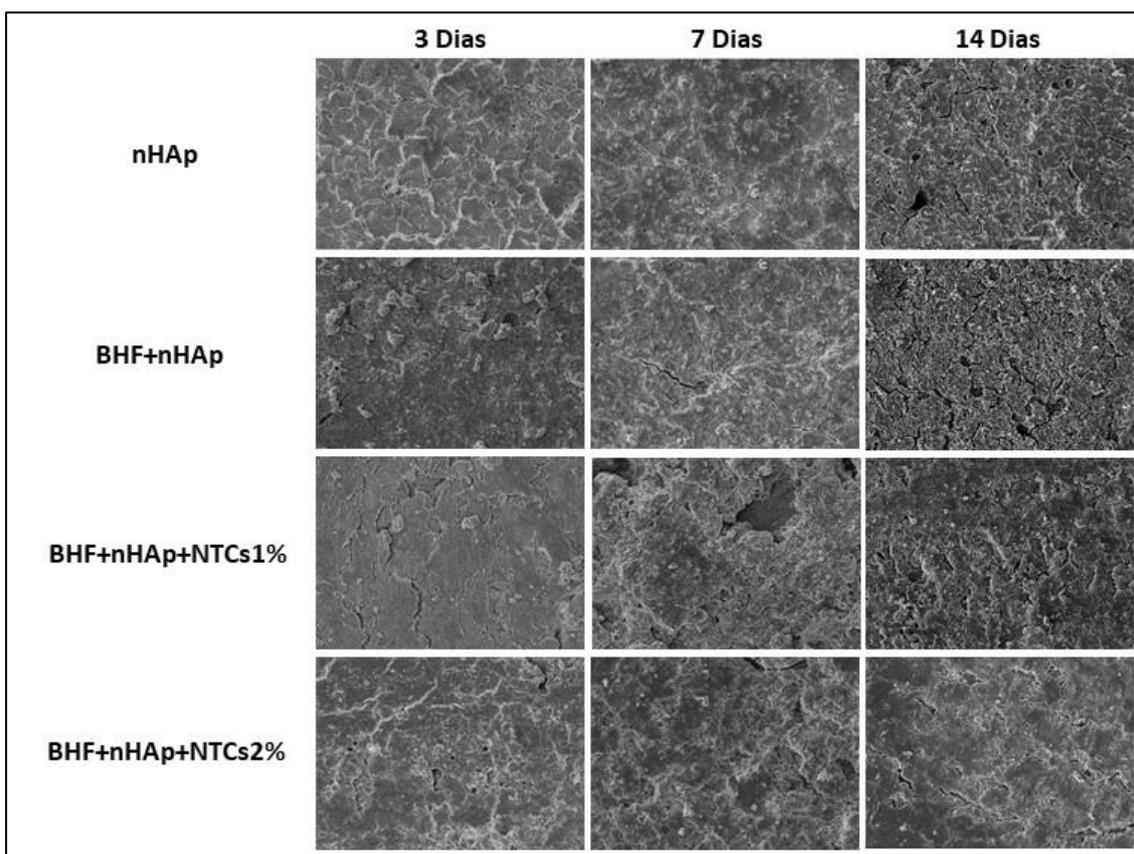


Fonte: Autoria própria

5.2 ANÁLISE DAS IMAGENS OBTIDAS NO MEV E INTENSIDADE DE BRILHO DOS PIXELS

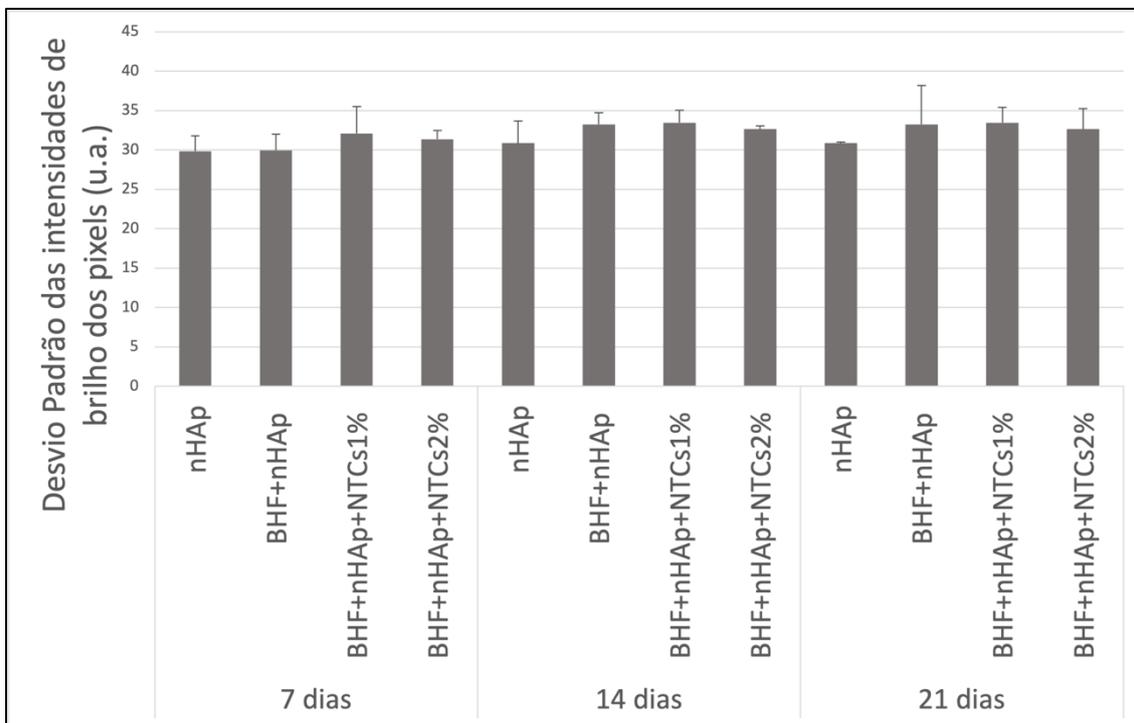
As figuras 8 e 9 mostram as análises morfológicas e de intensidade dos pixels dos materiais (após incubação em solução de PBS por 7, 14 e 21 dias) realizadas a partir das imagens de MEV, respectivamente. Verificamos que as misturas dos componentes ficaram uniformes e com uma distribuição homogênea indicando que o BHF teve uma boa interação com os nHAp+NTCs 1% e 2%.

Figura 8 – Imagens das amostras analisadas através do MEV. Na análise morfológica dos materiais verificamos que as amostras apresentaram uma superfície homogênea em todos os grupos, mesmo após incubação em solução de PBS por 7, 14 e 21 dias.



Fonte: Autoria própria

Figura 9 – Intensidade dos pixels: verificamos que não houve diferença estatística significativa em todas as amostras, indicando que a mistura dos componentes foi homogênea (u.a. unidade arbitrária)



Fonte: Autoria própria

5.3 ESTUDO *IN VITRO*

5.3.1 Viabilidade celular pelo ensaio de alamarBlue®

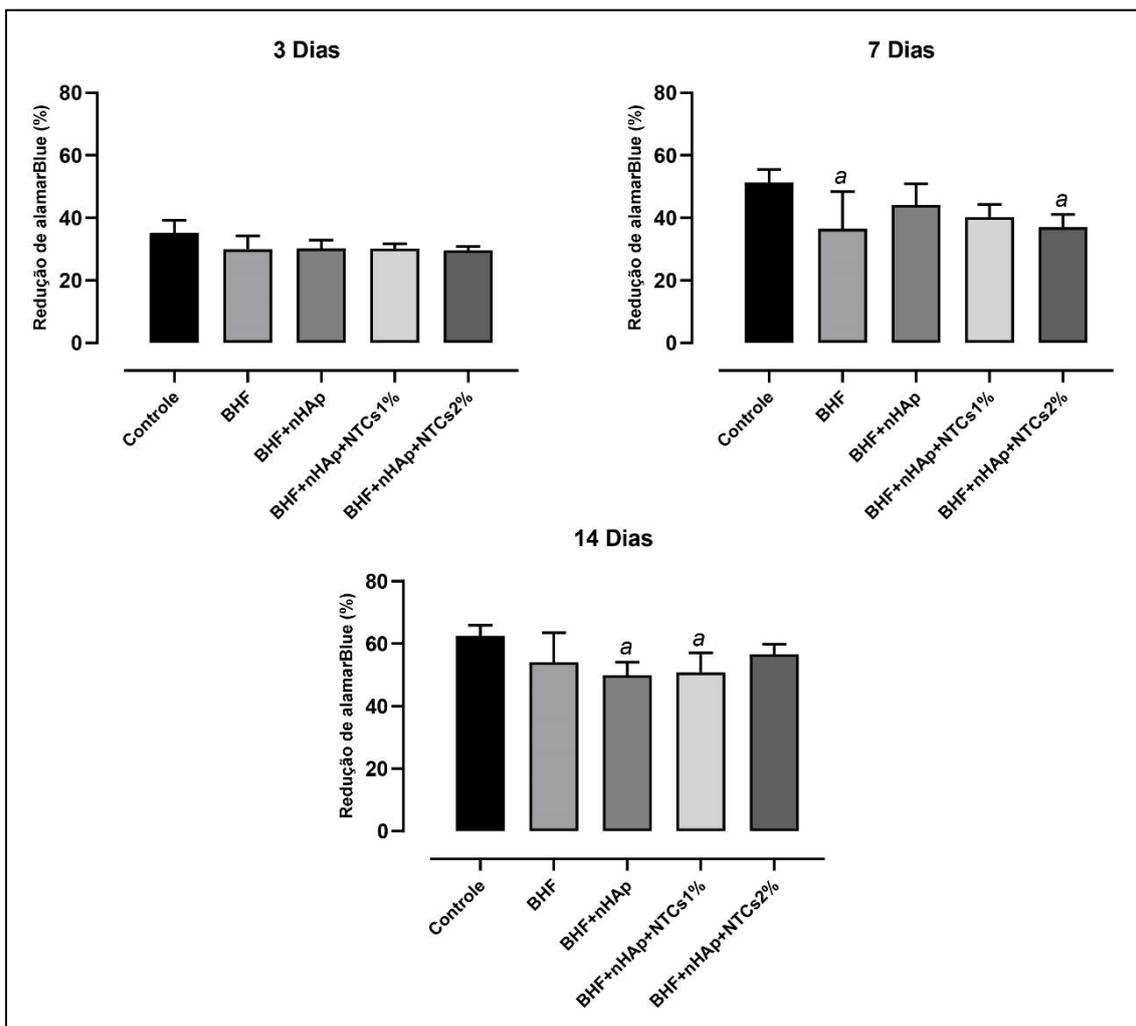
A Figura 10 representa o ensaio de viabilidade celular após o período de cultivo de 3, 7 e 14 dias de células MC3T3-E1 em contato com os diferentes materiais.

Após 3 dias de cultivo, não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos estudados. Entretanto, após 7 dias de cultivo celular, os grupos BHF e BHF+nHAp+NTCs2% apresentaram valores menores estatisticamente quando comparados com o grupo controle ($p = 0,022$ e $p = 0,020$, respectivamente).

Aos 14 dias de cultivo com os materiais, foi verificado que apenas os grupos BHF+nHAp e BHF+nHAp+NTCs1% apresentaram valores menores

significativos comparados ao controle ($p = 0,045$ e $p = 0,050$, respectivamente). Nenhuma outra diferença significativa foi observada ao comparar os demais grupos experimentais.

Figura 10 – Gráfico de redução de alamarBlue[®] dos grupos Controle, BHF, BHF+nHAp, BHF+nHAp+NTCs1% e BHF+nHAp+NTCs 2% em diferentes períodos experimentais. ^a $p \leq 0,05$ vs grupo Controle.



Fonte: Autoria própria

5.3.2 Viabilidade celular pelo Kit LIVE/DEAD[®] Viability/Cytotoxicity

A Figura 11 mostra as imagens representativas do ensaio de viabilidade celular pelo kit LIVE/DEAD após o período de cultivo de 3, 7 e 14 dias de cultivo das células MC3T3-E1 com os diferentes materiais.

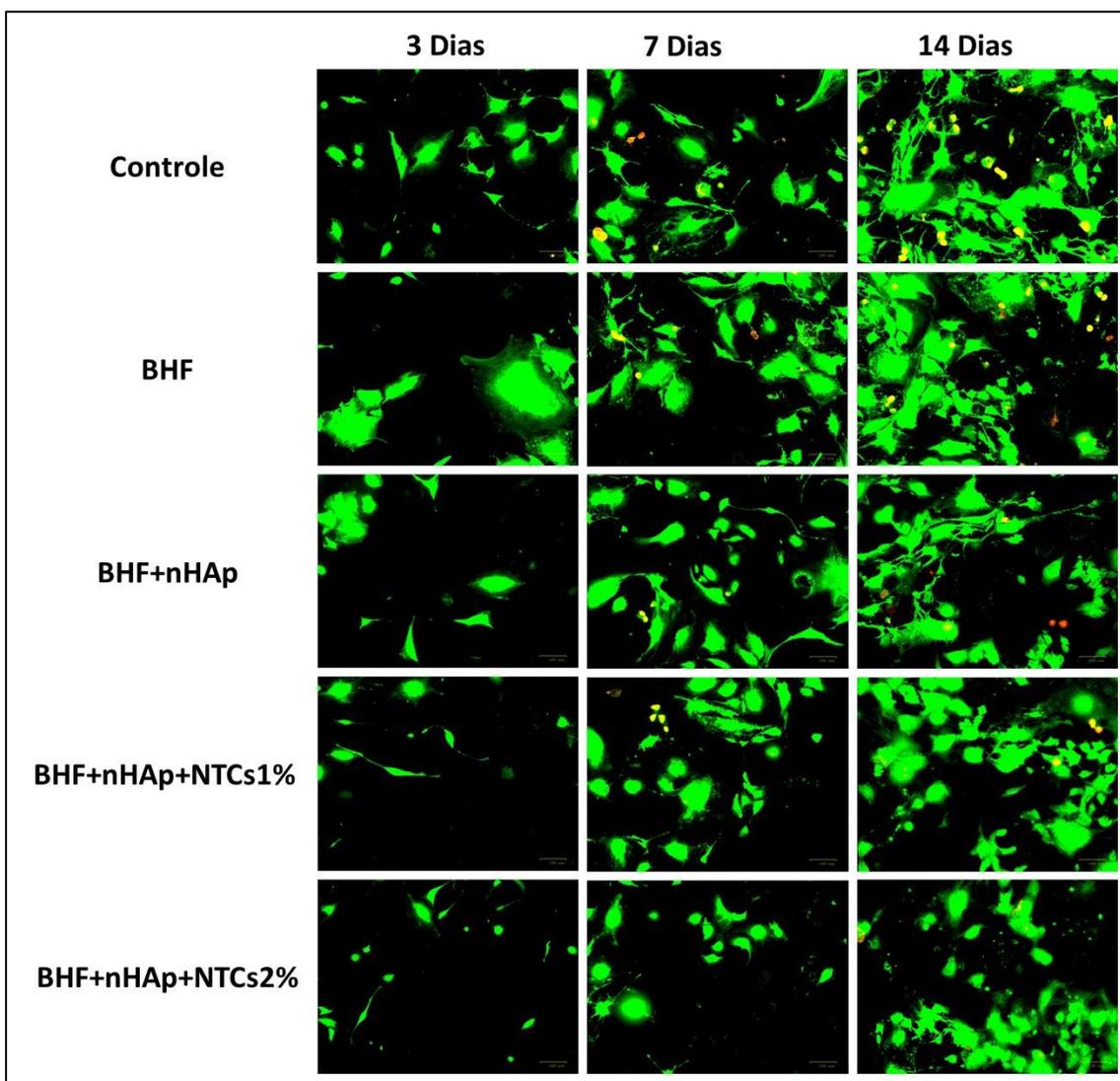
Após 3 dias, foi verificado a presença de células vivas (coradas em

verde) e nenhuma célula morta (coradas em vermelho) em todos os grupos avaliados.

Após 7 dias, uma maior densidade de células vivas pode ser evidenciada em todos os grupos quando comparado ao período anterior. Além disso, poucas células mortas foram observadas neste período nos grupos avaliados. O grupo controle teve uma maior presença de células vivas em relação aos demais grupos experimentais.

Percorrido o período de 14 dias, foi possível verificar uma alta densidade de células vivas, principalmente no grupo controle. Assim como no grupo controle, foi observada uma pequena quantidade de células mortas nos outros grupos avaliados. Nos grupos BHF, BHF+nHAp, BHF+nHAp+NTCs1% e BHF+nHAp+NTCs2%, foi possível notar a presença de uma grande quantidade de células em contato com os seus respectivos materiais. Neste período, foi verificada uma menor presença de células vivas no grupo BHF+nHAp.

Figura 11 – Imagens de fluorescência do ensaio de viabilidade celular: os ensaios foram feitos pelo método do Live/Dead de células MC3T3-E1 cultivadas nos grupos controle, BHF, BHF+nHAp, BHF+nHAp+NTCs1% e BHF+nHAp+NTCs2% após 3, 7 e 14 dias. Fluorescência verde indica células vivas e fluorescência vermelha indica células mortas



Fonte: Autoria própria

5.4 ESTUDO *IN VIVO*

5.4.1 Observações clínicas pós-cirúrgicas dos animais experimentais

Durante a execução dos experimentos, foram realizadas observações clínicas e comportamentais dos animais durante os 14 dias de recuperação da

cirurgia. Todos os animais, independente do grupo, apresentaram comportamento normal, ou seja, deambulavam pelo ambiente da caixa, se alimentavam e hidratavam normalmente.

5.4.2 Análise histológica

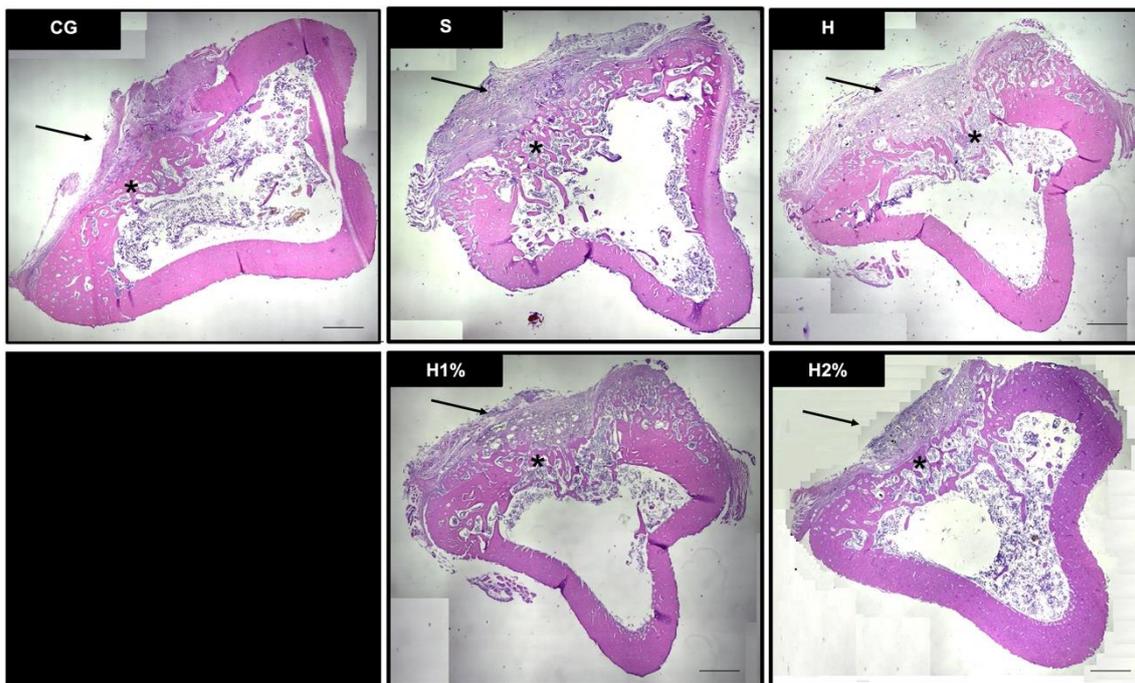
Na figura 12, estão apresentados os achados histológicos obtidos a partir da análise qualitativa descritiva.

Foi possível observar fechamento linear do defeito, com trabéculas ósseas imaturas, não lamelares e distribuição irregular presentes no canal medular (seta). A formação óssea originou-se do periósteo e do endósteo com um tecido conjuntivo ricamente vascularizado com leve invasão sobre o defeito em todos os grupos experimentais. Entretanto, nos grupos C, BHF, nHAp+BHF+NTCs1% e 2% foi possível observar maior quantidade de trabéculas ósseas com arranjo mais lamelar (asterisco), com destaque para o grupo C, em comparação ao grupo que recebeu apenas a hidroxiapatita (nHAp).

Pode-se observar que nos grupos BHF, nHAp+BHF=NTcs1% e 2% houve uma regeneração com fechamento do efeito comparável ao do grupo Controle. O grupo somente nHAp não foi observado reparo semelhante aos outros 4 grupos.

Figura 12 – Fotomicrografias representativas da análise histopatológica do

reparo ósseo:



Fonte: Autoria própria

6 DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a utilização de nanocompósitos à base de nHAp e NTCs como reforço em BHF derivado do veneno de serpente para utilização na regeneração óssea. Este trabalho teve como hipótese principal que o compósito sintetizado a partir de nHAp e NTCs, ao ser associado com o BHF poderia manter a biocompatibilidade destes materiais e proporcionar uma reparação óssea adequada em um modelo de defeito ósseo circular.

Os principais resultados demonstraram que os compósitos de nHAp+NTCs associados ao BHF apresentaram propriedades físico-químicas interessantes, como manutenção do pH, perda de massa e uniformidade das amostras. Além disso, estes compósitos apresentaram biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* e foi capaz de proporcionar uma adequada formação de tecido ósseo neoformado no local do defeito.

Durante todo o processo de síntese e caracterização da nHAp+NTCs, houve o monitoramento do pH das amostras e verificaram que não sofreram alterações (LOBO et al., 2013). Além disso, no presente estudo, ao adicionar o BHF ao composto de nHAp+NTCs verificamos que pH permaneceu próximo a neutralidade, em torno de 7,4 em todos os períodos estudados (7, 14 e 21 dias), demonstrando que o BFH não alterou o pH das amostras.

O monitoramento e manutenção do pH é um fator importante, pois as variações do pH pode promover modificações na estrutura do material e consequentemente das suas propriedades, modificando a sua consistência e alterando os efeitos desejados (DA CUNHA, 2010).

Após a verificação do pH, foi realizada a MEV onde pode-se observar detalhes da superfície das pastilhas e realizar as análises desejadas. Lobo et al. (2013) analisando a superfície das amostras de nHAp e nHAp+NTCs no MEV, não verificaram modificações morfológicas, mostrando estarem homogêneas. Na análise das nossas amostras no MEV, também não encontramos alterações morfológicas após a adição do BHF, mostrando uma homogeneidade e, portanto, não havendo interferência após a sua adição.

Quando foi avaliado a perda de massa das misturas, verificamos que houve perda de massa de aproximadamente 7% das amostras nHAp e nHAp+BHF+NTCs 1 e 2% nos primeiros 7 dias permanecendo esse índice

constante nos próximos 14 e 21 dias. A maior perda de massa se deu com a amostra BHF+nHAp, que já nos primeiros 7 dias perdeu cerca de 17% havendo uma ligeira recuperação aos 21 dias. Interessante notar que após a adição dos NTCs 1 e 2% na nHAp houve uma recuperação da massa permanecendo a patamares iguais aos outros grupos. Essa característica de perda de massa das amostras, mesmo nos grupos que tiveram a adição do BHF, é algo necessário para o sucesso dos implantes ósseos, uma vez que é esperado que os materiais possam ser reabsorvidos nos locais de implantação para que o ocorra a sua substituição pelo novo tecido formado (ANDERSON; MCNALLY, 2011).

Além da propriedade de degradação dos materiais, outra característica importante requerida para implantes destinados a engenharia de tecido ósseo é a biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* destes materiais (O'BRIEN, 2011). Embora os materiais utilizados neste estudo apresentem biocompatibilidade ao serem empregados isoladamente (MARTINELLI et al., 2018; GASPAROTTO et al., 2014), para que ocorra o uso destes compósitos em uma possível aplicação clínica, é necessário verificar os efeitos adversos agudos provenientes dessa nova formulação de materiais (ROGERO et al., 2003).

Referente as análises de viabilidade celular, no ensaio de viabilidade pelo método de redução de alamarBlue[®], foi verificada uma diminuição na viabilidade das células MC3T3-E1 quando expostas ao BHF e BHF+nHAp+NTCs2% em 7 dias e BHF+nHAp e BHF+nHAp+NTCs1% em 14 dias de cultivo. Entretanto, quando os diferentes grupos foram avaliados pelo método de viabilidade celular pelo kit Live/Dead[®], foi observado que os todos os grupos apresentaram uma grande presença de células vivas e poucas células mortas (semelhante ao grupo controle), indicando que os compósitos em todas as formulações não apresentaram citotoxicidade, sendo assim, biocompatíveis com as células da linhagem MC3T3-E1. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Martinelli et al. (2018), no qual verificaram que a nHAp sozinha ou associada a NTCs a 1 e 3% não apresentaram citotoxicidade para células da linhagem MG-63 (osteoblastos humanos).

Atualmente, os biomateriais, como por exemplo a nHAp, são amplamente utilizados para substituir tecidos humanos devido à várias características entre elas a biocompatibilidade. A nHAp é um constituinte encontrados nos ossos e dentes sendo ideal para substituir partes de tecidos

duros (BONAN et al., 2014).

Vários estudos foram realizados para verificar o papel de biomateriais a base de nHAp no processo do reparo ósseo associados a outros materiais, como por exemplo, o óxido de grafeno. Foi verificado que este composto promove uma melhoria na biocompatibilidade e na osseointegração contribuindo para o reparo ósseo (OLIVEIRA et al., 2019; LI et al., 2014).

O BHF desenvolvido a partir do veneno de serpente pelo CEVAP, possui propriedades importantes como por exemplo de ser um excelente adesivo biológico, promove regeneração tecidual, é absorvido, possui muitas aplicações clínicas, promove também regeneração da fibrocartilagem das articulações, cicatriza feridas e controla a infecção bacteriana (IZUTA et al., 2005; BUCHATA et al., 2004).

Neste estudo realizamos a mistura do BHF com nHAp e NTCs 1 e 2 % para verificar o efeito no reparo ósseo. Após a verificação das propriedades químicas, física e viabilidade do material, seguiu-se os testes *in vivo* para investigar se a associação do BHF ao nHAp+NTCs 1 e 2% potencializariam o crescimento das células ósseas e a neoformação óssea. Assim, os resultados da análise histológica demonstram que, após 14 dias, o BHF associado ou não a nHAp+NTCs 1 e 2% apresentaram formação óssea semelhante. Interessantemente, um efeito sinérgico do biopolímero de fibrina com biomateriais a base de nHAp era esperado e a adição do BHF a nHAp+NTCs 1 ou 2% no tratamento de lesões ósseas não otimizou o processo de reparo. Por outro lado, o uso de biopolímero de fibrina já demonstrou efeito benéfico quando associado a biocerâmicas. Abiraman et al., (2002) observaram propriedade osteoindutoras para a combinação de hidroxiapatita + Vidro bioativo + biopolímero de fibrina. Da mesma forma, o potencial para neoformação óssea foi observado na associação do biopolímero de fibrina e β - fosfato de tricálcio.

Os resultados do presente estudo demonstraram que o BHF (associado ou não ao nHAp+NTCs 1 ou 2%) estimulou a reparação tecidual óssea e, a associação dos biomateriais não promoveu o efeito sinérgico esperado em potencializar o processo de reparo ósseo. Uma vez que o presente estudo foi limitado a investigar as fases iniciais da neoformação óssea, informações sobre a influência das terapias na fase de remodelação óssea ainda não foi fornecida. Além disso, outras concentrações de nHAp+NTCs associado

ao BHF devem ser investigadas.

Não há na literatura relatos da associação do BHF com esses biomateriais utilizados neste estudo. Observamos também que houve reparo ósseo promovido pela nHAp pura, porém, não foi igual à apresentada pelo grupo controle e pelos grupos tratados.

Os resultados obtidos neste estudo, mostra que a mistura de nHAp com NTCs 1 e 2% misturados com o BHF é um material promissor a ser utilizado no reparo ósseo. Esse material pode vir a ser uma inovação e os resultados aqui obtidos abrem portas para futuros estudos para compreender melhor esse processo.

7 CONCLUSÕES

De acordo com nossos resultados, concluímos que:

- Não foi observado mudança de pH durante o processo de confecção das pastilhas. Não foi observado perda de massa significativa nos tempos avaliados para os grupos nHAp, BHF+nHAp+NTCs1% e BHF+nHAp+NTCs2%. Já o grupo BHF+nHAp apresentou uma redução de massa significativa nos tempos estudados.
- No processo de mistura das amostras observamos que as mesmas ficaram homogêneas e adequadas para serem utilizadas nos ensaios *in vivo*.
- A concentração mais adequada para os testes *in vivo* foi a de nHAp+BHF+NTCs2%.
- No estudo *in vitro*, mesmo que alguns grupos tenham apresentado uma redução da viabilidade celular quando comparado ao controle (no ensaio de redução do alamarBlue®), os materiais utilizados no estudo não apresentaram um efeito citotóxico para células da linhagem MC3T3-E1, uma vez que não foi verificada uma elevada redução de células vivas ou maior presença de células mortas nos grupos avaliados.
- O biopolímero de fibrina assim como sua associação com hidroxiapatita e nanotubos de carbono promoveram o tecido ósseo neoformado na área da fratura, mostrando potencial osteogênico em fraturas ósseas.

REFERÊNCIAS

ABIRAMAN, S. et al. Fibrin glue as an osteoinductive protein in a mouse model. **Biomaterials**, v. 23, n. 14, p. 3023–3031, 2002. doi:10.1016/s0142-9612(02)00064

ALVES, R. M.C.R. et al. . Effect of tranexamic acid associated with fibrin glue in bone repair: histologic study in rats. **Arch Health Invest.**, v. 3, n. 4, p. 59-65, 2014.

ANDERSON J. M.; MCNALLY, A.K. Biocompatibility of implants: lymphocyte/macrophage interactions. **Semin Immunopathol**, v. 33, p. 221–33, 2011.

AOKI, H. **Science and medical application of hidroxiapatite**. 1ed. Tokyo: Japanese Association of Apatite Science, p. 214, 1991

BARBOSA, M.D.S et al. .Fibrin adhesive derived from snake venom in periodontal surgery. **J Appl Oral Sci**. v.16, n. 5, p. 310-315, 2008.

BARROS, L.C et al. . A new fibrin sealant from crotalus durissus terrificus venom: applications in medicine. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, Part B. 2009; n. 12, p.553-571.

BARROS, C. N. de; et al. .A new heterologous fibrin sealant as a scaffold to cartilage repair - Experimental study and preliminary results. **Experimental Biology and Medicine**, v. 241, n. 3, p.1410–1415, 2015.

BERNI-NETO, E.A. **Desenvolvimento de nanobiocompositos de prata para aplicações bactericidas**. 2010. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada) - Instituto de Física de São Carlos, USP – São Paulo, 2010, p. 112.

BONAN, P.R. F. et al. Métodos de reforço microestrutural da hidroxiapatita. **Cerâmica**, v. 60, p. 402-410, 2014.

BORGES; J.P.M.R et al. **Substituto ósseo injectável e biocompatível**. Universidade Nova de Lisboa, PT Patente No. 104595 2009.

BUCHATA, C. et al. .Fibrin sealant produced by the CryoSeal FS System: product chemistry, material properties and possible preparation in the autologous preoperative setting. **Vox Sang**, v. 86, p. 257–62, 2004.

CALIMAN, L.B. **Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida a partir da casca de ovo de avestruz**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais), Vitória, ES, Instituto Federal do Espírito Santo. 2011 – IFES, 88p.

CARVALHO, J. O. de, et al. .Carbon Nanomaterials for Treating Osteoporotic Vertebral Fractures. **Current Osteoporosis Reports**. doi:10.1007/s11914-018-0476-2, 2018.

COSTA, A. C. F. M. et al. **Hidroxiapatita**: obtenção, caracterização e aplicações. [s. l.], 2009, v. 3, p. 29-38.

CUNHA, A. et al. .Osseointegration of atmospheric plasma-sprayed titanium implants: Influence of the native oxide layer. **J. Biomed. Mater. Res.** v. 102, n. 1, p. 30–36, 2014.

CUNHA, M.R.; FIGUEIRA, L.A. Evaluation of the bone repair in defects grafted with hydroxyapatite and collagen membrane combined with laser therapy in rats. **J Laser App.** v. 23, p.1-8, 2011. <https://doi.org/10.2351/1.3646907>

CUNHA, M. A da. **Síntese e caracterização de hidroxiapatita nanoestruturada obidos por aspersão de solução em chama**. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Escola de Engenharia de Materiais, Porto alegre, 2010.

DELFINO, C. S. et al. Uso de novos materiais para o capeamento pulpar (hidroxiapatita - HAp e fosfato tricálcico - β -TCP). **Cerâmica**, v. 56, p. 381-388, 2010. doi:10.1177/1535370215597192.

EDER, G. et al. .Preliminary Results of a Randomized Controlled Study on the Risk of Hepatitis Transmission of a Two-Component Fibrin Sealant (Tissucol/Tisseel) In: SCHLAG, G; REDL, H. **Fibrin Sealant in Operative Medicine**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1986.

FALONI, A.P.S. **Morte celular de osteoclastos do osso alveolar de ratas tratadas com estrogênio**. 2006. Tese (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal de São Paulo, 2006.

FERGUSON, J.; NÜRNBERGER, S.; REDL, H. .Fibrin: The Very First Biomimetic Glue – Still a Great Tool. In: BYERN, J.; GRUNWALD, I. **Biological Adhesive Systems: From Nature to Technical and Medical Application**. NewYork: SpringerWien, 2010, p. 225-236.

FERREIRA, R. S. et al. .Heterologous fibrin sealant derived from snake venom: from bench to bedside – an overview. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 23, n. 1, 2017. doi:10.1186/s40409-017-0109-8.

JUNIOR FERREIRA, R.S. .Autologous or heterologous fibrin sealant scaffold: which is the better choice? **J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.** v.20, p. 31, 2014. doi: 10.1186/1678-9199-20-31.

GASPAROTTO, P.O. et al. A new fibrin sealant as a three-dimensional scaffold candidate for mesenchymal stem cells. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 10, p. 78, 2014. Disponível em: <http://stemcellres.com/content/5/3/78>. Acesso em: 12 set. 2021.

GUASTALDI, A.C.; HERRERA, A..A. Fosfato de cálcio de interesse biológico: Importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de

recobrimentos. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1352-1358, 2010.

HAMILTON, R. F. et al. .The effects of varying degree of MWCNT carboxylation on bioactivity in various in vivo and in vitro exposure models. **Int J Mol Sci**. v. 19, n. 2, p. 354, 2018.

HENRIKSEN K. et al. .Local communication on and within bone controls bone remodelling. **Bone**, v. 44, p.1026, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Projeção da população do Brasil e das Unidades da Federação**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/index.html>. 2021. Acesso em 11out. 2021.

IZUTA, Y. et al. .Meniscal repair using bone marrow-derived mesenchymal stem cells: experimental study using green fluorescent protein transgenic rats. **The Knee**, v. 12; p. 217–223, 2005.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido Ósseo. In: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004, p.111-128.

KAWAMURA, M. et al. .Frequency of transmission of human parvovirus B19 infection by fibrin sealant used during thoracic surgery. **Ann Thorac Surg**. v. 73, n. 4, p. 1098–1100, 2002.

LI, M. et al. .Graphene oxide/hydroxyapatite composite coatings fabricated by electrophoretic nanotechnology for biological applications. **Carbon**, v. 67, p. 85–197, 2014 doi:10.1016/j.carbon.2013.09.080.

LOBO, A. O. et al. .Effect of ultrasound irradiation on the production of nHAp/MWCNT nanocomposites. **Materials Science and Engineering**, v. 33, n. 7, p. 4305–4312, 2013. doi:10.1016/j.msec.2013.06.032.

MARTINELLI, N. M. et al. .In Vitro Osteogenesis Stimulation via Nano-Hydroxyapatite/Carbon Nanotube Thin Films on Biomedical Stainless Steel **Materials**, v. 11, p. 1555, 2018. doi:10.3390/ma11091555.

MILANETTI, M.R. **Quantificação do volume e densidade mineral do calo ósseo em fraturas experimentais por micrografia 3D por raio X**. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia) Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MOREIRA, B. da S. A biomecânica da fratura e o processo de cicatrização. **Cadernos Unisum**, [s. l.], v. 3, n. n. 1, p. 101–117, 2013.

MOSSAAD, C., M. et al. .Thermodynamic modeling of hydroxyapatite crystallization with biomimetic design considerations. **Chem. Mater.**, v. 22, 2010. doi10.1021/cm900183v.

O'BRIEN, F. J. Biomaterials e scaffolds for tissue engineering. **Materials Today**, v. 14, p. 88-95, 2011.

OLIVEIRA, D. M. P. **Síntese e caracterização de pós de fosfato tricálcio- β e de hidroxiapatita: elaboração de bifásicos ha/tcp- β para aplicações como substituto ósseo**. 2010 Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Joinville – SC, Universidade do Estado de Santa Catarina – UEDSC, 2010.

OLIVEIRA, F.C. et al. .High loads of nano-hydroxyapatite/graphene nanoribbon composites guided bone regeneration using an osteoporotic animal model. **Int J Nanomedicine**, v.14, p. 865-874, 2019. <https://doi.org/10.2147/IJN.S192456>.

ORGANIZAÇÃO Mundial da Saúde. **OMS**. Disponível em: <https://jornal.usp.br/atualidades/em-2030-brasil-tera-a-quinta-populacao-mais-idosa-do-mundo/#:~:text=Nas%20pr%C3%B3ximas%20d%C3%A9cadas%2C%20a%20popula%C3%A7%C3%A3o%20mundial%20com%20mais,2016%2C%20a%20quinta%20maior%20popula%C3%A7%C3%A3o%20idosa%20do%20mundo.> Acesso em: 22 set. 2021.

ORSI, P. R. et al. .A unique heterologous fibrin sealant (HFS) as a candidate biological scaffold for mesenchymal stem cells in osteoporotic rats. **Stem Cell Research e Therapy**, v. 8, n. 1, p. 205, 2017.

PARK, J. W. et al. .Osteoblast response and osseointegration of a Ti-6Al-4V alloy implant incorporating strontium. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 7, p. 2843-2851, 2010.

POMINI, K. T. et al. Fibrin Sealant Derived from Human Plasma as a Scaffold for Bone Grafts Associated with Photobiomodulation Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 7, p.1761, 2019. doi:10.3390/ijms20071761

RATNER, B. D. **An Introduction to Materials in Medicine**. Oxford: Elsevier, 2013.

ROBERTS, I. et al. .Crash-2 trial collaborators. Antifibrinolytic therapy for acute traumatic injury. **Cochrane Database Syst Rev.**, v.1, 2011.

ROGERO, S. O. et al. .Teste in vitro de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

SALOMÃO M.; SIQUEIRA, J.D.T. Regeneração óssea guiada através de barreira exposta ao meio bucal após exodontias. Relato de caso. **Rev. Bras. Implant.** v. 5, 2010.

SANTOS, J. C. **Estudo das propriedades eletrônicas nanoestruturas de carbono**. Relatório. IFPI-Piauí, 2016.

SEVERINO, P. et al. Polímeros sintéticos biodegradáveis: matérias-primas e métodos de produção de micropartículas para uso em drug delivery e liberação controlada. **Polímeros**, São Carlos, v. 21, n. 4, p. 286-92, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282011005000060>.

SILVA, V. D. R. **Expressão do receptor MARCO em macrófagos, células dendríticas e células tumorais após internalização de nanotubos de carbono**. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica), Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação (FEEC) e Instituto de Biologia (IB), Campinas - SP, 2011. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/259960>. Acesso em: 11 nov. 2021.

SMITH, W. F.; HASHEMI, J.; **Fundamentos de Engenharia e Ciência dos Materiais**. Porto Alegre: McGrawHill, 2012.

STANDRING, S. . Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice. **Expert Consult Churchill Livingstone**, 2009, p. 27-59.

TAVARES, V. A. C. D. B. **Matrizes de policaprolactona e quitosano para aplicação em engenharia de tecidos**. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2011.

TORMENA, F. V. **Um modelo de remodelamento ósseo utilizando potenciais termodinâmicos generalizados**. 2009. 183f. Tese (Doutorado em Engenharia-PPGMNE) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

VAN NOORDEN, R. The trials of new carbon. **Nature**, v. 469, n. 14, p. 7328, 2011.

YELTEN, A.; YILMAZ, S. Comparison of Naturally and Synthetically Derived Hydroxyapatite Powders. **Acta Physica Polonica Series A**, v. 131, n. 1, p.55-58, 2017.

ANEXO I



Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "NANOCOMPÓSITOS À BASE DE HIDROXIAPATITA E NANOTUBOS DE CARBONO COMO REFORÇO EM SELANTE DE FIBRINA DERIVADO DE VENENO DE SERPENTE PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA, AVALIAÇÃO IN VIVO", protocolada sob o CEUA nº 6675311018 (ID 000108), sob a responsabilidade de **Jose Carlos Cogo e equipe; Stella Regina Zamuner** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho (CEUA/UNINOVE) na reunião de 20/02/2019.

We certify that the proposal "NANOCOMPOSITS BASED ON HYDROXYPATITIS AND CARBON NANOTUBES AS REINFORCEMENT IN FIBRIN SEALANT DERIVED FROM SERPENT VENOM FOR BONE REGENERATION, IN VIVO EVALUATION", utilizing 63 Heterogenics rats (63 males), protocol number CEUA 6675311018 (ID 000108), under the responsibility of **Jose Carlos Cogo and team; Stella Regina Zamuner** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Nove de Julho University (CEUA/UNINOVE) in the meeting of 02/20/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [03/2019](#) a [03/2021](#) Área: [Biofotônica Aplicada Às Ciências da Saúde](#)

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [03/2019](#) a [03/2021](#) Área: [Biofotônica Aplicada Às Ciências da Saúde](#)

Origem: [Animais de proprietários](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [6 a 12 semanas](#)

N: [63](#)

Linhagem: [wistar](#)

Peso: [300 a 450 g](#)

Local do experimento: Laboratório de Histologia e Fisiologia Aplicada à Engenharia Biomédica e à Bioengenharia.

São Paulo, 25 de fevereiro de 2019

Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho

Profa. Dra. Stella Regina Zamuner
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho