

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

**SEÂNIA SANTOS LEAL**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO DA CASCA DO CAULE DE  
“*XIMENIA AMERICANA L.*” INCORPORADO AO HIDROGEL A BASE  
DE GELATINA METACRILATO (GELMA) NO PROCESSO DE  
REPARO ÓSSEO INDUZIDO EM RATOS**

**EVALUATION OF THE EFFECT OF THE STEM BARK EXTRACT OF  
“*XIMENIA AMERICANA L.*” INCORPORATED INTO GELLATIN-BASED  
HYDROGEL METHACRYLATE (GELMA) IN THE INDUCED BONE  
REPAIR PROCESS IN RAT**

São Paulo – SP

2023

**PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA**

**SEÂNIA SANTOS LEAL**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO DA CASCA DO CAULE DE  
“*XIMENIA AMERICANA L.*” INCORPORADO AO HIDROGEL A BASE  
DE GELATINA METACRILATO (GELMA) NO PROCESSO DE  
REPARO ÓSSEO INDUZIDO EM RATOS**

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(a). Dr(a). Adriana Pavinatto da Costa  
**Orientador(a)**

Prof(a). Dr(a). Raurys Alencar de Oliveira  
**Coorientador(a)**

São Paulo – SP

2023

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

L473a LEAL, Seânia Santos.

Avaliação do efeito do extrato aquoso da casca do caule de "*Ximenia Americana L.*" incorporado à hidrogel à base de gelatina metacrilato (gelma) no processo de reparo ósseo induzido em ratos / Seânia Santos Leal -- Itaquera: Universidade Brasil, 2023.

81 f.: il. color.

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

Orientação: Profa. Dra. Adriana Pavinatto da Costa.

Coorientação: Profa. Dra. Raurys Alencar de Oliveira.

1. Reparo ósseo. 2. Biomateriais. 3. Fotobiomodulação. I. Costa, Adriana Pavinatto da. II. Oliveira, Raurys Alencar de. III. Título.

CDD 660.63



UNIVERSIDADE  
BRASIL

## TERMO DE APROVAÇÃO

**SEÂNIA SANTOS LEAL**

**“AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO DA CASCA DO CAULE DE “XIMENIA AMERICANA L.”  
INCORPORADO À HIDROGEL À BASE DE GELATINA METACRILATO (GELMA) ASSOCIADOS OU  
NÃO À TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO (LED) NO PROCESSO DE REPARO ÓSSEO  
EXPERIMENTALMENTE INDUZIDO EM RATOS”**

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:

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** ADRIANA PAVINATTO DA COSTA  
Data: 19/09/2023 14:21:51-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof(a). Dr(a). Adriana Pavinatto da Costa (Orientadora/Presidente)

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** CARLA ROBERTA TIM  
Data: 19/09/2023 16:13:15-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof(a). Dr(a). Carla Roberta Tim (UNIVERSIDADE BRASIL)

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** DENIS ROMULO LEITE FURTADO  
Data: 20/09/2023 13:01:50-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof(a). Dr(a). Dênis Rômulo Leite Furtado (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO)

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** LÍVIA ASSIS GARCIA  
Data: 19/09/2023 17:01:41-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** RAFAELA CRISTINA SANFELICE  
Data: 20/09/2023 11:31:52-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof(a). Dr(a). Rafaela Cristina Sanfelice (UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS)

São Paulo, 11 de setembro de 2023.

**Presidente da Banca Prof.(a) Dr.(a) Adriana Pavinatto da Costa**

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

Com base nas sugestões da banca, o título da tese será alterado para: **“AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO DA CASCA DO CAULE DE “XIMENIA AMERICANA L.” INCORPORADO AO HIDROGEL A BASE DE GELATINA METACRILATO (GELMA) NO PROCESSO DE REPARO ÓSSEO INDUZIDO EM RATOS.**

[www.ub.edu.br](http://www.ub.edu.br)



## Termo de Autorização

### Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWWdo Respectivo 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: “AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO DA CASCA DO CAULE DE “XIMENIA AMERICANA L.” INCORPORADO À HIDROGEL À BASE DE GELATINA METACRILATO (GELMA) ASSOCIADOS OU NÃO À TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO (LED) NO PROCESSO DE REPARO ÓSSEO EXPERIMENTALMENTE INDUZIDO EM RATOS”.**

**Autor(es):**

Discente: **Seânia Santos Leal**

Assinatura: \_\_\_\_\_  
Documento assinado digitalmente  
gov.br SEANIA SANTOS LEAL  
Data: 13/10/2023 14:22:47-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Orientador(a): **Prof.(a) Dr.(a) Adriana Pavinatto da Costa**

Assinatura: \_\_\_\_\_  
Documento assinado digitalmente  
gov.br ADRIANA PAVINATTO DA COSTA  
Data: 13/10/2023 14:17:53-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Coorientador(a): **Prof.(a) Dr.(a)**

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

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

Com base nas sugestões da banca, o título da tese foi alterado para: “Avaliação do efeito do extrato da casca do caule de “Ximения Americana L.” incorporado ao hidrogel a base de gelatina metacrilato (GelMA) no processo de reparo ósseo induzido em ratos”.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus permissor da vida, pai onipresente e fonte de paz e meu sustento diário.

Ao meus filhos João Pedro, Théo Lucas e Alice que tiveram de abdicar da minha presença por diversas vezes para conclusão deste trabalho.

Aos meus pais, familiares vivos e in memoriam (Diego Miranda Mota), amigos, namorado, compadres que torceram por mim e fizeram de tudo para esse trabalho acontecesse.

Aos colegas do LiMAV - UFPI em especial a aluna de doutorado Ariane Maria da Silva Santos Nascimento ,a aluna de Pibic de fisioterapia da Uespi Vitória Raquel da Silva Reis, a aluna de doutorado da UFPI Marleane Maria Feliz de Azevedo , a professora Doutora Celma de Oliveira Barbosa ;aos professores Gustavo Oliveira de Meira Gusmão, Valdiléia Teixeira Uchôa, José Figueiredo-Silva ,Lucielma Salmito Soares Pinto, Carla R. Tim, Livia Assis, Antonio Luiz Martins Maia-Filho, Anderson Oliveira Lobo e Diego Rodrigues Pessoa envolvidos na pesquisa e que muito contribuíram desde a parte experimental até a confecção do artigo.

Aos meus orientadores Raurys Alencar de Oliveira e Adriana Pavinatto, em especial, pela paciência, apoio incondicional e por acreditar na viabilidade do trabalho e publicação.

“A natureza é a nossa farmácia.”  
(HIPÓCRATES)

## RESUMO

Várias modalidades fisioterapêuticas têm sido estudadas com finalidade de favorecer a reparação óssea. No contextobiomédico vem sendo estudado o uso de Biomateriais para estimular esse processo, O presente trabalho visa produzir, caracterizar e avaliar o efeito do extrato da casca do caule de "*Ximenia americana L.*" incorporado ao *hidrogel* de gelatina metacrilato (GelMA) associados ou não à terapia por fotobiomodulação (LED) sob o processo de reparo ósseo induzido em ratos. Para tanto, foram produzidos e caracterizados os materiais GelMA e GelMA + extrato da casca do caule de "*Ximenia americana L.*" que foram utilizados nos experimentos *in vivo*. Os testes em animais foram realizados utilizando-se 50 ratos machos da linhagem Wistar distribuídos em 5 grupos distintos denominados: grupo controle (GC), grupo GelMA (GG), grupo Gelma + LED (GLED), grupo GelMA + extrato de *Ximenia americana* (GE) e grupo GelMA + extrato de *Ximenia americana* \_ LED (GELED) os quais foram submetidos ao protocolo de fratura induzida na região diafisária da tíbia direita e tratados com luz por emissão de diodo 858 nm e dose de energia 6J em um período estabelecido de 15 e 30 dias, sendo eutanasiados ao longo do mesmo ciclo. Para verificação dos efeitos das terapias foram realizadas análises histológicas e através da espectroscopia Raman. Os resultados mostraram que aos 15 dias da indução da lesão na tíbia de ratos, no grupo GE a neoformação óssea foi superior ao grupo controle e entre os grupos GG e GE. Em 30 dias do experimento, houve também uma diferença na neoformação óssea entre o grupo GELED e o grupo controle entre o grupo GE e controle. Houve diferença também entre os grupos GG e GE e GELED. Diante dos resultados, pode-se afirmar que o extrato do caule de "*Ximenia americana L.*" incorporado a GelMA associado com a fotobiomodulação proveniente do LED é um potencializador da reparação óssea em modelo animal.

**Palavras-chave:** Reparo ósseo. Biomateriais. Fotobiomodulação.



## ABSTRACT

Several physiotherapeutic modalities have been studied with the aim of promoting bone repair. In the biomedical context, the use of Biomaterials has been studied to stimulate this process. The present work aims to produce, characterize and evaluate the effect of the stem bark extract of "Ximenia americana L." incorporated into gelatin methacrylate hydrogel (GelMA) associated or not with photobiomodulation (LED) therapy in the bone repair process induced in rats. To this end, the materials GelMA and GelMA + stem bark extract of "Ximenia americana L." that were used in in vivo experiments. Animal tests were carried out using 50 male Wistar rats distributed into 5 distinct groups called: control group (CG), GelMA group (GG), Gelma + LED group (GLED), GelMA group + Ximenia americana extract (GE) and GelMA + Ximenia americana extract \_ LED (GELED) group, which were subjected to the induced fracture protocol in the diaphyseal region of the right tibia and treated with light by emission diode 858 nm and energy dose 6J in an established period of 15 and 30 days, being euthanized throughout the same cycle. To verify the effects of the therapies, histological analyzes and Raman spectroscopy were carried out. The results showed that 15 days after inducing injury in the tibia of rats, in the GE group, bone neoformation was higher than in the control group and between the GG and GE groups. In 30 days of the experiment, there was also a difference in bone neoformation between the GELED group and the control group between the GE and control group. There was also a difference between the GG and GE and GELED groups. Given the results, it can be stated that the stem extract of "Ximenia americana L" incorporated into GelMA associated with photobiomodulation from LED is a potentiator of bone repair in an animal model.

**Keywords:** Bone repair. Biomaterials. Photobiomodulation.

## **DIVULGAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTO**

Esta pesquisa procurou investigar a ação da “Ameixa do mato”, um planta bastante utilizada na medicina popular sobre a forma de infusões, maceradas ou chás para o controle da dor, inflamação, cicatrização e conhecida cientificamente pelo nome de *X. americana* associada ou não a terapia por fotobiomodulação (LED) (luz aplicada sobre a região da fratura) na aceleração da cura de ossos quebrados em ratos. Em nossos resultados foi possível constatar que a ameixa do mato e a terapia LED utilizadas em associação ou separadas podem potencializar a recuperação de fraturas ósseas em ratos.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Tipos de células encontradas no osso .....	20
Figura 2 - Fotos ilustrativas da X. Americana L.: A. Hábito; B. Caule; C. Ramo; D. Folhas; E. Fruto.....	30
Figura 3 - Estrutura química dos Flavonóides e da epicatequina.....	32
Figura 4 - Produção do Hidrogel de gelatina metacrilato fotopolimerizável (GelMA) .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 5 - Produção do Hidrogel de gelatina metacrilato fotopolimerizável (GelMA) + X. americana .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 6 - Procedimento experimental para a construção da curva de calibração (Ensaio de liberação controlada) da epicatequina (principal composto X. americana) .....	39
Figura 7 - Detalhes do procedimento de fratura óssea e implantação do biomaterial .....	42
Figura 8 - Curvas de TG do extrato de X. americana (a), GelMA (b) e GelMA + Ximenia. americana L. (c) .....	47
Figura 9 - Curvas de DSC do extrato de X. americana (a), GelMA (b) e GelMA + X. americana (c) .....	49
Figura 10 - Espectros de FTIR para extrato de X. americana , GelMA e GelMA + X. americana.....	52
Figura 11 - Difractogramas DRX obtidos para as amostras de X. americana, GelMA + X. americana e GelMA .....	53
Figura 12 - Espectro UV-Vis do extrato de X. americana.....	54
Figura 13 - Curva de calibração construída para X americana .....	55

Figura 14 - Liberação controlada de epicatequina em função do tempo a partir do hidrogel de X. americana .....	56
Figura 15 - Média dos espectros Raman do tecido ósseo para os grupos experimentais após 15 dias do procedimento cirúrgico, banda centrada em ~ 960 cm <sup>-1</sup> referente a v1PO4 <sup>3-</sup> .....	58
Figura 16 - Média dos espectros Raman do tecido ósseo para os grupos experimentais após 30 dias do procedimento cirúrgico, banda centrada em ~ 960 cm <sup>-1</sup> referente a v1PO4 <sup>3-</sup> .....	60
Figura 17 - Média e desvio padrão das áreas integradas da banda em 960 cm <sup>-1</sup> ....	62
Figura 18 - Média e desvio padrão da cristalinidade (inverso de FWHM) após 15 dias de tratamento (a) e após 30 dias de tratamento (b) .....	63
Figura 19 - Fotomicrografia do defeito ósseo 15 dias (A) e 30 dias (B) após a cirurgia. Tecido de granulação (*); osteóide (#); Tecido ósseo neoformado (→); ponta de sílica (#). Escala de barra = 500 μm (imagem de 2,5×), escala de barra = 50 μm (imagem de 40×). C .....	64
Figura 20 - Análise histopatológica quantitativa após 15 dias de tratamento (a) e após 30 dias de tratamento (b) .....	65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos grupos experimentais.....	40
Tabela 2 - Parâmetros da terapia LED que foram empregados no presente estudo	43
Tabela 3 - Resultados da análise térmica TGA .....	48

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALP	Fosfatase alcalina
C <sub>5</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	Epicatequina
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Piauí
DI	Água deionizada
DRX	Difração de raios-X
DSC	Calorimetria diferencial exploratória
EACCXA	Casca do caule da <i>X. americana</i>
ETDA	Ácido etilendiaminotetracético
FTIR	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier
GC	Grupo controle
GE	Grupo GelMA + extrato de <i>Ximenia americana</i>
GG	Grupo GelMA
GELED	Grupo GelMA + extrato de <i>Ximenia americana</i> _ LED
GLED	Grupo Gelma + LED
GelMA	Metacrilóil de gelatina
IL-1	Interleucina 1 (),
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina-10
IL-17	Interleucina-17
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
LED	Terapia por fotobiomodulação
LED terapia	<i>Light Emitting Diode therapy</i>
LIMAV	Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados
MMP	Metaloproteinase de matriz
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimentos Tradicionais Associados
SUS	Sistema Único de Saúde

TG	Curvas termogravimétricas
TGA	Análise termogravimétrica
TGF-B	fator de crescimento de transformador beta
TGF-B1	Fator transformador de crescimento B-1
TLBI	Terapia a laser de baixa intensidade
UFPI	Universidade Federal do Piauí
<i>X. americana</i>	<i>Ximenia americana L.</i>
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>19</b>
3.1 TECIDO ÓSSEO.....	19
3.2 FASES DO REPARO ÓSSEO.....	22
3.3 DIODO EMISSOR DE LUZ (LIGHT EMITTING DIODE).....	25
3.4 FITOTERAPIA.....	27
3.5 <i>XIMENIA AMERICANA L</i> .....	28
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>34</b>
4.1 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DA FRAÇÃO DO CAULE DA <i>XIMENIA AMERICANA L</i> .....	34
4.1.1 Análises térmicas.....	36
4.1.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).....	37
4.1.3 Difração de Raios-X (DRX).....	37
4.1.4 Aspectos éticos e legais.....	40
4.1.5 Delimitação do universo do estudo.....	40
4.1.6 Indução experimental da fratura.....	41
4.1.7 LED Terapia.....	43



4.1.8 Análise Histológica .....	44
4.1.9 Espectroscopia raman dispersiva .....	45
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE X AMERICANA , GELMA E GELMA + X. AMERICANA .....	46
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>68</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os ossos são componentes sólidos, vigorosos e rígidos que apesar de apresentarem fisionomia inerte, crescem, remodelam-se e mantêm-se ativos durante todas as fases da vida do organismo, sendo que sua principal função é promover a sustentação do esqueleto humano (DIMITRIOU et al., 2011; SARINHO et al., 2017). Os ossos podem estar suscetíveis a fraturas quando sua resistência sofre colapso frente a uma grande força externa (APOLINÁRIO; COELHO; LOUZADA, 2011; MARCU et al., 2011). Em situações normais, a maioria das lesões não apresenta problemas de reparação (PINHEIRO et al., 2013), já em situações patológicas a fragilidade está aumentada (osteoporose, osteomalácia, hiperparatireoidismo e na osteogênese imperfeita) favorecendo para que o processo de reparação seja mais demorado (LORENTZON; CUMMINGS, 2015).

O reparo ósseo é um mecanismo biológico complexo. Várias modalidades da fisioterapia têm sido estudadas com finalidade de favorecer a reparação óssea (GÁRCIA et al., 2013; PENTEADO et al., 2013; JONASSON et al., 2017; VALE, 2019), como: ultrassom terapêutico (US) (OLIVEIRA et al., 2012; FONTES-PEREIRA et al., 2013; PUTS et al., 2016), fotobiomodulação (LASER/LED) (OLIVEIRA et al., 2011; PINHEIRO et al., 2012; JAFARABADI et al., 2016; COMUNIAN et al., 2017), isolados ou associados à Biomateriais (QI et al., 2020; Ji et al., 2020; SEDGHI; SHAABANI; SAYYARI, 2020) confeccionados em hidrogel de GelMA (GAO et al., 2019; GU et al., 2020) e/ou extratos de plantas medicinais associados a recursos físicos e mecânicos (COELHO et al., 2013; LEAL et al., 2016).

Terapia por fotobiomodulação refere-se ao evento que favorece alterações celulares a partir da irradiação da luz em diferentes comprimentos de onda específicos (CHUNG; MILLIGAN; GONG, 2015). A aplicação da fotobiomodulação a partir do emprego da terapia a laser de baixa intensidade (TLBI) e da LED terapia (*Light Emitting Diode therapy*) vem sendo amplamente estudada no tratamento de diferentes afecções ósseas (DENIZ et al., 2015; SANTOS et al., 2017; MOSTAFAVINIA et al., 2017). Os resultados desses estudos têm evidenciado que a irradiação no espectro do comprimento de onda do infravermelho próximo (invisível) tem apresentado resultados expressivos sobre a reparação óssea, devido ao seu coeficiente de penetração nos tecidos ser mais profundo quando comparados com o emprego da

terapia no espectro no vermelho (visível) (CHEN et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2012; CONTO et al., 2013; BARBOSA et al., 2014; SELLA et al., 2015).

Já a LED terapia é caracterizada como a emissão de luz monocromática, não coerente e não colimada que tem sido utilizada como um recurso alternativo para o tratamento de afecções neuromusculoesqueléticas (COSTA et al., 2017). Os estudos com LED terapia tem evidenciado que o recurso possibilita a síntese de colágeno e RNA ,o incremento no número de osteócitos, proliferação e diferenciação dos osteoblastos, favorecimento da atividade osteoblástica e o acréscimo da proliferação de fibroblastos e formação de osteóide, favorecendo uma ossificação mais eficaz (CHUNG; TOMPSON; GONG, 2015; EKIZER et al., 2015).

Uma outra modalidade terapêutica que vem sendo estudada para promover o reparo tecidual é a administração de produtos naturais, através do uso de extratos de plantas medicinais, uma vez que a prescrição de fitoterápicos vem crescendo expressivamente durante as últimas décadas nos países industrializados (LEAL et al., 2016). Entre os fitoterápicos mais estudados, destaca-se a "*X. Americana*" uma planta que ocorre em várias regiões do mundo, com propriedades medicinais conhecidas e aplicadas (SANTANA et al., 2018). A *X. americana* apresenta caule pulverizado recomendado para reparação e para o controle do processo inflamatório, sendo que resultados comprovados em pesquisas realizadas através de modelos experimentais evidenciaram que esse extrato podeseer utilizado para promover a reparação tecidual (LEAL et al., 2016).

Dada sua ampla distribuição geográfica e seu potencial biológico, desenvolver formulações farmacêuticas com *X. americana* é uma proposta inovadora e promissora (ALMEIDA; OSHIRO JÚNIOR; SILVA et al., 2019). Diante desta perspectiva, o interesse pelo tema justifica-se pela escassez de estudos que investiguem a incorporação do extrato da *X. americana* ao hidrogel de GelMA, bem como a associação dos componentes com a fotobiomodulação no reparo ósseo.

## 2 OBJETIVOS

Avaliar o efeito do extrato aquoso da casca do caule de “*Ximenia americana L.*” incorporado à hidrogel à base de gelatina metacrilato (GelMA) no processo de reparo ósseo induzido em ratos.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir, caracterizar e avaliar os materiais GelMA e GelMA + extrato aquoso do caule *X. Americana* através das análises: termogravimétrica (TGA) e de calorimetria exploratória diferencial (DSC), Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) e Difração De Raios-X (DRX);
- Quantificar a liberação controlada de epicatequina (composto bioativo da *X. americana*) do hidrogel de GelMA em função do tempo experimental de 15 e 30 ~~ds~~ dias;
- Avaliar qualitativamente a remodelação óssea nos ratos submetidos às ~~tempo~~ propostas por meio da análise histológica;
- Averiguar através de Espectroscopia Raman a influência do tratamento ~~controlado~~ (extrato de *X. americana* incorporado à hidrogel de GelMA e fototerapia) sobre os marcadores de picos de hidroxiapatita de cálcio fosfatada ( $\sim 960 \text{ cm}^{-1}$ ).

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

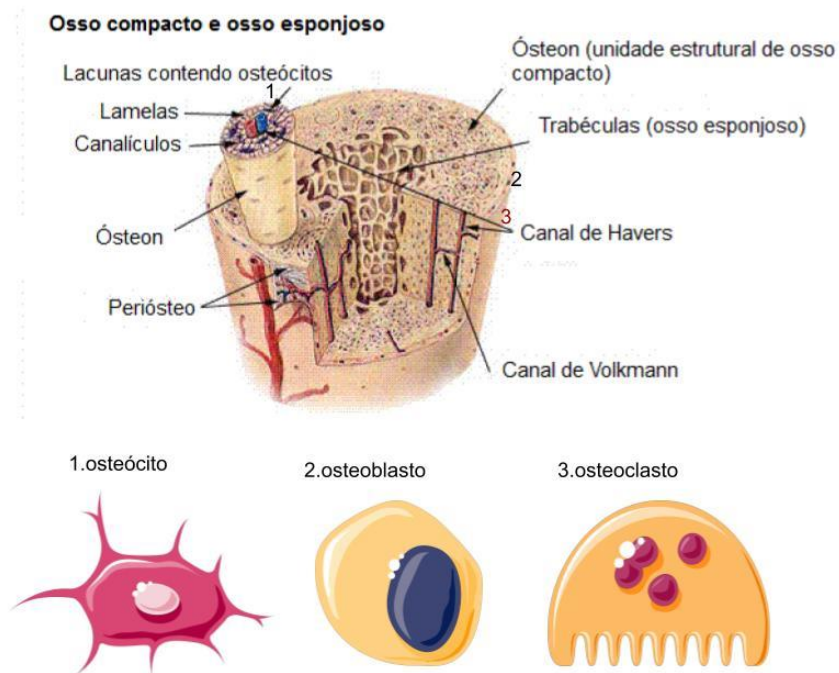
#### 3.1 TECIDO ÓSSEO

O osso é um órgão que apresenta funções relevantes no corpo, como, a locomoção, sustentação, proteção de tecidos moles e o armazenamento de cálcio e fósforo (MOORE; DALLEY, 2013). O tecido ósseo é formado principalmente por tecido conjuntivo especializado constituído essencialmente por células (osteoblastos, osteoclastos e osteócitos), uma matriz orgânica composta quase em sua totalidade por colágeno do tipo I (95%) e por substância base (proteoglicanos e glicoproteínas) sendo responsáveis pela resistência, dureza e elasticidade, e a matriz inorgânica é formada basicamente por cálcio e fósforo em forma de hidroxiapatita, íons bicarbonato, magnésio, potássio, citrato e sódio em menor proporção (FLORÊNCIO-SILVA et al., 2015).

O tecido ósseo é formado por quatro tipos de células: osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e células osteoprogenitoras. Os osteoblastos são células responsáveis pela biogênese dos compostos orgânicos da matriz, existentes na superfície óssea, sendo responsáveis pela formação óssea; Os osteócitos são células maduras e diferenciadas derivadas dos osteoblastos, responsáveis pela formação de osso durante o processo de ossificação e desempenham um papel crucial na homeostase óssea, ajudando a regular a deposição e reabsorção do osso; os osteoclastos são constituintes maduros oriundos do Monócito fagocitário, encontrados no interior da matriz calcificada, tendo como finalidade favorecer a secreção de constituintes necessários para conservação da matriz óssea; são partículas encarregadas pela reabsorção óssea, encontradas na medula óssea sendo responsável pelo processo de remodelação; e as células osteoprogenitoras, que são consideradas células em repouso e/ou de reserva, que podem ser transformadas em osteoblastos para favorecer a produção de matriz óssea, tendo função importante no processo de reparo em lesões ósseas. Estas podem ser encontradas na camada mais interna do periosteio entre as células endósteas de revestimento das cavidades medulares e as células de revestimento dos canais de Havers e de Volkmann (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Macroscopicamente, os ossos são constituídos principalmente por osso esponjoso (trabecular) (20%) e em sua grande parte por osso compacto (cortical) (80%). Ambos os tipos são muito parecidos, uma vez que possuem as mesmas células e as mesmas características da matriz óssea, sendo diferenciados pela organização tridimensional das suas fibras colágenas (FLORÊNCIO-SILVA et al., 2015).

Figura 1 - Tipos de células encontradas no osso



**Fonte:** Autoria própria utilizando a ferramenta Google Drawings. Acesso em 8 out. 2023.

O osso cortical é formado por um sistema de lamelas ósseas paralelas ou concêntricas, geralmente ao redor de um canal vascular central constituindo o sistema de Havers, canais centrais contendo nervos e vasos sanguíneos, comunicando-se com a cavidade medular óssea através de canais de Wolkmann. Já o osso trabecular é morfologicamente mais ativo que o osso compacto, é encontrado em regiões denominadas de trabéculas (locais com muitos poros) que são lâminas ósseas irregularmente dispostas em vários sentidos, deixando espaços livres entre si,

ocupados pela medula óssea, tendo função de produzir as células sanguíneas (MOREIRA, 2013).

Além das diferenças estruturais, os dois tipos diferem também quanto a outros aspectos como: a distribuição espacial das células, densidade da matriz mineralizada, distribuição dos vasos sanguíneos e a área ocupada pela medula óssea. Em ambos, os osteoblastos e osteoclastos movem-se sobre a superfície, sendo que os osteoblastos podem tornar-se embebidos na matriz, dando origem aos osteócitos. O osso esponjoso apresenta uma matriz porosa organizada em trabéculas, desta forma o osso cortical tem uma função de resistência e proteção, enquanto que o osso esponjoso atua nas funções metabólicas. Os ossos são revestidos externamente pelo endóstio e internamente pelo perióstio, que tem como principal função possibilitar a integridade dos ossos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

O processo de ossificação pode ser dividido em duas etapas: osteogênese intramembranosa e endocondral. A osteogênese intramembranosa é constituída pelo desenvolvimento do tecido ósseo a partir de uma membrana conjuntiva fibrosa, sem formação de um tecido cartilaginoso prévio. A osteogênese intramembranosa ocorre através de uma membrana mesenquimal extremamente vascularizada, na qual as células osteoprogenitoras se distinguem em osteoblastos, que por sua vez iniciam a fabricação de matriz óssea orgânica, formando assim trabéculas de tecido ósseo (TRUJILLO et al., 2011). As trabéculas produzidas vão se interconectando em tecido ósseo esponjoso, cujas regiões periféricas são remodeladas para formar o osso compacto. A região da membrana mesenquimal que não participa do processo é constituída pelo endóstio e perióstio (ZAMARIAN, 2014).

A ossificação endocondral é caracterizada pela formação óssea através dos condrócitos que originam inicialmente uma matriz cartilaginosa calcificada, que será remodelada em tecido ósseo, sendo que esse modelo de ossificação acontece a partir da formação do tecido cartilaginoso hialino que substitui o molde ósseo sobre o osso que é formado (ZAMARIAN, 2014).

Os componentes ósseos podem apresentar arquiteturas e propriedades mecânicas instáveis, assim como sua composição, sendo que a sua resistência e rigidez dependem da formação, bem como das propriedades estruturais. Quando o

componente ósseo é submetido a uma carga de alta magnitude, ocorre um evento denominado de fratura, que está associado a forças de cisalhamento, tensão, compressão, curvamento e torção, que acarretarão a perda da integridade do componente ósseo (PRENTICE, 2012). Vasconcelos et al. (2013) enfatiza em seu estudo que a consolidação de fraturas pode ser almejada em até 5 fases distintas: formação do hematoma, angiogênese, iniciação do calo plástico, organização do calo e remodelação óssea.

### **3.2 FASES DO REPARO ÓSSEO**

A regeneração óssea é um processo multifatorial e complexo mais importante do corpo, constituído por uma série de fenômenos biológicos (celulares, moleculares e hormonais) orquestrados por um número de mediadores e elementos celulares envolvidos nos processos de recrutamento, proliferação e diferenciação celular induzidos por moléculas mediadoras, sinalizadoras e fatores de crescimento (EINHORN; GERSTENFELD, 2014). O evento mais comum no reparo ósseo é a cicatrização das fraturas, que normalmente, dura em torno de 8 semanas, exceto, quando há algum evento adverso que compromete o restabelecimento tecidual (neoplasias) (SICCO; TASSO, 2017).

Os eventos subjacentes à cicatrização óssea compreendem as interações celulares, citocinas e a matriz óssea, requerendo eventos reparadores, constituídos pela resposta inflamatória, desenvolvimento do calo duro e união óssea seguida de remodelação óssea (GÓMEZ-BARRENA et al., 2015). O processo de reparo ósseo é caracterizado em duas fases bem distintas: a reparação óssea primária e a reparação secundária (GÓMEZ-BARRENA et al., 2015).

No processo de reparação primária (direta) não há produção de calo ósseo, e as células osteogênicas e endoteliais dos capilares morrem em regiões adjacentes à área lesada em decorrência da interrupção do fluxo sanguíneo. Nesse processo, ocorre também a morte dos osteócitos que circulam os canais de Havers. Nos locais dos canais de Havers, onde as células estão vivas, há proliferação celular, crescimento celular e neovascularização, fazendo com que as células osteogênicas se transformem em osteoblastos e iniciem a reestruturação dos canais de Havers. Já a reparação secundária (indireta) é complexa e constituída de inúmeros eventos



(formação do hematoma, angiogênese, iniciação do calo plástico, organização do calo) que antecedem a reparação óssea. Este mecanismo pode ser caracterizado por três fases distintas, sendo elas: fase inflamatória, de reparação (proliferação) e remodelamento, sendo que cada uma das fases de cicatrização apresenta características histológicas únicas, e podem ocorrer isoladamente ou em concomitância com outras para favorecer a reparação óssea (LANDE et al., 2012).

Após a injúria, ocorre a descontinuação do perióstio e endóstio, destruição da matriz, morte celular e afastamento dos fragmentos ósseos, favorecendo o início da fase inflamatória logo após a fratura e prosseguindo até a segunda e terceira semana de lesão (SCHROEDER; MOSHEIFF, 2011). Nesta fase há ruptura dos vasos sanguíneos, promovendo hemorragia local, desta forma, completando a zona de fratura e originando um coágulo (SCHROEDER; MOSHEIFF, 2011). Esse processo inflamatório local é indispensável para a evolução do processo de cicatrização, iniciado em resposta à lesão, em relação a isso, diversos mediadores da inflamação são liberados, como: plaquetas, mastócitos, neutrófilos, macrófagos, linfócitos, fibronectina, osteoblasto, fatores de crescimento, células endoteliais, fibroblastos, além da liberação de citocinas pelas células inflamatórias. Dentre as principais células inflamatórias estão a interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e fator transformador de crescimento B-1 (TGF-B1) (KOLAR et al., 2010), favorecendo a angiogênese, estimulando a produção de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (PESSOA et al., 2007), a fabricação primária do calo cartilaginoso (MOREIRA, 2013) e a osteogênese (MARSELL; EINHORN, 2011).

Fatores quimiotáticos estão envolvidos na fase de reparação, promovendo influxo de células mesenquimatosas do perióstio, endóstio, que irão se distinguir em fibroblastos, condroblastos e osteoblastos, originando assim o tecido fibroso, cartilaginoso e ósseo, aliado a proliferação e diferenciação, acontece a angiogênese que formará o tecido de granulação (SILVEIRA, 2013).

Após 72 horas da injúria, ocorre a proliferação dos osteoblastos, dando origem aos eventos subperiosteal e endosteal, que estão atrelados à formação das trabéculas ósseas, compostas por osso imaturo (SCHROEDER; MOSHEIFF, 2011). Nesse período, o tecido necrótico local é degradado pelas células fagocitárias, estimulando

a formação de novos vasos sanguíneos, que irão possibilitar o aporte de nutrientes e células no sítio da lesão, através da cascata de cicatrização (SCHROEDER; MOSHEIFF, 2011).

O tecido de granulação é formado em torno de três a quatro dias, promovendo pequena estabilidade no foco de fratura (FOSSUM et al., 2007), o qual é constituído principalmente por fibrina, formado logo após o coágulo, iniciando assim o processo de ossificação endocondral. Concomitantemente, a ossificação intramembranosa ocorre na região subjacente do periósteo, formando assim um calo ósseo (ROZEN et al., 2007). Nesta fase o tecido de granulação é marcado por uma acentuada angiogênese e o recrutamento de células mesenquimais progenitoras, originando um tecido altamente vascularizado e com alto acúmulo de células indiferenciadas (ROZEN et al., 2007).

Para que ocorra a formação do tecido de granulação é necessário que ocorra ação quimiotática e mitogênica no fator de crescimento de transformador beta (TGF-B), o qual é produzido por macrófagos e plaquetas no hematoma, estimulando a produção de células mesenquimais, osteoprogenitoras, condroblastos e osteoblastos. O TGF-B tem função importante nesta fase, favorecendo a inibição de enzimas proteolíticas que são capazes de prejudicar a produção do tecido neoformado, além de ter a função de produzir a matriz celular orgânica (ROZEN et al., 2007).

A formação do calo ósseo ocorre a partir do quarto até o décimo quarto dia após a injúria tecidual, sendo que nessa etapa é formado infiltrado rico em fibroblastos e células mesenquimais, diferenciando-se em condroblastos capazes de sintetizar matriz cartilaginosa, ou seja, colágeno tipo II e proteoglicanos, que caracterizam a formação do calo macio. Os condroblastos distinguem-se em condrócitos maduros, favorecendo a hipertrofia do tecido cartilaginoso, portanto, gerando estabilidade mecânica até que o calo cartilágneo seja mineralizado gradualmente (MARSELL; EINHORN, 2011). A vascularização favorece a formação do calo cartilaginoso e auxilia a mineralização intersticial, onde os condrócitos maduros sofrem apoptose e o tecido cartilaginoso é degradado gradualmente pelos osteoclastos advindos do aporte vascular e substituído por matriz óssea neoformada pelos osteoblastos (SCHROEDER; MOSHEIFF, 2011).

A fase de remodelamento inicia-se logo após a formação do calo duro, e pode durar meses ou anos. O processo envolve a mudança do osso trabecular por osso medular, o qual é denominado de remodelamento harvesiano. Esse procedimento leva a restauração do canal medular e a modificação de todo o tecido cicatricial formado durante a consolidação óssea e, por fim, faz com que o osso tenha a mesma fisionomia do osso original. Por fim, nesta fase de remodelação, os osteoclastos são os grandes protagonistas, por favorecerem a reabsorção do calo mineralizado abundantes e com integração dos osteoblastos, reestruturando o tecido ósseo lesado (ZAMARIAN, 2014).

Alguns fatores podem retardar ou mesmo neutralizar a reconstituição dos fragmentos ósseos, como a severidade e o local da fratura, a natureza do aporte sanguíneo para o osso, a dimensão da lesão nos tecidos, perda óssea, infecções, ou mesmo presença de neoplasias. Outros fatores podem estar envolvidos no retardo, como alcoolismo, fumo, idade e a diabetes (MOREIRA, 2013).

Diante disso é necessário o estudo de recursos que otimizem o processo de reparo.

### **3.3 DIODO EMISSOR DE LUZ (LIGHT EMITTING DIODE)**

LED é um acrônimo de *light emitting diode* que surgiu na prática clínica como uma modalidade coadjuvante da fototerapia em relação a terapia de laser de baixa intensidade (TLBI), devido aos custos do aparelho de laser, dificultando o tratamento de indivíduos com menor poder aquisitivo, uma vez que tanto a terapia por LED como por LASER apresenta os mesmos efeitos fotobiomoduladores (PRIANTI et al., 2018). Fontes de laser e LEDs são similares do ponto de vista da luz emitida, ambos produzem uma faixa espectral relativamente estreita, porém o LED tem um espectro maior (~ 20 nm) (PRIANTI et al., 2018).

A terapia por LED é uma modalidade terapêutica semelhante a TLBI, que tem sido extensivamente investigada na prática clínica em relação aos seus fotofísicos, fotoquímicos e fotoelétricos. Assim como os lasers, o LED apresenta características próprias que o difere da luz comum, como: a monocromaticidade, a não coerência e colimação. Este recurso emite radiação no espectro eletromagnético, nas cores azul,

verde e ciano, do vermelho (visível) e infravermelho (invisível) gerando efeitos atérmicos, que não causam danos ao tecido biológico (CALDERHEAD; TANAKA, 2017).

A LED terapia tem como finalidade fornecer energia não ionizante capaz de estimular a membrana celular a partir do momento em que há interação da luz com o tecido biológico, proporcionando uma transferência de elétrons. Tal efeito não tem a capacidade de modificar as ligações químicas, mas promove alterações fotobiomoduladoras nas células, fazendo com que haja liberação de substâncias químicas resultando em reações fisiológicas, como a ativação de enzimas protéicas através da fotoestimulação dos cromóforos, por exemplo (BUENO; CRISTOFOLINI, 2014).

Os efeitos da terapia por LED são semelhantes aos da TLBI, nos comprimentos de onda do vermelho e infravermelho, sendo que ambas as modalidades visam promover uma interação entre a luz e um fotorreceptor, o qual promoverá a produção de oxigênio celular, desencadeando uma série de eventos celulares que modulam a função e a proliferação celular, bem como o reparo de células comprometidas. O mecanismo de ação da fotobiomodulação é a ativação dos cromóforos no citocromo C oxidase da célula, resultando em atividade celular acelerada, aumento das concentrações de ATP e fosfatase alcalina (ALP) e liberação de cálcio (POMINI et al., 2022). No reparo ósseo a luz estimula PMB (proteínas morfogênicas ósseas) - RUNX-2 - importantes proteínas morfogênicas responsáveis pela formação óssea, promove diferenciação celular e aumento do número de osteoblastos assim como componentes orgânicos da matriz (NAS et al., 2018).

A fotobiomodulação acelera a deposição de matriz óssea mineralizada no defeito, aumentando a atividade osteoblástica e estimulando a deposição de íons inorgânicos. Além disso, reduz a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 e a interleucina-17 (IL-17), além de aumentar a produção de citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina-10 (IL-10), que favorece a regeneração tecidual (REIS et al., 2022).

É de suma importância tanto na irradiação a TLBI quanto na terapia LED, estabelecer parâmetros de irradiação (comprimento de onda, energia, densidade de

energia, tempo e o modo de excitação luminosa) de modo a promover os efeitos terapêuticos benéficos (BAKER, 2016).

### 3.4 FITOTERAPIA

A fitoterapia é um ramo da medicina popular que estuda as plantas medicinais e suas aplicações na cura das doenças, consistindo em um conjunto de saberes internalizados nos diversos usuários e praticantes, especialmente pela tradição oral, tornando-se um método eficaz no atendimento primário à saúde, podendo complementar o tratamento usualmente empregado (BRUNING; MOSEGUI; VIANNA, 2012).

No Brasil, o Sistema Único de Saúde (SUS), por meio dos seus princípios e resoluções normatizadoras, determina que a fitoterapia seja considerada um recurso terapêutico integrativo e complementar à saúde que se dispõe de políticas públicas e normatizações específicas que buscam institucionalizar esta prática (FONTENELLE; CARVALHO, 2013). Apesar das plantas medicinais já fazerem parte da cultura popular, nas últimas décadas o interesse pela fitoterapia teve um aumento considerável entre usuários, pesquisadores e serviços de saúde (SOUZA et al., 2013).

Na declaração de Alma-Ata, em 1978, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece que 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e 85% usam plantas medicinais ou preparações feitas a partir destas. Desde então, a OMS tem expressado a sua posição a respeito da necessidade de valorizar a utilização de plantas medicinais no âmbito sanitário e na atenção básica à saúde (ANTONIO; TESSER; MORETTI-PIRES, 2014).

Embora haja uma grande biodiversidade no Brasil, alguns problemas dificultam o emprego de plantas medicinais para o desenvolvimento de medicamentos. Sua utilização esbarra na existência de poucas leis específicas para o seu acesso, além da grande complexidade em se obter os metabólitos secundários a partir de produtos naturais sendo longo o tempo necessário para o extrato / isolamento desses princípios ativos até sua utilização. Adicionalmente, a literatura científica disponível sobre produtos naturais, com informações sobre a estrutura química e a atividade biológica desses compostos é escassa, havendo grande resistência de alguns profissionais de

saúde em trabalhar com esses produtos naturais (LIMA et al., 2015).

Os fitoterápicos são usados para combater/prevenir diversas doenças e morbidades, principalmente promovendo acessibilidade a pessoas de baixa renda. No reparo ósseo, estudos são encontrados na utilização de alguns recursos fitoterápicos como a *Davallina orientalis* (CHOW et al., 1982); *Lepidium sativum* (JUMA, 2007); *Cimicifuga racemosa* (KOLIOS et al., 2010); *Piper sarmentosum* (ESTAI et al., 2011); *Ormocarpum cochinchinense* (KUMAR et al., 2013); *Peperomia pellucida* (NGUEGUIM et al., 2013; FLORENÇA et al., 2017); *Symphytum Sfficinale* (ARAÚJO et al., 2014); *Chenopodium ambrosioides* (NETO PINHEIRO et al., 2015); *Epimedium sagittatum* (BURIM et al., 2016); *Nigella sativa* (EZIRGANLI et al., 2016); *Aloe Vera* (SELVAKUMAR et al., 2016); *Sambucus williamsii* (YANG et al., 2016); *Ulmus davidiana* (ZHUANG et al., 2016); *Spinacia oleracea* (ADHIKARY et al., 2017); *Dalbergia sissoo* (KARVANDE et al., 2017; KHEDGIKAR et al., 2017); *Marantodes pumilum* (GIAZE et al., 2018); *Cassia occidentalis L.* (PAL et al., 2019); *Anredera cordifolia* (HANAFIAH et al., 2021). Porém, estes estudos necessitam de pesquisas mais aprofundadas que avaliem a efetividade dos tratamentos, além da resistência e qualidade do osso neoformado, para que possam ser utilizados por pacientes.

### **3.5 XIMENIA AMERICANA L**

A *Ximenia americana L.* (*X. americana*) é uma das plantas medicinais silvestres comestíveis mais valiosas do mundo. O gênero *Ximenia* pertence à família Olacaceae, que compreende cerca de 8 espécies, que atualmente tem sido utilizada para fins medicinais e alimentares. A *Ximenia* é encontrada em uma árvore pequena (3-4 m de altura) de aspecto espinhoso, de casca fina, avermelhada ou cinza, lisa ou pouco rugosa, com folhas pequenas, simples, inteiras, alternas, pecioladas, oblongas, glabras e flores branco-amareladas, aromáticas, com as pétalas recurvadas, dispostas em racemos curtos, axilares ou terminais (FEYSSA et al., 2012; KEFELEGN: DESTA, 2021).

Em diferentes países, é utilizada como alimento, medicamento, fonte de óleo essencial e componente industrial de outros produtos (KEFELEGN; DESTA, 2021). É encontrada em regiões tropicais e temperadas, de países como a África, Índia, Nova Zelândia, América Central e a América do Sul. No Brasil, essa planta é encontrada e

utilizada nas regiões Norte e Nordeste, sendo popularmente conhecida como “ameixa do mato”, “ameixa brava” ou “ameixa do sertão”, e menos popularmente como ababone, ababoni, ababuí, ameixeira-do-brasil, ameixa-do-brasil, ambuí (ou ambuy), ameixa-da-baía, ameixeira-da-baía, ameixa-da-terra, ameixa-de-espinho, ameixa-do-pará, ameixeira-do-pará, espinheiro-de-ameixa, limão-bravo-do-brejo, sândalo-do-brasil e umbu-bravo. Na medicina popular brasileira, o extrato da *X. americana* tem sido administrado como analgésico para o tratamento da dor de cabeça, dores gástricas e nas costas e outras condições inflamatórias (SILVA-LEITE et al., 2017).

Todas as partes da planta são utilizadas no manejo clínico de doenças em animais e humanos, sendo as folhas e galhos utilizadas contra febre, resfriado, dores de dente, como laxante, loção para os olhos e cura de venenos; a raiz da planta é utilizada para queimaduras na pele, hanseníase, dores de cabeça, hemorróidas, ataque de vermes da Guiné, sonolência, inchaço e algumas doenças sexualmente transmissíveis. Já a fruta é consumida em quantidades para tratar a constipação (KEFELEGN; DESTA, 2021; MENEZES et al., 2019).

O caule da planta tem sido utilizado para o tratamento de patologias como a hepatite e a malária, sob forma de chá e pulverizado tem ação antisséptica e cicatrizante para promover a cicatrização das feridas (FEYSSA et al., 2012) e propriedades anti-inflamatórias e anti-hipernociceptivas (SILVA-LEITE et al., 2018), atividade antiedematogênica em modelos de inflamação aguda e crônica, (SILVA et al., 2018), atividade antiviral contra o vírus da imunodeficiência humana) (CHINSEMBU, 2016), bem como atividade antimicrobiana contra *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* e resistência fúngica contra *Candida albicans* (SOUZA et al., 2017).

Figura 2 - Fotos ilustrativas da *X. Americana* L.: A. Hábito; B. Caule; C. Ramo; D. Folhas; E. Fruto



Fonte: Sousa e Lemos (2020).

O óleo produzido a partir das sementes da *X. americana* apresentam 10 ácidos graxos (monoinsaturados e saturados) e esteroides naturais, estando relativamente susceptível a oxidação. Tais óleos são frequentemente utilizados para fins cosméticos e antissépsanticos (FEYSSA et al., 2012; LUCILANIA et al., 2016; BAZEZEW et al., 2021).

Os extratos de *X. americana* possuem ação antimicrobiana e antifúngica (SILVA et al., 2012; MONIK et al., 2015; MENEZES, 2019). O extrato bruto aquoso, metanoico, etanoico, butanoico e clorofórmico de diferentes partes (folhas, raízes, caule e casca do caule) da planta possuem metabólitos secundários como saponinas,



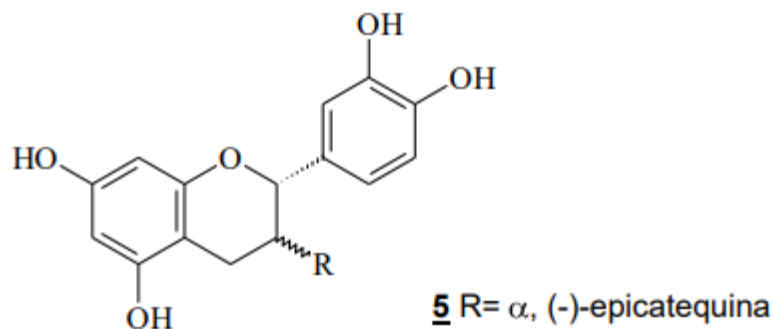
flavonóides, taninos, terpenóides, esteróis, quinonas, alcalóides, glicosídeos e carboidratos na forma de açúcares e amido solúvel (SILVA et al., 2012; MONIK et al., 2015).

Os flavonóides atuam em alguns processos fisiológicos do organismo, promovendo a absorção do ferro e vitaminas, e estimulando a cicatrização. Eles agem como antioxidantes, combatendo os radicais livres, possuem atividade antimicrobiana e moduladora do sistema imune, apresentam ação anti-inflamatória e antinociceptiva (DIAS et al., 2018), analgésica, regenerativa de cartilagens, ossos e produzem vasodilatação (CHAVES et al., 2013) e cicatrização tecidual em feridas incisionais (PALMA et al., 2020). Dentre os flavonóides que constituem a *Ximenia Americana L.*, a epicatequina (C<sub>5</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>) é o composto encontrado em maior quantidade nos extratos do caule e da raiz da planta (UCHÔA et al., 2016; MAIA, 2018).

Estudos recentes com extrato aquoso das cascas do caule de *X. americana* indicam a presença do flavonóide (-)-epicatequina com ação anti-inflamatória no tratamento de DPOC induzida em ratos fumantes (CARVALHO et al., 2020) e aliada ao uso de beclometasona. Os resultados evidenciam redução nas alterações histológicas e morfológicas da DPOC bem como na quantidade de células inflamatórias no lavado brônquico-alveolar e de células calciformes produtoras de muco no pulmão (RODRIGUES JUNIOR et al., 2021).

A epicatequina é um flavonóide, polifenol composto de ligações C=C e O-H. É tida como um importante citoprotetor, tanto por ter uma atividade antioxidante intensa como também por prevenir apoptose celular interferindo na cadeia de caspases. Tem potencial para atuar como anti-inflamatório, apresentando propriedades anticancerígenas, atividades vasodilatadoras, antivirais, antimicrobianas e cicatrizante (SOUZA NETO JÚNIOR et al., 2019). Segundo Hernández (2021), a epicatequina é conhecida por sua excelente atividade antioxidante, podendo desempenhar um papel benéfico em vários tecidos e órgãos do corpo humano, especialmente nos músculos e no osso.

Figura 3 - Estrutura química dos Flavonóides e da epicatequina



Fonte: Andreo et al, 2006.

O processo de cicatrização é favorecido pela ação antimicrobiana dos taninos que possuem três mecanismos de ação: i) a inibição das enzimas microbianas extracelulares, que dificultam a multiplicação e desenvolvimento dos microorganismos; ii) a privação dos substratos e íons metálicos, por exemplo ferro, cobre, cálcio, manganês e alumínio, importantes em atividades fisiológicas como a respiração microbiana; iii) a inibição da fosforilação oxidativa, o que leva a morte os microorganismos por não formação do ATP (adenosina trifosfato) (LIMA., 2010).

### 3.6 BIOMATERIAIS NO REPARO ÓSSEO (GELMA)

Novos biomateriais baseados em hidrogel com propriedades físicas e biológicas ajustáveis vem sendo desenvolvidos e se mostram materiais promissores para o avanço de aplicações relacionadas à engenharia de tecidos e medicina regenerativa (FARES et al., 2018). Os hidrogéis desempenham um papel importante nos campos biomédicos como a engenharia de tecidos, medicina regenerativa, sinalização celular, entrega de drogas e genes e biossensores (YUE et al., 2015). Além disso, os hidrogéis se assemelham estruturalmente à matriz celular, podendo oferecer condições miméticas para cultura celular *in vitro* e *in vivo* (KLOTZ et al., 2016).

Os hidrogéis são divididos principalmente em dois tipos, hidrogéis naturais e hidrogéis sintéticos. Comparado aos hidrogéis sintéticos, os hidrogéis naturais têm melhor biocompatibilidade, o que contribui significativamente para a viabilidade,

multiplicação, diferenciação e locomoção de células. Pode-se comentar também que com o desenvolvimento da ciência dos materiais, os chamados “Scaffolds”, estruturas tridimensionais baseadas em hidrogéis para cultura de células, têm um grande potencial no campo da engenharia de tecidos (KOUHI et al., 2020; LIU et al., 2020).

Dentre os hidrogéis utilizados na engenharia de tecidos, o formado por um derivado de gelatina, o metacrilóil de gelatina (GelMA), provou ser um dos hidrogéis mais versáteis disponíveis para cultura de células 3D e bioimpressão, desde a sua primeira descrição feita por Van Den Bulcke *et al.* (KLOTZ et al., 2016). A gelatina é um tipo de polímero hidrofílico natural produzido a partir da hidrólise e desnaturação de colágeno (pele de porco) sob alta temperatura. Essa possui propriedades interessantes, incluindo biocompatibilidade, solubilidade em água, degradabilidade, fácil aquisição, baixo custo, menor antigenicidade, dentre outras, podendo ser utilizada na formação de hidrogéis que podem ser utilizados como scaffolds (ALDANA et al., 2019; SUN et al., 2020; LANTIGUA et al., 2021; RAJABI et al., 2021; VELASCO-RODRIGUEZ et al., 2022; HUANG et al., 2022).

A gelatina contém muitas sequências de ácido arginina-glicina-aspártico (RGD) que promovem a adesão celular (LIU; CHAN-PARK, 2010), bem como as sequências alvo de metaloproteinase de matriz (MMP), que são adequados para remodelação celular (YUE et al., 2015).

O GelMA é um hidrogel versátil do ponto de vista de processamento e reticula quando exposto à irradiação de luz, podendo ser microfabricado usando diferentes metodologias, incluindo micromoldagem, fotomascaramento, bioimpressão, automontagem e técnicas microfluídicas (YUE et al., 2015). *Scaffolds* formados por GelMA demonstraram-se adequados para diferentes aplicações de engenharia de tecidos, podendo ser otimizados através da modificação da concentração do polímero, do grau de metacrilção ou da intensidade da luz UV (SWIESZKOWSKI et al., 2018).

*Scaffolds* formados por GelMA são extremamente flexíveis, porosos e hidrofílicos, promovem resposta inflamatória mínima na condição corporal (RAJABI et al., 2021) e têm capacidades osteoindutoras promissoras que podem ser adequadas para o reparo ósseo (LANTIGUA et al., 2021; GOTO et al., 2021; JIANG et al., 2021; PU et al., 2022).

A GelMA é um hidrogel semi-sintético típico, que permite a exploração dos sinais biológicos inerentes à molécula de gelatina, permitindo o controle das propriedades mecânicas (RUEDINGER, 2015). É obtido pela derivatização da gelatina com anidrido metacrílico, resultando na modificação dos resíduos de lisina e hidroxila com grupos laterais de metacrilamida e metacrilato (YUE, 2015).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DA FRAÇÃO DO CAULE DA *XIMENIA AMERICANA* L

Foi coletada na cidade de Domingos Mourão (4°09' 14,8" S e 41° 18'28,3" W), Piauí, Brasil, em janeiro de 2018. O botânico Dr. Francisco Soares Santos Filho identificou uma amostra da planta contendo caule, folhas, flores e frutos e o exemplar do comprovante foi depositado no Herbário Afrânio Gomes Fernandes (UESPI) sob o número de acesso HAF 03541.

Seguindo a metodologia de Carvalho, *et al.* 2020, a casca do caule da *X. americana* (300 g) foi lavada em água, adicionada a um recipiente com água destilada (2 L) e armazenada em geladeira por 5 dias. Após esse período, o líquido foi filtrado para obter extrato aquoso da casca do caule da *X. americana* (EACCXA) no laboratório de Química da Universidade Estadual do Piauí. Posteriormente, uma parte do extrato foi liofilizada no laboratório de Materiais da Universidade Federal do Piauí. O extrato aquoso foi liofilizado e pó ( $m = 0,0005$  g) foi administrado a solução do GelMA para produção de hidrogel com *X.americana*.

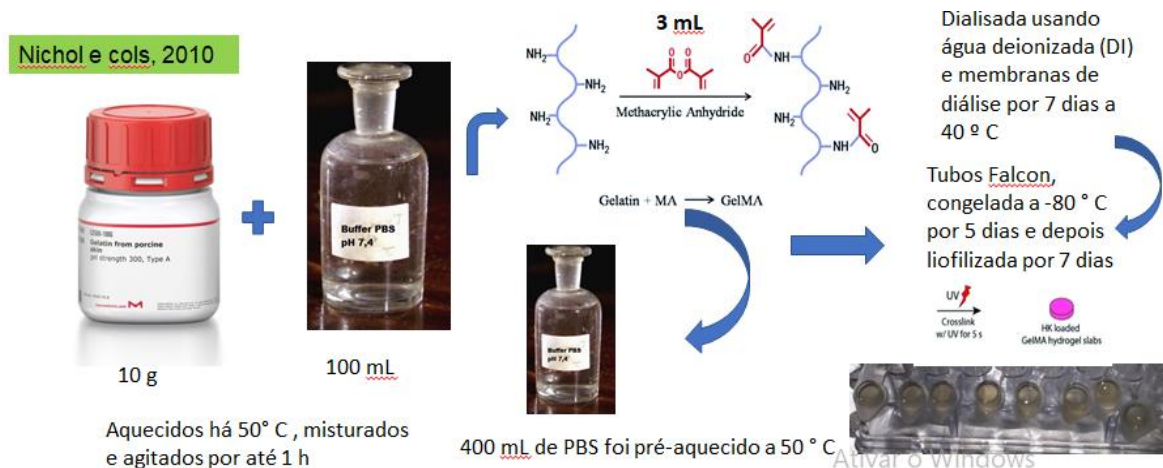
#### a. Produção do Hidrogel de gelatina metacrilato fotopolimerizável (GelMA) e do GelMA + *X. americana*

A produção de GelMA foi realizada no Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados (LIMAV), na Universidade Federal do Piauí (UFPI), seguindo procedimento descrito por Nichol *et al.* (2010). Resumidamente, 10 g de gelatina (Tipo A, pele de porco, obtida comercialmente na empresa Sigma-Aldrich) foram dissolvidos em 100 mL de Tampão Fosfato Salino (PBS, pH 7,4, obtido comercialmente na empresa Sigma-Aldrich) aquecidos há 50°C, misturados e agitados por até 1h.

Em seguida, gotejaram-se lentamente 3 mL de anidrido de metacrilato (3-(trimethoxysilyl) propyl methacrylate, obtido comercialmente na empresa Sigma-Aldrich) e agitou-se em um sistema fechado por 3 h (50 °C). Separadamente, 400 mL de PBS foi pré-aquecido a 50 °C e depois misturado a solução inicial (volume final 500 mL). A solução foi então dividida em duas porções e dialisada usando água deionizada (DI) e membranas de diálise 12-14 KDA (obtidas comercialmente na empresa Sigma-Aldrich) por 7 dias a 40 °C . A água deionizada foi trocada duas vezes por dia. Finalmente, a solução foi transferida para tubos Falcon, congelada a -80°C por 5 dias e depois liofilizada por 7 dias . Ao final desse procedimento, GelMA foi obtido.

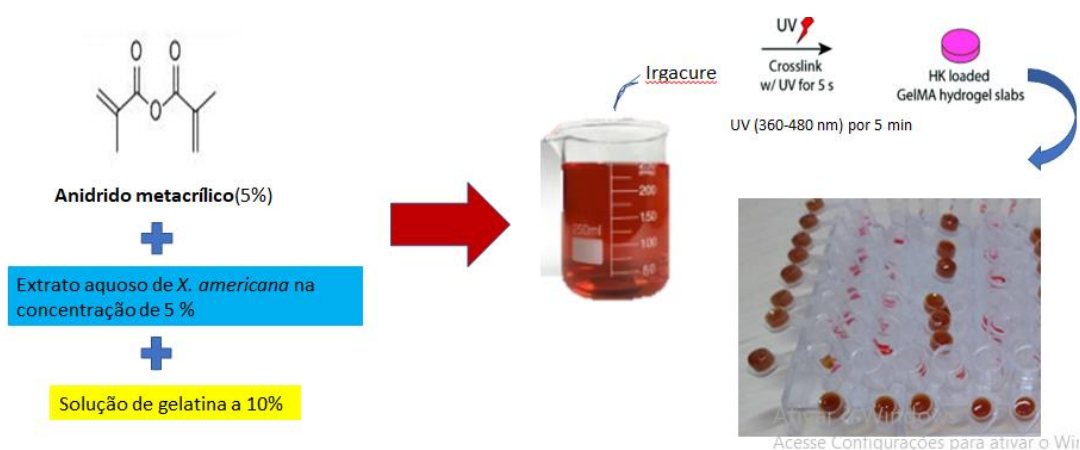
O material GelMA + *X. americana* foi obtido adicionando-se anidrido metacrílico (5%), extrato aquoso das cascas do caule de *X. americana* na concentração de 5 % e um agente fotoiniciador Irgacure na concentração de 0,5% (2-hidroxi-4 - (2-hidroxietoxi) -2- metilpropiofenona (Irgacure 2959, obtido comercialmente na empresa Sigma- Aldrich) à solução de gelatina a 10%. A solução foi agitada por 1 h para obter uma mistura homogênea, sendo colocada em tampas de Eppendorf (utilizadas como molde) e levadas para foto-reticulação UV (360 - 480 nm) por 5 min.

Figura 4 - Produção do Hidrogel de gelatina metacrilato fotopolimerizável (GelMA)



Fonte: Autoria própria.

Figura 5 - Produção do Hidrogel de gelatina metacrilato fotopolimerizável (GelMA) + *X. americana*



Fonte: Autoria própria.

## b. Caracterização dos hidrogéis produzidos

Os materiais GelMA e GelMA + *X. americana* (GelMA com EACCXA) produzidos, foram congelados e liofilizados no laboratório de materiais da UFPI e, então, encaminhados para as seguintes análises de caracterização: análise termogravimétrica (TGA), calorimetria diferencial exploratória (DSC), espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e difração de raios-X (DRX).

### 4.1.1 Análises térmicas

As propriedades térmicas foram determinadas por análise termogravimétrica (TGA) e de calorimetria exploratória diferencial (DSC), realizadas no laboratório da empresa Dermo Probes (São José dos Campos- SP). As curvas DSC foram obtidas em um calorímetro modelo DSC Q20 (TA Instruments), utilizando-se cadinhos de alumínio, contendo  $2 \pm 10$  mg de amostra em atmosfera de nitrogênio, sob um fluxo de  $20 \text{ mL min}^{-1}$ . Os experimentos foram conduzidos entre as temperaturas de 20 a  $800 \text{ }^\circ\text{C}$ , a uma razão de aquecimento de  $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ . Para a calibração do equipamento, foi utilizado um padrão de Índio (p.f. =  $156,6 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Os dados foram analisados utilizando-se o software TA Instruments Universal Analysis 2000, versão 4.7A.

As curvas termogravimétricas (TG) não-isotérmicas foram obtidas utilizando-se

um analisador simultâneo TG/DTA/DSC, modelo SDT Q600 (*TA Instruments*), utilizando-se cadinhos de alumina contendo  $8 \pm 0,1$  mg de amostra, em atmosfera de nitrogênio, sob um fluxo de  $40 \text{ mL min}^{-1}$ . Os experimentos foram conduzidos entre as temperaturas de 20 a  $800 \text{ }^\circ\text{C}$ , a uma razão de aquecimento de  $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ . Para a calibração do equipamento foi utilizado um padrão de oxalato de cálcio monohidratado.

#### 4.1.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Os espectros foram obtidos em pastilhas de KBr (grau espectroscópico) na proporção de 1:100 amostra/KBr. Tanto o KBr como as amostras de *X. americana*, GelMA e GelMA + *X americana*. foram previamente secas em estufa a  $50^\circ\text{C}$  por 40 min e depois misturadas e trituradas em cadinho de porcelana. As amostras trituradas foram novamente secas em estufa a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , por 40 min. Após este período as pastilhas foram preparadas com a utilização de prensa. As análises foram realizadas em equipamento *Thermo Nicolet Nexus 470* com transformada de Fourier utilizando módulo de transmitância, com acúmulo de 48 varreduras, no intervalo de  $4000 - 500 \text{ cm}^{-1}$  e com resolução de  $2 \text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.1.3 Difração de Raios-X (DRX)

As análises foram realizadas no Grupo de Cristalografia do Instituto de Física de São Carlos (USP - São Carlos) em dois procedimentos experimentais diferentes para as três amostras (extrato de *X.americana*, GelMA e GelMA + *X. americana*). No procedimento experimental 1, as amostras foram analisadas sem qualquer intervenção/preparo, observando varredura normal de  $5^\circ$  a  $80^\circ$ , passo  $0.0200/\text{segundo}$ , com velocidade de  $2^\circ/\text{min}$ . Já no procedimento experimental 2, as amostras foram moídas e o tempo de aquisição dos espectros aumentado, sendo que a varredura foi realizada de  $10^\circ$  a  $70^\circ$ , passo  $0.0200/\text{segundo}$  velocidade de  $.0.5^\circ/\text{min}$ , no total de 2 horas de análises para cada amostra. Na realização dos experimentos foi utilizado unidade de raios-X Rigaku, modelo última IV 2Theta/Theta, tensão de 40 kV e corrente de 30 mA, tubo selado de Cu.

a. Ensaio de liberação controlada de GelMA (Epicatequina-principal composto

da *X. americana*)

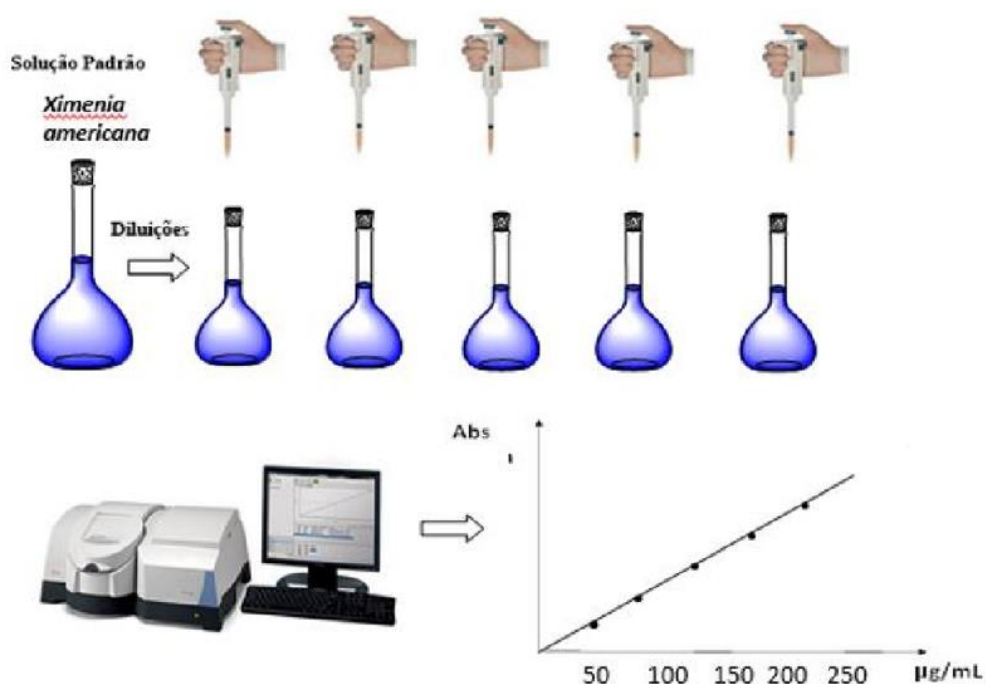
Espectros de absorção no UV-Vis foram obtidos para identificação da banda de absorbância da amostra de *X. americana*. O espectro foi obtido através de varredura na faixa de 200 a 700 nm, para a identificação da banda de absorção da epicatequina. A identificação da máxima absorbância da amostra ( $\lambda$  máx), foi utilizada para posterior estudo da liberação de GelMA a partir dos hidrogéis produzidos, a partir da construção de uma curva analítica de calibração.

Para construção da curva de calibração, partiu-se da solução estoque de *X. americana* (1mg/ml) a partir de qual foram realizadas diluições para obtenção das seguintes concentrações: 50, 100, 150, 200 e 250  $\mu\text{g/mL}$ . Espectros UV-Vis foram então obtidos para todas as concentrações. A curva de calibração foi obtida por análise de regressão linear interpolando a concentração nominal do padrão com a área do pico observado ( $\lambda$  máx. = 278nm) no espectrofotômetro (Shimadzu UV- 160A), na faixa espectral de 200 a 800 nm. As curvas foram obtidas em triplicata (n=3). Após a construção da curva de calibração, ensaio *in vitro* de liberação foi realizado. Para tanto, o experimento foi realizado utilizando-se o hidrogel de GelMA + *X. americana* a 5% (m = 0,0005 g) e este foi mergulhado e incubado a 37 °C, em 10 mL de solução tampão fosfato salina (PBS, pH 7,4  $\pm$  0,1) sob agitação (100 rpm).

Em intervalos de tempo fixados em 15 min, 30 min, 1 hora, 2 horas, 24 horas e durante 30 dias (tempo experimental máximo na aplicação *in vivo* dos hidrogéis no animal), 3,0 mL de solução foi retirada do meio de dissolução e, por conseguinte, a quantidade do composto foi detectada em um espectrofotômetro UV-Vis em 278 nm, a partir da curva de calibração obtida. Após cada retirada o mesmo volume foi substituído por solução tampão fosfato salina (PBS, pH 7,4  $\pm$  0,1) nova. Cada experimento foi realizado em triplicata (n=3). Um esquema dos procedimentos de diluição e construção da curva de calibração, podem ser observados na Figura 6.



Figura 4 - Procedimento experimental para a construção da curva de calibração (Ensaio de liberação controlada) da epicatequina (principal composto X. americana)



Fonte: Autoria própria.

A porcentagem de liberação cumulativa do composto em função do tempo foi calculada usando a seguinte equação:

$$\text{Quantidade cumulativa de liberação (\%)} = (C_t/C_\infty) \times 100$$

Onde,  $C_t$  é a quantidade de epicatequina liberada no tempo  $t$  e  $C_\infty$  refere-se à quantidade total do composto carregado na amostra do hidrogel. Todos os resultados foram realizados em triplicata.

#### b. Caracterização do estudo

Este estudo está delineado como uma pesquisa do tipo experimental, com abordagem quali-quantitativa.

#### c. Experimentos in vivo

#### 4.1.4 Aspectos éticos e legais

Este trabalho foi realizado utilizando modelo *in vivo* (modelo animal). Esta pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Piauí (CEUA), conforme protocolo: 00089.007021/2021-66, de acordo com os Princípios Orientadores para os Cuidados e Uso de Animais de Laboratório e de acordo com as Lei Federal nº 11.974 de 2008 - Experimentação em Animais, e foi cadastrado na Plataforma do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimentos Tradicionais Associados - SISGEN (A22C996), de acordo com a Lei da Biodiversidade nº 13.123 de 2015.

#### 4.1.5 Delimitação do universo do estudo

A amostra da pesquisa foi determinada como uma amostra probabilística, aleatória, constituída de 50 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) com oito semanas de idade, com pesos corporais médios variando entre 250 e 300 g provenientes do Biotério da UESPI. Os animais foram mantidos ao longo do estudo em gaiolas padrão de polietileno, devidamente etiquetadas, com 05 animais por gaiola, em temperatura ambiente controlada de  $24 \pm 1$  °C e umidade do ar de 60 %, fotoperíodo de 12 h claro/escuro, recebendo água e alimentação padrão (Presence Ratos e Camundongos, *In vivo* Nutrição e Saúde Animal Ltda. Paulínia, SP, Brasil) *ad libitum*.

Os animais foram divididos em 5 grupos (GC, Grupos GG , GLED, GE e GELED), contendo 10 ratos em cada um, sendo 05 ratos de cada grupo eutanasiados nos tempos experimentais de 15 e 30 dias do tratamento (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição dos grupos experimentais

<b>Grupos</b>					
<b>Experimentais</b>	<b>Eutanásia</b>			<b>Animais por grupo</b>	
	GelMA	Extrato	LED	15 dias	30 dias

<b>Grupo GC</b>	-----	-----	-----	5 animais	5 animais
<b>Grupo GG</b>	X	-----	-	5 animais	5 animais
<b>Grupo GLED</b>	x	-----	x	5 animais	5 animais
<b>Grupo GE</b>	x	x		5 animais	5 animais
<b>Grupo GELED</b>	X	X	X	5 animais	5 animais

Legenda. Controle (C). G (GelMA). E (extrato de *X. americana*). L (LED).

Fonte: Autoria própria.

#### 4.1.6 Indução experimental do defeito ósseo

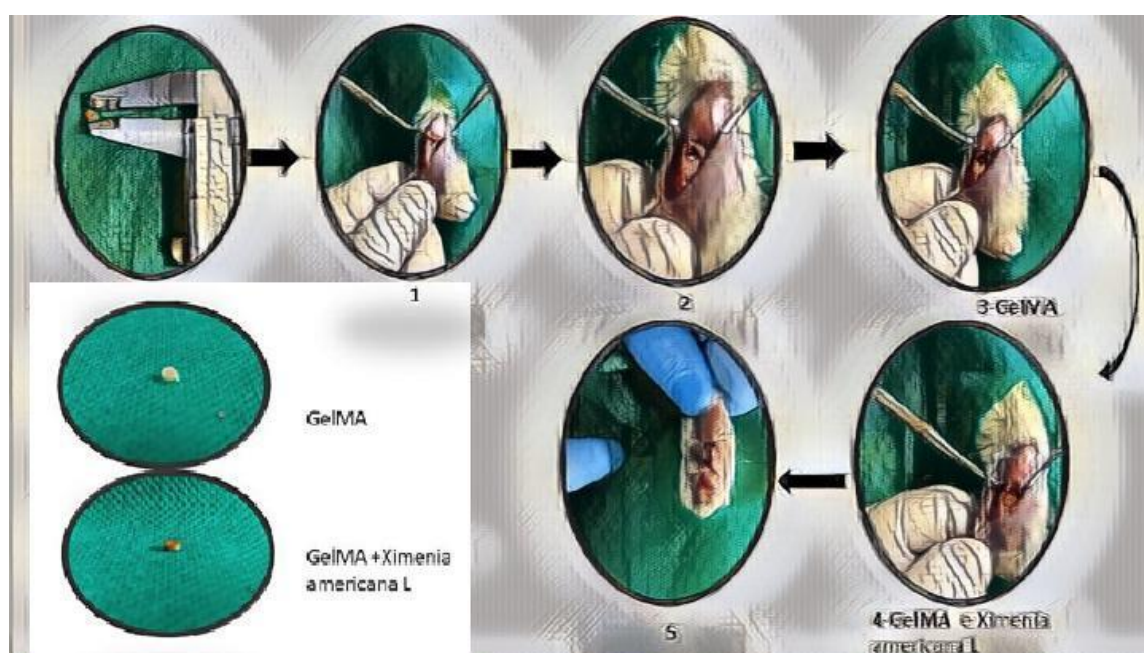
Os animais receberam pré-tratamento com atropina cedido pela Alergan® na dose de 0,04 mL para cada 100g de peso corpóreo. Após 15 minutos, foram anestesiados de forma dissociativa por via intramuscular (cloridrato de cetamina 10% com dose de 0,1 mL para cada 100 g de peso corpóreo e cloridrato de xilazina 2% com dose de 0,1 mL para cada 100 g de peso corpóreo - obtidos pela Syntec®) (BRASIL, 2016; LEE et al., 2016; SCHLICKWEI et al., 2019). Após a anestesia, cada animal foi submetido à depilação e assepsia na região da tíbia direita com polvidine tópico Bioquímica®.

Utilizando o protocolo de fratura adaptado de Kido 2015, os procedimentos de fratura e implantação do biomaterial foram realizados, conforme mostra a Figura 7. Após incisão longitudinal na pele e separação do tecido conjuntivo subcutâneo (Figura 7 - etapa 1), o defeito crítico foi induzido na tíbia direita dos animais com um micromotor cirúrgico com broca do tipo trefina de 3 mm de diâmetro (Figura 7 – etapa

2), seguido da implantação do biomaterial (Figura 7 – etapas 3 e 4) (formato circular, 3 mm de diâmetro e espessura média de aproximadamente 400 µm) no local da lesão de acordo com os grupos tratados. Para confecção desta cavidade, foi estipulado um torque constante de 45 N, velocidade de 45.000 rpm e irrigação abundante (70% - regulagem do motor elétrico) com soro fisiológico para viabilidade de regeneração óssea (Figura 7).

O biomaterial GelMA foi implantado nos grupos GelMA e GelMA + LED e GelMA+ *X. americana* + LED no local da lesão no grupo tratado. O grupo controle não recebeu nenhum tipo de tratamento. Em seguida, em ambos os grupos as margens da ferida foram suturadas (fio de seda 4-0 Sertix®) para uma perfeita coaptação (Figura 7 – etapa 5).

Figura 5 - Detalhes do procedimento de fratura óssea e implantação do biomaterial



Fonte: Autoria própria.

Ao término do procedimento os animais receberam analgésico cloridrato de tramadol subcutâneo (12,5 mg/Kg) ministrado a cada 6 horas. Ainda, avaliações periódicas (a cada 2 horas) foram realizadas para identificação de dor por expressão facial e comportamento. Os animais foram eutanasiados aos 15 e 30 dias após indução da lesão por meio de overdose de tionebutal sódico (150 mg/kg) (ALVES et

al., 2017; NASCIMENTO et al., 2019; NASCIMENTO et al., 2020) e amostras do tecido ósseo dos grupos foram removidas, as quais foram mantidas em nitrogênio líquido. As amostras de cada grupo foram encaminhadas para análises de espectroscopia Raman e processo laboratorial de rotina para inclusão em parafina e análise histopatológica.

#### 4.1.7 LED Terapia

Com a intenção de estimular o reparo ósseo, foi utilizado 1 aparelho de luz LED, Endophoton marca KLD, emitindo no espectro eletromagnético do infravermelho próximo de 858 $\pm$  20nm.

A intervenção do grupo LED foi realizada logo após o procedimento cirúrgico, o que corresponde ao período do início da fase inflamatória de reparação óssea, em dias contínuos subsequentes ao pós-operatório, até a eutanásia.

A aplicação foi realizada na tíbia direita, utilizando a técnica pontual em apenas um ponto sobre a fratura, sendo que a caneta do equipamento foi posicionada perpendicularmente ao tecido ósseo, conforme mostra a Figura 8. A Tabela 2 enfatiza todos os parâmetros utilizados.

Tabela 2 - Parâmetros da terapia LED que foram empregados no presente estudo

Parâmetros	Valores
Potência (W)	50 mW- 0,05 w
Área do Feixe (cm <sup>2</sup> )	0,5
Diodo semicondutor	AsGaAL
Comprimento de onda (nm)	858 nm
Energia (J)	6J
Densidade de energia (J/cm <sup>2</sup> )	12
Densidade de Potência (W/cm <sup>2</sup> )	0,1

Tempo de Irradiação (s)	120
Número de Pontos	01

#### 4.1.8 Análise Histológica

As amostras foram primeiramente fixadas em formalina tamponada por 48h e após fixação foram descalcificadas com ácido etilendiaminotetracético (ETDA), 10% p/v, pH 7,2, durante 4 semanas. Após a descalcificação, os espécimes foram desidratados através de bateria de soluções alcoólicas em concentrações graduais e crescentes e tratadas com xilol em um processador automático de tecidos (PT05 TS Luptec, São Paulo, Brasil). Depois de incluídos em parafina, foram obtidos cortes histopatológicos seriados com distância entre 2 e 3  $\mu\text{m}$  e espessura de 5  $\mu\text{m}$  em micrótomo rotativo (MRP09 Luptec, São Paulo, Brasil), os quais foram corados com hematoxilina e eosina (H.E.), dois cortes/lâmina.

As seções de todas as amostras foram analisadas utilizando microscópio de luz trinocular (Olympus CX31, Japão) e fotografadas em triplicata com câmera digital (Moticam WiFi X, Motic Microscopes, Richmond, VA, USA) acoplada a um computador. A análise histopatológica semiquantitativa da neoformação óssea foi realizada segundo os aspectos descritos por Cardoso (2008), descritas sucintamente abaixo:

1. **Leve** – neoformação óssea incipiente restrita às bordas do defeito ósseo;
2. **Leve-moderada** – neoformação óssea mais marcante, representada pela deposição de trabéculas a partir das bordas do defeito ósseo;
3. **Moderada** – neoformação óssea a partir da borda do defeito ósseo e no interior do mesmo, mas em áreas restritas;
4. **Moderada-intensa** – neoformação óssea a partir da borda e no interior do defeito ósseo quase preenchendo toda a extensão deste;
5. **Intensa** – Preenchimento do defeito ósseo por trabéculas de osso neoformado em toda sua extensão, mas não em espessura;
6. **Completa** – Preenchimento total do defeito ósseo por trabéculas de osso neoformado, tanto em extensão quanto em espessura.

Todas as imagens foram ampliadas, tendo como parâmetro de magnitude de amplificação uma régua micrométrica que foi inserida em todas as imagens coletadas nas objetivas de 4x e 10x de aumento. Os espécimes processados foram avaliados por meio da análise descritiva comparativa, no Laboratório de Patologia da UESPI.

#### 4.1.9 Espectroscopia raman dispersiva

A fim de obter os espectros Raman, as amostras foram retiradas do nitrogênio e mantidas à temperatura ambiente. Um espectrômetro Raman (modelo Senterra II, Bruker) com  $\lambda = 785$  nm laser foi utilizado para excitação. A potência de saída do laser utilizado foi de cerca de 50 mW na amostra superfície. A resolução espectral foi ajustada para  $9 - 15 \text{ cm}^{-1}$  para 15 s, gama espectral 400a, 90-3,  $500 \text{ cm}^{-1}$ , 10 objetiva. Em cada região óssea de interesse, ou seja, na região de transição fronteira, foram recolhidos três espectros com uma distância aproximada de  $10 \mu\text{m}$  entre os pontos. O espectro de osso cortical normal também foi obtido, que foi denotado como hígido, numa região distante da lesão induzida, após sacrifício em 15 e 30 dias.

Finalmente, o espectro Raman dos biomateriais (GelMA e GelMA + *X. americana*) foram comparados com a região tratada e a região saudável. O programa Labspec 5.0 foi utilizado para remover a fluorescência do espectro em bruto na região de  $90 - 3500 \text{ cm}^{-1}$  através do ajuste polinomial de quinta ordem. Além disso, também permitiu etapas de pré-processamento, tais como o ajuste da linha de base.

Na sequência, o processamento foi concluído no software Origin 2018, no qual os espectros foram submetidos a um vector normalização (cada intensidade Raman foi dividida pela raiz quadrada da soma das intensidades quadradas calculadas de todo o espectro); foram identificados os picos e as áreas integradas dos principais picos avaliados foram realizadas nos seguintes intervalos:  $957 - 962 \text{ cm}^{-1}$  (referente ao fosfato), representativo do conteúdo mineral. A fim de quantificar a composição óssea, bem como de caracterizar alterações ósseas no mineral realizado o cálculo da razão da área integrada da banda de fosfato  $\nu_1$  ( $\sim 960 \text{ cm}^{-1}$ ). Além disso, a cristalinidade foi obtida invertendo a largura total do pico à metade do máximo (FWHM) da banda de fosfato  $\nu_1$  ( $\sim 960 \text{ cm}^{-1}$ ). O software Origin 2018 foi utilizado para calcular a razão.

#### a. Análise estatística

Os dados estatísticos foram analisados pela análise de variância, ANOVA e pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, pois o número de amostras em cada grupo foi reduzido, seguido de um pós-teste de Dunn. Para essas análises, foi utilizado o programa Graphpad Prism (versão 8.3.0, San Diego, CA, EUA). Diferenças significativas foram consideradas quando o valor de p foi inferior a 0,005. Os resultados foram expressos como suas médias e desvio padrão.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE *X AMERICANA L*, GELMA E GELMA + *X. AMERICANA*

A Figura 8 mostra as curvas TG/DTG para o extrato *X. americana*, GelMA e GelMA+ *X. americana*. As curvas do extrato de *X. americana*, mostraram três processos de decomposição, com um resíduo mineral de aproximadamente 23,4%. O 1º evento ocorre na faixa de temperatura compreendida entre 27 e 138 °C e está relacionado à perda de materiais voláteis, como por exemplo, a água utilizada no processo. Já o 2º e 3º eventos ocorrem em temperaturas acima de 138 °C e 400 °C e podem ser associados à decomposição de uma grande variedade de metabólitos secundários, principalmente fenólicos, presentes no extrato. Resultados semelhantes foram obtidos por Santana (2016) e Almeida et al. (2019).

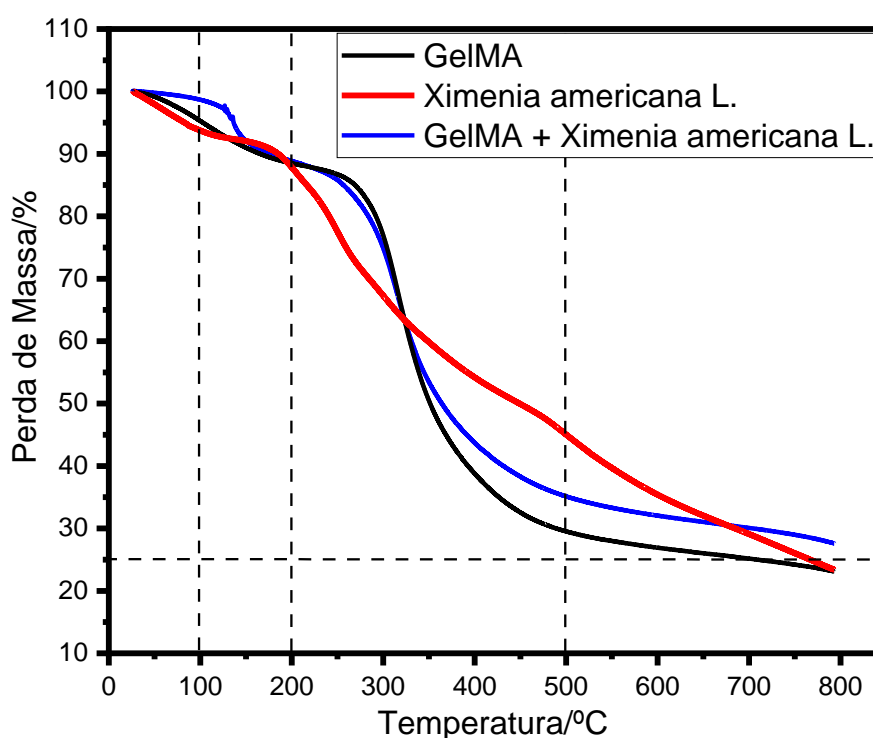
O comportamento da degradação térmica do hidrogel de gelatina metacrilato fotopolimerizável (GelMA) mostra 2 eventos de perda de massa. O 1º acontece na faixa de temperatura compreendida entre 27°C e 212 °C, provavelmente causada pela perda de moléculas de água e um 2º evento ocorre em temperaturas superiores de aproximadamente 212 °C, que pode ser atribuído à degradação do biopolímero, sendo que um resíduo de aproximadamente 23,1% de massa foi observado. Resultados semelhantes de comportamento térmico foram obtidos por Aldana et al. (2019), estudo o qual teve como objetivo projetar *scaffolds* à base de gelatina com características morfológicas de alta resolução e desempenho, com baixo custo. Em seus resultados, os autores relataram que a metodologia utilizada é uma ferramenta valiosa para



desenvolver padrões nanofibrosos baseados em *scaffolds* de GelMA para cultura de células e engenharia de tecidos.

Já o hidrogel GelMA + *X. americana* apresenta comportamento térmico semelhante ao obtido para GelMA, onde pode ser observado a partir dos termogramas dois eventos de perda de massa principais. O 1º evento de perda de massa é observado na faixa de temperatura compreendida entre 26°C e 202°C, provavelmente causada pela perda de moléculas de água e de materiais voláteis, e o 2º evento de perda de massa em temperaturas superiores a 202°C que pode ser atribuído a degradação do biopolímero edecomposição de metabólitos secundários, sendo que um resíduo de aproximadamente 27,6% de massa foi observado. A Tabela 3 resume os valores dos principais eventos de perda de massa por degradação térmica dos materiais. A partir dos resultados de análise TG/DTG podemos concluir que tanto GelMA quanto GelMA + *X. americana* tem boa estabilidade térmica em temperaturas de até 200 °C, não havendo perda significativa de massa (decomposição) nesse range de temperatura. Tal resultado possibilita a aplicação desses materiais no range mencionado.

Figura 6 - Curvas de TG do extrato de *X. americana* (a), GelMA (b) e GelMA + *Ximenia americana L.* (c)



Fonte: Autoria própria.

Tabela 3 - Resultados da análise térmica TGA

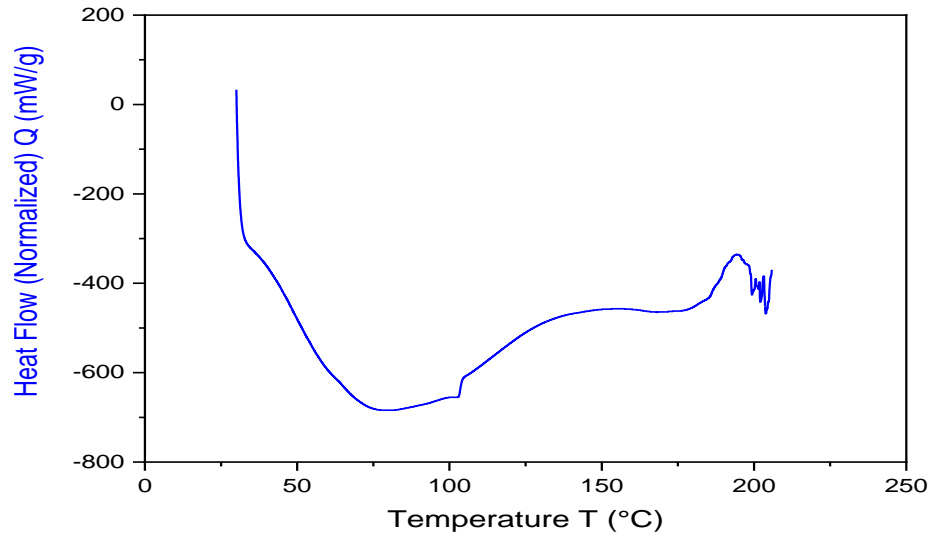
<b>Amostra</b>	<b>Temperatura no 1º estágio de perda de massa</b>	<b>Temperatura no 2º estágio de perda de massa</b>	<b>Temperatura no 3º estágio de perda de massa</b>	<b>Resíduo de massa</b>
<b>GeIMA</b>	<b>27 - 212</b>	<b>212 - 400</b>	<b>-</b>	<b>23.1%</b>
<b><i>X. americana L.</i></b>	<b>27 - 138</b>	<b>138 - 400</b>	<b>≥ 400</b>	<b>23.4%</b>
<b>GeIMA + <i>X. americana L.</i></b>	<b>26 - 202</b>	<b>202 - 400</b>	<b>-</b>	<b>27.6%</b>

Fonte: Autoria própria.

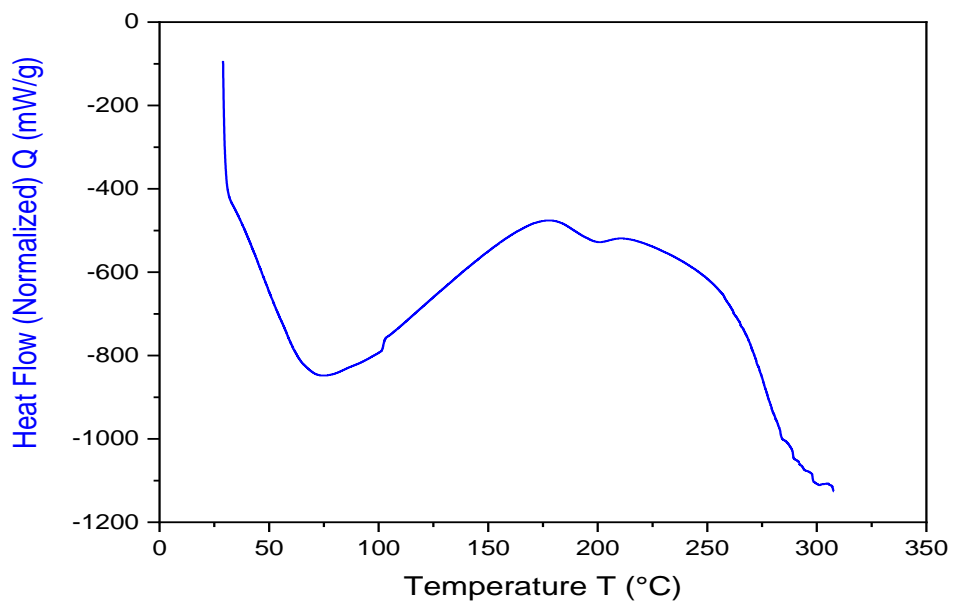
A Figura 9 mostra as curvas DSC para o extrato *X. americana*, GeIMA e GeIMA + *X. americana*. Na curva DSC do GeIMA (Figura 10 b) foi observada uma banda endotérmica na faixa entre 30 °C e 120 °C, que podem ser atribuídas à transição vítrea de blocos de aminoácidos na cadeia peptídica relativa às regiões amorfas de gelatina e à perda de água e degradação de proteínas. Resultado semelhante também foi encontrado por Aldana *et al.* (2019). Corroborando esses achados, El-Maghawry *et al.* (2020) verificou certa semelhança na avaliação de DSC de gelatinas empregadas em um sistema potencial para possível direcionamento do fármaco Etoricoxib ao cólon.

As curvas de DSC do hidrogel GeIMA + *X. americana* são mostrados na Figuras 9c. A curva de DSC mostra uma banda endotérmica na faixa de 36 °C a 110 °C que pode ser atribuída a transição vítrea de blocos de aminoácidos na cadeia peptídica relativa às regiões amorfas de gelatina e à perda de água e degradação de proteínas, assim como observado para o DSC do GeIMA (Figura 10 b). Na região entre 250 °C e 320 °C foi observada uma banda endotérmica e que pode ser atribuída a quebra das ligações hidroxílicas presente na *X. americana*, fenômeno semelhante foi observado por Salvi *et al.* (2014).

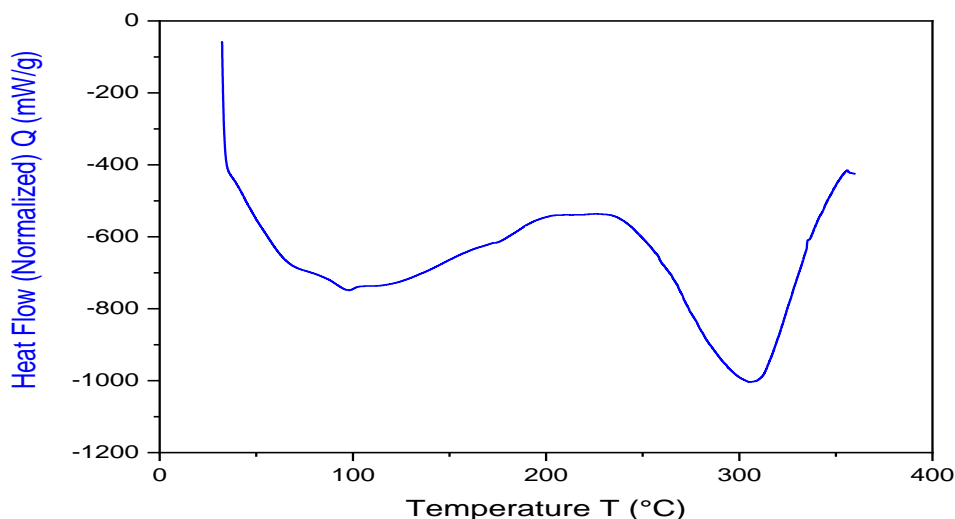
Figura 7 - Curvas de DSC do extrato de *X. americana* (a), GelMA (b) e GelMA + *X. americana* (c)



(a)



(b)



(c)

Fonte: Autoria própria.

A espectroscopia FTIR é utilizada para caracterizar o material e avaliar sua composição química e é uma forma também de confirmar a compatibilidade de materiais associados. É uma técnica espectroscópica não destrutiva e importante nas análises de materiais produzidos. Basicamente o que se mede nesta análise, é a fração da energia transmitida ou absorvida em relação à incidente em determinado comprimento de onda ou número de onda (EVORA et al., 2002).

Segundo Tozetto et al. (2007), a espectroscopia de FTIR trata-se de uma técnica espectroscópica de absorção, no qual, envolve transições moleculares de estados vibracionais ou rotacionais de baixa energia ( $4000$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ ). Como o número e o tipo de transições que a molécula sofre estão relacionados com o número e o tipo de ligações que ela contém, as informações contidas em espectros deste tipo permitem a identificação de grupos funcionais da estrutura química dos compostos.

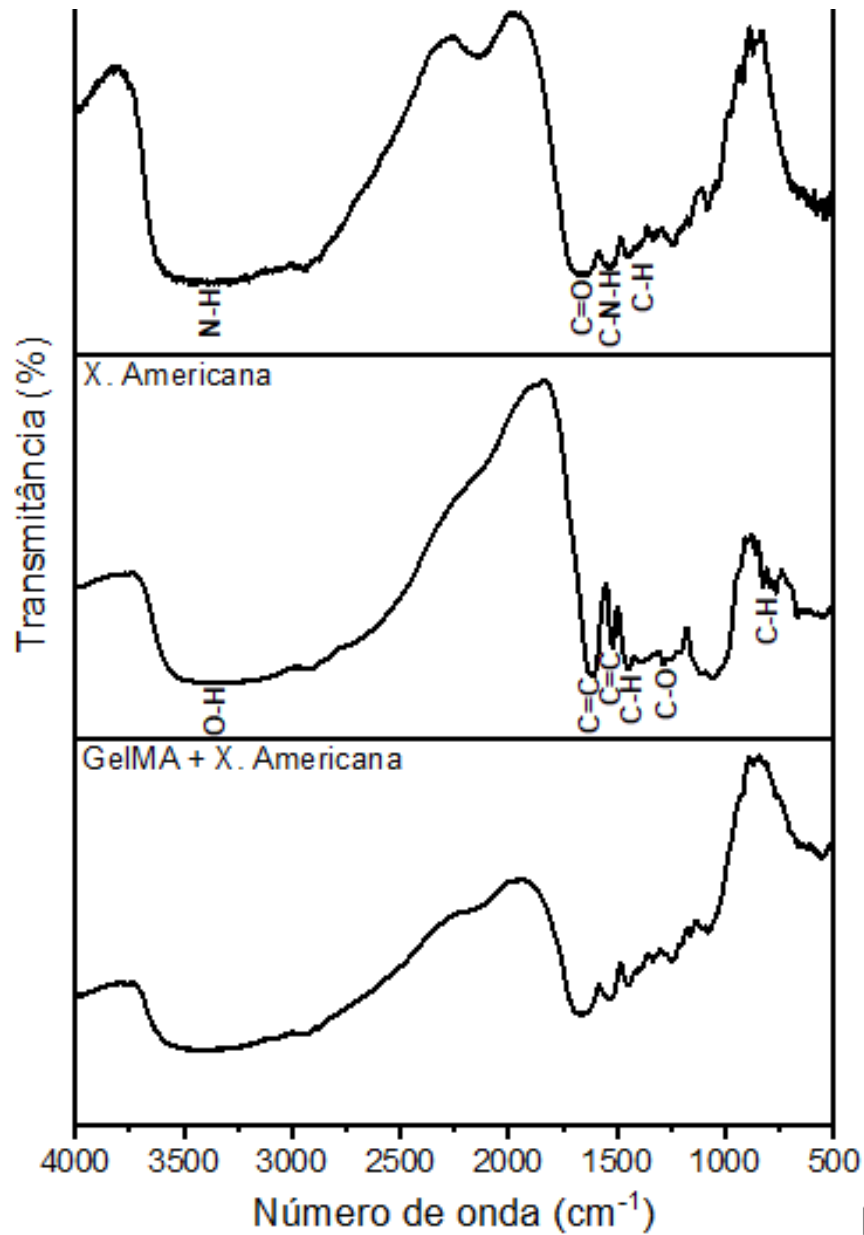
Na Figura 10 encontram-se os espectros do extrato de *X. americana* (Figura 10 a), GelMA pura (Figura 10 b) e GelMA + *X. americana* (Figura 10 c). Para o espectro de *X. americana*, as principais bandas encontradas e atribuídas foram: em torno de  $3000$  a  $3800\text{ cm}^{-1}$  banda relacionada ao estiramento da ligação O-H, em  $1614$  e  $1517\text{ cm}^{-1}$  banda relacionada às ligações C=C dos grupos aromáticos, em  $1448$  e  $1388\text{ cm}^{-1}$  bandas referentes as ligações C-H, em  $1300$  a  $1000\text{ cm}^{-1}$  bandas características da

vibração de estiramento C-O e em 796 e 667  $\text{cm}^{-1}$  bandas relacionadas às ligações C-H em aromáticos. As bandas foram atribuídas de acordo com os resultados encontrados em Santana et al. (2018) e Almeida et al. (2019).

A Figura 10 apresenta o espectro FTIR obtido para GelMA, as principais bandas encontradas e atribuídas foram: em torno de 3000 e 3600  $\text{cm}^{-1}$  banda referente a ligações de peptídeos (N-H), em 1650  $\text{cm}^{-1}$  banda relacionada a Amida I, principalmente grupos de estiramento C=O e em 1490 e 1580  $\text{cm}^{-1}$  banda correspondente a vibrações de dobramento C-N-H. As bandas foram atribuídas de acordo com a literatura (RAHALI et al., 2017; FONSECA et al., 2020). Segundo Santana et al. (2018), Santana (2014) e Almeida et al. (2019), essas ligações químicas referem-se a uma variedade de grupos funcionais – como éteres, ésteres e ácidos carboxílicos – que acompanham a composição química de flavonóides, taninos, antraquinonas e outros metabólitos secundários presentes no extrato.

O espectro da amostra GelMA + *X. AMERICANA* é mostrado na Figura 10 c. Conforme podemos observar, o espectro obtido para GelMA + *X. AMERICANA* manteve o mesmo perfil do espectro da GelMA, observando apenas um aumento da intensidade de transmitância das bandas. Tal fato demonstra que houve sobreposição das bandas dos materiais GelMA e GelMA + *X. AMERICANA*, sendo que essa sobreposição não é indicativa de incompatibilidade química.

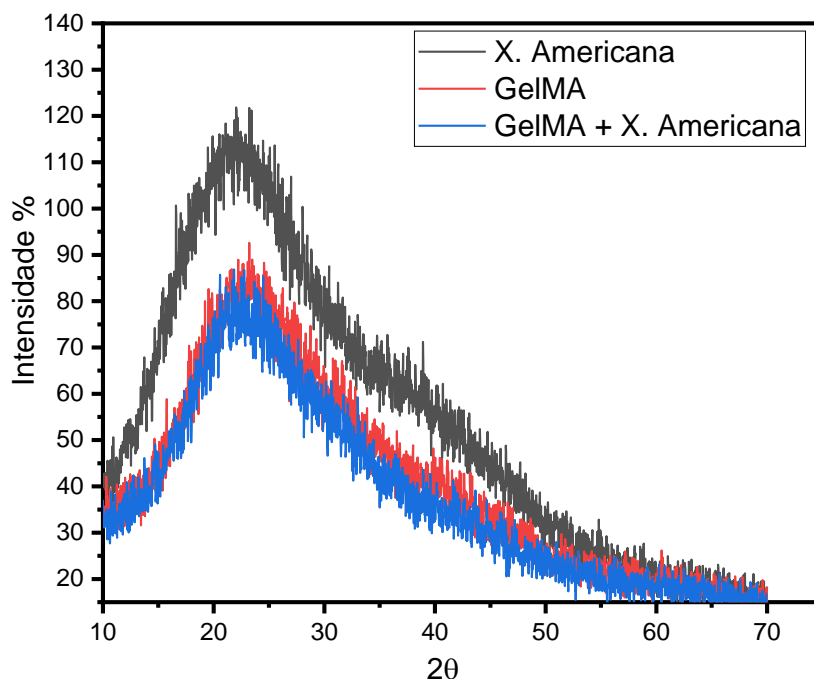
Figura 8 - Espectros de FTIR para extrato de *X. americana*, GelMA e GelMA + *X. americana*



Fonte: Autoria própria.

A Figura 11 mostra os difratogramas das amostras *X. americana*, GelMA e GelMA + *X. americana*. Conforme podemos observar, ambas as amostras apresentam elevado grau de amorfização, sendo que apenas uma banda muito alargada pode ser vista, tanto para a amostra de *X. americana* quanto de hidrogel GelMA + *X. americana*, na região compreendida entre os ângulos de 10° e 40°, correspondentes a gelatina pura (RADEV et al., 2009; MUNIR, 2016).

Figura 9 - Difratomogramas DRX obtidos para as amostras de *X. americana*, GelMA + *X. americana* e GelMA



Fonte: Autoria própria.

#### a. Ensaio de liberação controlada de GelMA em função do tempo (Epicatequina)

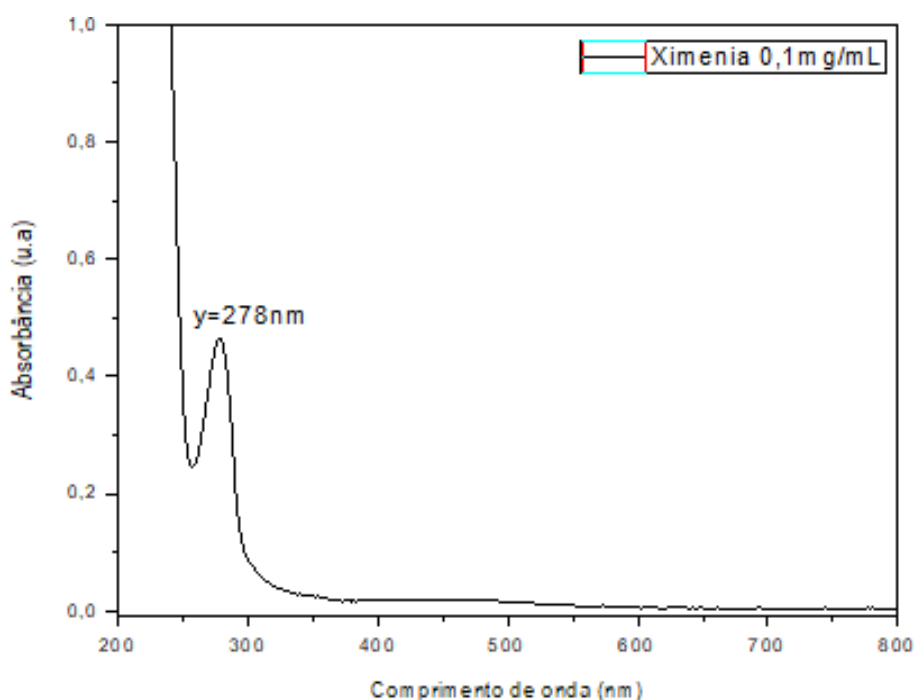
A caracterização bioquímica da *X. americana* na maioria dos estudos existentes está concentrada na investigação da polpa e semente dos frutos, sendo raros os trabalhos envolvendo o caule, mesmo sabendo que este componente é amplamente utilizado na medicina tradicional. Investigações fitoquímicas utilizando extratos aquosos, etanólicos e hidroalcoólicos de casca de *X. americana* L. (OKHALE et al., 2017; SANTANA et al., 2018; ALMEIDA et al., 2019) demonstram a presença de taninos condensados, taninos hidrolisáveis, saponinas, glicosídeos, polifenóis, flavonóides, e terpenóides que são responsáveis por diversas atividades biológicas.

Por meio da varredura espectrofotométrica do extrato do caule de *X. americana* foi encontrado uma banda de absorvância na região UV, com pico centrado em 278 nm, conforme mostra a Figura 12. Segundo trabalho publicado por Aragão, (2019), bandas de absorção centradas em 270 nm, 278 nm e 280 nm correspondem aos

principais constituintes da casca do caule de *X. americana*, que são: procianidina B, catequina/epicatequina e procianidina C, respectivamente. Dentre esses compostos, a epicatequina foi encontrada em maior quantidade conforme mostram os resultados da cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e espectros de UV-Vis de cascas do caule de *X. americana*, em trabalhos publicados por Sousa Carvalho et al. (2019) e Santana et al. (2018). Ambos os trabalhos reportaram a presença de bandas referentes a epicatequina entre 276 nm – 278 nm.

Com base nesses estudos, a banda encontrada em 278 nm a partir do extrato utilizado em nosso trabalho foi atribuída ao composto epicatequina/catequina ( $C_5H_{14}O_6$ ).

Figura 10 - Espectro UV-Vis do extrato de *X. americana*



Fonte: Autoria própria.

Para avaliação do tempo de liberação da epicatequina pelo GelMA + *X. americana* em função dos tempos experimentais de aplicação *in vivo*, foram realizadas a curva de calibração e de liberação controlada de epicatequina.

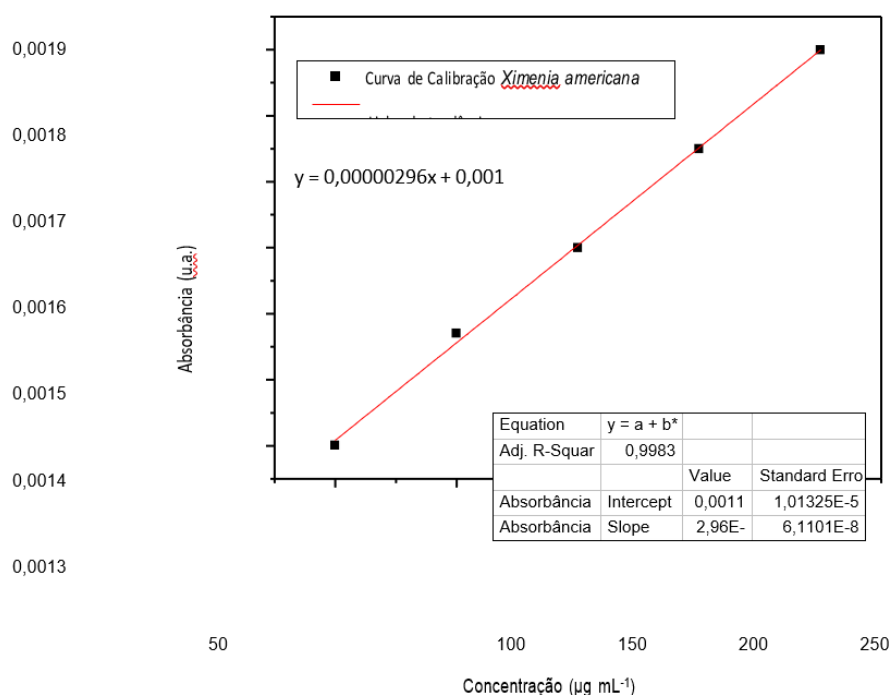
No que se refere a calibração, o método apresentou-se linear em uma faixa de



5 a 250 µg/mL. A curva analítica ( $y = 0,00000296x + 0,001$ ) obtida pelo método dos mínimos quadrados apresentou um coeficiente de correlação ( $r$ ) igual a 0,9983, estando em concordância com os critérios estabelecidos pela RE Nº 899/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que preconiza valor mínimo de  $r = 0,99$  (BRASIL, 2003). O coeficiente de correlação ( $r$ ) demonstra que nos intervalos de concentração estudados, os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração dos fármacos na amostra, e com uma excelente correlação devido ao  $r$  ser maior que 0,99.

Na Figura 13 é possível observar a curva de calibração construída para *X. americana* e que foi utilizada para a quantificação da liberação controlada.

Figura 11 - Curva de calibração construída para *X americana*

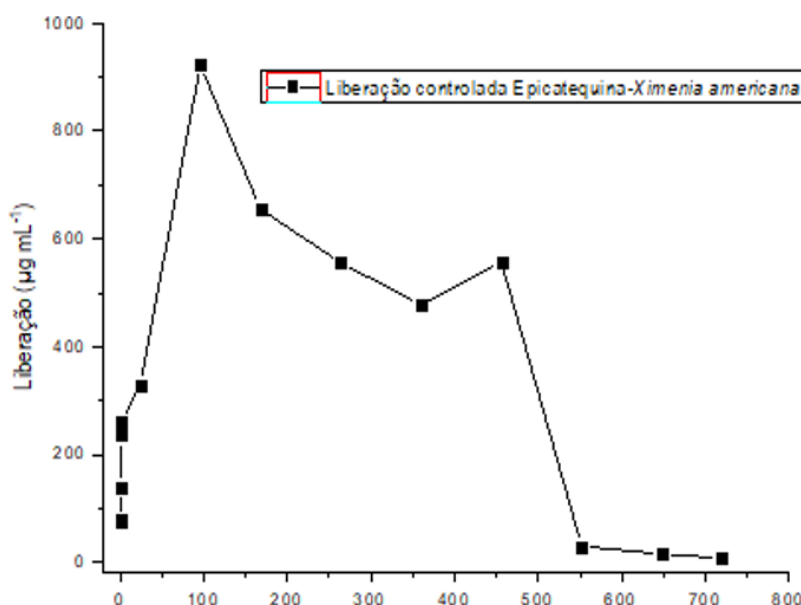


Fonte: Autoria própria.

Para avaliar o tempo de liberação da epicatequina e estimar qual seria o tempo da ação direta da substância liberada pelo hidrogel GelMA + *X. americana* nos experimentos *in vivo*, foi feita a curva de liberação, conforme mostra a Figura 14. Pode-se observar que a liberação do extrato inicia em 15 min após a aplicação e permanece

de forma ascendente até atingir o pico máximo ( $922,50 \mu\text{g/ml}^{-1}$ ) em  $\cong 4$  dias. Após esse período, começa a decair lentamente até  $\cong 15$  dias e um novo pico de liberação ocorre em 19 dias ( $654,9 \mu\text{g/ml}^{-1}$ ), decaindo rapidamente até  $\cong 23$  dias ( $0,8296 \mu\text{g/ml}^{-1}$ ), onde a quantidade liberada no tempo experimental de 30 dias é mínima, constante e próxima do zero ( $0,233 \mu\text{g/ml}^{-1}$ ). Por não zerar e permanecer liberando mesmo que em menor quantidade até os 30 dias do tempo experimental, pode-se concluir que os tempos experimentais do teste *in-vivo* são adequados.

Figura 12 - Liberação controlada de epicatequina em função do tempo a partir do hidrogel de X. americana



Fonte: Autoria própria.

Na literatura atual, não há registros de ensaios clínicos que abordem a importância da liberação controlada de epicatequina. Entretanto, existem ensaios de liberação controlada de vários substratos incorporados ao GeIMA (MAN et al., 2022; BORDINI et al., 2021) usados na otimização do reparo ósseo e, alguns ensaios clínicos também têm avaliado a liberação de galato de epigalocatequina em diferentes casos. Chatree et al. (2020), constataram que a liberação controlada de galato de epigalocatequina diminui os triglicerídeos plasmáticos, a pressão arterial e a kisspeptina sérica em humanos obesos. Já no estudo de Huang et al. (2013),

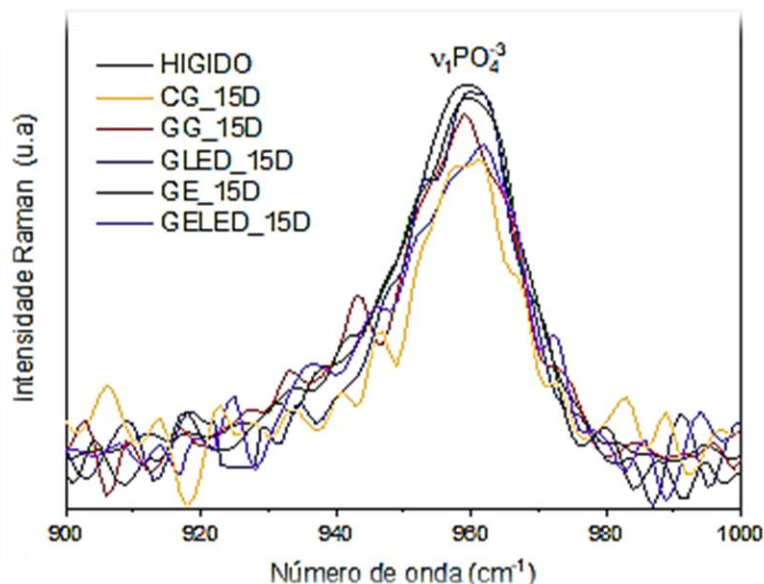
utilizando um composto chamado de pionrito, foi evidenciado que a liberação controlada de metabólicos provenientes da fitoterapia possibilitou o aumento da secreção sRAGE, que é uma substância relacionada a prevenção de diabetes mellitus, tipo 2, em humanos. Portanto, apesar da literatura não apresentar estudos que abordem a liberação controlada de epicatequina, derivados da *Ximenia*, é possível constatar que a liberação controlada de metabólicos provenientes da fitoterapia já é realizada para vários problemas de saúde.

#### b. Experimentos *in vivo*

A cicatrização óssea pode ser monitorada utilizando espectroscopia Raman por meio da determinação da concentração/incorporação de hidroxiapatita, que representa o principal componente do osso mineralizado. Através dessa técnica a banda de fosfato de hidroxiapatita centrada em aproximadamente  $960\text{ cm}^{-1}$  pode ser monitorada (ACIOLE, 2014) e utilizada como marcador de reparo ósseo. (AKKUS et al., 2004; AWONUSI et al., 2007; MORRIS; MANDAIR, 2011; ACIOLE, 2014). Tal ferramenta de análise foi utilizada neste estudo.

A Figura 15 mostra os espectros Raman após 15 dias do procedimento cirúrgico. Conforme podemos observar os grupos GLED (GelMA + LED) e GE (GelMA + *X. americana*) apresentaram bandas com maior intensidade e mais próximas a do hígido, sugerindo um processo de regeneração óssea otimizado nesses grupos, sugerindo alta deposição de  $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ , em concentração similar ao do osso hígido. Por outro lado, o grupo GC (controle) apresentou baixo teor de mineralização, inferior aos demais, indicado pela baixa intensidade relativa da banda associada a  $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ .

Figura 13 - Média dos espectros Raman do tecido ósseo para os grupos experimentais após 15 dias do procedimento cirúrgico, banda centrada em ~ 960 cm<sup>-1</sup> referente a  $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$



**Legenda:** GC (Controle), GG (GelMA), GLED (GelMA + LED), GE (GelMA + *X. americana*) e GELED (GelMA + *X. americana*+ LED)

Fonte: Autoria própria.

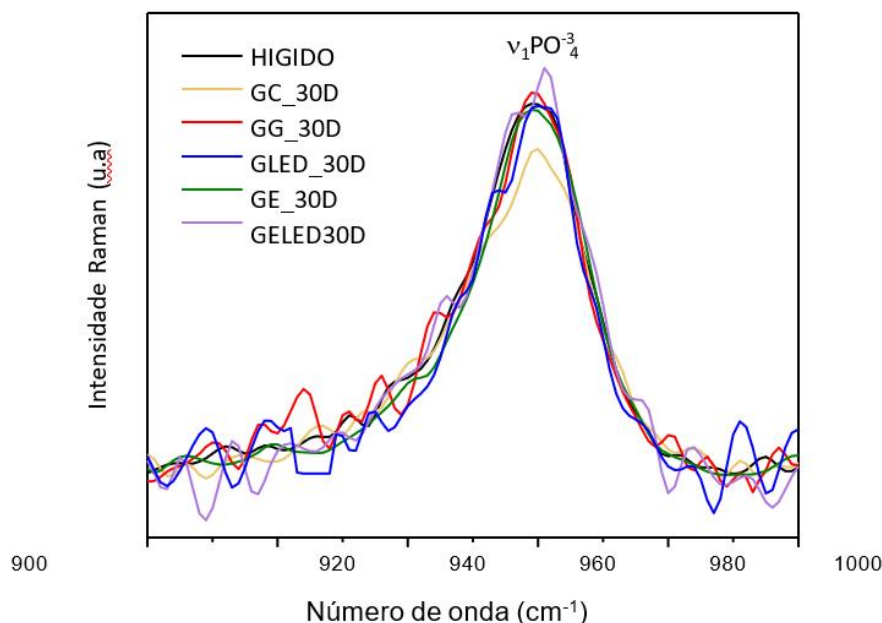
A maior reparação óssea observada nos primeiros 15 dias para os grupos GLED (Gelma + LED) e GE (Gelma + *X. americana*) pode ser explicada pelo efeito imediato da utilização da *X. americana* no GE e do LED no GLED. Em relação ao GE, podemos atribuir essa otimização de reparação óssea a grande quantidade de epicatequina liberada pela *X. americana* nos primeiros dias (Figura 15), onde o pico de liberação foi observado por volta dos 4 primeiros dias. A epicatequina é um flavonóide, que apresenta atividade antioxidante atribuída aos radicais fenólicos de sua estrutura química. Estes achados corroboram com o estudo de Wan Osman *et al.*, (2019), o qual investigou a utilização de folhas de noni (rica em epicatequina) na reparação óssea e no combate à inflamação da cartilagem articular em ratos. A investigação aconteceu por meio de culturas de explantes de cartilagem e estudos pré-clínicos. Em seus resultados, em período anterior aos 30 dias a epicatequina suprimiu liberação de glicosaminoglicano e óxido nítrico do explante de cartilagem e reduziu significativamente a quantidade de mRNA dos tecidos articulares, aumentando

assim a formação óssea, além de melhorar a estrutura da cartilagem articular e condrócitos celularidade.

No tocante ao grupo GLED (Gelma + LED), podemos atribuir essa melhora nos primeiros dias ao efeito sistêmico e instantâneo decorrente da fotobiomodulação por meio da irradiação do LED ao tecido. Segundo Pinheiro *et al.*, (2020), o reparo de fraturas é um processo bioquímico e celular complexo envolvendo uma série de mecanismos para restaurar o osso. A fotobiomodulação proveniente do LED aumenta o metabolismo ósseo e acelera a consolidação da fratura. Nossos resultados corroboram com os achados de Aciole (2014), Comunian et al. (2017) e Pinheiro et al. (2020), os quais também encontraram evidências da otimização da reparação óssea em fratura em período anterior aos 30 dias.

A Figura 16 mostra os espectros Raman após 30 dias do procedimento cirúrgico. Conforme podemos observar, nossos resultados mostraram que a intensidade relativa da banda  $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$  dos grupos GG (Gelma), GLED (Gelma + LED), GE (Gelma + *X. americana*) se igualaram ao do osso hígido, no entanto, a intensidade da banda referente ao grupo GELED (GelMA + *X. americana* +LED) ultrapassou a do osso hígido, sugerindo maior deposição de fosfato (osso) que o normal. Fato esse que pode ser corroborado pela grande quantidade de osso neoformado em volta da fratura e do GelMA, visualizada abaixo na análise histológica. Por outro lado, o grupo GC (controle) apresentou baixo teor de mineralização, inferior aos demais, sugerido pela baixa intensidade relativa da banda de  $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$  no mesmo período experimental (30 dias).

Figura 14 - Média dos espectros Raman do tecido ósseo para os grupos experimentais após 30 dias do procedimento cirúrgico, banda centrada em ~ 960 cm<sup>-1</sup> referente a  $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$



**Legenda:** GC (Controle), GG (GelMA), GLED (GelMA + LED), GE (GelMA + *X. americana*) e GELED (GelMA + *X. americana*+ LED)

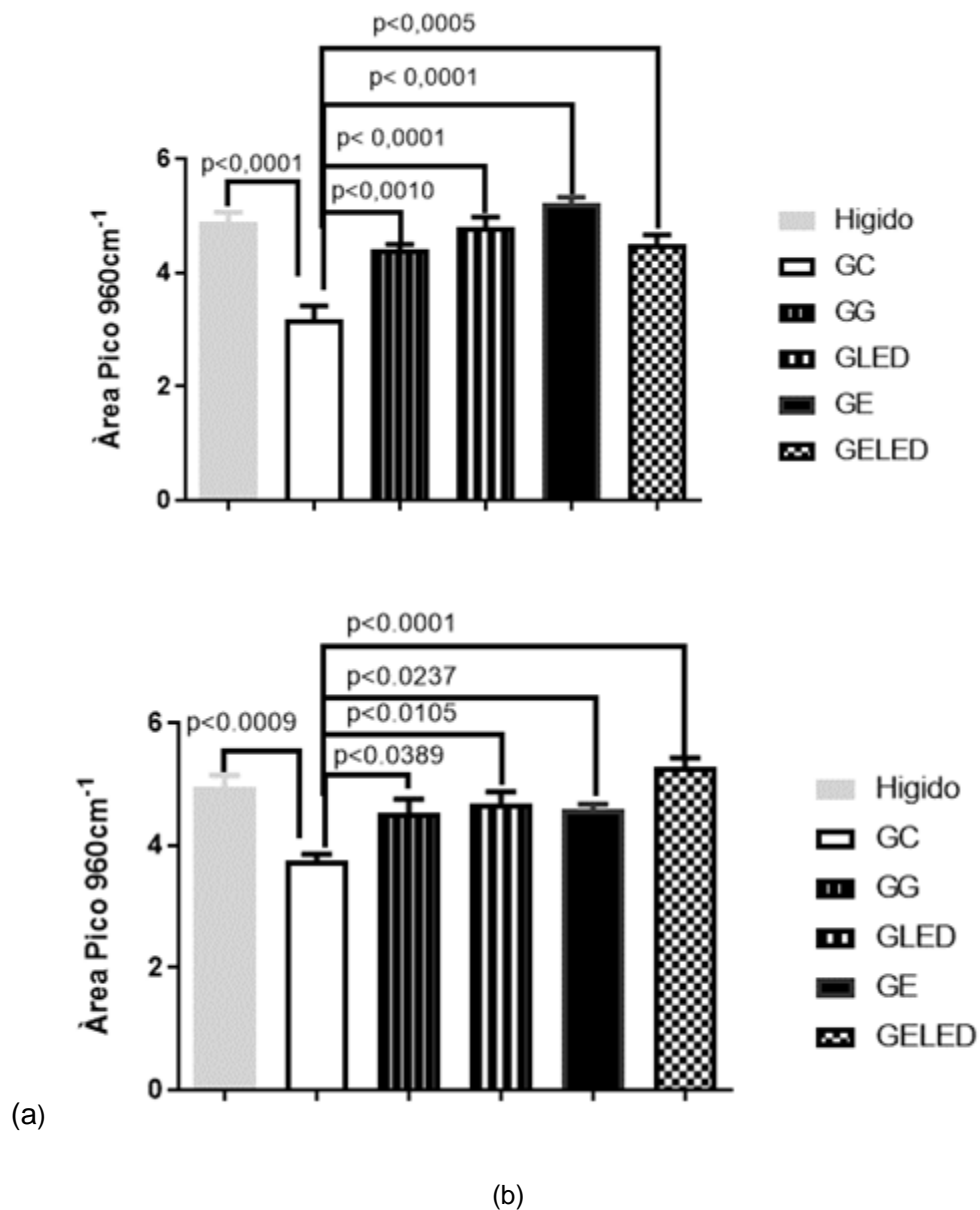
A grande otimização da reparação óssea alcançada com 30 dias no grupo GELED (GelMA + *X. americana* + LED) concretiza de maneira sólida a hipótese de nosso estudo, no qual, esperava-se que o extrato do caule de *X. americana* incorporado ao *scaffold* de gelatina metacrilato (GelMA) associado à fotobiomodulação (LED), fosse capaz de estimular a proliferação celular, acelerando o metabolismo ósseo, contribuindo para um processo de reparo ósseo mais eficaz.

Sabe-se que a fotobiomodulação a TLBI tem como principal finalidade promover a interação entre os tecidos biológicos associadas às suas características ópticas, como a reflexão, transmissão, espalhamento e absorção (PESSOA et al., 2016). Já sobre os efeitos da fotobiomodulação no tecido ósseo, a terapia visa estimular a proliferação celular, uma vez que este recurso tem capacidade de interagir com o conteúdo ósseo, favorecendo modulações bioquímicas das células ósseas, estimulando a respiração mitocondrial, acelerando o potencial osteogênico por meio da migração e diferenciação de células ósseas para o local da irradiação, culminando na produção de colágeno e mineralização da matriz extracelular (PATROCÍNIO-SILVA et al., 2016).

A Figura 17 apresenta a média e desvio padrão do cálculo das áreas integradas das bandas analisadas. O cálculo de áreas integradas da banda de hidroxiapatita centrada em aproximadamente  $960\text{ cm}^{-1}$  referente a vibração ( $\nu_1$ -  $\text{PO}_4^{3-}$ ) foi utilizado para obter os dados da apatita carbonatada. Aos 15 dias de experimento, houve diferença estatística entre todos os grupos tratados e controle, identificando um aumento na deposição de  $\text{PO}_4^{3-}$ , sendo estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ) entre os grupos GLED (GelMA + LED) e GE (GelMA + *X. americana*), com  $p < 0,001$  para o GELED (GelMA + *X. americana* + LED) e GG (GelMA), confirmando os achados da Figura 15. Foi encontrado ainda diferença ( $p < 0,05$ ) entre os grupos GG (GelMA) e GE (GelMA + *X. americana*), observando ainda que o grupo controle apresentou uma deposição de  $\text{PO}_4^{3-}$  significativamente inferior ao osso hígido ( $p < 0,0001$ ).

Após 30 dias do experimento houve uma diferença estatística entre todos os grupos tratados e controle, identificando um aumento na deposição de  $\text{PO}_4^{3-}$ , sendo estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ) entre os grupos GELED (GelMA + *X. americana* + LED e controle, e ( $p < 0,05$ ) entre GLED (GelMA + LED), GE (GelMA + *X. americana*) e GG (GelMA). Foi encontrado ainda diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos GG (GelMA) e GELED (GelMA + *X. americana* + LED), observando ainda que o grupo controle apresentou uma deposição de  $\text{PO}_4^{3-}$  inferior ao osso hígido ( $p < 0,001$ ).

Figura 15 - Média e desvio padrão das áreas integradas da banda em 960 cm<sup>-1</sup>



Fonte: Autoria própria.

A Figura 18 apresenta resultados da média e desvio padrão da cristalinidade (inverso da largura a meia altura do pico - FWHM), que avalia a composição óssea pela deposição de novos cristais de hidroxiapatita no osso neoformado.

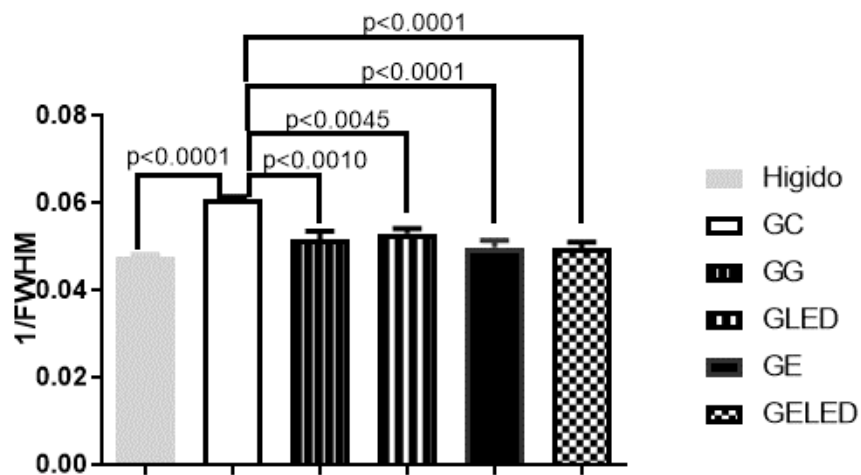
A cristalinidade dos grupos tratados ( $p < 0,0001$ ) e do osso hígido ( $p < 0,001$ ) foram significativamente maior do que a do grupo controle após 30 dias de tratamento, não sendo observada diferença estatística entre os grupos tratados. Aos 15 dias de tratamento houve diferença estatística entre os grupos hígido e controle ( $p < 0,05$ ) e



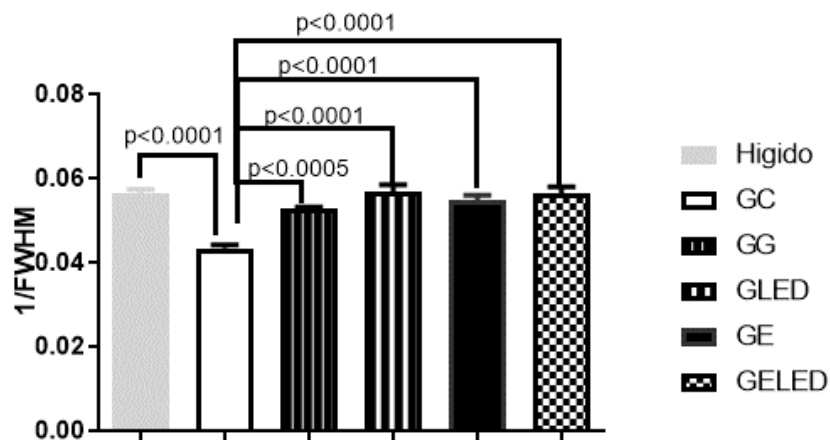
o grupo controle apresentou menor cristalinidade.

A cristalinidade mineral reflete o tamanho do cristal mineral (ACIOLE, 2014). A cristalinidade reduzida sugere que cristais mais jovens e, portanto, menores são formados no local lesado. À medida que o osso cicatriza, o aumentada cristalinidade está relacionado com a maturação dos cristais, à medida que o osso cicatriza, há menos substituição de carbonato e melhor cristalinidade (ACIOLE, 2014).

Figura 16 - Média e desvio padrão da cristalinidade (inverso de FWHM) após 15 dias de tratamento (a) e após 30 dias de tratamento (b)



(a)

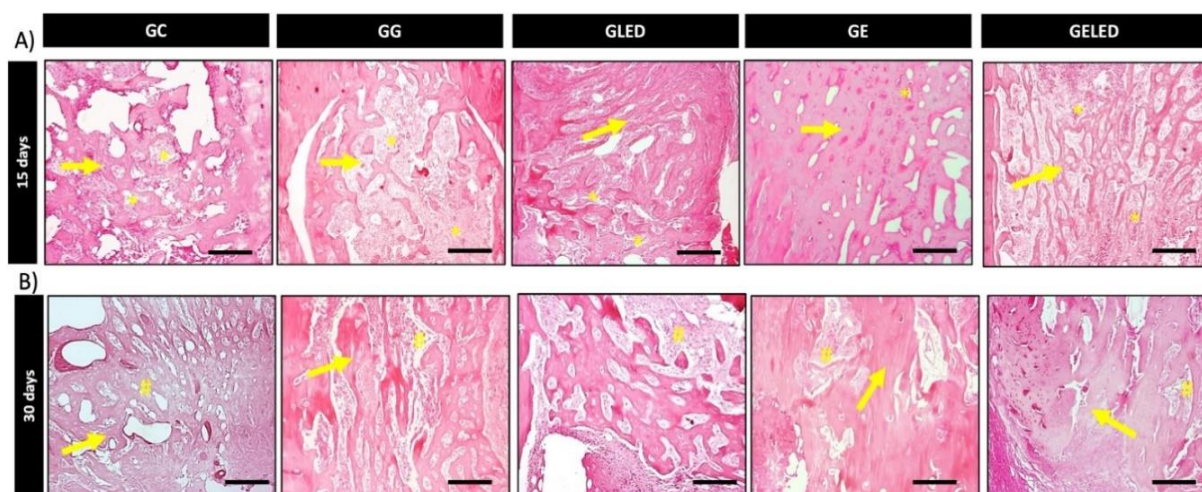


(b)

Fonte. Autoria própria.

A Figura 19 apresenta a análise histopatológica em fotografias ilustrativas para 15 dias (A) e 30 dias (B) após procedimento cirúrgico/tratamento, onde foi avaliado o defeito cortical e suas áreas marginais.

Figura 17 - Fotomicrografia do defeito ósseo 15 dias (A) e 30 dias (B) após a cirurgia. Tecido de granulação (\*); osteóide (#); Tecido ósseo neoformado (→); ponta de sílica (#). Escala de barra = 500 µm (imagem de 2,5×), escala de barra = 50 µm (imagem de 40×). C



Fonte: Autoria própria.

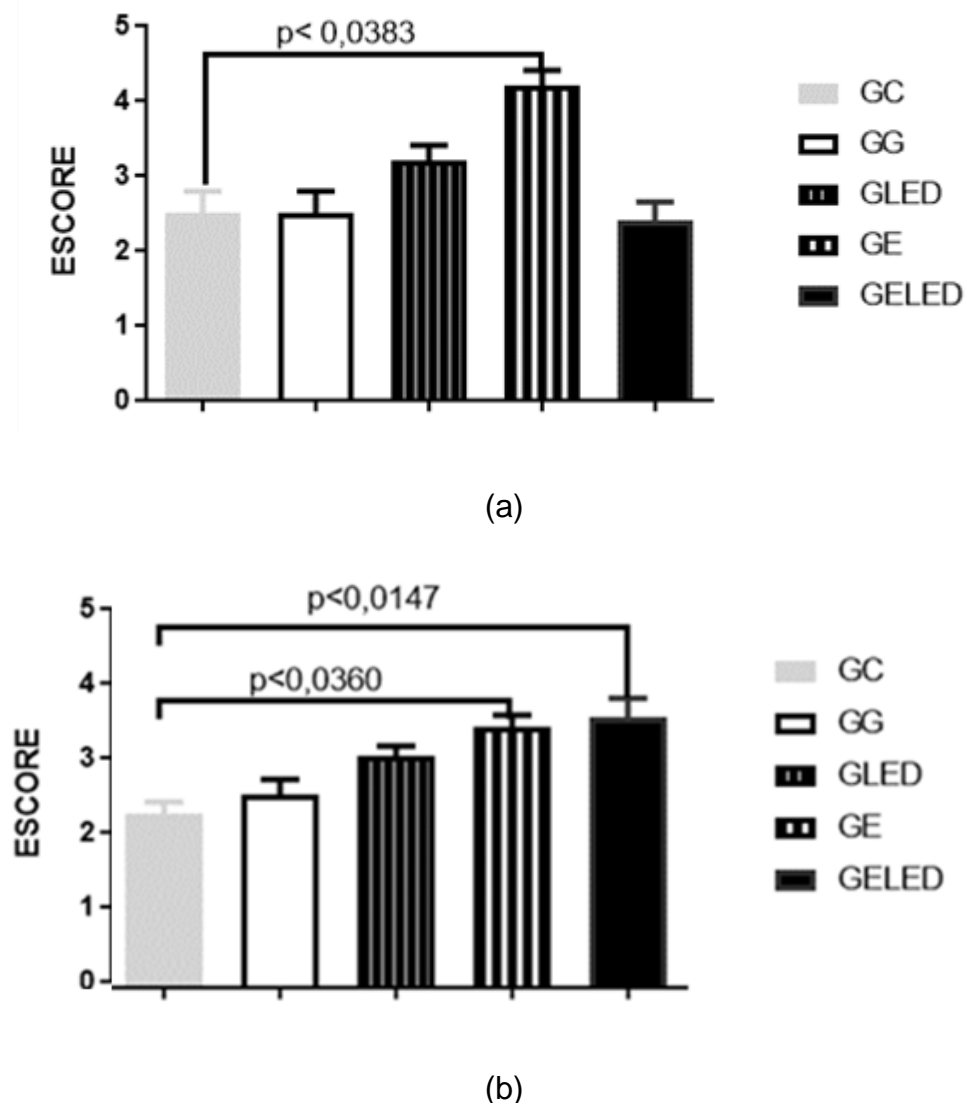
A Figura 19 fornece uma visão geral histológica representativa de todos os grupos experimentais em dois momentos diferentes, especificamente 15 dias (A) e 30 dias (B) após a criação do defeito ósseo. Após 15 dias, para os grupos CG, GG, GLED e GELED, pode-se observar em todo o defeito a presença de tecido de granulação e discreta neoformação óssea. No entanto, o grupo GE apresentou maior presença de novos sítios de tecido ósseo quando comparado aos outros grupos experimentais.

Após 30 dias, foi possível observar que para os grupos GC, GG e GLED, o centro do defeito estava ocupado por tecido osteóide e células ósseas neoformadas imaturas, exibindo algumas trabéculas interligadas. Para os grupos GE e GELED, o tecido ósseo formado demonstrou um aspecto mais maduro com um feixe de tecido ósseo bem organizado em comparação com os outros grupos tratados.

A Figura 20 apresenta a análise histopatológica quantitativa, que avaliou a neoformação óssea e foi realizada segundo os aspectos descritos por Cardoso ,A.B,

2008). Observa-se que aos 15 dias (Figura 20 a) da indução da lesão na tíbia de ratos, no grupo GE a neoformação óssea foi significativamente superior ao GC ( $p < 0,00383$ ). Em 30 dias do experimento (Figura 20 b), houve também uma diferença estatisticamente significativa na neoformação óssea entre o grupo GELED e o GC com  $p < 0,0147$  e  $p < 0,0360$  entre o grupo GE e grupo controle.

Figura 18 - Análise histopatológica quantitativa após 15 dias de tratamento (a) e após 30 dias de tratamento (b)



Fonte: Autoria Própria.

Pelos achados da análise histológica, é possível sugerir que ambas as terapias empregadas (associadas ou isoladas), propiciaram maior preenchimento de

trabeculado ósseo, sendo os resultados de reparo ósseo mais expressivos no grupo GE em 15 dias e GE e GELED em 30 dias, verificado pelo aumento da síntese de osteoblastos e colágeno.

Na literatura não há estudos que testaram e/ou reportaram o uso da *Ximenia americana* L. em reparação óssea. Entretanto, esses resultados positivos podem ser explicados por dois fatores. O primeiro seria correspondente a própria *Ximenia*, uma vez que diversos autores (SILVA et al., 2012; MONIK et al., 2015) inferem que o caule, e como caracterizado nesse estudo, apresentam metabólitos secundários como os flavonóides. Esses metabólitos podem exercer atividades antimicrobianas e moduladoras, além de ação anti-inflamatória entre outros (CHAVES et al., 2013). Todas essas propriedades, inerentes à *Ximenia*, quando empregadas isoladas ou associadas parecem favorecer o reparo ósseo.

O segundo fator seria decorrente dos tratamentos associados, visto que tanto o GelMA (ZUO et al., 2015) quanto a fotobiomodulação parecem contribuir para o aumento do metabolismo celular e, conseqüentemente, para o reparo ósseo. O GelMA incrementa o tecido ósseo pela sua bioatividade inerente e adaptabilidade físico-química (YUE et al., 2015). Ainda, devido a sua arquitetura porosa, promove a migração, proliferação e diferenciação osteogênica e condrogênica (JIANG et al., 2021). Nos estudos de Comunian et al. (2012) e Ekizer et al. (2015) que avaliaram a fotobiomodulação no reparo ósseo, foi verificado que essa modalidade possibilitou a melhora na neoformação e da qualidade do tecido ósseo formado. Tais resultados, se devem ao fato da fotobiomodulação promover o aumento da síntese do número de osteócitos, síntese de colágeno e DNA, proliferação e diferenciação dos osteoblastos, além do metabolismo celular, como já citado (CHUNG; TOMPSON; GONG, 2015; EKIZER et al., 2015). Portanto, todos esses fatores também explicariam os melhores resultados obtidos pelo grupo GELED (GelMA + *Ximenia* + LED) em 30 dias.

As implicações clínicas desses resultados são significativas e podem levar a várias aplicações na prática clínica e na pesquisa futura podendo ser usada para acelerar o processo de cicatrização em fraturas ósseas, especialmente em casos de fraturas complexas ou de difícil cicatrização., em procedimentos cirúrgicos ortopédicos para promover a regeneração óssea após a remoção de tumores ósseos ou outras cirurgias de reconstrução; Pode melhorar a osseointegração de implantes dentários;

pode ser explorada para fortalecer ossos enfraquecidos devido à osteoporose, pode ajudar na recuperação de lesões ósseas causadas por acidentes automobilísticos, quedas ou outras lesões traumáticas, podem inspirar o desenvolvimento de novos biomateriais para regeneração óssea, não apenas para uso clínico, mas também para estudos de laboratório e pesquisas futuras e pode servir como base para futuros ensaios clínicos controlados.

## 6 CONCLUSÃO

Por meio dos resultados obtidos, baseado na metodologia apresentada, podemos concluir que:

O extrato do caule de *X. americana* incorporado a GelMA apresentaram resultado satisfatório, acelerando assim a reparação óssea nos primeiros 15 dias após a fratura.

Em relação a associação dos tratamentos, o grupo GELED, tratado com GelMA + *X. americana* + LED apresentou melhores resultados, em relação ao reparo e fortalecimento da região do osso lesionado em 30 dias.

Histologicamente, evidenciou-se que ambas as terapias aplicadas no estudo (associadas ou não), causaram um maior preenchimento pelo trabeculado ósseo quando comparadas com o GC (grupo controle). Em 30 dias o grupo GELED, tratado com GelMA + *X. americana* + LED e GE, tratado com GelMA + *X. americana*, apresentou tecido ósseo neoformado nitidamente mais compacto e maturação para tecido ósseo de padrão cortical.

Contudo, é correto afirmar que o extrato de *X. americana* incorporado a GelMA juntamente com a fotobiomodulação proveniente do LED é um potencializador da reparação óssea em modelo animal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACIOLE, J. M. D. S. **Avaliação da Fotobiomodulação Laser/LED em defeito ósseo no fêmur de ratas osteoporóticas**: estudo histológico, histomorfométrico e por espectroscopia Raman em modelo animal. 2014. Tese (Doutorado em Odontologia) - Centro de Odontologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

ALDANA, A. A. *et al.* Fabrication of Gelatin Methacrylate (GelMA) Scaffolds with Nano- and Micro-Topographical and Morphological Features. **Nanomaterials**, [S.l.], v. 9, n. 1, p. 120, 2019 doi: 10.3390/nano9010120. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30669422/>. Acesso em: 16 dez. 2021.

ALMEIDA, L. *et al.* Tablet of Ximenia Americana L. Developed from Mucoadhesive Polymers for Future Use in Oral Treatment of Fungal Infections. **Polymers**, [S.l.], v.11, n. 2, p. 379, fev. 2019. doi:10.3390/polym11020379. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30960363/> Acesso em: 05 out. 2021.

ALMEIDA, A. L. P. F. *et al.* The effect of low-level laser on bone healing in critical size defects treated with or without autogenous bone graft: an experimental study in rat calvaria. **Clinical oral implants research**, [S.l.], v. 25, n. 10, p. 1131-1136, 2014.

ANDREO, M. A. *et al.* Effect of Mouriri pusa extracts on experimentally induced gastric lesions in rodents: role of endogenous sulfhydryls compounds and nitric oxide in gastroprotection. **J. Ethnopharmacol.**, [S.l.], v. 107, p. 431-441, 2006.

CARDOSO, Á. B. **Estudo histomorfométrico comparativo da reparação óssea em Ratos após o uso de biomateriais de origem bovina e sintética**. 2008. Tese (Doutorado em Odontologia) - Centro de Odontologia Universidade Federal da Paraíba, 2008.

ALVES, A. M. M. *et al.* Evaluation of bone repair after application of a norbixin membrane scaffold with and without laser photobiomodulation ( $\lambda$  780 nm). **Lasers Medical in Science**, [S.l.], p.1-12, 2018.

ANTONIO, G. D.; TESSER, C. D.; MORETTI-PIRES, R O. Fitoterapia na atenção primária à saúde. **Revista de Saúde Pública**, [S.l.], v. 48, n. 3, p. 541-553, 2014.

APOLINÁRIO, J. C.; COELHO, W. M. D.; LOUZADA, M. J. Q. Análise da influência do ultrassom de baixa intensidade na região de reparo ósseo em ratos sob ausência de carga. **Fisioterapia e Pesquisa**, [S.l.], v. 18, n. 3, p. 275-279, 2011.

ARAGÃO, T. P. **Atividade gastroprotetora da casca do caule de Ximenia americana L. (ameixa de espinho) (olacaceae) em ratos**. 2019 Tese. (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Recife, Recife, 2019.

ARAÚJO, L. U. *et al.* In vivo wound healing effects of *Symphytum officinale* L. leaves extract in different topical formulations. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S.l.], v. 67, n. 4, p. 355-360, 2012.

AKKUS, O.; ADAR, F.; SCHAFFLER, M. B. Age-related changes in physicochemical properties of mineral crystals are related to impaired mechanical function of cortical bone. **Bone**, [S.l.], v. 34, n. 3, p. 443–453. 2004.

AWONUSI, A.; MORRIS, M. D; TECKLENBURG, M. M. J. Carbonate Assignment and Calibration in the Raman Spectrum of Apatite. **Calcified Tissue International**, [S.l.], v. 81, n. 1, p. 46-52, 2007.

BAKER, A. Light-emitting diode red light therapy: evidence base for aesthetic indications. **Journal Of Aesthetic Nursing**, Londres, p. 478-482, dez. 2016.

BARBOSA, D. *et al.* Laser therapy in bone repair in rats: analysis of bone optical density. **Acta Ortopédica Brasileira**, [S.l.], v. 22, n. 2, p. 71-74, 2014.

BAYAT, M. *et al.* The effects of low-level laser therapy on bone in diabetic and nondiabetic rats. **Photomedicine and laser surgery**, [S.l.], v. 27, n. 5, p. 703-708, 2009.

BAZEZEW, A. M.; EMIRE, S. A.; SISAY, M. T. Bioactive composition, free radical scavenging and fatty acid profile of *Ximenia americana* grown in Ethiopia. **Heliyon**, [S.l.], v. 7, n. 6), p. e07187,2021 doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e07187. PMID: 34141940; PMCID: PMC8187810. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34141940/>. Acesso em: 05 maio 2022.

BOSSINI, P. S. *et al.* Low-level laser therapy (830 nm) improves bone repair in osteoporotic rats: similar outcomes at two different dosages. **Experimental gerontology**, [S.l.], v. 47, n. 2, p. 136-142, 2012.

BRASIL. Resolução N° 899, de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 2003.

BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANNA, C. M. M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu - Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência & saúde coletiva**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 10, p. 2675- 2685, 2012.

BORDINI, E. A. F. *et al.* Injectable Multifunctional Drug Delivery System for Hard Tissue Regeneration under Inflammatory Microenvironments. **ACS Appl Bio Mater**, [S.l.], v. 4, n. 9, p. 6993-7006, 2021.

BUENO, J.; CRISTOFOLINI, G. M. A. F. LED terapia na faixa do vermelho ao infravermelho: uma nova abordagem sob a visão quântica para a saúde. **Revista Saúde Quântica**, Maringá, v. 3, n. 3, p.102-110, jan./dez. 2014.

BURIM R. A. *et al.* Repair of critical calvarias defects with systemic Epimedium sagittatum extract. **Journal of Craniofacial Surgery**, [S.l.], v. 27, n. 3, p. 799–804, 2016.

CALDERHEAD, R. G.; TANAKA, Y. Photobiological basics and clinical indications of phototherapy for skin rejuvenation. In: photomedicine-advances in clinical practice.



intech, 2017.

CARVALHO, M. *et al.* The Role of Hybrid Chitosan Membranes On Scarring Process Following Lumbar Surgery: Post-Laminectomy Experimental Model. **Neurological Research**, [S.l.], v. 37, n. 1, p.23-29, 2014.

CARVALHO, G. F. S. *et al.* Phytochemical study, molecular docking, genotoxicity and therapeutic efficacy of the aqueous extract of the stem bark of *Ximenia americana* L. in the treatment of experimental COPD in rats. **Journal of ethnopharmacology**, [S.l.], v. 247, 2020.

CHADHA, R.; BHANDARI, S. Drug-excipient compatibility screening: Role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. **J. Pharm. Biomed. Anal**, [S.l.], v. 87, p. 82–97, 2014.

CHAVES, T. P. *et al.* Seasonal variation in the production of secondary metabolites and antimicrobial activity of two plant species used in Brazilian traditional medicine. **African Journal of Biotechnology**, [S.l.], v. 12, n. 8, 2013.

CHEN, A. C. H. *et al.* Effects of 810-nm laser on murine bone-marrow-derived dendritic cells. **Photomedicine and laser surgery**, [S.l.], v. 29, n. 6, p. 383-389, 2011.

CHINSEMBU, K. C. Ethnobotanical Study of Plants Used in the Management of HIV/AIDS-Related Diseases in Livingstone, Southern Province, Zambia. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [S.l.], mar. 2016.

CHOW S. P. *et al.* The effect of *Davallina Orientalis* on bone healing – a preliminary report. **The American Journal of Chinese Medicine**, [S.l.], v. 10, n. 4, p.101–106, 1982.

CHUNG, S. E. V.; TOMPSON, B.; GONG, S. G. The effect of light emitting diode phototherapy on rate of orthodontic tooth movement: a split mouth, controlled clinical trial. **Journal of orthodontics**, [S.l.], v. 42, n. 4, p. 274-283, 2015.

CHUNG, S.; MILLIGAN, M.; GONG, S. G. Photobiostimulation as a modality to accelerate orthodontic tooth movement. **Seminars In Orthodontics**, [S.l.], v. 21, n. 3, p.195-202, set. 2015.

COELHO, R. C. P. *et al.* Systemic effects of LLLT on bone repair around PLLA– PGA screws in the rabbit tibia. **Lasers In Medical Science**, [S.l.], v. 29, n. 2, p.703-708, 2013.

COMUNIAN, C. R. *et al.* Photobiomodulation with LED and laser in repair of mandibular socket rabbit: clinical evaluation, histological, and histomorphometric. **Oral And Maxillofacial Surgery**, [S.l.], v. 21, n. 2, p. 201-206, 2017.

COSTA, D. R. *et al.* Effect of LED therapy on temporomandibular disorder: a case study. **Scientia Medica**, [S.l.], v. 27, n. 2, p. 25872, 2017.

CONTO, F. *et al.* Effects of low-level laser therapy on distraction osteogenesis: a histological analysis. **Revista da Faculdade de Odontologia-UPF**, [S.l.], v. 17, n. 3, 2013.

DENIZ, E. *et al.* Evaluation of light-emitting diode photobiomodulation on bone healing of rat calvarial defects. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, [S.l.], v. 29, n. 4, p.758-765, 27 abr. 2015.

DIAS, T. L. M. F. *et al.* Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of the Ethanolic Extract, of Fractions and of Epicatechin Isolated from the Stem Bark of *Ximenia americana* L. (Oleaceae). **Revista Virtual de Quimica**, [S.l.], v. 10, n. 1, p. 86-101, 2018.

DIMITRIOU, R. *et al.* Bone regeneration: current concepts and future directions. **BMC Medicine**, v. 9, n. 66, p. 2-10, 2011.

EINHORN, T. A.; GERSTENFELD, L. C. Fracture healing: mechanisms and interventions. **Nature Review Rheumatology**, [S.l.], v. 11, n. 1, p. 45–54, 2014.

EKIZER, A. *et al.* Effect of LED-mediated-photobiomodulation therapy on orthodontic tooth movement and root resorption in rats. **Lasers in medical science**, [S.l.], v. 30, n. 2, p. 779-785, 2015.

ESTAI, M. A. *et al.* Piper sarmentosum enhances fracture healing in ovariectomized osteoporotic rats: a radiological study. **Clinics**, [S.l.], v. 66, n. 5, p. 865–872, 2011.

EVORA, M. C. *et al.* Comparação de Técnicas FTIR de Transmissão, Reflexão e Fotoacústica na Análise de Poliamida-6, Reciclada e Irradiada. **Polímeros**, [S.l.], v. 12, n. 1, 2002.

FEYSSA, D. H. *et al.* Uses and management of *Ximenia americana*, Olacaceae in semi-arid East Shewa, Ethiopia. **Pakistan Journal of Botany**, v. 44, p. 1177-84, 2012.

FLORÊNCIO-SILVA, R. *et al.* Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. **BioMed research international**, [S.l.], v. 2015, 2015.

FLORENCE N. T., HUGUETTE S. T. S., HUBERT D. J. *et al.* Aqueous extract of *Peperomia pellucida* (L.) HBK accelerates fracture healing in Wistar rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, [S.l.], v. 17, n. 1, p. 188, 2017.

FONTENELE, R. P. *et al.* Fitoterapia na Atenção Básica: olhares dos gestores e profissionais da Estratégia Saúde da Família de Teresina (PI), Brasil. **Ciência & saúde coletiva**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 8, p. 2385-2394, 2013.

FONTES-PEREIRA, A. J. *et al.* Efeito do ultrassom terapêutico de baixa intensidade em fratura induzida em tíbia de ratos. **Acta Ortopédica Brasileira**, [S.l.], v. 21, n. 1, 2013.

FONSECA, D. F. S. *et al.* Swellable gelatin methacryloyl microneedles for extraction of interstitial skin fluid toward minimally invasive monitoring of urea. **Macromolecular Bioscience**, [S.l.], v. 20, n. 10, p. 2000195, 2020.

FOSSUM, T. W.; HEDLUND, C. S.; JOHNSON, A. L. **Small Animal Surgery**. 3 ed. St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier, 2007.

GAO, Q. I. N. G. *et al.* 3D printing of complex GelMA-based scaffolds with nanoclay. **Biofabrication**, [S.I.], v. 11, n. 3, 2019.

GARCIA V. G. *et al.* Effects of LLLT in combination with bisphosphonate on bone healing in critical size defects: a histological and histometric study in Rat calvaria. **Lasers Medical in Science**, [S.I.], v. 28, p. 407-414, 2013.

GIAZE T. R. *et al.* Marantodes pumilum leaves promote repair of osteoporotic fracture in postmenopausal Sprague-Dawley rats. International. **Journal of Pharmacology**, [S.I.], v. 14, n. 7), p. 973–980, 2018.

GÓMEZ-BARRENA, E. Bone fracture healing: cell therapy in delayed unions and nonunions. **Bone**, [S.I.], v. 70, n. 1, p. 93–101, 2015.

GOTO R. *et al.* Gelatin Methacryloyl-Riboflavin (GelMA-RF) Hydrogels for Bone Regeneration. **Int J Mol Sci.**, [S.I.], v. 6, n. 22, p. 1635, fev. 2021.

GU, L. I. T. *et al.* Preparation and characterization of methacrylated gelatin/bacterial cellulose composite hydrogels for cartilage tissue engineering. **Regen Biomater**, [S.I.], v. 7, n. 2, p. 195-202, mar. 2020.

HANAFIAH, O. A. *et al.* Effects of 3% binahong (*Anredera cordifolia*) leaf extract gel on alveolar bone healing in post-extraction tooth socket wound in Wistar rats (*Rattus norvegicus*). **F1000Res**, [S.I.], v. 15, n. 10, p. 923, 2021.

HEIN, S. *et al.* Chitosan composites for biomedical applications: status, challenges and perspectives. **Materials Science and Technology**, [S.I.], v. 24, p. 1053-1061, 2008.

HO, M. H. *et al.* Chitosan nanofiber scaffold improves bone healing via stimulating

trabecular bone production due to upregulation of the Runx2/osteocalcin/alkaline phosphatase signaling pathway. **International journal of nanomedicine**, [S.l.], v. 10, p. 5941, 2015.

HUANG, B. O. *et al.* "Hydrogel composite scaffolds achieve recruitment and chondrogenesis in cartilage tissue engineering applications." **Journal of nanobiotechnology**, [S.l.], v. 20, n. 25, jan. 2022.

JAFARABADI, M. R. *et al.* The effects of photobiomodulation and low-amplitude high-frequency vibration on bone healing process: a comparative study. **Lasers In Medical Science**, [S.l.], v. 31, n. 9, p.1827-1836, 2016.

JIANG, G. *et al.* A 3D-printed PRP-GelMA hydrogel promotes osteochondral regeneration through M2 macrophage polarization in a rabbit model. **Acta Biomaterialia**, [S.l.], v. 128, 2021.

JIANG, Q. *et al.* Scaffolds Combined with SW033291 for Bone Regeneration by Modulating Macrophage Polarization. **Pharmaceutics**, [S.l.], v. 13, n. 11, p.1934, 2021.

JONASSON, T. H. *et al.* Effects of low-level laser therapy and platelet concentrate on bone repair: Histological, histomorphometric, immunohistochemical, and radiographic study. **Journal Of Cranio-maxillofacial Surgery**, [S.l.], v. 45, n. 11, p.1846-1853, nov. 2017.

JUMA A. B. H. The effects of *Lepidium sativum* seeds on fracture-induced healing in rabbits. **Medscape General Medicine**, [S.l.], 2007.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**: texto, atlas. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

KARAKEÇILI, A. G.; GÜMÜŞDERELIOĞLU, M. Physico-chemical and thermodynamic aspects of fibroblastic attachment on RGDS-modified chitosan membranes. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [S.l.], v. 61, n. 2, p.216-223, 2008.

KARU, T. Mitochondrial Mechanisms of Photobiomodulation in Context of New Data About Multiple Roles of ATP. **Photomedicine and laser surgery**, [S.l.], v. 28, n. 2, p. 159–60, 2010.

KARVANDE, A. *et al.* Heartwood extract from *Dalbergia sissoo* promotes fracture healing and its application in ovariectomy-induced osteoporotic rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [S.l.], v. 69, n. 10, p. 1381–1397, 2017.

KEFELEGN, G. A.; DESTA, B. *Ximenia americana*: Economic Importance, Medicinal Value, and Current Status in Ethiopia. **ScientificWorldJournal**, [S.l.], p.8880021, 2021.

KIDO, H. W. **Ação da vitrocerâmica bioativa (biosilicato®) no processo de Reparação óssea em ratos**. 2015. Tese. (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

KOUHI, M. *et al.* Injectable gellan/lignocellulose nanofibrils hydrogels enriched with melatonin loaded forsterite nanoparticles for cartilage tissue engineering: Fabrication, characterization and cell culture studies. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.**, [S.l.], v. 115, p. 111-114, 2020.

KOLAR, P. *et al.* The Early Fracture Hematoma and Its Potential Role in Fracture Healing. **Tissue Engineering: Part B**, [S.l.], v.16, n. 4, p. 427-434, 2010.

KOLIOS, L. *et al.* Equol but not genistein improves early metaphyseal fracture healing in osteoporotic rats. **Planta Medica**, [S.l.], v. 75, n. 5, p. 459-465, 2009.

KUMAR, M. D.; JOHN, K. M. M.; KARTHIK, S. The bone fracture–healing potential of *Ormocarpum cochinchinense*, methanolic extract on albino Wistar rats. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v. 19, n. 1, p. 1-10, 2013.

KHEDGIKAR, V. *et al.* Ethanolic extract of *Dalbergia sissoo* promotes rapid regeneration of cortical bone in drill-hole defect model of rat. **Biomedicine &**

**Pharmacotherapy**, [S.l.], v. 86, p. 16–22, 2017.

KLOTZ, B. J. *et al.* Gelatin-methacryloyl hydrogels: towards biofabrication- based tissue repair. **Trends in biotechnology**, [S.l.], v. 34, n. 5, p. 394-407, 2016.

LANDE, R. G. *et al.* Comparison between a novel bovine xenoinplant and autogenous cancellous bone graft in tibial tuberosity advancement. **Veterinary Surgery**, v. 41, n. 5, p. 559-567, 2012.

LANTIGUA D. *et al.* Composite Scaffolds from Gelatin and Bone Meal Powder for Tissue **Engineering.Bioengineering**, [S.l.], v. 8, n. 11, p.169, 2021.

LEAL, S. S. *et al.* Eficácia da fonoforese com ximenia americana I. Na inflamação de tendão de ratos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, [S.l.], v. 22, n. 5, p. 355-360, 2016.

LI, X. *et al.* Guided bone regeneration at a dehiscence-type defect using chitosan/collagen membranes in dogs. **Chinese journal of stomatology**, [S.l.], v. 49, n. 4, p. 204-209, 2014.

LI, X. *et al.* Guided Bone Regeneration Using Chitosan-Collagen Membranes in Dog Dehiscence-Type Defect Model. **Journal Of Oral And Maxillofacial Surgery**, v. 72, n. 2, p.304-304, fev. 2014.

LIU, J. H. *et al.* Self-Healable Porous Polyampholyte Hydrogels with Higher Water Content as Cell Culture Scaffolds for Tissue Engineering Applications. **ACS Appl Bio Mater**, [S.l.], v. 3, n. 8, p. 5446-5453, 2020.

LIU, Y.; CHAN-PARK, M. B. Um hidrogel biomimético baseado em dextrano-enxerto-lisina metacrilado e gelatina para cultura de células musculares lisas 3D. **Biomateriais**, [S.l.], v. 31, p. 1158-1170, 2010.

LIMA, C. R. O. **Reparação de feridas cutâneas incisionais em coelhos após tratamento com barbatimão e quitosana**. 2010. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

- LIN, S. Y. *et al.* Green Tea Catechin (-)-Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) Facilitates Fracture Healing. **Biomolecules**, [S.l.], v. 10, n. 4, 2020.
- LIMA, F. A. *et al.* A fitoterapia e sua inserção no contexto da atenção básica. **Revista Saúde & Ciência Online**, [S.l.], v. 4, n. 2, p. 120-128, 2015.
- LORENTZON, M.; CUMMINGS, S. R. Osteoporosis: the evolution of a diagnosis. **Journal of internal medicine**, [S.l.], v. 277, n. 6, p. 650-661, 2015.
- LUCILANIA, M. B. A. *et al.* Bioactive compounds and antioxidant potential fruit of *Ximenia Americana* L. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 192, p. 1078-1082, 2016.
- MAIA FILHO, A. L. M. *et al.* Evaluation of inorganic and organic bone components after application of an apatite-coated Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> implants as scaffolds for bone repair. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [S.l.], v. 57, n. 3, p. 334-339, 2014.
- MAIA, C. E. G. **Análise do potencial fitoquímico de *Ximenia americana* e Capacidade antiglicante da mangiferina e dos extratos Metanólicos obtidos das folhas de café.** 2018 Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Ceará, 2018. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/31949>. Acesso em: 23 abr. 2022.
- MAIA, F. *et al.* Morphological and chemical evaluation of bone with apatite-coated Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> implants as scaffolds for bone repair. **Cerâmica**, [S.l.], v. 59, n. 352, p. 533-538, 2013.
- MAN, K. *et al.* "Controlled Release of Epigenetically-Enhanced Extracellular Vesicles from a GelMA/Nanoclay Composite Hydrogel to Promote Bone Repair." **International journal of molecular sciences**, [S.l.], v. 23, n. 2, p. 832, 2022.
- MARCU, F. *et al.* The histopathological study of osteoporosis. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, [S.l.], v. 52, n. 1, p. 321-5, 2011.
- MARSELL, R.; EINHORN, T.A. The biology of fracture healing. **Injury**, [S.l.], v. 42, n.



6, p. 551-5, 2011.

MENEZES I. R. A. *et al.* Ximenia americana L. enhances the antibiotic activity and inhibit the development of kinetoplastid parasites. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, [S.l.], v. 64, p. 40-46. 2019.

MONIK, A. K *et al.* Modulation of the erythromycin resistance in Staphylococcus aureus by ethanolic extracts of Ximenia americana L and Schinopsis brasiliensis Engl. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, [S.l.], v. 14, n. 2, 2015.

MOORE, K. L.; DALLEY, A. F. **Anatomia orientada para a clinica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

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

MORRIS, M. D.; MANDAIR, G. S. Raman Assessment of Bone Quality. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, [S.l.], v. 469, n. 8, p. 2160-2169, 2011.

MOSTAFAVINIA, A. *et al.* Evaluation of the Effects of Photobiomodulation on Bone Healing in Healthy and Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats. **Photomedicine And Laser Surgery**, [S.l.], v. 35, n. 10, p. 537-545, 2017.

MOURA JÚNIOR, M. J. *et al.* Assessing the biochemical changes of tendons of rats in an experimental model of tenotomy under therapeutic ultrasound and LEDs (625 and 945 nm) by near-infrared Raman spectroscopy. **Lasers In Medical Science**, [S.l.], v. 30, n. 6, p.1729-1738, 2015.

MUNIR, M. U. What is X-ray diffraction (XRD) pattern of Gelatin Methacrylate (GelMA). **Researchgate**, 2016. Disponível em: [https://www.researchgate.net/post/What\\_is\\_Xray\\_diffraction\\_XRD\\_pattern\\_of\\_Gelatin\\_Methacrylate\\_GelMA/57f3787e93553bee4640f021/citation/download](https://www.researchgate.net/post/What_is_Xray_diffraction_XRD_pattern_of_Gelatin_Methacrylate_GelMA/57f3787e93553bee4640f021/citation/download). Acesso em: 10 abr. 2023.

MUZZARELLI, R. A. A. Chitins and Chitosans For The Repair Of Wounded Skin, Nerve, Cartilage And Bone. **Carbohydrate Polymers**, [S.l.], v. 76, p. 167–182, 2009.

NA, S. *et al.* Análise de dose de terapia de fotobiomodulação em osteoblastos, osteoclastos e osteócitos Análise de dose de terapia de fotobiomodulação em osteoblastos, osteoclastos, e Osteócito. **J. Biomed.**, [S.l.], v. 23, 2018.

NETO PINHEIRO, V. F. *et al.* Chenopodium Ambrosioides in the repair of fractures in rabbits. **International Journal of Pharmacology**, [S.l.], v. 11, p. 732–737, 2015.

NICHOL, J. W. *et al.* Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. **Biomaterials**, [S.l.], v. 31, p. 5536-5544, 2010.

NGUEGUIM, F. T. *et al.* Ethanol extract of Peperomia pellucida (Piperaceae) promotes fracture healing by an anabolic effect on osteoblasts. **Journal of ethnopharmacology**, [S.l.], v. 148, n. 1, p. 62-68, 2013.

OLIVEIRA, P. *et al.* Comparação dos efeitos do laser de baixa potência e do ultrassom de baixa intensidade no processo de reparo ósseo em tíbia de rato. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, [S.l.], v. 15, n. 3, 2011.

OLIVEIRA, P. *et al.* Comparação dos efeitos do laser de baixa potência e do ultrassom de baixa intensidade associado ao biosilicato® no processo de reparo ósseo em tíbias de ratos. **Revista Brasileira de Ortopedia**, [S.l.], v. 47, n. 1, p. 102-107, 2012.

ORYAN, A.; SAHVIEH, S. Effectiveness of Chitosan Scaffold In Skin, Bone And Cartilage Healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.l.], v. 104, p.1003-1011, nov. 2017.

OKHALE, S. E.; NNACHOR, A. C.; BASSE, U. Avaliação de HPLC-DAD e características antiproliferativas da infusão foliar de Ximenia americana Linn.

**MicroMedicina**, [S.l.], v. 5, p. 45-52, 2017.

PAL, S. *et al.* Extract and fraction of *Cassia occidentalis* L. (a synonym of *Senna occidentalis*) have osteogenic effect and prevent glucocorticoid-induced osteopenia.

**Second life**, [S.l.], v. 235, p. 8-18, 2019.

PALMA, A. F. M. *et al.* Avaliação dos Extratos Hidroalcoólicos do Caule e Folhas da *Ximenia americana* L. na Cicatrização de Feridas Excisionais Aguda em Pele de Camundongos. **Rev. Virtual Quim.**, [S.l.], v. 12, n. 1, p 37-50, 2020.

PARK, K. R. *et al.* Calycosin-7-O- $\beta$ -Glucoside Isolated from *Astragalus membranaceus* Promotes Osteogenesis and Mineralization in Human Mesenchymal Stem Cells. **Int J Mol Sci.**, [S.l.], v. 22, n. 21, p. 11362, 2021.

PATROCÍNIO-SILVA, T. L. *et al.* Low-level laser therapy associated to a resistance training protocol on bone tissue in diabetic rats. **Archives of endocrinology and metabolism**, [S.l.], v. 60, n. 5, p. 457-464, 2016.

PENG, L. *et al.* A rapid and sensitive UPLC-MS/MS method for quantification of two caffeoylquinic acids and four main active components in rat plasma after an intravenous administration of Qingkailing injection and its application to a pharmacokinetic study. **Biomedical Chromatography**, [S.l.], v. 28, n. 5, p. 601-609, 2014.

PENTEADO, L. A. M. *et al.* Evaluation of bioactive glass and platelet-rich plasma for bone healing in rabbit calvarial defects. **Journal of oral science**, [S.l.], v. 55, n. 3, p. 225-232, 2013.

PESSOA, D. R. *et al.* Effects of low-level laser therapy in an experimental model of tendinopathy in rats: literature review. **Revista Univap**, [S.l.], v. 23, n. 43, p. 102-112, 2017.

PINHEIRO, A. L. B. *et al.* Effects of LED phototherapy on bone defects grafted with MTA, bone morphogenetic proteins and guided bone regeneration: a Raman

spectroscopic study. **Lasers in Medical Science**, [S.l.], v. 27, n. 5, p. 903-16, 2012.

PINHEIRO, A. L. B. *et al.* The efficacy of the use of IR laser phototherapy associated to biphasic ceramic graft and guided bone regeneration on surgical fractures treated with miniplates: a Raman spectral study on rabbits. **Lasers in Medical Science**, [S.l.], v. 28, n. 2, p. 513–518, 2013.

PINHEIRO, A. L. B.; BRUGNERA JÚNIOR, A.; ZANIN, F. A. A. **Aplicação do laser na odontologia**. São Paulo: Santos, 2010.

PINHEIRO, A. L. B. *et al.* The use of photobiomodulation therapy or LED and mineral trioxide aggregate improves the repair of complete tibial fractures treated with wire osteosynthesis in rodents. **Lasers in Medical Science**, [S.l.], 2020.

PINTO, K. N. Z. *et al.* Effects of Biosilicate® scaffolds and low-level laser therapy on the process of bone healing. **Photomedicine and laser surgery**, [S.l.], v. 31, n. 6, p. 252-260, 2013.

PRENTICE, W. E. **Fisioterapia na prática esportiva uma abordagem baseada em competências**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

PRIANTI, B. M. *et al.* Evaluation of the therapeutic effects of led ( $\lambda 627\pm 10$  nm) on the initial phase of ankle sprain treatment: a randomised placebo-controlled clinical trial. **Lasers in Medical Science**, [S.l.], p. 1-8, 2018.

POMINI, K. T. *et al.* Use of Photobiomodulation Combined with Fibrin Sealant and Bone Substitute Improving the Bone Repair of Critical Defects. **Polymers**, [S.l.], v. 4, n. 14, p. 4170, 2022.

PU, X. *et al.* Bioinspired Hydrogel Anchoring 3DP GelMA/HAp Scaffolds Accelerates Bone Reconstruction. **ACS Appl Mater Interfaces**, [S.l.], v. 11, n. 14, n. 18, p. 20591-2002, 2022.

PUTS, R. *et al.* A Focused Low-Intensity Pulsed Ultrasound (FLIPUS) System for Cell Stimulation: Physical and Biological Proof of Principle. **Ieee Transactions On Ultrasonics, Ferroelectrics, And Frequency Control**, [S.I.], v. 63, n. 1, p.91-100, jan. 2016.

RADEV, L. *et al.* Organic/Inorganic bioactive materials Part III: in vitro bioactivity of gelatin/silicocarnotite hybrids. **Central European Journal of Chemistry**, [S.I.], v. 7, p. 721-730, 2009.

RAJABI, N. *et al.* Recent Advances on Bioprinted Gelatin Methacrylate-Based Hydrogels for Tissue Repair. **Tissue Eng Part A**, [S.I.], v. 27, n. 11-12, p. 679-702, 2021.

RAHALI, K. *et al.* Synthesis and characterization of nanofunctionalized gelatin methacrylate hydrogels. **International journal of molecular sciences**, [S.I.], v. 18, n. 12, p. 2675, 2017.

RATNER, B. D. *et al.* **Biomaterials science**: An introduction to materials in medicine. 3. ed. Oxford: Elsevier, 2013.

REIS, C. H. B. *et al.* Effects of a Biocomplex Formed by Two Scaffold Biomaterials, Hydroxyapatite/Tricalcium Phosphate Ceramic and Fibrin Biopolymer, with Photobiomodulation, on Bone Repair. **Polymers**, v. 14, n. 10, 2022.

ROCHA, R. *et al.* Fluorescence and Reflectance Spectroscopy for Identification of Atherosclerosis in Human Carotid Arteries Using Principal Components Analysis. **Photomedicine and Laser Surgery**, [S.I.], 26, n. 4, p. 329-335, 2008.

RODRIGUES JUNIOR, F. A. *et al.* Efeitos do extrato da *Ximenia americana* L. associado a corticoide e exercício no tratamento de doença pulmonar obstrutiva crônica induzida em *Rattus norvegicus*. **Research, Society and Development**, [S.I.], v. 10, n. 11, e202101119500, 2021.

ROZEN, N *et al.* Role of bone regeneration and turnover modulators in control of fracture. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, [S.l.], v. 17, n. 3, p. 197-213, 2007.

RUEDINGER, F. *et al.* Hydrogels for 3D mammalian cell culture: a starting guide for laboratory practice. **Applied microbiology and biotechnology**, [S.l.], v. 99, n. 2, p. 623-636, 2015.

SANTANA, C. P. **Caracterização de Extratos nebulizados de plantas medicinais medicinais por técnicas analíticas**. 2014. Tese.(Doutorado em Farmácia) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual de Campina Grande, Campina Grande, 2014.

SANTANA, C. P. *et al.* Dissolution and uniformity of content of tablets developed with extract of *Ximenia americana* L. **PLoS ONE**, v. 13, 2018.

SANTANA, C. P. *et al.* Compatibility study of dry extract of *Ximenia americana* L. and pharmaceutical excipients used in solid state. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, [S.l.], v. 133, n.1, p. 603-617, 2017.

SANTOS, S. A. *et al.* Photobiomodulation therapy associated with treadmill training in the oxidative stress in a collagen-induced arthritis model. **Lasers In Medical Science**, [S.l.], v. 32, n. 5, p.1071-1079, 21 abr. 2017.

SARINHO, E. S. C.; MELO, V. M. P. P. Glucocorticoid-induced bone disease: mechanisms and importance in pediatric practice. **Revista Paulista de Pediatria**, [S.l.], v. 35, n. 2, p. 207-215, 2017.

SCHROEDER, J. E.; MOSHEIFF, R. Tissue engineering approaches for bone repair: concepts and evidence. **Injury**, [S.l.], v. 42, n. 6, p. 609-13. 2011.

SELLA, V. R. G. *et al.* Effect of low-level laser therapy on bone repair: a randomized controlled experimental study. **Lasers In Medical Science**, [S.l.], v. 30, n. 3, p. 1061-1068, 2015.

SELVAKUMAR, M. *et al.* Excavating the role of Aloe Vera wrapped mesoporous hydroxyapatite frame ornamentation in newly architected polyurethane scaffolds for osteogenesis and guided bone regeneration with microbial protection. **ACS Applied Materials & Interfaces**, [S.I.], v. 8, n. 9, p. 5941-5960, 2016.

SICCO, C.; TASSO, R. Harnessing Endogenous Cellular Mechanisms for Bone Repair. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [S.I.], v. 5, p. 52, 2017.

SILVA, B. A. F. *et al.* HPLC profile and anti-inflammatory activity of *Ximenia americana* L. (Olacaceae) in mice models of skin inflammation. **Food and Chemical Toxicology**, [S.I.], v. 119, p. 199-205, 2018.

SILVA, J. M. *et al.* Tailored Freestanding Multilayered Membranes based on Chitosan and Alginate. **Biomacromolecules**, [S.I.], v. 15, n. 10, p. 3817-3826, 2014.

SALVI, D. T. B. *et al.* Preparation, thermal characterization, and DFT study of the bacterial cellulose. **J Therm Anal Calorim**, [S.I.], v. 118, p. 205–15, 2014.

SILVA-LEITE, K. E. S. *et al.* *Ximenia americana* heteropolysaccharides ameliorate inflammation and visceral hypernociception in murine caerulein-induced acute pancreatitis: Involvement of CB2 receptors. **Biomed Pharmacother**, [S.I.], v. 106, p. 1317-1324, 2018.

SILVA-LEITE, K. E. S. *et al.* Polysaccharide rich fractions from barks of *Ximenia americana* inhibit peripheral inflammatory nociception in mice: Antinociceptive effect of *Ximenia americana* polysaccharide rich fractions. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.I.], v. 27, n. 3, p. 339-345, 2017.

SILVA, M. S. P. *et al.* Study bioprospecting of medicinal plant extracts of the semiarid northeast: contribution to the control of oral microorganisms. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [S.I.], v. 2012, 2012.

SILVEIRA, F. R. **Comparação da utilização exclusiva de osso esponjoso autólogo com a utilização mista de osso esponjoso autólogo e fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) na cicatrização do espaço criado pela osteotomia realizada na técnica de tibial tuberosity advancement (TTA).** 2013. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2013.

SOARES, L. G. P. *et al.* Raman study of the repair of surgical bone defects grafted with biphasic synthetic microgranular HA+  $\beta$ -calcium triphosphate and irradiated ornot with  $\lambda$ 780 nm laser. **Lasers in Medical Science**, [S.l.], v. 29, n. 5, p. 1539-1550, 2014.

SOUZA, C. M. P. *et al.* Utilização de plantas medicinais medicinais com atividade antimicrobiana por usuários do serviço público de saúde em Campina Grande - Paraíba. **Revista Brasileira de Plantas medicinais Mediciniais**, [S.l.], v. 15, n. 2, p. 188-193, 2013.

SOUZA, J. C. *et al.* Mast cell concentration and skin wound contraction in rats treated with *Ximenia americana* L. **Acta Cirurgica Brasileira**, [S.l.], v. 32, n. 2, 2017.

SOUZA NETO JÚNIOR, J. C. *et al.* Pomada de *Ximenes americana* promove aceleração da cicatrização de feridas em ratos. **Acta Cir Bras.**, [S.l.], v. 34, n. 3, mar. 2019.

SUN, X. I. N. *et al.* “Three-dimensional bioprinting of multicell-laden scaffolds containing bone morphogenic protein-4 for promoting M2 macrophage polarization and accelerating bone defect repair in diabetes mellitus.” **Bioactive materials**, [S.l.], v. 6, n. 3, p. 757-769, 2020.

SPENCER, J. P. E. *et al.* Epicatechin and its in vivo metabolite, 3-O-methyl epicatechin, protect human fibroblasts from oxidative-stress-induced cell death involving caspase-3 activation. **Biochemical Journal**, [S.l.], v. 35, n. 3, p. 493–500, 2001.



TIM, C. R. *et al.* Low-level laser therapy enhances the expression of osteogenic factors during bone repair in rats. **Lasers in Medical Science**, [S.l.], v. 29, n. 1, p. 147- 156, 2014.

TOZETTO, A.; DEMIATE, I. M.; NAGATA, N. Análise exploratória de adoçantes de mesa via espectroscopia no infravermelho (FTIR) e análise por componentes principais (ACP). **Food Science and Technology**, [S.l.], v. 27, n. 4, 2007.

TRUJILLO, H. A. G. *et al.* Ossificação endocondral em embriões e fetos de bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S.l.], v. 63, n. 4, p. 799-804, 2011.

UCHÔA, V. T. *et al.* Capacidade de eliminação de radicais livres de extratos de casca e folhas do caule de *Ximenia americana* L. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, [S.l.], v. 6, n. 1, p. 91-096, 2016.

VASCONCELOS, J. W. *et al.* Avaliação da sinvastatina no processo de consolidação de fraturas em tíbias de ratos. **Revista Brasileira de Ortopedia**, [S.l.], v. 48, n. 2, p.191-195, 2013.

VELASCO-RODRIGUEZ, B. *et al.* Hybrid Methacrylated Gelatin and Hyaluronic Acid Hydrogel Scaffolds. Preparation and Systematic Characterization for Prospective Tissue Engineering Applications. **Int JMol Sci.**, [S.l.], v. 22, n. 13, p. 6758, 2021.

VINAGRE, N. P. L. *et al.* Efetividade clínica de um enxaguatório bucal fitoterápico com tintura padronizada de *Calendula officinalis* na manutenção da saúde periodontal. **Revista de Odontologia da UNESP**, [S.l.], v. 40, n. 1, p. 30-5, 2011.

WAN OSMAN, W. N. *et al.* Epicatechin and scopoletin rich *Morinda citrifolia* (Noni) leaf extract supplementation, mitigated Osteoarthritis via anti-inflammatory, anti-oxidative, and anti-protease pathways. **Journal of Food Biochemistry**, [S.l.], 2019.

YUE, K. *et al.* Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. **Biomaterials**, [S.l.], v. 73, p. 254-271, 2015.

ZAMARIAN, T. P. **Avaliação do processo de reparo em falhas ósseas induzidas em tibias de coelhos tratados com decanoato de nandrolona.** 2014, 61 f.

Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná, Palotina, 2014.

ZARBIN, A. Química de (nano) materiais. **Química Nova**, [S.l.], v. 30, n. 6, p. 1469-1479, 2007.

ZUO Y. *et al.* Gelatina metacrilada fotocruzável e hidrogel híbrido de hidroxiapatita para engenharia modular de osteon biomimético. **Interfaces do aplicativo ACS**, [S.l.], 2015.