



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

NÁTALY DOMINGUES ALMEIDA

**VIDRO BIOATIVO ASSOCIADO COM POLÍMERO E
FUNCIONALIZADO COM FIBRA DE CARBONO:
desenvolvimento e interações biológicas *in vitro* e *in vivo***

NÁTALY DOMINGUES ALMEIDA

**VIDRO BIOATIVO ASSOCIADO COM POLÍMERO E FUNCIONALIZADO COM
FIBRA DE CARBONO: desenvolvimento e interações biológicas *in vitro* e *in vivo***

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE BUCAL.

Área: Periodontia Linha de pesquisa: Desenvolvimento de biomateriais em saúde bucal.

Orientadora: Profa. Assoc. Andrea Carvalho De Marco
Coorientadora: Prof. Dr. Camilla Magnoni Moretto Nunes

São José dos Campos

2024

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2024]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Almeida, Nátaly Domingues

Vidro bioativo associado com polímero e funcionalizado com fibra de carbono: desenvolvimento e interações biológicas in vitro e in vivo / Nátaly Domingues Almeida. - São José dos Campos : [s.n.], 2024.
85 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2024.

Orientador: Andrea Carvalho De Marco

Coorientador: Camilla Magnoni Moretto Nunes

1. Engenharia Tecidual. 2. Materiais Biocompatíveis. 3. Osteogênese. I. De Marco , Andrea Carvalho, orient. II. Nunes, Camilla Magnoni Moretto, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - UNESP. V. Universidade Estadual Paulista (UNESP). VI. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

A proposta de desenvolver a aplicação deste material vitrocerâmico visa não apenas proporcionar uma resposta biológica aprimorada, mas também garantir um menor prazo e custo no processo de regeneração óssea. Dessa forma, os vidros bioativos recombinados solucionam o problema da ausência de tecido ósseo em regiões que necessitam de reabilitação na área biomédica, incorporando novos componentes que aumentam a bioatividade do material. A inovação no processo de produção e na incorporação de novos materiais com propriedades sinérgicas oferecem vantagens em relação aos métodos tradicionais de fundição, permitindo a incorporação de novos componentes em menores temperaturas de queima (fusão). Além disso, esses materiais possuem estabilidade química, mecânica e biocompatibilidade. Essa abordagem não só reduz os custos de produção como também remove a dependência de materiais importados, influenciando positivamente a comercialização nacional. Nesta pesquisa, a produção dos novos materiais foi avaliada por meio de análises *in vivo* e *in vitro*, contribuindo para futuras investigações e avanços no campo da engenharia de tecido ósseos.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

The proposal to develop the application of this glass-ceramic material aims not only to provide an improved biological response but also to guarantee a shorter time and reduced cost in the bone regeneration process. Recombined bioactive glasses address the issue of absent bone tissue in regions requiring rehabilitation in the biomedical field by incorporating new components that enhance the material's bioactivity. Innovation in the production process and the incorporation of new materials with synergistic properties offer advantages over traditional casting methods, allowing the incorporation of new components at lower melting temperatures. Furthermore, these materials possess chemical and mechanical stability as well as biocompatibility. This approach not only reduces production costs but also eliminates dependence on imported materials, positively influencing national sales. In this research, the production of new materials was evaluated through *in vivo* and *in vitro* analyses, contributing to future investigations and advancements in the field of bone tissue engineering.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Assoc. Andrea Carvalho De Marco (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

São José dos Campos

Prof. Assoc. Rodrigo França

University of Manitoba

Faculty of Health Science

Winnipeg

Prof^a. Titular. Maria Aparecida Neves Jardim

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

São José dos Campos

São José dos Campos, 23 de agosto de 2024.

DEDICATÓRIA

*Este trabalho é uma homenagem à minha amada e doce **Noely Alves da Conceição** (in memoriam), cuja sua lembrança permanece viva em meu coração. Seu amor e cuidados durante minha infância foram fundamentais para eu tornar quem sou hoje.*

AGRADECIMENTOS

A Deus e à Nossa Senhora do Perpétuo Socorro por protegerem e guiarem minhas escolhas.

À Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, na pessoa do diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Prof. Dr. Cesar Rogério Pucci e da vice-diretora Prof^a. Dra. Symone Cristina Teixeira.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde - CASB, na pessoa do coordenador Prof. Titular Alexandre Luiz Souto.

Aos meus pais, Lindobergue e Rosangela, que nunca mediram esforços para me proporcionar uma educação de qualidade e por todos os valores e ensinamentos. O amor e apoio de vocês me proporcionaram as oportunidades que hoje enriquecem minha vida. Obrigada por estarem sempre ao meu lado; o incentivo de vocês me transmite segurança para enfrentar os desafios da vida.

Ao meu irmão, Milton, e à minha cunhada Letícia, que valorizam e vibram com todas as minhas escolhas, por sempre acreditar em mim e me incentivarem a seguir meus sonhos.

À minha sobrinha, Luiza que é meu maior combustível para me tornar uma pessoa melhor a cada dia, ela me motiva a crescer e evoluir.

Ao meu namorado, Renan, por sua infinita paciência, dedicação e amor. Obrigada por ser o meu maior incentivador e apoiador em todos os meus projetos e escolhas, por não medir esforços para estar sempre ao meu lado.

À minha orientadora, Prof^a. Assoc. Andrea Carvalho De Marco, por confiar em mim e me encorajar a ser uma profissional melhor. Sua dedicação ao meu crescimento profissional e pessoal é inestimável.

À minha coorientadora, Prof^a. Dra. Camila Magnoni Moretto Nunes pela amizade, dedicação e valiosos ensinamentos.

Ao Prof. Assoc. Rodrigo França, expresso minha profunda gratidão por ter depositada confiança em meu projeto e por ter contribuído de forma essencial na realização de um sonho. Agradeço o suporte à minha formação e por me acolher em seu laboratório. Minha gratidão também pelo aceite em compor a banca de defesa.

À Prof. Titular Maria Aparecida Neves Jardim, pelo aceite na banca de defesa, contribuindo para a minha formação.

À Prof^a. Titular Luana Marotta Reis de Vasconcellos, pela parceria, incentivo e por estar sempre à disposição e contribuir com esta pesquisa.

À Resix Ivent Indústria Química Ltda., pela colaboração e suporte durante o desenvolvimento desse estudo.

Aos funcionários e técnicos do Instituto de Ciência e Tecnologia da Unesp – Campus São José dos Campos, por toda atenção e ajuda.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa de Mestrado no período de 01/09/2022 a 28/02/2023 (88887.704724/2022-00).

À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP), pela concessão das bolsas de Iniciação Científica para Luiz Augusto Rodrigues dos Santos

(2023/01639-7) e Bruna Gonçalves Da Silva (2023/03668-4), e aos alunos que participaram ativamente deste trabalho.

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica - PIBIC, pela concessão da bolsa para Rebeca Nogueira Gomes de Oliveira (8147) e Tainá Amorim Ono (10579).

Ao Emerging Leaders in the Americas Program - ELAP, pela concessão da bolsa e pela oportunidade inestimável de participar deste programa. A experiência foi enriquecedora e desempenhou um papel crucial no meu desenvolvimento acadêmico e pessoal.

Aos meus queridos amigos da pós-graduação: Juliani, Letícia, Clarissa, Eduardo, Luiz e Bruna. Obrigada pelo companheirismo, dedicação e auxílio; vocês foram fundamentais nessa minha jornada, tornando cada desafio mais leve.

À minha amiga, Karina, que foi meu ombro amigo nos momentos de saudade durante o meu intercâmbio. Você trouxe luz para os dias cinzas, me guiando e trazendo alegria quando tudo era incerto. Sou muito grata por ter vivido essa experiência ao seu lado.

À minha amiga, Camila, que foi meu suporte e esteve ao meu lado durante o intercâmbio. Agradeço por me ajudar a me adaptar a uma nova cultura e por tornar essa experiência ainda mais especial.

As minhas amigas, Larissa, Rafaela e Caroline, que mesmo de longe se fazem presente, vibrando e torcendo pelas minhas conquistas.

Aos animais que participaram dessa pesquisa, que foi conduzida com ética, preservando ao máximo pelo seu bem-estar.

" *Onde há um desejo, há um caminho*". Albert Einstein

RESUMO

Almeida ND. Vidro bioativo associado com polímero e funcionalizado com fibra de carbono: desenvolvimento e interações biológicas *in vitro* e *in vivo* [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2024.

Devido as limitações obtenção de um enxerto autógeno, biomateriais sintéticos aloplásticos vem sendo desenvolvidos para promover regeneração óssea. O biovidro 45S5 Bioglass® é amplamente utilizado em tratamentos de defeitos ósseos, mas possui um alto custo no Brasil. Com intuito de melhorar as propriedades do vidro bioativo, polímeros e outros íons são frequentemente adicionados. O objetivo deste estudo foi analisar a caracterização do biomaterial e suas interações *in vitro* e *in vivo* para avaliar seu potencial como enxerto ósseo sintético. Para isso, foram obtidos dois grupos experimentais: vidro bioativo funcionalizado com polímero (B+P) e vidro bioativo funcionalizado com polímero associado com fibra de carbono (B+P+F). A síntese de todos os vidros foi realizada por meio de fusão, seguida da caracterização. Suas propriedades morfológicas e químicas foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura/MEV, espectroscopia de energia dispersiva/EDS e espectroscopia de fotoelétrons de raio-X de ultra-eixo de Kratos (XPS). Os biomateriais foram submetidos aos testes *in vitro* e *in vivo*. Para o estudo *in vitro*, foram obtidas células da medula óssea dos fêmures de ratos, as quais foram isoladas e plaqueadas com os biomateriais para avaliação da citotoxicidade, conteúdo de proteína total (PT) e atividade de fosfatase alcalina (ALP). No estudo *in vivo*, foi avaliada a resposta inflamatória nos períodos de 7 e 14 dias. Para isso, os materiais foram implantados no tecido subcutâneo de 42 ratos Wistar, divididos em 3 grupos experimentais (n=7), Grupo Sham: Ferida cirúrgica sem inserção de biomaterial (zona de pseudo operação); grupo B+P e grupo B+P+F. A toxicidade foi avaliada em órgãos como: coração, baço, fígado e rim. A avaliação da reparação óssea foi realizada em 36 ratos Wistar, nos períodos de 15 e 60 dias, divididos em 3 grupos (n=6), C, B+P e B+P+F, os quais foram submetidos à confecção de um defeito ósseo críticos de 3 mm, nas tíbias direita e esquerda. Após a eutanásia, as peças foram submetidas às análises histológica, histomorfométrica e MicroCT. Os dados obtidos foram estatisticamente analisados pelo teste ANOVA um ou dois fatores, seguindo pelo teste de Tukey e teste T, com nível de significância adotado de 5%. A caracterização por MEV confirmou a incorporação de fibras de carbono ao vidro bioativo, além disso por meio da análise química XPS, foi possível observar os picos de selênio e de bório. Na análise *in vitro* observou que os grupos experimentais não foram citotóxicos, proporcionando um ambiente adequado para a atividade e diferenciação celular. No teste de conteúdo de proteína total o grupo B+P demonstrou alta atividade celular, entretanto os materiais experimentais não influenciaram a atividade de fosfatase alcalina. Na análise *in vivo*, não foram observadas alterações dos aspectos de normalidade nos órgãos, indicando que não houve sinais de toxicidade sistêmica aguda. Na análise histológica descritiva, todos os grupos em ambos os períodos demonstraram neoformação óssea na região do defeito crítico em 60 dias. Na micro-CT a análise estatística de comparações intergrupos demonstrou diferença estatística

no parâmetro de superfície óssea/volume ósseo (*bs.bv*). Na análise histomorfométrica, os grupos não apresentaram diferença estatística. Conclui-se que o biomaterial é osteoindutor, porém novos estudos devem ser realizados para elucidar sua resistência mecânica e aperfeiçoar o processo de síntese do biomaterial.

Palavras-chave: Engenharia Tecidual; Materiais Biocompatíveis; Osteogênese.

ABSTRACT

Almeida ND. Bioactive glass associated with Polymer and functionalized with carbon fiber: development and biological interactions in vitro and in vivo [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2023.

Due to the limitations of obtaining autogenous grafts, synthetic alloplastic biomaterials have been developed to promote bone regeneration. Bioglass® 45S5 is widely used in the treatment of bone defects, though it is costly in Brazil. To enhance the properties of bioactive glass, polymers and other ions are often added. This study aimed to analyze the characterization of the biomaterial and its interactions in vitro and in vivo to assess its potential as a synthetic bone graft. Two experimental groups were created: bioactive glass functionalized with polymer (B+P) and bioactive glass functionalized with polymer and carbon fiber (B+P+F). All glasses were synthesized by melting, followed by characterization. Their morphological and chemical properties were assessed using scanning electron microscopy (SEM), energy-dispersive spectroscopy (EDS), and Kratos ultra-axis X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). The biomaterials were tested in vitro and in vivo. For the in vitro study, bone marrow cells from rat femurs were obtained, isolated, and plated with the biomaterials to assess cytotoxicity, total protein (TP) content, and alkaline phosphatase (ALP) activity. In the in vivo study, the inflammatory response was evaluated at 7 and 14 days by implanting the materials in the subcutaneous tissue of 42 Wistar rats, divided into 3 experimental groups (n=7): Sham group (surgical wound without insertion of biomaterial), B+P group, and B+P+F group. Toxicity was assessed in organs such as the heart, spleen, liver, and kidney. Bone repair was evaluated in 36 Wistar rats, divided into 3 groups (n=6): C, B+P, and B+P+F, which underwent the creation of a 3 mm critical bone defect in the right and left tibias. After euthanasia, the specimens were subjected to histological, histomorphometric, and MicroCT analysis. The data obtained were statistically analyzed using one- or two-factor ANOVA, followed by Tukey and T-tests, with a significance level of 5%. SEM characterization confirmed the incorporation of carbon fibers into the bioactive glass, and XPS chemical analysis revealed peaks for selenium and boron. In vitro analysis showed that the experimental groups were not cytotoxic, providing a suitable environment for cell activity and differentiation. In the total protein content test, the B+P group showed high cellular activity, though the experimental materials did not influence alkaline phosphatase activity. In the in vivo analysis, no alterations in the normal appearance of the organs were observed, indicating no signs of acute systemic toxicity. Descriptive histological analysis showed bone neoformation in the critical defect region in all groups after 60 days. In the micro-CT analysis, intergroup comparisons showed a statistically significant difference in the bone surface/bone volume parameter (bs.bv). However, histomorphometric analysis revealed no statistical differences between the groups. It is concluded that the biomaterial is osteoinductive, but further studies are necessary to elucidate its mechanical strength and improve the biomaterial synthesis process.

Keywords: Biocompatible Materials; Tissue Engineering; Bone Regeneration.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
3 PROPOSIÇÃO	22
4 MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Biomaterial.....	23
4.1.1 Preparação do vidro bioativo associado com polímero e fibra de carbono	23
4.2 Caracterização do material	23
4.2.1 Microestrutura e topografia por Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV	23
4.2.2 Espectroscopia de energia dispersiva de raio x (EDS)	25
4.2.3 Composição química da superfície por espectroscopia de fotoelétrons de raio-X de ultra-eixo de Kratos (XPS)	25
4.3 Aspectos éticos e diretrizes experimentais	26
4.4 Ensaios biológicos in vitro	27
4.4.1 Cultura celular	28
4.4.2 Determinação da viabilidade celular (citotoxicidade)	32
4.4.3 Conteúdo de proteína total	33
4.4.4 Atividade de fosfatase alcalina.....	33
4.5 Modelo experimental <i>in vivo</i>	34
4.5.1 Desenho do estudo dos ensaios <i>in vivo</i> para avaliação da toxicidade sistêmica.....	34
4.5.2 Procedimento cirúrgico para a implantação dos corpos de prova no tecido subcutâneo	35
4.5.3 Análise histológica para avaliação da toxicidade nos órgãos	36
4.5.4 Desenho do estudo dos ensaios <i>in vivo</i> para avaliação da reparação óssea	37
4.5.5 Cálculo amostral análise de reparação óssea	37
4.5.6 Procedimento cirúrgico para implantação dos corpos de prova no defeito ósseo	38
4.5.7 Processamento histológico	39

4.5.8 Avaliação por microtomografia computadorizada tridimensional (microCT)	40
4.5.9 Análise histomorfométrica	41
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
6 RESULTADO	43
6.1.1 Microestrutura e topografia por Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV	43
6.1.2 Espectroscopia de energia dispersiva de raio x (EDS)	44
6.1.3 Composição química da superfície por espectroscopia de fotoelétrons por raio-X (XPS).....	46
6.2 Análise <i>in vitro</i>	48
6.2.1 Determinação da viabilidade celular (citotoxicidade)	48
6.2.2 Conteúdo de proteína total	49
6.2.3 Atividade de fosfatase alcalina	50
6.3 Análise <i>in vivo</i>	52
6.3.1 Avaliação histológica dos órgãos	52
6.3.2 Análise da reparação óssea	55
6.3.3 Avaliação por microtomografia computadorizada tridimensional (microCT)	58
6.3.4 Análise histomorfométrica	67
7 DISCUSSÃO	68
8 CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS	74
APÊNDICE A	82
ANEXO A	83
ANEXO B	84

1 INTRODUÇÃO

Existe uma diversidade de enxertos com a capacidade de induzir a reparação óssea, e eles são divididos em enxertos aloplásticos, enxertos autógenos, aloenxertos e xenoenxertos. Contudo, eles devem apresentar algumas propriedades para a realização de uma enxertia óssea apropriada (Sheikh et al., 2017). Dessa forma, o uso de enxertos autógenos se mantém como padrão-ouro (Rather et al., 2019). No entanto, a necessidade de um segundo sítio cirúrgico e a insuficiência de enxerto autógeno (Ge et al., 2018) são desvantagens que impulsionam busca por novos biomateriais na medicina regenerativa.

Os aloenxertos são extraídos de membros da mesma espécie, mas geneticamente diferentes. Contudo, esses enxertos apresentam riscos de contaminação dos tecidos e transmissão de doenças com novos patógenos (Sheikh et al., 2017). Os xenoenxertos são enxertos obtidos de animais, o mais comumente utilizado na regeneração periodontal é o mineral desproteínizado de osso bovino (Bio-Oss®) (Sheikh et al., 2017). Embora processos térmicos e químicos sejam aplicados, eles não são suficientes para eliminar completamente o risco de doenças como espongiforme bovino e encefalopatia, além de ocorrer a rejeição do enxerto (Wenz et al., 2001). Isso ocorre porque os xenoenxertos ativam a imunidade do hospedeiro, expressando xenoantígenos imunogênicos que fornecem alvos para o reconhecimento a rejeição imunes (Yang et al., 2010).

Assim, os biomateriais sintéticos aloplásticos foram desenvolvidos para suprir essas desvantagens (Sheikh et al., 2017). Eles são utilizados para tratamento de infecções, regeneração óssea e funções biológicas (Hoppe et al., 2016). Para um biomaterial ser considerado ideal, algumas características são essenciais: ser inerte para prevenir reações ou infecções no corpo quando implantado, não ser tóxico, ser facilmente moldado durante a operação e não precisar de tempo cirúrgico adicional (Cannio et al., 2021).

Entre esses biomateriais, destacam-se os vidros bioativos, que possuem propriedades biocompatíveis e bioativas (Jones et al., 2015). Esses materiais apresentam características favoráveis à formação óssea, propriedades antibacterianas e promovem a regeneração de tecidos moles e cicatrização de feridas

(Islam et al., 2017; Bairo et al., 2016). Além disso, demonstram funções osteoindutoras e osteocondutoras por meio do estabelecimento da hidroxiapatita carbonatada com o osso (Abbasi Z et al., 2016; Hench, 1972). Dessa forma, são empregues como material de preenchimento ósseo na ortopedia e na odontologia (Lizzi et al., 2017).

Diversas formas de vidros bioativos foram desenvolvidas, cada uma com composição e apresentações distintas. Eles podem ser disponibilizados em formato sólido, pó ou em compósitos, e sua composição pode influenciar o tempo de dissolução e a liberação dos íons. O biovidro de silicato padrão 45S5 Bioglass®, desenvolvido por Larry Hench em 1969, foi o primeiro biovidro a ser gerado (Hench et al., 2015). Este material é amplamente utilizado no tratamento de defeitos ósseos periodontais. De acordo com Pereira et al., (2017), quando utilizado como material de enxerto durante o desbridamento em cirurgia periodontal a retalho, demonstrou uma melhora na profundidade de sondagem e no nível de inserção clínica. Também é utilizado em tratamentos de fusão espinhal, reconstrução craniana maxilo-facial e confecção de próteses de orelha média (Cannio et al., 2021).

A liberação de íons durante a implantação dos materiais é a característica mais importante para garantir a bioatividade, pois influencia a atividade celular, regulando a proliferação, a diferenciação e a expressão gênica das células (Xynos et al., 2000; Naruphontjirakul et al., 2018). Após a implantação do vidro bioativo, inicia-se o crescimento de um novo osso, acompanhado por reações que formam uma camada de depósitos de fosfato de cálcio (Abbasi et al., 2016). Em seguida, ocorrer a liberação de íons que aumentam o pH local e a pressão osmótica. Uma camada de sílica gel cobre a superfície do vidro, e os fosfatos de cálcio se precipitam (Cannio et al., 2021). A cristalização dessas estruturas amorfas em hidroxiapatita ativa os osteoblastos, que são essenciais para a formação óssea (Ferrando et al., 2017). Diante disso, a substituição do biomaterial pelo osso neoformado é dividida em duas etapas: degradação do vidro bioativo e a liberação de íons específicos. Este mecanismo, portanto, estimula as propriedades antibacterianas do vidro e favorece a angiogênese.

Visto que é possível controlar as propriedades dos vidros bioativos ajustando sua composição química para melhorar a regeneração dos tecidos duros ou moles (Zhang et al., 2019; Fernandes et al., 2017; Yin et al., 2017). Diversas marcas comerciais com diferentes íons metálicos são utilizadas para reconstruir defeitos

ósseos relacionados à mandíbula (Abbasi et al., 2016); sendo estas, PerioGlas® e BioGran®, que são biovidros baseados no 45S5 BioGlass®. Essas formulações melhoram a cicatrização periodontal em defeitos intraósseos, promovendo a formação de um novo cimento associado à regeneração periodontal, sem reações adversas (Sohrabi et al., 2012; Pereira et al., 2017). Defeitos intraósseos que podem incluir lesões de furca (Sohrabi et al., 2012), defeitos ósseos verticais (Chacko et al., 2014), lesões decorrentes de traumas, defeitos congênitos ou doenças como osteoporose e remoção de tumores (Jones et al., 2015).

Devido ao alto teor de óxidos metálicos alcalinos e alcalino-terroso como: Na^+ e Ca^{2+} , o biovidro 45S5 promove rápida reabsorção, o que afeta negativamente o equilíbrio do osso natural durante a remodelação do tecido. Isso leva à formação de fendas entre o tecido e o substituto do enxerto ósseo (Goel et al., 2012), resultando em uma incompatibilidade entre a taxa de degradação e a de regeneração do novo tecido ósseo (Fernandes et al., 2017). Em razão disto, o biovidro 45S5 possui resistência mecânica limitada e baixa tenacidade (Aoki et al., 2020; Hench 2006). Atualmente, não há biovidros porosos disponíveis em larga escala no mercado (Hench et al., 2015). Sobretudo, no Brasil, esse biomaterial é considerado de alto custo, uma vez que precisa ser importado, o que dificulta seu acesso.

Para superar essas desvantagens polímeros, hidrogéis e cerâmicas vem sendo associados ao vidro bioativo para confeccionar *scaffolds* com características aprimoradas. Para isto, é necessário conter porosidade, para permitir a penetração celular para o crescimento de tecido (Vitale-Brovarone et al., 2009), além de suportar cargas e tensões (Baino et al., 2015). Diversos *scaffolds* tem sido desenvolvido, mas há dificuldades, pois o vidro bioativo utilizado tende a cristalizar antes da densificação completa, originando assim um biomaterial extremamente frágil (Baino et al., 2015).

Polímeros orgânicos e inorgânicos são amplamente utilizados para complementar a engenharia de tecido ósseo, uma vez que a sua incorporação pode aprimorar as propriedades mecânicas dos *scaffolds*, aumentando sua resistência mecânica (Guo et al., 2023). Polímeros naturais geralmente oferecem vantagens em termos de biocompatibilidade e capacidade de degradação em comparação com os sintéticos. Por outro lado, os polímeros sintéticos proporcionam melhores propriedades físicas e químicas, promovendo a proliferação celular e o crescimento de novos tecidos (Bharadwaz et al., 2020).

Dessa forma, neste biomaterial, foram associados o polímero sintético hidroxipopolimetilcelulose (HPMC) e a quitosana, um polímero natural. Essa combinação, quando associada aos vidros bioativos, demonstrou melhorar a resistência e porosidade do biomaterial, tornando-o promissor na reparação óssea (Zeeshan et al., 2018). O HPMC é um polímero biodegradável, hidrofílico, sendo utilizado no desenvolvimento de formulações de liberação controlada, o que permite uma liberação gradual de fármacos, contribuindo para aumentar a eficácia do tratamento (Mahmoudian et al., 2017). A quitosana, por sua vez, facilita a adesão e proliferação celular, além de possuir biocompatibilidade e baixa citotoxicidade. Entretanto, sua baixa resistência mecânica requer a adição de biomateriais como hidroxiapatita e beta-fosfato de cálcio para melhorar suas propriedades (Wong et al., 2023; Jahan et al., 2020; Chatzipetros et al., 2018; Puvaneswary et al., 2016)

As fibras de carbono são empregues para regeneração do tecido ósseo, reconstrução de tendões, ligamentos e perdas de cartilagem, demonstrando biocompatibilidade tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Fraczek-Szczypta et al., 2015). Além disso, são amplamente aplicadas como carga para polímeros de reforço, sendo ótimas candidato para se unir ao polímero (Wang et al., 2017; Ning et al., 2015). Para mais, a associação da fibra de carbono ao vidro bioativo acelera o crescimento de hidroxiapatita, promove proliferação e diferenciação de osteoblastos e células mesenquimais indiferenciadas (Cheng et al., 2016), melhora o comportamento mecânico (Touri et al., 2013), a adesão celular, a proliferação e indução osteogênica de células-tronco (Fraczek-Szczypta et al., 2015).

Portanto, polímeros e fibras de carbono são materiais promissores para a reparação óssea, devido às suas propriedades biomédicas. Por isso, este estudo tem como objetivo desenvolver vidro bioativo associado com polímero e funcionalizado com fibra de carbono no Brasil, tornando-o um biomaterial mais acessível economicamente no país, além de melhorar suas propriedades. Para isso, analisamos suas interações biológicas *in vitro* e *in vivo*, com vistas à obtenção de materiais com potencial de enxerto ósseo sintético.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Com o aumento da expectativa de vida e de saúde da população, surgem algumas preocupações. Ao longo da vida, estamos sujeitos a diversas exposições que podem impactar na saúde humana. No envelhecimento, ocorrem alterações fisiológicas, entre elas a diminuição de fatores de crescimento no local da fratura e a diminuição de colágeno maduro dentro do osso (Schwartzman et al., 2024). Isso reduz a resistência e tenacidade óssea, além de prejudicar a auto reparação do tecido ósseo, especialmente em casos de condições mórbidas e doenças sistêmicas que afetam negativamente a cura de fraturas (Meinberg et al., 2020).

O osso é um tecido conjuntivo especializado que possui funções de proteção e sustentação, sendo único em sua capacidade auto remodelação e regeneração (Wei et al., 2022). Dessa forma, a engenharia de tecido ósseo tem desenvolvido novas alternativas biológicas para substituir o uso de enxertos autógenos. Atualmente, há um forte enfoque no desenvolvimento de materiais biológicos sintéticos com o intuito de regenerar e restaurar células ou tecidos danificados. Em casos de defeitos ou fraturas óssea extensas, pode ser necessário o emprego de manobras cirúrgicas, para induzir o processo de regeneração óssea (El Bialy et al., 2017). Desse modo, a engenharia de tecido ósseo vem ganhando destaque nos últimos anos, propondo o avanço de biomateriais que formam um tecido ósseo inédito com a proliferação de osteoblastos e osteócitos, a partir da diferenciação de células osteogênicas (Peng et al., 2020).

Esse progresso proporcionou o desenvolvimento de diversos biomateriais, que podem ser divididos em orgânicos, inorgânicos e biopolímeros naturais ou sintéticos (Thrivikraman et al., 2017). Cada um possui características singulares com a intenção de promover regeneração óssea de forma semelhante ao osso nativo. Assim, os biomateriais atuam como uma estrutura para fixação celular, substituição e crescimento interno de tecidos (Kumari et al., 2022).

Os *scaffolds* de biovidro 45S5 Bioglass® são estruturas porosas que permitem a penetração das células, favorecerem a secreção do fator de crescimento endotelial vascular e aumentam a vascularização, desempenham um papel importante na reparação dos tecidos (Cannio et al., 2021). Desse modo, os vidros ativos não se

restringem apenas à reparação óssea; possuem diversas bioaplicações (Baino et al., 2018), como no tratamento de hipersensibilidade dentária (Tai et al., 2006; Gillam et al., 2002), reparo de tecidos moles (Baino et al., 2016) e reparação nervosa (Gilchris et al., 1998).

O vidro bioativo induz a formação de tecidos ósseos, evidenciada pela formação de hidroxiapatita após a dissolução do material. Ele interage com as fibrilas de colágeno do osso danificado e forma uma ligação (Hench et al., 1973). Essa dissolução promove um pH propício para à nucleação de hidroxiapatita (Jones et al., 2015). No entanto, a bioatividade pode sofrer alterações dependendo do método de processamento: temperatura de fusão e rotação sol-gel. A rota sol-gel tende a ter nanoporosidade inerente, enquanto a fusão resulta em vidros densos (Jones et al., 2015; Hench et al., 1973). Assim, a fusão melhora a processabilidade, aumentando a solubilidade do vidro, consequentemente melhora a bioatividade (Jones et al., 2015).

Entretanto, para reparação de defeitos em larga escala, esses materiais são considerados frágeis e, portanto, não são adequados para todas as aplicações de enxerto, especialmente em locais sob cargas cíclicas (Hench et al., 2015). Por isso, são necessários *scaffolds* mais resistentes e que mantenham todas as propriedades bioativas do vidro bioativo (Hench et al., 2015). Os vidros bioativos são reconhecidos como inorgânicos e, quando combinados com polímeros biodegradáveis, são considerados alguns dos biomateriais mais promissores para aplicação na regeneração óssea (Thrivikraman et al., 2027; Gerhardt et al., 2010 et al.). Desse modo, a associação aos polímeros visa qualificar as características do vidro bioativo.

Uma outra forma de aprimorar a bioatividade dos vidros bioativos é a introdução de oligoelementos, pois, após a exposição deles em um ambiente fisiológico, favorecem o comportamento das células humanas, aumentando a osteogênese e à angiogênese dos materiais (Hope et al., 2011).

Em um estudo de Aksakal et al., (2018), foram analisados a citotoxicidade e a atividade antimicrobiana do bioglass® dopado com selênio (Se) e prata (Ag) em quatro concentrações (5%, 10%, 15% e 20%). Os resultados demonstram que a viabilidade celular e a atividade antibacteriana aumentaram conforme as concentrações de Se e Ag eram maiores. Dessa forma, ambos os materiais possuem viabilidade celular satisfatória, embora, os efeitos antibacterianos não foram tão relevantes.

No estudo de Prasad et al., (2017), foi desenvolvido um vidro bioativo com diversas concentrações (1%, 2%, 4% e 8%) de óxido de bismuto. Eles avaliaram a bioatividade *in vitro* e a atividade antimicrobiana. Foi possível observar que todos os materiais possuem efeitos bacteriostático, entretanto, a proliferação celular foi maior para o material com 1% de óxido de bismuto em todos os períodos de observação (3, 7 e 11 dias). Com isso, em concentrações menores, é considerado um potente aditivo para vidros bioativos, sendo utilizados no tratamento de infecções relacionada ao osso.

Recentemente, no estudo de Souza et al., (2020), foi investigado um vidro bioativo contendo nióbio para aplicação na regeneração óssea. Analisaram a bioatividade *in vitro* e *in vivo* por meio de defeitos em calvaria de ratos. Os resultados exibiram que o nióbio, contém um potencial significativo e pode substituir o pentóxido de fósforo (P_2O_5) sem causar danos celulares. Além disso, na análise *in vivo*, houve o preenchimento de 90% do defeito, dessa maneira, sugere-se que é um material seguro, eficaz e biocompatível para substituição óssea.

Barrioni et al., (2019) exibiram vidro bioativos contendo diferentes teores de Manganês (Mn) (2,5% e 5%) incorporados na estrutura de vidro bioativo. Eles avaliaram os efeitos osteogênicos e a mineralização óssea de células-tronco mesenquimais, com intuito de obter um material eficiente para engenharia de tecidos. Os resultados comprovaram que os materiais não apresentaram efeito citotóxico e os materiais que continha em sua composição MnO ao invés de CaO apresentaram maiores diferenciação celular. Além de formar osteoblastos maduros e mineralização óssea, indicando que a incorporação de Mn é uma estratégia valiosa para regeneração óssea.

Luz et al., (2012) produziram duas membranas ($SiO_2CaOP_2O_5$ e $SiO_2CaOP_2O_5MgO$), baseadas de nanopartículas de vidro bioativo com um polímero natural, a matriz de quitosana, com a intenção de encontrar equilíbrio entre a bioatividade e a ativação dos osteoblastos. Os resultados demonstraram maior proliferação nas membranas testadas. A membrana - $SiO_2CaOP_2O_5MgO$ apresentou maior atividade osteoblástica. Deste modo, ambas os materiais são adequados para a regeneração guiada, além de serem excelentes candidatas para regeneração óssea.

Em um estudo recente de Park et al., (2024), foi desenvolvido um vidro bioativo carregado com irisina, por meio de álcool polivinílico. As análises de

biocompatibilidade e deposição de cálcio foram demonstradas por meio de testes *in vitro*. A capacidade de regeneração foi avaliada por meio de defeitos nos fêmures de coelho. Observou-se nos testes *in vitro* que as amostras carregadas de vidro bioativo e irisina não eram biocompatíveis, mas possuíam propriedades osteogênicas, devido a formação de nódulos de cálcio. Na análise *in vivo*, os vidros bioativos carregados de irisina apresentaram maior formação óssea, logo, a irisina aumenta a capacidade osteogênica do biomaterial, podendo ser uma estratégia promissora para futuros problemas relacionados aos ossos.

Esses estudos exibem a constante evolução dos biomateriais na engenharia de tecido ósseo, com a intenção de desenvolver substitutos ósseos com propriedades indispensáveis como bioatividade, osteoindução e osteocondução. Além de possuir um custo-benefício adequado, ser fácil de manusear e não promover complicações pós-operatórias (Canio et al., 2021).

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo principal desenvolver e avaliar um vidro bioativo associado com polímero e fibra de carbono, vistas à obtenção de material com potencial de enxerto ósseo sintético.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar:

- a) Caracterização – composição química de superfície;
- b) Citotoxicidade, conteúdo de proteína total e a atividade da fosfatase alcalina;
- c) Toxicidade nos órgãos: rim, fígado, coração e baço;
- d) A neoformação óssea por meio das análises, histológica, microtomografia computadorizada- Micro-CT e histomorfometria.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Biomaterial

4.1.1 Preparação do vidro bioativo associado com polímero e fibra de carbono

As etapas de preparação, confecção do biomaterial foram realizados pela Resix Invent Indústria Química Ltda. O vidro bioativo modificado tem os acréscimos de polímero e fibra de carbono. Portanto, é formado através da fusão a 1500°C seguido de choque térmico, logo após, é moído de forma a obter a granulometria. Em um segundo momento, na fase de otimização, ocorre a homogeneização da mistura com o agente pirogénico (sal) e a obtenção de corpos de prova prensados a 100-200 MPa. Contudo, após a extração do agente pirogénico e sua maturação, é realizada a caracterização física, para obter as diferentes formulações das amostras.

4.2 Caracterização do material

A caracterização foi realizada com a intenção de identificar detalhadamente a superfície dos biomateriais, em relação a suas características e composição.

4.2.1 Microestrutura e topografia por Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

A análise da topografia superficial das amostras (B+P; B+P+F), foi realizada utilizando um microscópio eletrônico de varredura Quanta 650 FEG Environmental SEM (ESEM) de FEI Company, now Thermo Fisher Scientific, Hillsboro, OR USA, Mahwah, NJ USA (Figura 1) situado em Manitoba Institute for Materials & Faculty of

Science. As imagens eletrônicas secundárias foram obtidas, utilizando um detector Everhart-Thornley. A tensão de aceleração para todos os materiais foi de 15 kV a distância de trabalho do feixe em torno de 10 mm; as ampliações estavam na faixa de 2,5 k e 50 k. As magnificações utilizadas foram de 100x.

Figura 1 – Microscópio eletrônico de varredura



Fonte: Umanitoba.ca, 2024.

4.2.2 Espectroscopia de energia dispersiva de raio x (EDS)

Um microscópio eletrônico de varredura Quanta 650 FEG Environmental SEM (ESEM) de FEI Company, now Thermo Fisher Scientific, Hillsboro, OR USA, Mahwah, NJ USA (Figura 1), com um detector de espectroscopia de raios X de energia dispersiva (EDS) (Octane Super Silicon Drift Detector) da EDAX Company Mahwah, NJ USA. A tensão de aceleração para todos os materiais foi de 15 kV e a distância de trabalho do feixe foi de cerca de 10 mm; as ampliações estavam na faixa de 2,5 k e 50 k. O microscópio foi equipado para análise química de EDS, com detector EDS de janela ultrafina com os seguintes parâmetros: decolagem: 35,8, Amp Time (μ s): 7,68, resolução (eV): 127,9. Para detectar a composição da matriz de cada amostra foram analisados três locais com $\sim 100 \mu\text{m}^2$, e utilizando o modo de retroespalhamento, três pontos foram selecionados para análise de partículas de carga. Foi utilizado o software EDS-Genesis. A profundidade de sondagem do feixe EDS é de cerca de 1–3 μm .

4.2.3 Composição química da superfície por espectroscopia de fotoelétrons de raio-X de ultra-eixo de Kratos (XPS)

XPS fornece uma distribuição de energia cinética de elétrons emitidos como resultado da interação entre os raios X e o substrato; estes podem então ser convertidos em energias de ligação de elétrons. Qualitativamente, identificam o elemento que emite os elétrons; quantitativamente, eles fornecem as concentrações relativas dos componentes de pico dos elementos que emitem os elétrons. As análises XPS foram realizadas utilizando um VG ESCALAB 3 MK II (Figura 2); Foi utilizada radiação Al $K\alpha$ ($h\nu = 1486,6 \text{ eV}$, com resolução do instrumento de 0,85 eV), a uma pressão inferior a 1×10^{-9} torr. Os elementos detectados foram observados usando espectros de pesquisa e de alta resolução, com profundidades de sonda dependentes de elemento de $\sim 4\text{--}5 \text{ nm}$. Os valores de energia de ligação XPS (BE) foram corrigidos para a carga do carbono adventício não carregado a 285,0 eV. Este método de análise fornece a distribuição de energia dos elétrons emitidos como

resultado da interação entre o biomaterial e os raios X incidentes. Sua análise fornece informações qualitativas (elementos presentes) e quantitativas (a concentração relativa de cada componente do pico espectral).

Figura 2 – Espectrômetro de fotoelétrons de raio X



Fonte: Umanitoba.ca, 2024.

4.3 Aspectos éticos e diretrizes experimentais

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA do Instituto de Ciência e

Tecnologia de São José dos Campos/UNESP sob os números de protocolo nº: 09/2022 02/2023 (Anexo A) e nº: 02/2023 (Anexo B). Este projeto também seguiu as diretrizes preconizadas pelo ARRIVE (*Animal research: Reporting in vivo experiments* (Percie du Sert et al., 2020)).

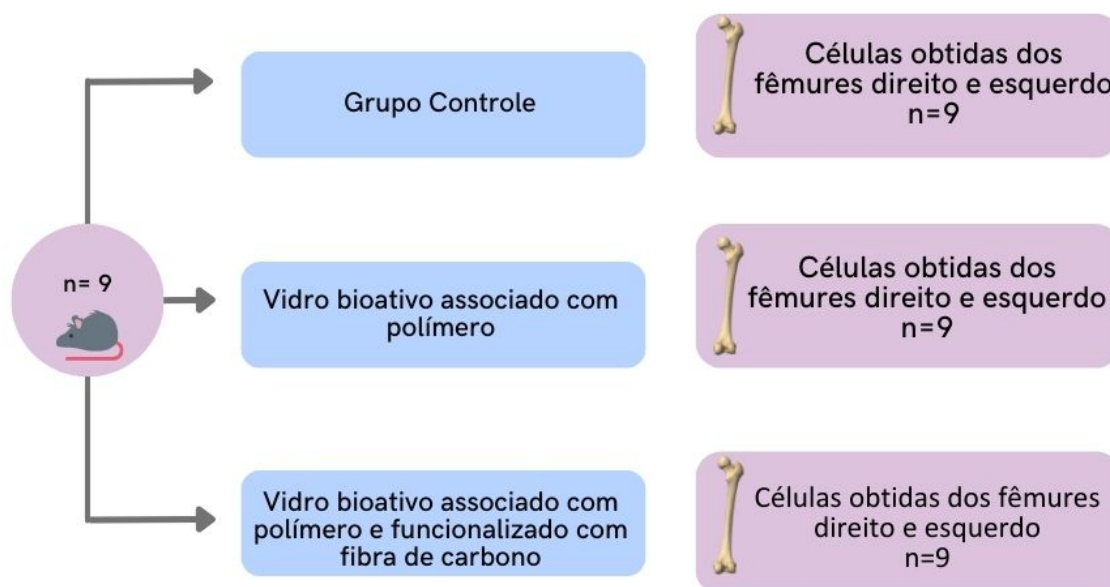
4.4 Ensaios biológicos *in vitro*

Os procedimentos biológicos *in vitro* foram efetuados no Laboratório de Estudos Interdisciplinares em Células (LEIC) situado no Departamento de Biociência e Diagnóstico Bucal Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp, Campus de São José dos Campos.

Essa etapa tem ao todo 3 grupos experimentais: Grupo **C**: Controle celular – células mesenquimais são plaqueadas sem o biomaterial; Grupo **B+P**: Células mesenquimais são plaqueadas no vidro bioativo associado com polímero; Grupo **B+P+F**: Células mesenquimais são plaqueadas no vidro bioativo associado com polímero e funcionalizado com fibra de carbono (Figura 3).

As partículas dos biomateriais são previamente preparadas e confeccionadas em amostras com 4mm de diâmetro (para placas com 96 poços) ou 15mm de diâmetro (para placas de 24 poços) e 2mm de espessura, e esterilizadas por ácido peracético.

Figura 3- Fluxograma para o esclarecimento da quantidade de animais



Fonte: Elaborado pelo autor.

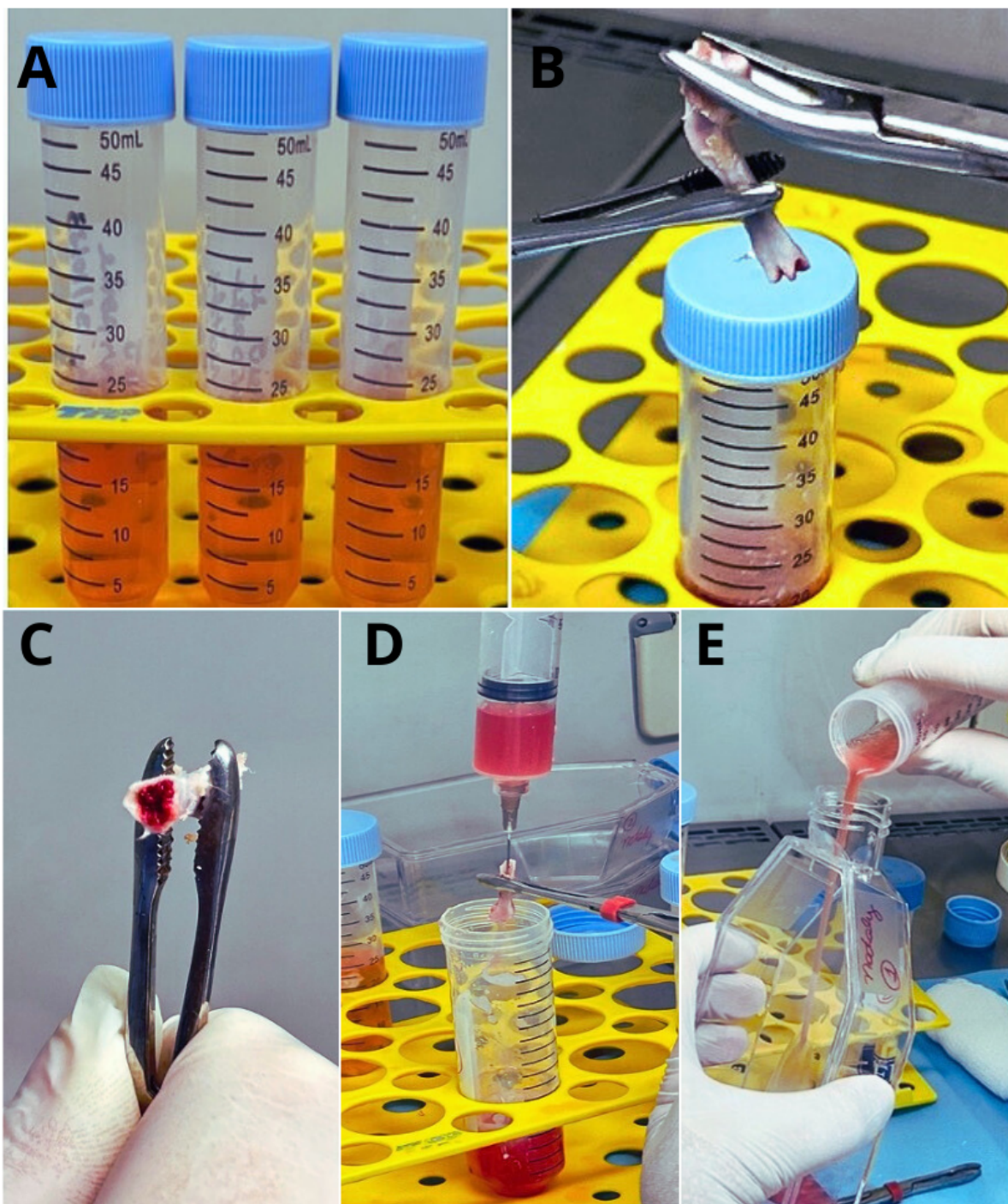
4.4.1 Cultura celular

As células mesenquimais para cultura celular foram obtidas de fêmures de 09 ratos machos adultos (*Rattus norvegicus*, Wistar), pesando cerca de 300g com 90 dias de idade. Os ratos foram alocados em gaiolas apropriadas e receberam dieta e água *ad libitum* até o momento da eutanásia. Os animais foram eutanasiados utilizando sobredose de anestésico de uma solução Cloridrato de Cetamina 10% (100mg/kg Dopalen – Ceva Brasil), anestésico geral e de Cloridrato de Xilazina 2% (10mg/Kg Anasedan – Ceva Brasil), substância com propriedades sedativas e analgésicas, além de relaxante muscular, por via intramuscular, em seguida dos testes de sensibilidade os animais foram decapitados.

As células da medula de ambos fêmures dos animais foram isoladas e inseridas em frascos para cultura celular de 250ml (TPP, Biosystems, Curitiba, Brasil) com meio de cultura essencial mínimo alfa MEM (Gibco® - Life Technologies, EUA) suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (Cultilab Ltda, Brasil) e gentamicina (500

µg/ml) (Gibco® - Life Technologies, EUA), chamado meio total suplementado (MTS) (Figura 4), e incubadas em estufa à temperatura de 37°C, com umidade atmosférica contendo 5% de dióxido de carbono CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada três dias e a cultura celular avaliada por microscopia de fase invertida (Microscópio *Carl Zeiss – Axiovert 40C, Germany*). As células mesenquimais foram selecionadas pela aderência ao poliestireno e expandidas até as células atingirem a confluência, ocupando mais de 80% do frasco, visto que, geralmente ocorre por volta do sétimo dia.

Figura 4 – Procedimento para coleta de células mesenquimais

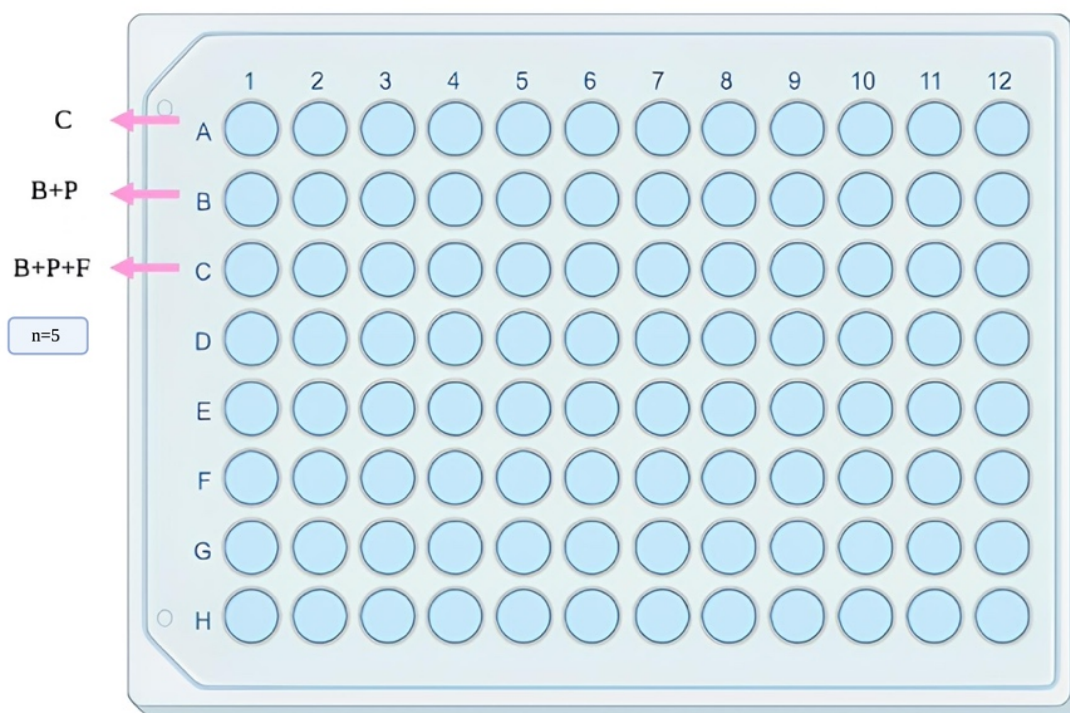


Legenda: Frascos com meio de cultura e antibiótico; B - Remoção das epífases dos fêmures dissecados; C - Fêmur sem a epífase; D - Remoção das células mesenquimais; E - Vertendo a solução contendo células no frasco de cultura celular.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para o plaqueamento celular, as células foram lavadas com solução tampão fosfato-salino (PBS) (Gibco® - Life Technologies, EUA) e foi adicionado ao frasco 3ml da solução de tripsina 0,25% (Cultilab Ltda, Brasil). Em seguida, o conteúdo de tripsina foi neutralizado com 6ml de meio MTS e o conjunto foi transferido para um tubo Falcon de 15ml (TTP, Biosystems, Brasil) que foi centrifugado em 5000rpm por 5 minutos (Centrífuga Labnet– HERMLE Z 300K, NJ, EUA), com consequente formação do pellet. O sobrenadante foi desprezado e as células foram re-suspendidas em MTS e distribuídas nos poços das placas. Foi realizado o plaqueamento celular com aproximadamente 5.000 células/poço, sendo que as células foram contadas por meio do contador automático Countess® (Invitrogen®, EUA). O meio de cultura da placa foi meio osteogênico (MTS-O), contendo 5mg/ml de ácido ascórbico (Neon®, Neon Comercial, Brasil) e 2,16g de beta glicerofosfato (Sigma-Aldrich® ref 50020, Merck KGaA, Alemanha), e foi trocado a cada 48h. Nos poços do grupo controle permaneceu o plaqueamento apenas das células e nos grupos experimentais foi inserido as amostras por meio de uma pinça clínica no interior dos poços (Figura 5). Logo em seguida todas as placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ e mantidas até o momento dos testes.

Figura 5 – Esquema da placa de 96 poços para análises *in vitro*



Legenda: C: controle celular; B+P: vidro bioativo associado com polímero; B+P+F: vidro ativo associado com polímero funcionalizado com fibra de carbono.

Imagem ilustrativa obtidas no Biorender®.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4.2 Determinação da viabilidade celular (citotoxicidade)

Após 3 e 7 dias de cultura, foi realizada a avaliação quantitativa da viabilidade celular pelo metabolismo celular após a exposição ao agente tóxico pela incubação com o corante MTT [brometo de 3-4,5-dimetiltiazol] (Sigma Aldrich®, Merck KGaA, Alemanha) e análise espectrofotométrica do corante incorporado. Alíquotas de MTT a 0,5mg/mL foram preparadas, seguida da incubação das culturas primárias com esta solução por 4h a 37°C, em estufa com 5% de CO₂. Após esse período, a solução de MTT foi removida e foi adicionado 500µL da solução de DMSO (Dimethyl Sulfoxide Gibco®, EUA) que permaneceu nos poços por 10 minutos em estufa de CO₂ a 37°C. A placa foi colocada sob

agitação por 10 minutos para solubilização completa do precipitado formado. Alíquotas de 100µL foram retiradas dos poços e transferidas para placa de 96 poços (Greiner CELLSTAR®, Merck KGaA, Alemanha) para medida colorimétrica em leitor de microplaca no comprimento de onda $\lambda=570\text{nm}$ (Biotek® EL808IU, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA). Os dados foram aferidos como absorbância e armazenados para análise estatística.

4.4.3 Conteúdo de proteína total

O conteúdo de proteína total foi calculado após 10 dias de cultura. Esta mensuração foi realizada de acordo com o método modificado de Lowry (1951). Após a remoção dos meios de cultura os poços foram lavados três vezes com PBS e preenchidos com 2mL de lauril sulfato de sódio a 0,1% (Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Alemanha). Após 30 minutos, 1mL da solução de cada poço foi misturada com 1mL da solução de Lowry (Sigma-Aldrich®, Alemanha) por 20 minutos. Em seguida foi acrescentado à mistura 1mL de reagente de Folin e Ciocalteu (Sigma-Aldrich®, Alemanha) por 30 minutos. A seguir, a absorbância foi aferida a 680nm em espectrofotômetro (Micronal® AJX 1900, Micronal, S.A., Brasil) e foi calculado a curva-padrão determinada pela albumina bovina, e expresso em µg/mL.

4.4.4 Atividade de fosfatase alcalina

A atividade de fosfatase alcalina foi avaliada após 10 dias de cultura, por meio da liberação de timolftaleína por hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, utilizando um kit comercial Labtest Diagnóstica® (Labtest Diagnóstica S.A, Brasil). Foi realizado nos mesmos períodos da proteína total, utilizando os mesmos lisados. Foram misturados 50µL de timolftaleína monofosfato com 0,5mL de tampão dietanolamina a 0,3M, pH 10,1. À solução foi acrescentada alíquota de 50µL dos lisados obtidos de cada poço, permanecendo por 10 minutos a 37°C. em banho-maria. Foram adicionados 2mL de Na_2CO_3 a 0,09M e NaOH a 0,25M, para o

desenvolvimento de cor. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Micronal® AJX 1900, Micronal, S.A., Brasil), com absorbância de $\lambda = 590$ nm e calculada a curva-padrão usando a timolftaleína expresso em timolftaleína/hora/ μ g proteína.

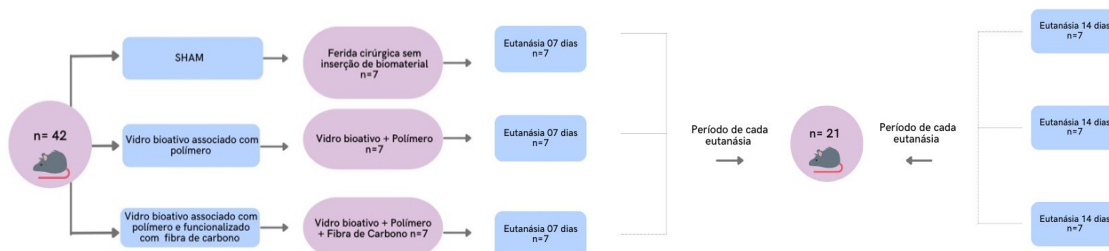
4.5 Modelo experimental *in vivo*

A etapa *in vivo* consistiu primeiramente na implantação das amostras em tecido subcutâneo, e em um segundo momento, na aplicação dos biomateriais no reparo de defeitos ósseos de tamanho crítico.

4.5.1 Desenho do estudo dos ensaios *in vivo* para avaliação da toxicidade sistêmica

Para realização do ensaio *in vivo* de toxicidade sistêmica foram formados 3 grupos experimentais: Grupo **SHAM**: Ferida cirúrgica sem inserção de biomaterial (zona de pseudo operação – incisão com distância e profundidade semelhantes aos demais grupos (n=7 -7 dias, n=7 - 14 dias); Grupo **B+P**: Vidro bioativo associado com polímero (n=7 -7 dias, n=7 - 14 dias); Grupo **B+P+F**: vidro bioativo associado com polímero e funcionalizado com fibra de carbono (n=7 -7 dias, n=7 - 14 dias). A distribuição dos animais em cada grupo foi de forma randomizada, com isso foram utilizados 42 ratos *Wistar* machos (*Rattus norvegicus*), com 90 dias de idade e cerca de 300 g, contendo 7 animais por grupo/período (Mori et al., 2014; Moura et al., 2011) (Figura 6).

Figura 6 - Fluxograma para esclarecimento da quantidade de animais e o período de suas eutanásias

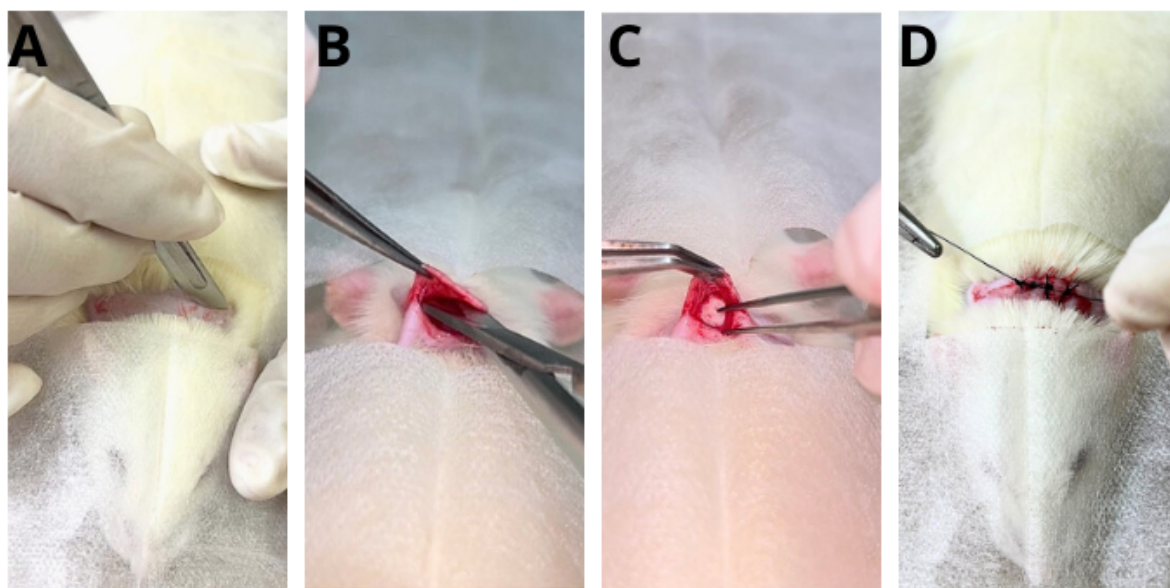


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5.2 Procedimento cirúrgico para a implantação dos corpos de prova no tecido subcutâneo

Para a execução das cirurgias os animais foram anestesiados via intraperitoneal com a combinação de 100mg/kg de Cetamina 10% e 10mg/Kg de cloridrato de xilazina 2%, depois de anestesiado, foi realizada a tricotomia e desinfecção do dorso do animal com clorexidina 2%, em seguida a incisão foi feita e uma bolsa subcutânea foi aberta para a colocação da amostra, logo após, foi realizada a sutura com fio de seda (Figura 7). A medicação pós-operatória foi o Tylenol, por via oral, dosagem de 1-2mg/mL na água de beber durante 03 dias. As eutanásias ocorreram aos 07 e 14 dias, triplicando as doses da medicação anestésica, seguida de decapitação. Após a eutanásia, os principais órgãos foram removidos: coração, fígado, baço e rins, para análise histológica, a fim de investigar a possível liberação de resíduos dos biomateriais no sangue, resultando em danos às células e parênquima dos principais órgãos.

Figura 7 – Procedimento cirúrgico no tecido subcutâneo



Legenda: A - Incisão com lâmina de bisturi no dorso do animal; B - Divulsão dos tecidos; C - Inserção do biomaterial; D - Sutura da incisão.

Fonte: Elaborado pelo autor.

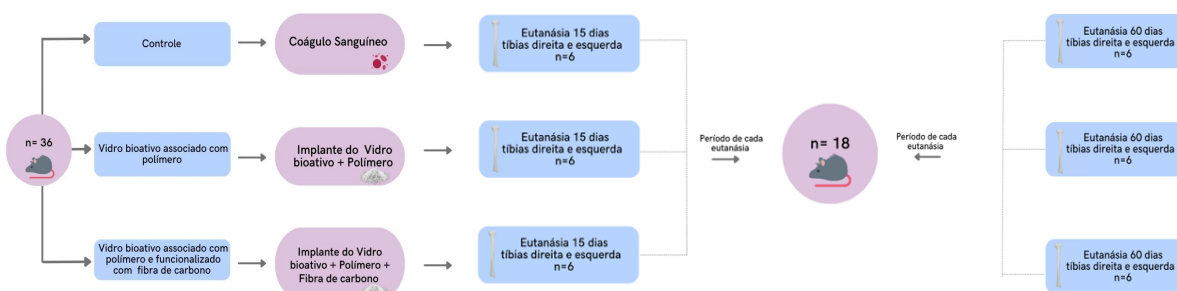
4.5.3 Análise histológica para avaliação da toxicidade nos órgãos

Para análise histológica, os espécimes foram fixados em formalina tamponada neutra a 10%. Após 48h, os espécimes foram processados com inclusão de parafina. O bloco de parafina foi orientado paralelamente ao eixo longo do material, e foi realizados cortes seriados de 5µm de espessura. Cinco lâminas foram obtidas de cada órgão, corados em seguida com Hematoxilina e Eosina (HE). Para análise da morfologia celular e parênquima dos órgãos foi realizada por microscopia de luz Axiophot2 (Carl Zeiss Oberköchen, Alemanha) acoplado a uma câmera digital AxioCam MRc5 (Carl Zeiss Oberköchen, Alemanha) que transmitiu para o programa computacional AxioVision Release 4.7.2.

4.5.4 Desenho do estudo dos ensaios *in vivo* para avaliação da reparação óssea

Para realização dos testes *in vivo* de reparação óssea, foram incluídos 3 grupos experimentais: Grupo **C**: Controle - coágulo sanguíneo; Grupo **B+P**: vidro bioativo associado com polímero, **B+P+F**: vidro bioativo associado com polímero e funcionalizado com fibra de carbono. A distribuição dos animais em cada grupo foi de forma randomizada de acordo com a ferramenta NC3Rs EDA. Trinta e seis ratos adultos (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, *Wistar*) foram utilizados nesta fase do estudo, sendo por grupo, seis tíbias direitas destinadas a Micro CT e análise histomorfométricas e as tíbias esquerdas destinadas para análise de textura (não demonstrada no presente estudo), períodos de eutanásia foram: 15 e 60 dias (Figura 8).

Figura 8 – Fluxograma para esclarecimento da quantidade de animais e o período de suas eutanásias



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5.5 Cálculo amostral análise de reparação óssea

O número de animais por grupo foi 6, com poder maior que 90%, de acordo com o cálculo amostral realizado no programa Minitab versão 19, considerando-se a mínima diferença a ser detectada de 20,23, estimativa do desvio padrão 8,37

(Bernabé et al., 2011), número de grupos de 4, erro alfa de 5% e erro beta de 20% (Apêndice A).

4.5.6 Procedimento cirúrgico para implantação dos corpos de prova no defeito ósseo

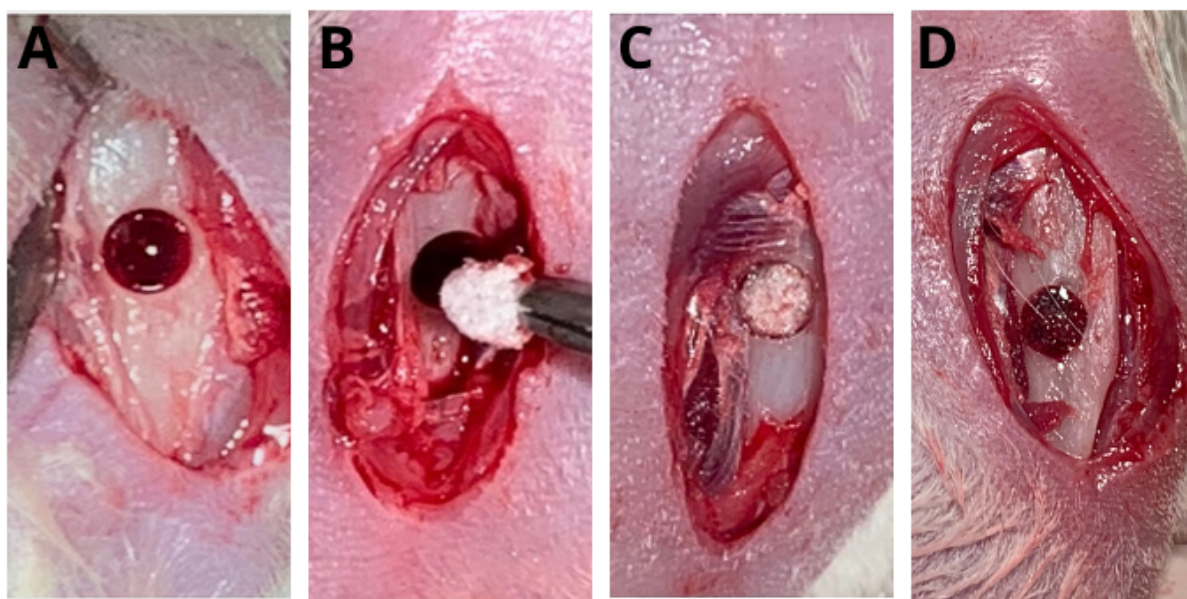
Aos 90 dias de idade dos animais foi realizado um defeito ósseo de tamanho crítico com 3 mm de diâmetro (Cardoso et al., 2018; Vasconcellos et al., 2021) em cada tíbia de todos os animais os quais foram aleatoriamente divididos em grupos de acordo com o material de preenchimento do defeito da tíbia. A cirurgia ocorreu no Biotério do ICT/Unesp.

Os animais foram anestesiados via intraperitoneal com a combinação de 100mg/kg de Cloridrato de Cetamina 10% (Dopalen® – Vetbrands, Jacareí – Brasil) e 10 mg/Kg de Cloridrato de Xilazina 2% (Anasedan® - Vetbrands, Jacareí – Brasil). Em seguida, foi administrado um fármaco analgésico cloridrato de tramadol, 8-10 mg/kg, via oral. Os locais cirúrgicos das tíbias direita e esquerda foram submetidos à tricotomia e à antissepsia com solução de álcool iodado. A incisão foi realizada na região correspondente à face medial da tíbia com uma lâmina de bisturi número 15, seguida da divulsão dos músculos e periósteo para expor a tíbia. Um defeito cirúrgico foi então confeccionado utilizando uma ponta diamantada esférica de haste longa, com irrigação abundante e contínua de solução fisiológica para evitar superaquecimento causado pelo atrito da broca. A ponta ativa da broca, com diâmetro de 3 mm, portanto, foi completamente inserida na cavidade medular do tecido ósseo, perfurando o tecido ósseo cortical. Após a perfuração, o biomaterial, previamente esterilizado por raio gama, foi inserido no defeito com o auxílio de uma pinça clínica preenchendo completamente a cavidade. Nos animais que não receberam biomaterial, foi aguardada a formação e estabilização do coágulo. Seguido de ambos os procedimentos os tecidos foram reposicionados e suturados com fio de seda nº 4 (Ethicon/Johnson & Johnson) (Figura 9).

Posteriormente a cirurgia, os ratos foram colocados em gaiolas contendo seis animais, com ração e água *ad libitum*. O cloridrato de tramadol, foi administrado

por via oral, na dose 8-10 mg/kg, a cada 12 horas, durante cinco dias após a cirurgia. Os animais foram supervisionados até os dias das eutanásias, que foram em 15 e 60 dias pós-operatório. As eutanásias foram realizadas utilizando sobredoses da medicação anestésica para garantir que os animais não retornassem ao estado de consciência, logo em seguida houve a decapitação.

Figura 9 – Procedimento cirúrgico nas tíbias



Legenda: A - Defeito ósseo de 3mm, feito com broca carbide; B - Inserção do biomaterial no defeito ósseo; C – vidro bioativo associado com polímero preenchendo todo o defeito ósseo; D – Vidro bioativo associado com polímero funcionalizado com fibra de Carbono.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5.7 Processamento histológico

Para as análises histológica e histomorfométrica, a área operada foi fixada em formol a 10% por um período máximo de 48 horas. Cada espécime foi catalogado. Em seguida teve início o processo de descalcificação em ácido fórmico (Merck KGaA, em Darmstadt, Alemanha) na concentração de 20% (Rasouli Ghahroudi et al., 2014). Após a descalcificação os espécimes foram embebidos em parafina.

Os cortes foram realizados no sentido longitudinal na região de maior diâmetro do defeito que tiveram espessura de 5µm e foram realizados de forma semi seriada. No total, foram realizados cortes com 5µm de espessura para confecção de 10 lâminas, cada uma contendo pelo menos três cortes seriados, em seguida, esses cortes foram corados por hematoxilina-eosina e examinados em microscopia de luz (Messora et al., 2008; Nunes et al., 2019). Para análise histomorfométrica apenas três das dez lâminas de cada espécime foram selecionadas, e de cada uma dessas três lâminas o melhor corte foi escolhido para a análise, totalizando três imagens panorâmicas para análise de cada animal. A captura de imagens dos cortes foi a partir de um microscópio de luz Axiophot 2 (Carl Zeiss Oberkochen, Alemanha) acoplado a uma câmera digital AxioCam MRc 5 (Carl Zeiss Oberkochen, Alemanha) que as transmite para o programa computacional AxioVision Release 4.7.2. Um único examinador realizou a captura das imagens que receberam códigos e posteriormente foram analisadas por um outro examinador devidamente calibrado (ICC: 0,929769), permitindo o cegamento dos dados.

4.5.8 Avaliação por microtomografia computadorizada tridimensional (microCT)

Logo após a eutanásia, os segmentos ósseos foram mantidos em solução de formalina tamponada a 10%, pH 7,0, por 48 h e depois transferidos para uma solução de etanol a 70% por 72 horas. Em seguida, as amostras foram submetidas à microtomografia computadorizada tridimensional (microCT), utilizando-se o microtomógrafo SMX90CT. Os parâmetros utilizados para o escaneamento foram os seguintes: Voltagem: 60kV de tensão, Amperagem: 110mA e de corrente 360° de varredura. As imagens geradas foram posteriormente reconstruídas com uma resolução de 1024 x 1024 e tamanho de voxel de 21µm. As análises foram realizadas em um software de imagem (VGStudio 3.5) com faixa de níveis de cinza padronizada e seleção da área do defeito por segmentação entre níveis (min 33592/max55987).

A partir da segmentação foi padronizada uma Região de Interesse (ROI), onde foram calculados os parâmetros morfométricos e o volume de osso em cada defeito. Foram realizadas as seguintes análises: 1) volume ósseo/volume em mm^3 ; 2) superfície óssea/volume ósseo (bs/bv); 3) % de volume ósseo – fração óssea (bv/tv); 4) espessura trabecular (tb.th); 5) número de trabéculas (tb.n) e 6) separação trabecular (tb.sp).

4.5.9 Análise histomorfométrica

A análise histomorfométrica foi realizada por um único examinador devidamente calibrado. Seis cortes foram selecionados e nesses cortes uma medida foi tomada; após 24h as medidas foram novamente tomadas, e foram submetidas ao teste de correlação de Pearson por um segundo pesquisador, e o examinador foi considerado calibrado quando atingiu pelo menos $p=0,9$ de concordância entre os exames. A análise foi realizada em aumento de X2.5. As medidas histomorfométricas foram realizadas a partir de fotomicrografias montadas em forma de uma fotografia panorâmica onde foi possível visualizar o defeito em toda a sua extensão. A análise histomorfométrica foi realizada com utilização do programa computacional Image J (NHISoftware, Domínio Público). O critério a seguir foi utilizado para padronizar a análise das imagens digitais (Messora et al., 2008): área total (em mm^2) correspondente à área total do defeito cirúrgico original, determinada pela identificação das superfícies externa e interna do osso original das tíbias e das bordas direita e esquerda do defeito cirúrgico e, em seguida, conectando-os com linhas desenhadas de acordo com suas respectivas curvaturas.

A área óssea recém-formada (em mm^2) foi delineada dentro da área total do defeito. A área total foi considerada 100% da área a ser analisada. As áreas de neoformação óssea dentro dos defeitos foram calculadas como uma porcentagem da área total. O osso imaturo recém-formado foi identificado pelo crescimento ósseo no defeito adjacente ao osso lamelar original. As imagens possuíam códigos para a não identificação do grupo experimental ao qual pertencem, possibilitando uma análise cega dos dados. Foram feitas as seguintes medidas:

- a) Área total do defeito (AT): área total do defeito cirúrgico (mm²);
- b) Área de neoformação total (AN): área de neoformação óssea dentro dos limites determinados entre as bordas do defeito (mm²);
- c) Proporção (%) de neoformação óssea.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para cada análise, os dados foram dispostos em medidas de tendência central e variabilidade. Em seguida, foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk para determinar a aplicação de testes estáticos apropriados (paramétricos ou não paramétricos), de acordo com a distribuição dos dados. Adotou-se o nível de significância convencional de 5%.

Os dados das análises *in vitro*, referente aos testes de proteína total e atividade da fosfatase alcalina, foram analisados usando o teste de análise de variância (ANOVA) – one way, seguido pelo teste de Tukey. Os dados do teste de viabilidade celular foram analisados com o teste de ANOVA - dois fatores, seguido pelo teste de Tukey.

Os dados da histomorfometria e da Micro-CT foram submetidos ao teste paramétrico ANOVA – dois fatores, seguido pelo teste de Tukey, e teste T.

Todos os testes estatísticos foram realizados no software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

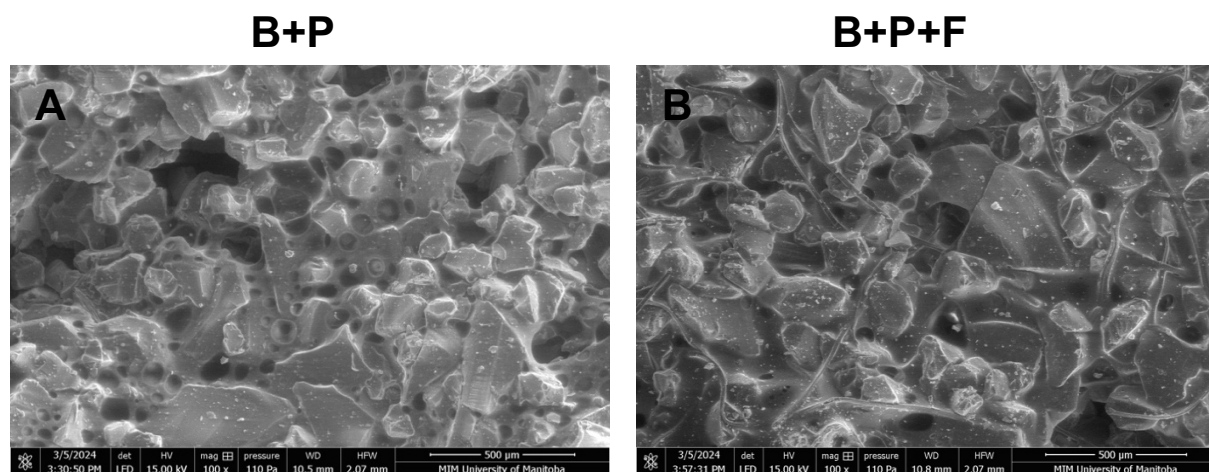
5 RESULTADO

5.1 Caracterização dos materiais

5.1.1 Microestrutura e topografia por Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

Na microscopia eletrônica de varredura (MEV), observa-se que no grupo B+P, as partículas de vidro apresentam bordas definidas e facetadas, com uma superfície porosa e rugosa, resultando em uma maior área superficial que favorece a interação com o meio, além de possuir regiões amorfa (figura 10A). No grupo B+P+F, as partículas exibem ângulos arredondados, e as fibras de carbono, por sua vez, demonstram uma estrutura bidimensional desordenada, contendo partículas de vidro bioativo em sua superfície (Figura 10B).

Figura 10 – Micrografias obtidas por FEG



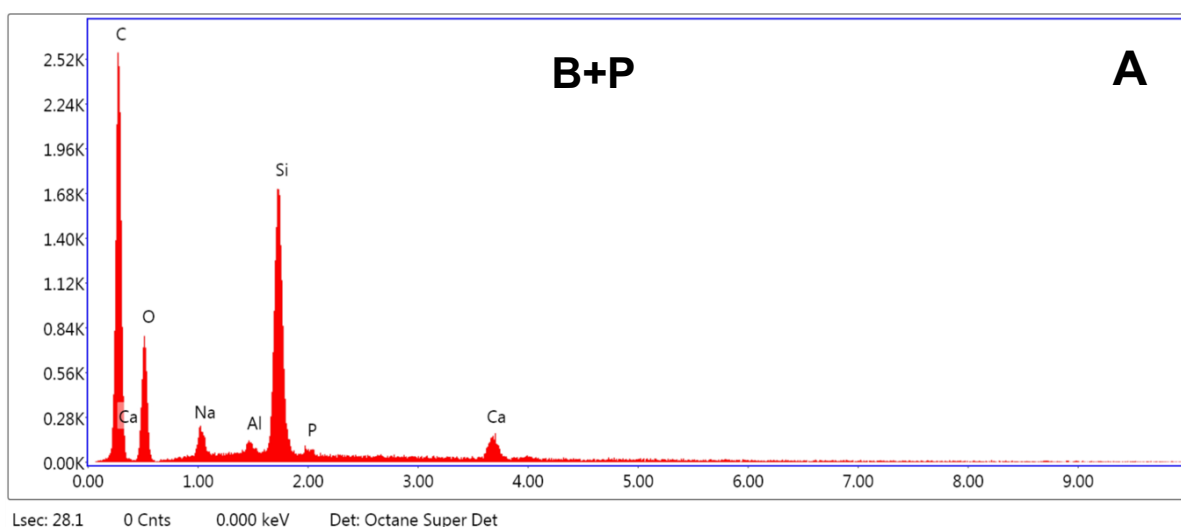
Legenda: Fotomicrografias MEV da imagem A - vidro bioativo associado com polímero; imagem B - vidro bioativo associado com polímero e funcionalizado fibra de carbono.

Fonte: Elaborado pelo autor.

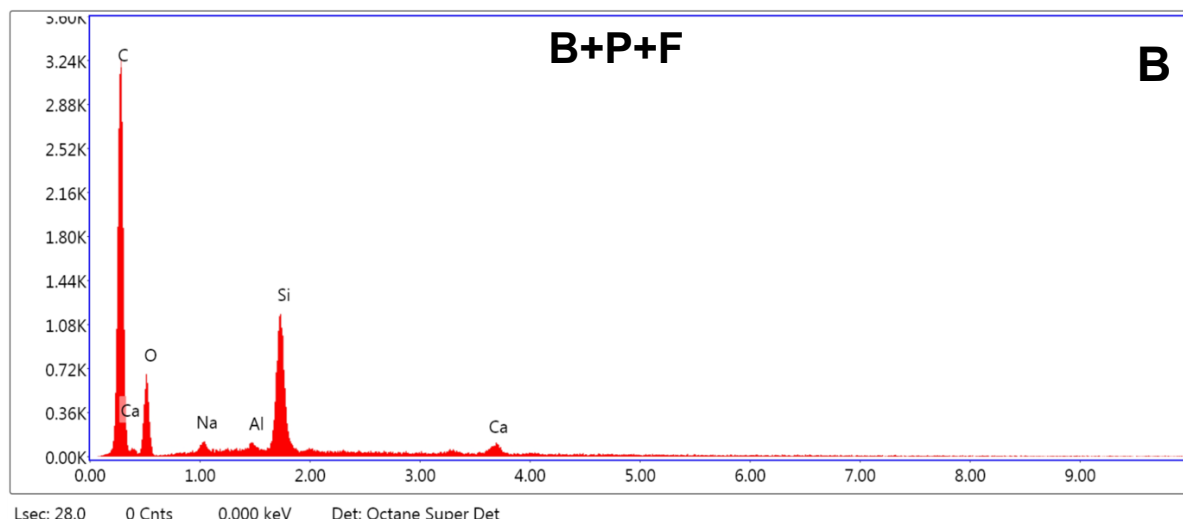
5.1.2 Espectroscopia de energia dispersiva de raio x (EDS)

A espectroscopia foi utilizada para determinar a composição química qualitativa das amostras. As análises EDS revelaram a presença de carbono (C), oxigênio (O), sódio (Na), alumínio Al, sílica (Si), fósforo (P), (cálcio) Ca nas amostras de biovidro 45S5 funcionalizado com polímero (Figura 9). O vidro bioativo funcionalizado com polímero e fibra de carbono se difere, pois contém potássio (K) em sua composição (Figura 9). Com isso, compreende-se que a composição dos biomateriais é distinta.

Figura 11- Difratograma da microanálise por espectroscopia por dispersão de energia



Legenda: A - Espectros de espectroscopia de raios X com dispersão de energia dos materiais de B+P.
Fonte: Elaborado pelo autor.



Legenda: B - Espectros de espectroscopia de raios X com dispersão de energia dos materiais de B+P+F.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os dados da estatística descritiva (média $\pm$ desvio padrão) obtidos a partir da mensuração dos elementos químicos no EDS estão ilustrados nas tabelas 1.

Tabela 1 – Valores das médias e do desvio padrão de cada amostra

Íons	Biomaterial	
	B+P	B+P+F
C	58 $\pm$ (6,6)	64 $\pm$ (10,6)
O	18 $\pm$ (1,7)	19 $\pm$ (0,5)
Na	2 $\pm$ (1,8)	0,7 $\pm$ (0,6)
Al	0,4 $\pm$ (0,09)	0,5 $\pm$ (0,1)
Si	18 $\pm$ (11,1)	12 $\pm$ (6,5)
P	0,5 $\pm$ (0,4)	0,3 $\pm$ (0,4)
K	-	1 $\pm$ (1,6)
Ca	3 $\pm$ (2,1)	3 $\pm$ (1,0)

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.1.3 Composição química da superfície por espectroscopia de fotoelétrons por raio-X (XPS)

Esta técnica de caracterização determina a composição química superficial das amostras. Isso ocorre porque um espectro de alta resolução de um pico elementar específico é coletado. Com isso, identificamos a presença de sílica (Si), selênio (Se), bório (B), carbono (C), cálcio (Ca), nitrogênio (N), oxigênio (O) e sódio (Na) (Tabela 2 e Figura 12).

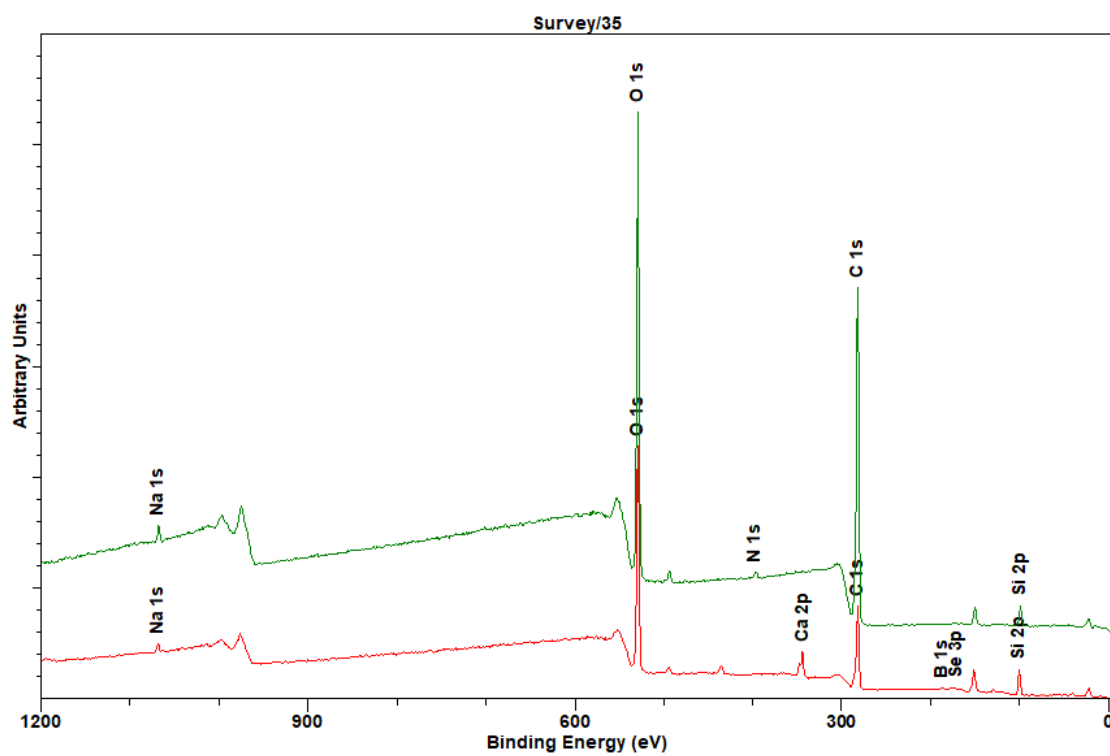
Por meio dos resultados, confirma-se a presença de carbono na superfície de ambos os biomateriais, os quais foram calibradas mediante ao carbono 285 eV. Este carbono adventício foi atribuído à manipulação ou contaminação da amostra.

Tabela 2 – Composição superficial em (at. %) obtida por XPS

Íons	Biomaterial	
	B+P	B+P+F
C 1s %	12	20
N 1s %	-	0.19
Na 1s %	0.09	0.09
Ca 2p %	0.86	-
B 1s %	0.32	-
Se 3p %	0.20	-
Si 2p %	4	1,0

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 12 – Espectro de pesquisa XPS



Fonte: Elaborado pelo autor.

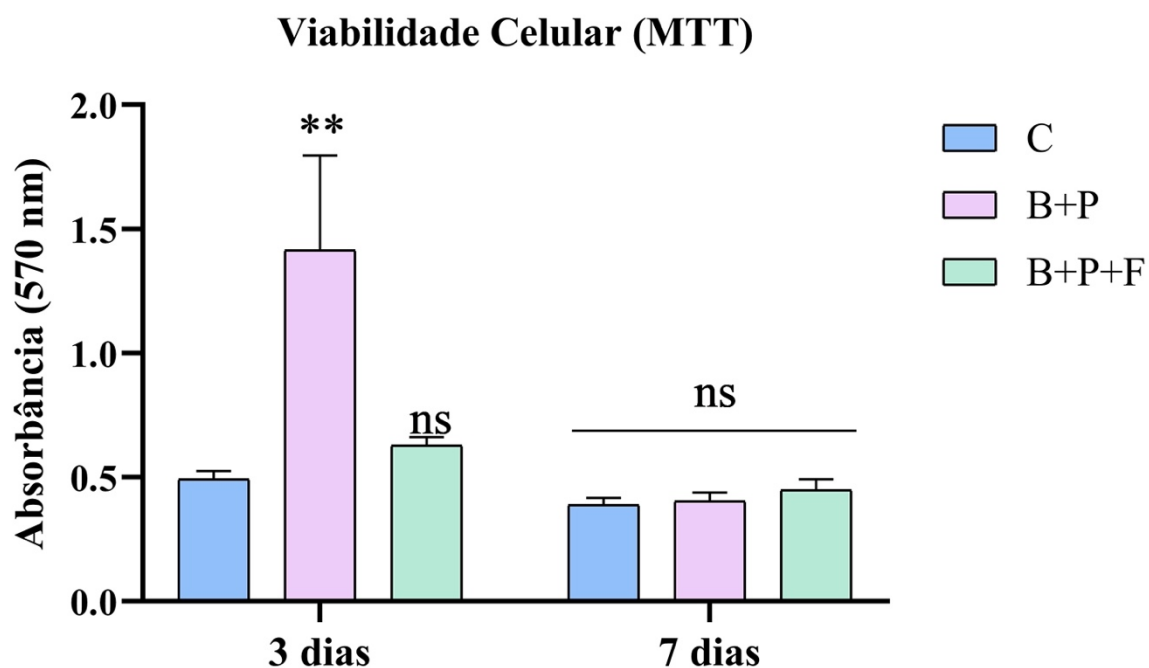
5.2 Análise *in vitro*

5.2.1 Determinação da viabilidade celular (citotoxicidade)

A viabilidade celular foi avaliada ao terceiro e sétimo dia (Figura 13), revelando que os biomateriais não foram citotóxicos, visto que todos os grupos demonstraram viabilidade celular acima de 30%, indicando uma viabilidade celular adequada. No período de 3 dias, algumas diferenças estatísticas foram identificadas: o grupo C vs. B+P ($p=0.001$), e B+P vs. B+P+F ($p=0.004$). No período de 7 dias, não houve diferença estatística significativa entre os grupos ($p>0.05$).

Na análise entre os períodos, constatou-se que o grupo B+P no terceiro dia apresentou uma viabilidade celular superior a todos os outros grupos do sétimo dia, exibindo o maior número de células viáveis.

Figura 13 – Gráfico representativo com a média e desvio padrão da avaliação da viabilidade celular no terceiro e sétimo dia de cultura celular



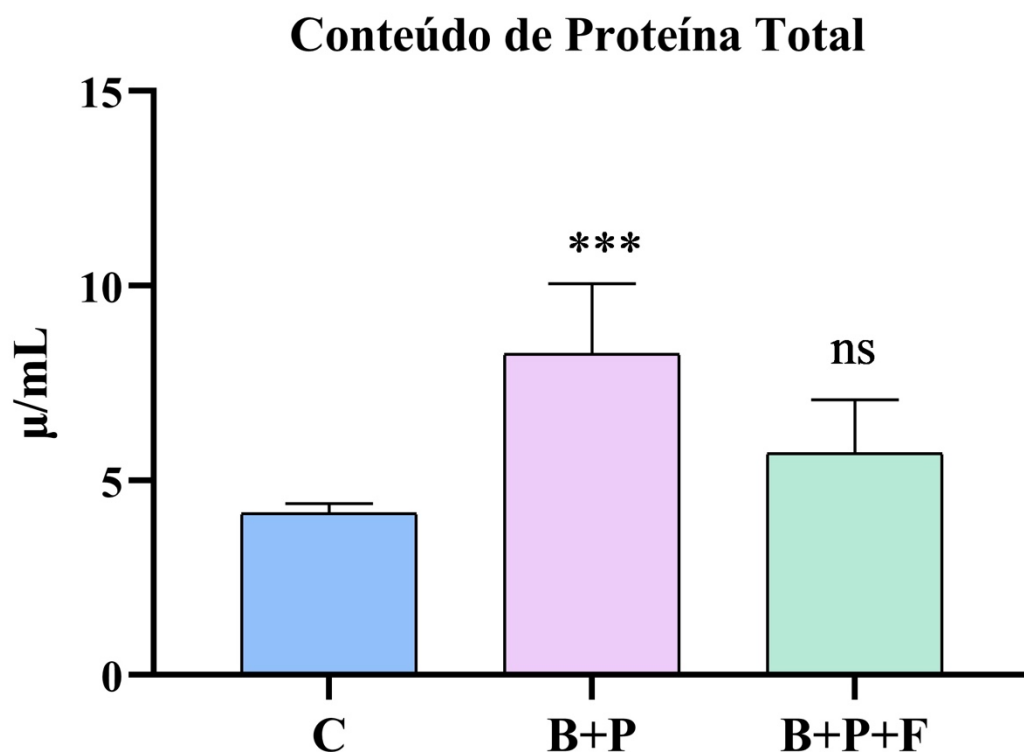
Legenda: ns significa sem diferença estatística; asterisco (**) B+P intragrupo representa a diferença estatísticas significativas, ANOVA – two way e Tukey ($p < 0.05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.2 Conteúdo de proteína total

Na avaliação do conteúdo de proteína total, foi analisada a atividade metabólica celular em todos os grupos, resultando em valores médios maiores nos grupos experimentais (Figura 14). Diferença estatística foram observadas entre C vs. B+P ($p=0.001$) e B+P vs. B+P+F ($p=0.02$). Além disso, o grupo B+P+F demonstrou maior quantidade de proteínas totais em comparação ao grupo C ($p > 0.05$). (Figura 14).

Figura 14 – Gráfico representativo com a média e desvio padrão da avaliação do conteúdo de proteína total ao décimo dia



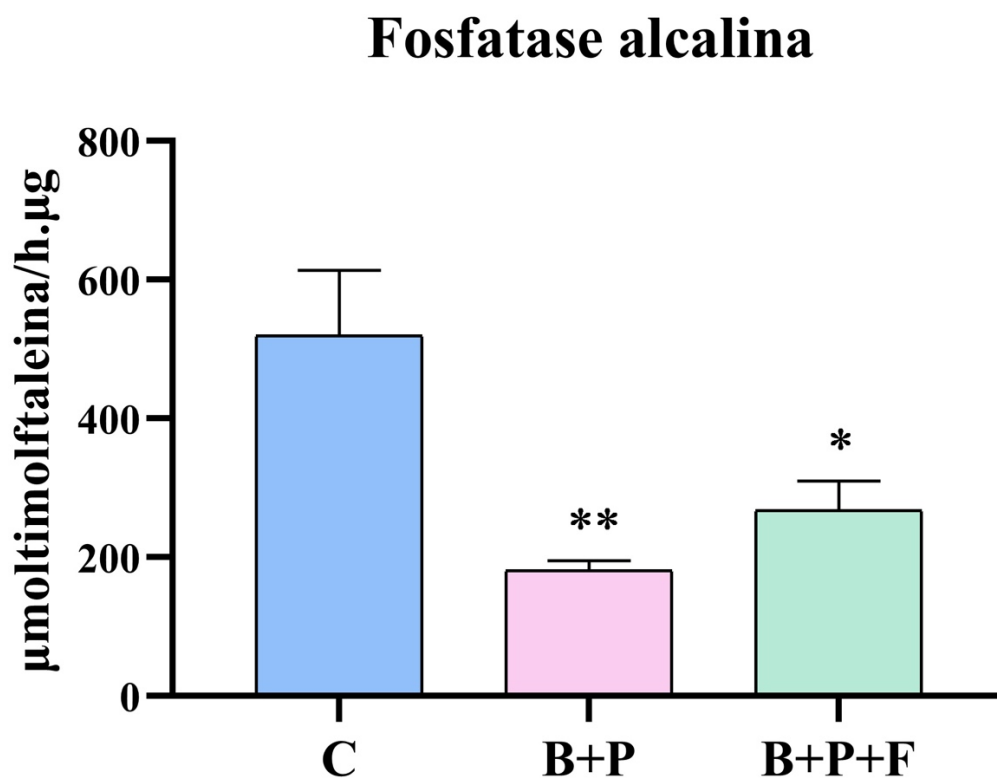
Legenda: ns significa sem diferença estatística; (***) asterisco representa diferenças estatísticas significativas, ANOVA – one way e Tukey ($p < 0.05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.3 Atividade de fosfatase alcalina

A atividade de fosfatase alcalina também foi avaliada ao décimo dia, exibindo diferenças estatísticas significativas entre os grupos C vs. B+P ($p=0.004$) e entre C vs. B+P+F ($p=0.02$). Contudo, não houve diferença estatística significativa entre os grupos dos biomateriais testados ($p>0.05$). Observou-se, entretanto, que a atividade de fosfatase alcalina foi maior no grupo controle e no grupo B+P+F (Figura 15).

Figura 15 – Gráfico representativo com média e desvio padrão da avaliação de atividade fosfatase alcalina



Legenda: Asterisco (**); (*) representa diferenças estatísticas significativas, ANOVA – one way e Tukey ($p < 0.05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 Análise *in vivo*

5.3.1 Avaliação histológica dos órgãos

Macroscopicamente os órgãos não apresentaram alteração em tamanho e contorno. Não houve alterações dos aspectos de normalidade como: sangramento e edema.

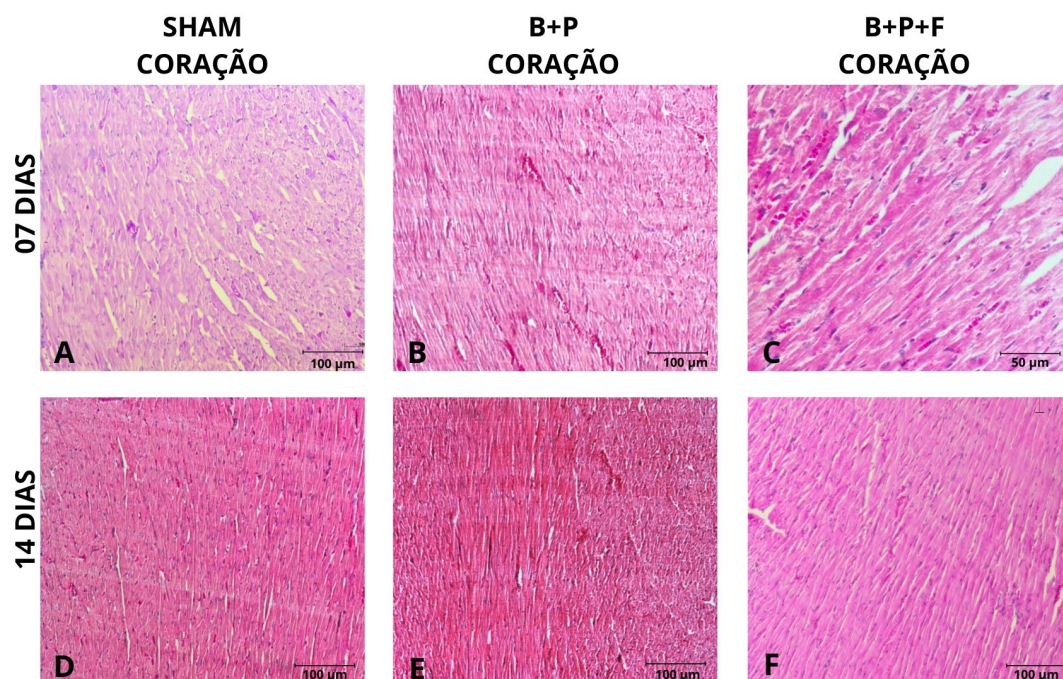
No coração dois animais do grupo B+P do período de 14 dias exibiram células inflamatórias crônicas e vasos turgidos. Em contrapartida, os outros animais de ambos os períodos apresentaram normalidade nas regiões do endocárdio, miocárdio e epicárdio. Observou-se também a presença de núcleos centrais claros nas fibras cardíacas, demonstrando atividade celular normal (Figura 16 A, B, C, D e F).

O rim apresentou normalidade tanto na zona cortical quanto na zona medular, sendo possível visualizar túbulos secretores e os corpúsculos de Malpihi na zona cortical. Ademias, na zona medular observou-se túbulos excretores (Figura 17 A, B, C, D e F).

Aspectos histológicos de normalidade também foi encontrado no baço exibindo duas regiões, a polpa branca e a vermelha. A polpa branca composta por folículos e tecido linfóide com a presença de uma artéria central. Já a polpa vermelha possui trabéculas linfóides por capilares sinusoides que também apresentaram normalidade (Figura 18 A, B, C, D e F).

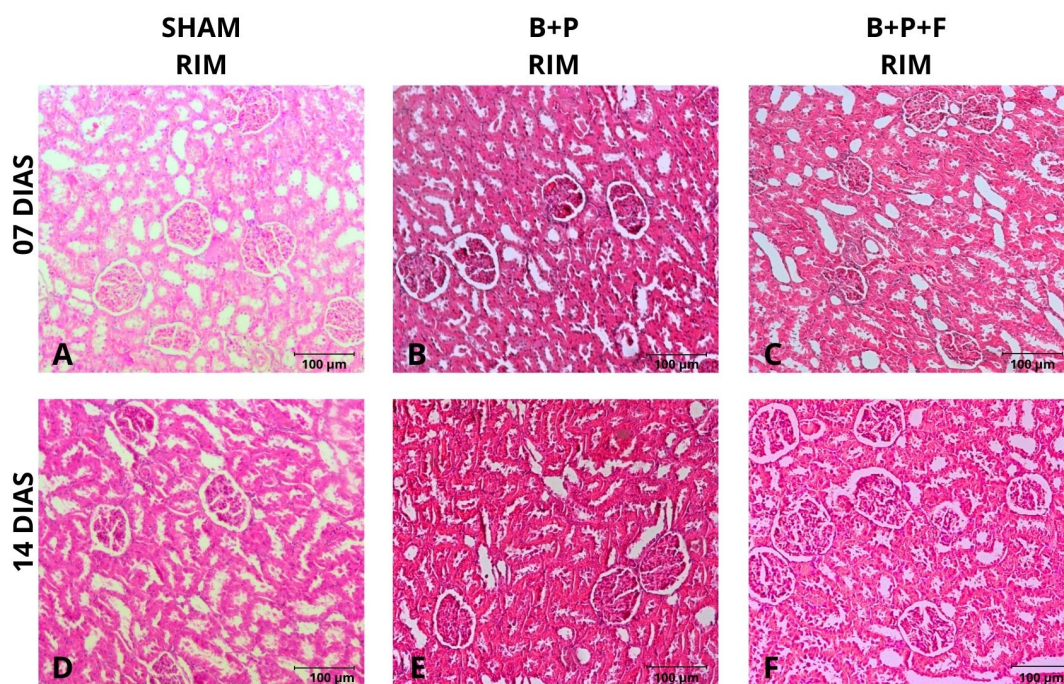
Finalizando com o fígado, onde analisamos normalidade do lóbulo hepático poligonais e nos hepatócitos. Observou-se a preservação dos capilares sinusoides, a presença da veia central, ducto biliar, artéria hepática, espaço porta-biliar e o ramo da veia porta, todos demonstrando aspectos de normalidade (Figura 19 A, B, C, D e F).

Figura 16 – Análise histológica do coração



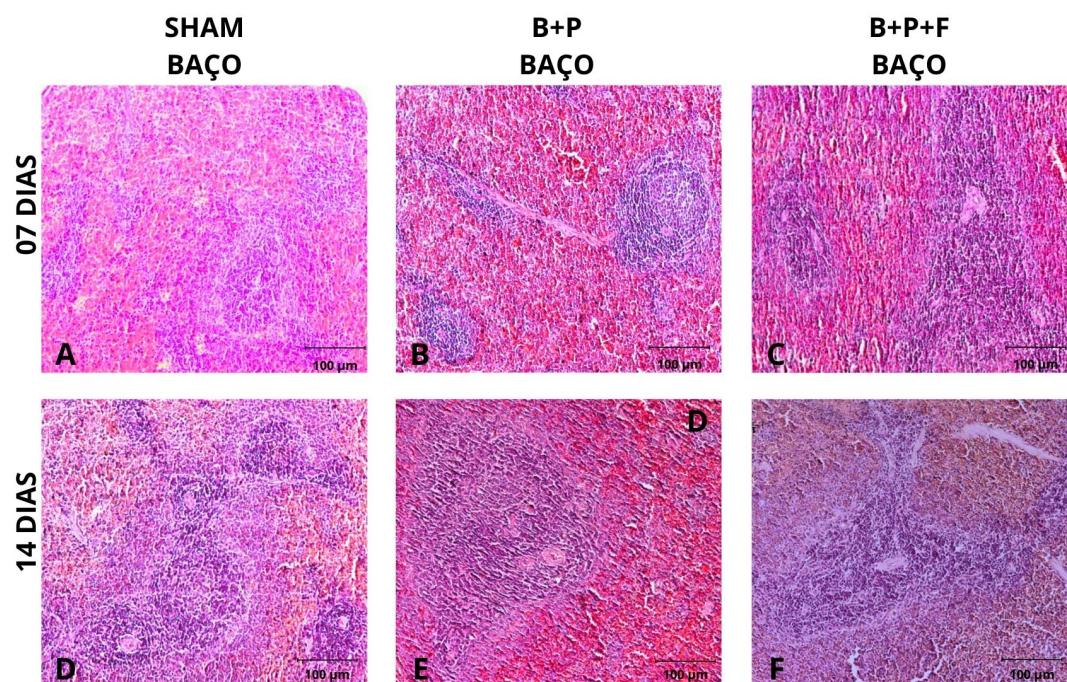
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 17 – Análise histológica do rim



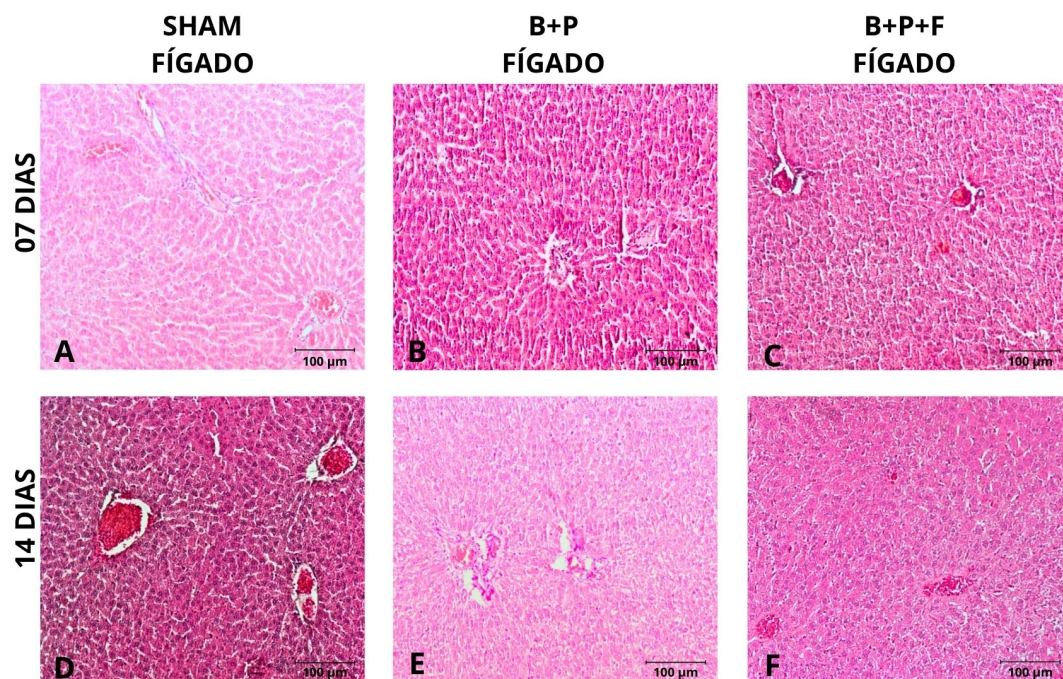
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 18 - Análise histológica do baço



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 19- Análise histológica do fígado



Fonte: Elaborado pelo autor.

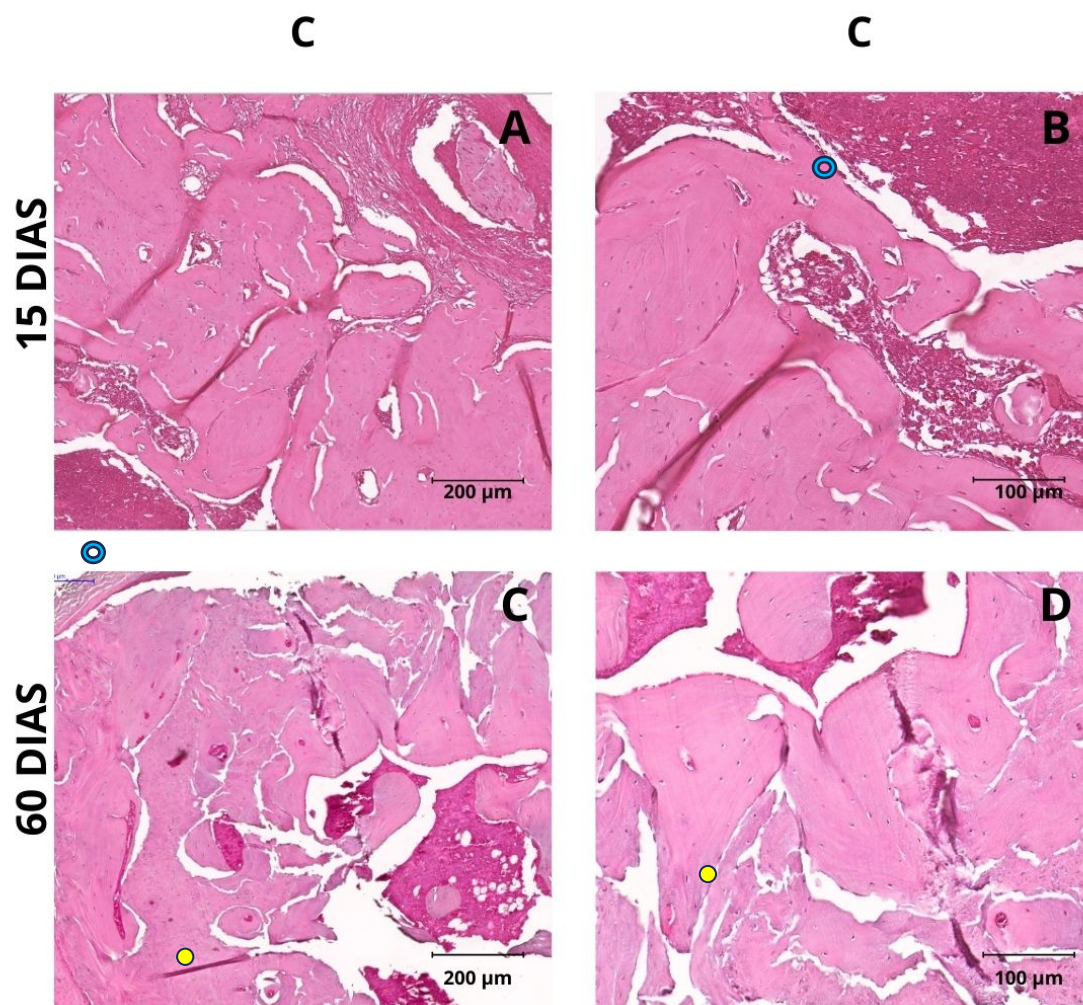
5.3.2 Análise da reparação óssea

Na análise histológica foi possível observar neoformação óssea na área do defeito de todos os grupos, indicando o início do reparo ósseo. Foram notados sinais de remodelação do tecido ósseo em ambos os períodos. No período pós-operatório de 15 dias, observou-se a presença de formação de trabeculado ósseo com pontes de neoformação. No entanto, não se pode afirmar que houve o fechamento completo da região devido à presença de tecido conjuntivo frouxo e delgado (Figura 20A e 20B). Neste mesmo período não houve sinais de inflamação e infecção do tecido. Nas imagens (Figuras 21A e 21B), verificou-se a presença de partículas do biomaterial na área do defeito. No grupo B+P+F, foram observadas partículas do biomaterial entre as pontes ósseas por ele formado, indicando que não houve a degradação completa do biomaterial (Figura 22A; 22B; 22C e 22D). Além disso, os espaços vazios e de contorno geométricos representam o espaço anteriormente ocupado pelo vidro bioativo. Em relação às células de tecido ósseo presente, foram visualizadas áreas de osso imaturo neoformado, que formaram ponte ósseas (Figura 21A; 21B; 22A e 22B).

Nos espécimes do período de 60 dias, houve formação de pontes ósseas mais nítidas, sugerindo aumento da espessura de tecido ósseo neoformado em comparação aos grupos experimentais de 15 dias, mesmo no grupo controle (Figuras 20C, 20D, 21C; 21D, 22C e 22D). Observa-se área de matriz óssea mais organizada com presença de osteócitos (Figura 21C). No entanto, nas figuras 22C e 22D, mesmo com a presença de partículas de biomaterial, observaram-se ponte ósseas, embora, não tenha ocorrido o fechamento completo da área do defeito.

Os grupos experimentais apresentaram semelhança no desenvolvimento do reparo ósseo, com a formação inicial de um tecido conjuntivo frouxo que evoluiu para um tecido mineralizado envolvendo os grânulos dos biomateriais testados. Assim, indica-se que ambos os biomateriais são responsáveis pela indução de tecido ósseo.

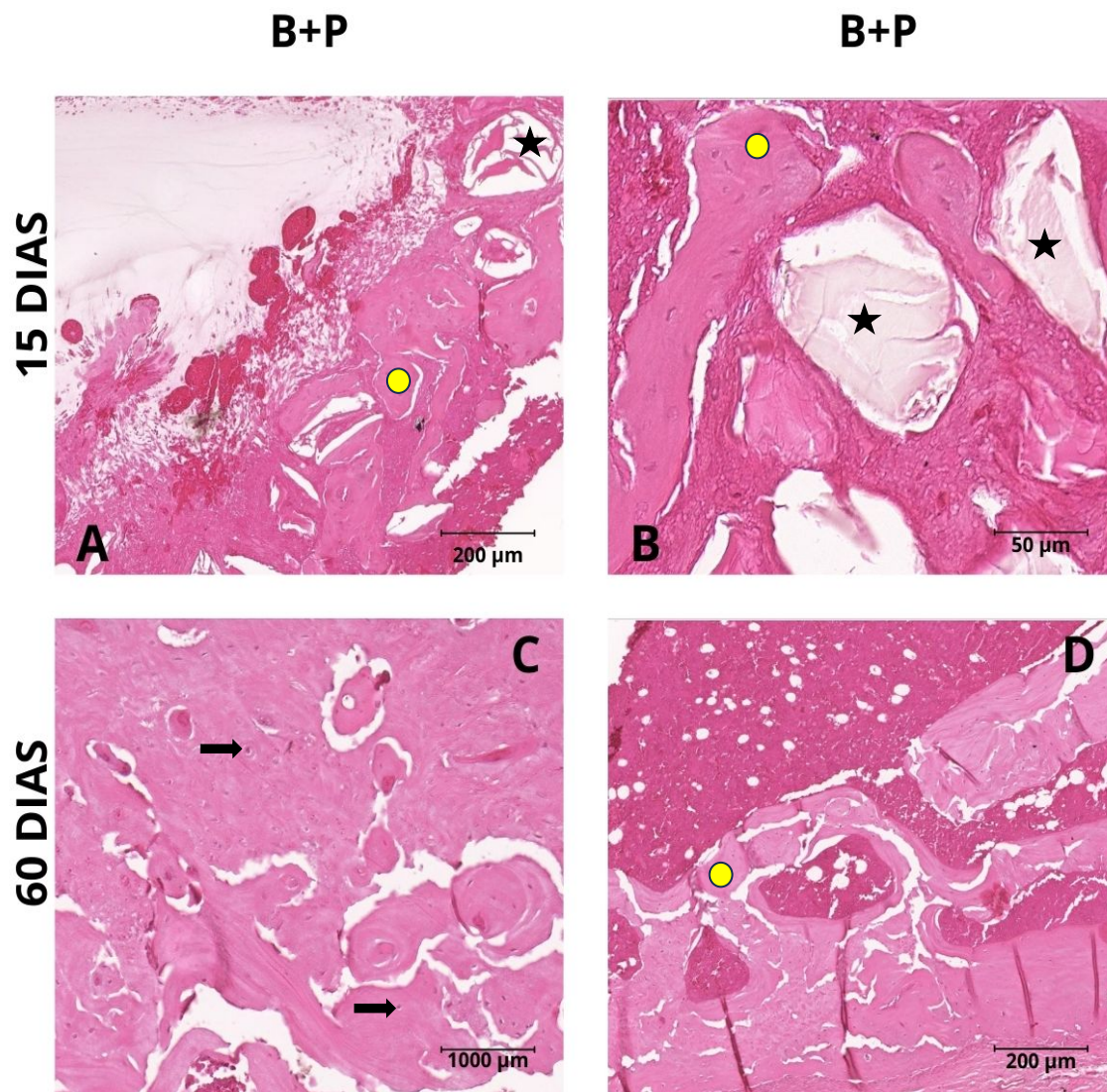
Figura 20 – Fotomicrografia do corte histológico na área do defeito do grupo C nos períodos de 15 e 60 dias



Legenda: (●) Tecido conjuntivo frouxo e delgado; (●) osso neoformado.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 21 – Fotomicrografia do corte histológico na área do defeito do grupo B+P nos

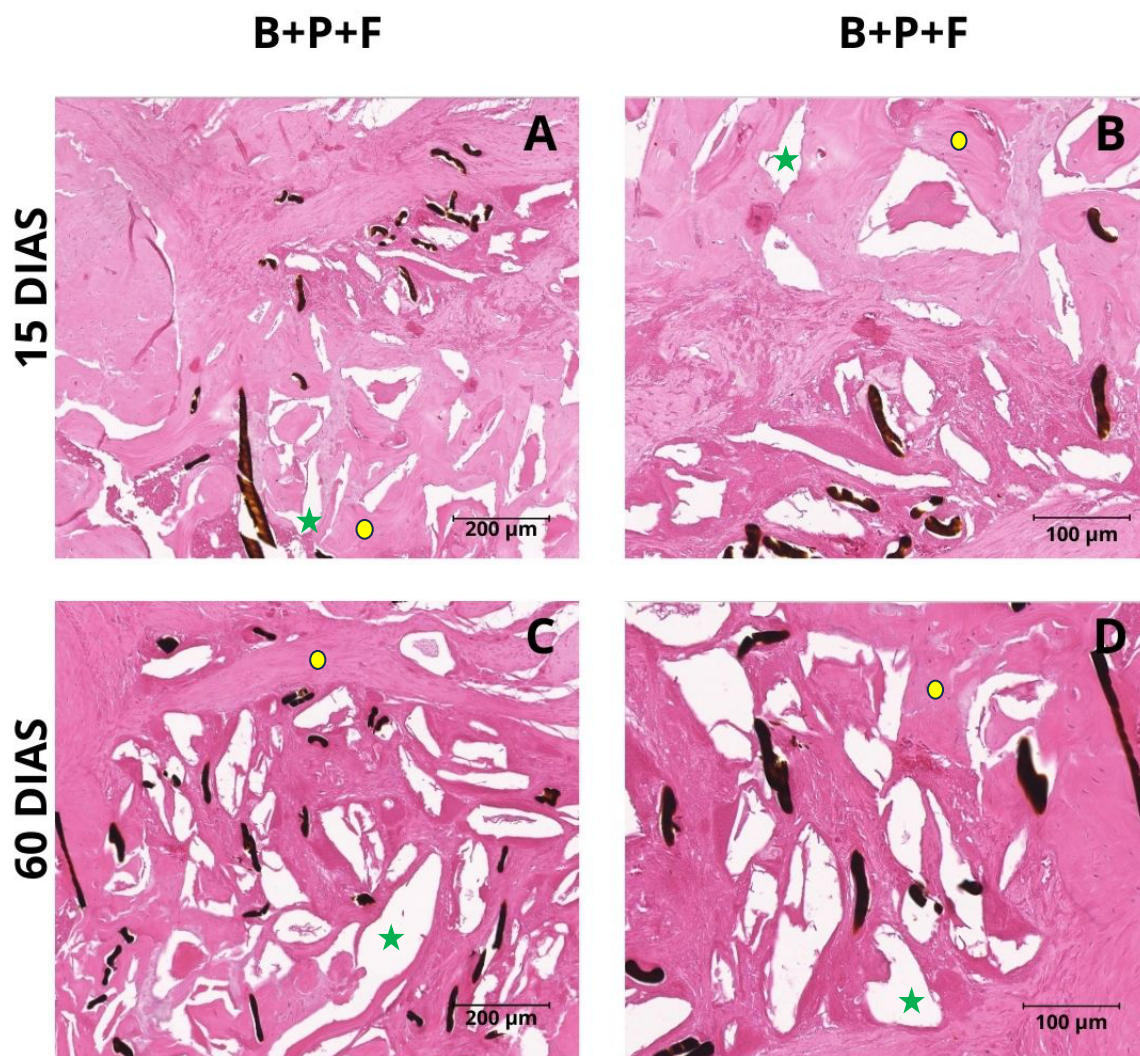
períodos de 15 e 60 dias



Legenda: (★) Partículas do biomaterial; (●) osso neoformado; (➡) Osteócitos.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 22 - Fotomicrografia do corte histológico na área do defeito do grupo B+P+F

nos períodos de 15 e 60 dias



Legenda: (★) Espaços geométricos; (●) osso neoformado.
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.3 Avaliação por microtomografia computadorizada tridimensional

(microCT)

A microCT foi realizada na Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, utilizando o microtomógrafo computadorizado de raios-x (SMX90CT). Logo após foram reconstruídas por meio de um software de imagem (VGStudio 3.5), onde foi escolhida a área de reconstrução, e posteriormente delimitada a principal área de interesse com faixa de níveis de cinza padronizada. A partir da segmentação foi padronizada uma Região de Interesse (ROI), na qual foram calculados os parâmetros morfométricos e o volume de osso em cada defeito (Tabela 3 e 4) (Figura 23).

Os valores de média e desvio padrão para as modalidades de tratamento em 15 e 60 dias estão apresentados nas tabelas 3 e 4, respectivamente.

Tabela 3 – Valores de média e desvio padrão dos dados obtidos por microCT a partir dos espécimes para o período de 15 dias

Parâmetros	C	B	B+N	B+N+F
Volume (mm³)	3,50±0,68	5,70±1,82	4,94±2,42	6,73±3,46
bv/tv (mm³)	0.34 ± 0.14	0.36 ± 0.15	0.41 ± 0.21	0.38 ± 0.19
bs/bv (mm⁻¹)	20.25 ± 5.44	23.00 ± 4.72	20.71 ± 1.70	19.59 ± 4.88
tb.th (mm⁻¹)	0.11 ± 0.04	0.09 ± 0.02	0.12 ± 0.04	0.11 ± 0.02
tb.n (mm⁻¹)	3.61 ± 1.69	3.86 ± 1.28	4.23 ± 2.10	3.61 ± 1.54
tb.Sp (mm)	0.17 ± 0.07	0.20 ± 0.14	0.14 ± 0.14	0.28± 0.33

Legenda: Dados obtidos por MicroCT para o período de 15 dias, representados estão em média e desvio padrão.

Volume: volume ósseo

bv/tv: volume ósseo/fração de volume ósseo

bs/bv: superfície óssea/volume ósseo

tb.th: espessura trabecular

tb.n: número de trabéculas

tb.Sp: espaço entre as trabéculas

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 4 – Valores de média e desvio padrão dos dados obtidos por microCT a partir dos espécimes para o período de 60 dias

Parâmetros	C	B	B+N	B+N+F
Volume (mm³)	3,91±0,15	6,22±1,04	7,25±2,33	6,48±3,25
bv/tv (mm³)	0.55 ± 0.17	0.55 ± 0.14	0.58 ± 0.20	0.46 ± 0.21
bs/bv (mm⁻¹)	12.86 ± 13.05	12.07 ± 4.18	10.71 ± 2.74	10.74 ± 2.82
tb.th (mm⁻¹)	0.28 ± 0.19	0.19 ± 0.07	0.19 ± 0.04	0.20 ± 0.04
tb.n (mm⁻¹)	2.78 ± 1.83	3.07 ± 0.43	3.07 ± 1.18	2.45 ± 1.19
tb.Sp (mm)	0.18 ± 0.07	0.15 ± 0.04	0.20 ± 0.23	0.33 ± 0.29

Legenda: Dados obtidos por MicroCT para o período de 60 dias, representados estão em média e desvio padrão

Volume: volume ósseo

bt/tv: volume ósseo/fração de volume ósseo

bs/bv: superfície óssea/volume ósseo

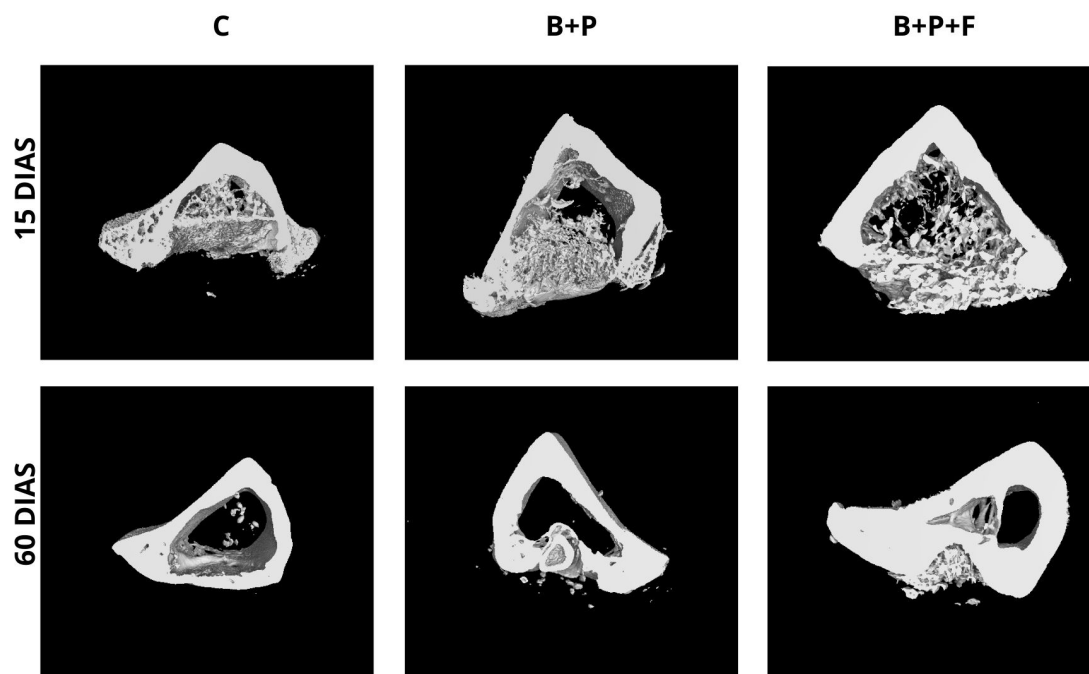
tb.th: espessura trabecular

tb.n: número de trabéculas

tb.Sp: espaço entre as trabéculas

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 23 – Imagens de Micro-CT em cortes transversais dos defeitos ósseos



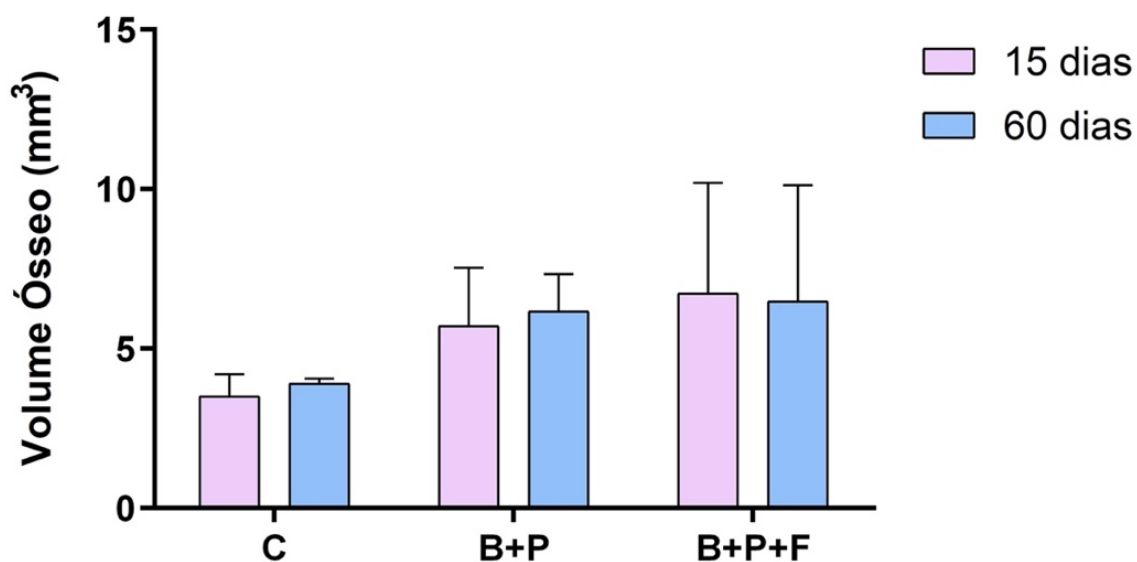
Fonte: Elaborado pelo autor.

As análises estatísticas significativas obtidas pela análise estatística inferencial estão descritas a seguir.

Para os seguintes parâmetros: volume ósseo, espessura trabecular (*tb.th*), número de trabéculas (*tb.n*), espaço entre as trabéculas (*tb.sp*), espaço entre as trabéculas (*tb.sp*) e % de volume ósseo – fração óssea (*bv/tv*) não houve diferença estatística significativa entre os grupos, com isso, as modalidades dos tratamentos não apresentaram influência significativa na reparação óssea, nem mesmo entre os períodos de tempos analisados ($p>0.05$) (Figuras 24, 25, 26, 27, 28 e 29).

Entretanto na análise estatística de comparações intergrupos o parâmetro de superfície óssea/volume ósseo (*bs.bv*) foram notadas algumas diferenças estatísticas: 15 dias B+P vs 60 dias B+P ($p=0.0017$), 15 dias B+P+F vs 60 dias (B+P+F $p=0.0027$), indicando maior espessura óssea, ou maior complexidade óssea para todas as modalidades de tratamento em 60 dias (Figura 30).

Figura 24 – Dados obtidos por Micro-CT para os grupos de 15 e 60 dias, avaliando o volume ósseo



Legenda: Comparações entre os períodos e os grupos ANOVA – dois fatores, teste Tukey $p<0.05$.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 25 - Dados obtidos por MicroCT para os grupos de 15 e 60 dias, avaliando a espessura trabecular (tb/th)

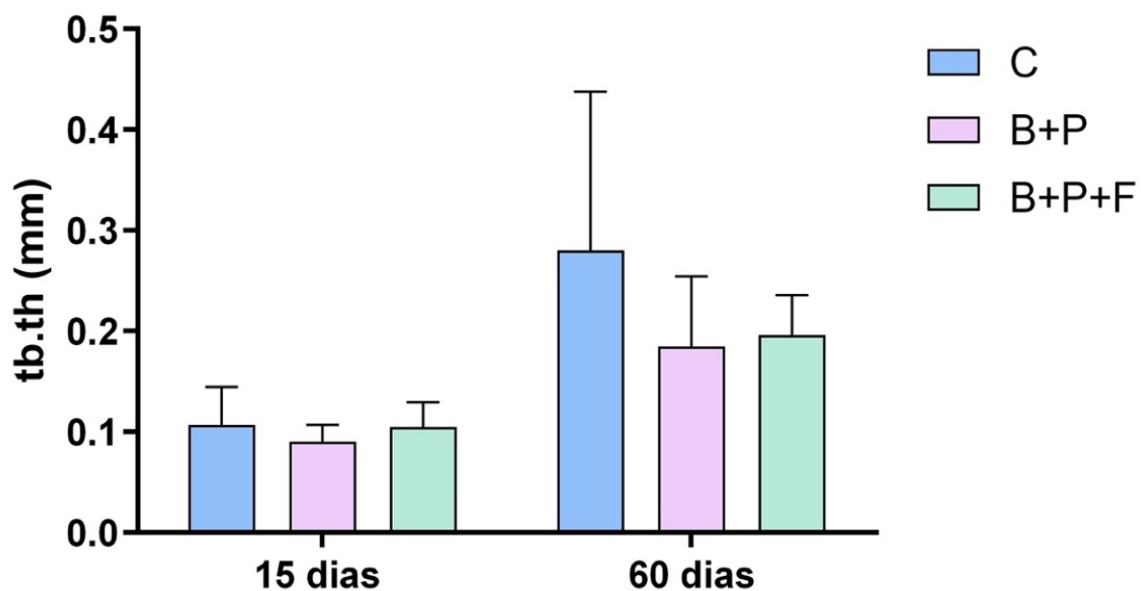
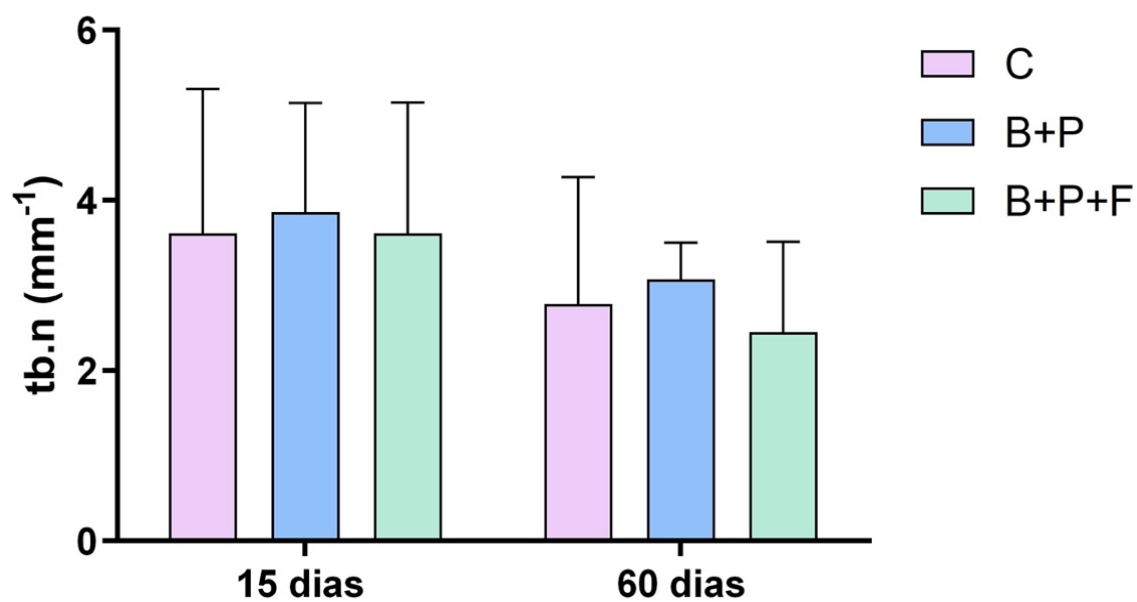


Figure Legenda: Comparações entre os períodos e os grupos ANOVA – dois fatores, teste Tukey $p < 0.05$.

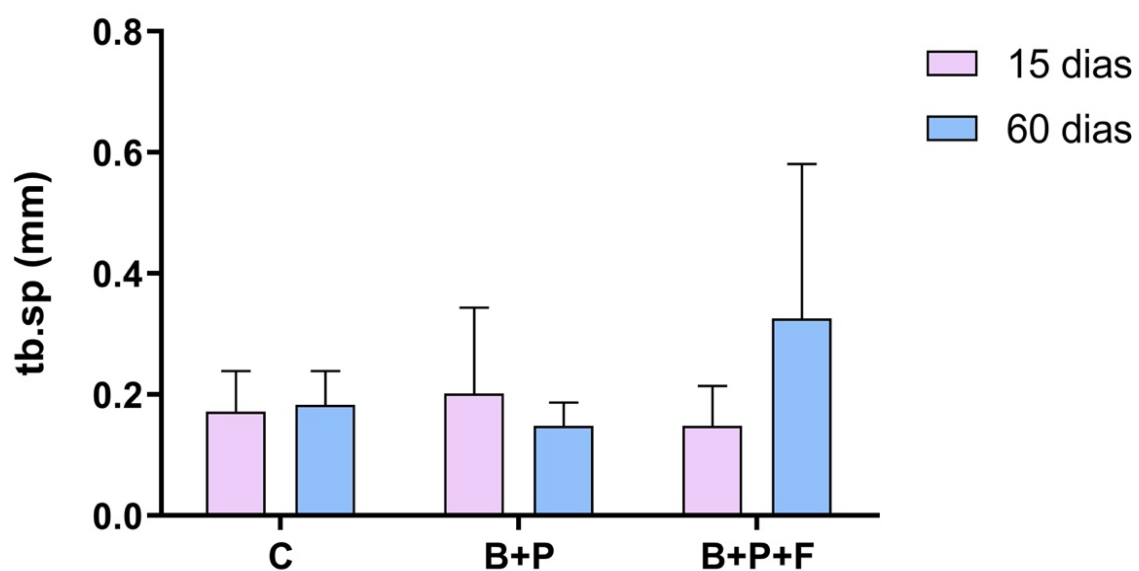
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 26- Dados obtidos por MicroCT para os grupos de 15 e 60 dias, avaliando número de trabéculas (*tb.n*)



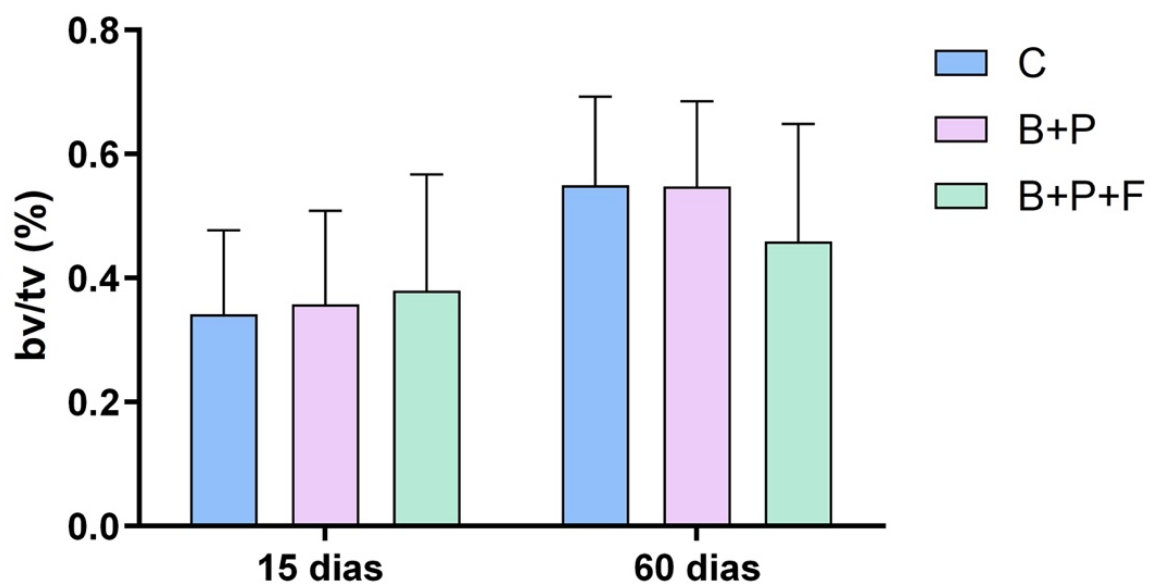
Legenda: Comparações entre os períodos e os grupos ANOVA – dois fatores, teste Tukey $p < 0.05$.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 27 - Dados obtidos por MicroCT para os períodos de 15 e 50 dias, avaliando a separação trabecular (*tb.sp*)



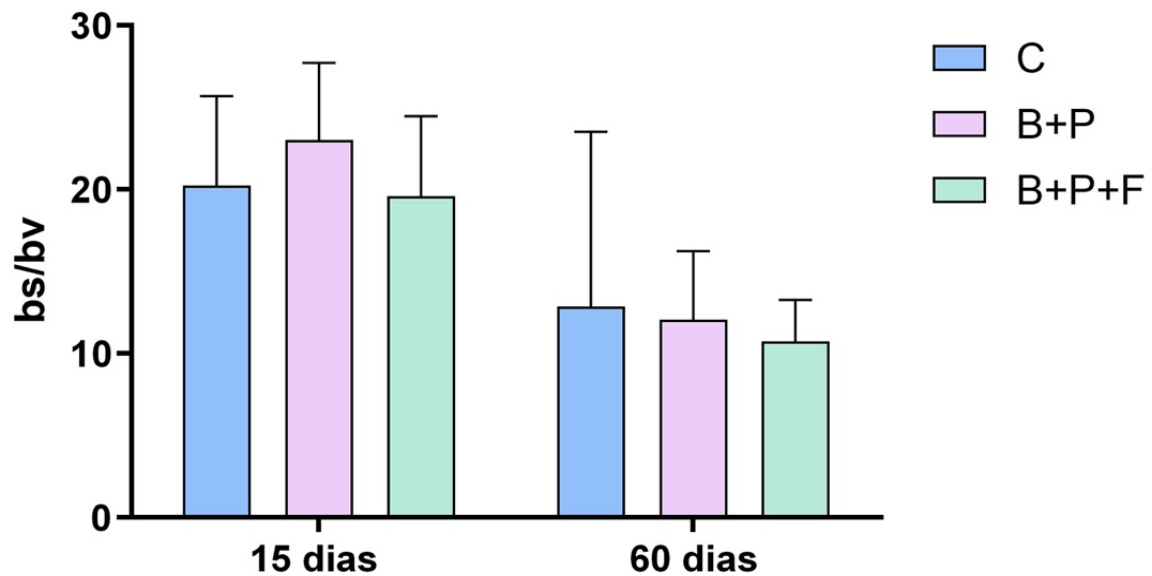
Legenda: Comparações entre os períodos e os grupos ANOVA – dois fatores, teste Tukey $p < 0.05$.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 28 - Dados obtidos por MicroCT para os grupos de 15 e 60 dias, avaliando o volume ósseo/fração de volume ósseo (bv/tv)



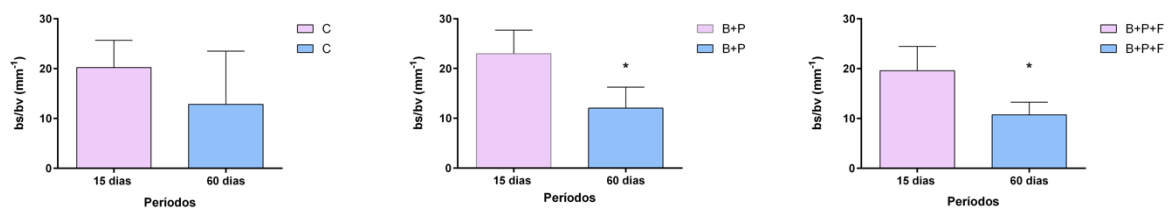
Legenda: Comparações entre os períodos e os grupos ANOVA – dois fatores, teste Tukey $p < 0.05$.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 29 - Dados obtidos por MicroCT para os grupos de 15 e 60 dias, avaliando a superfície óssea/volume ósseo (bs/bv)



Legenda: Comparações entre os períodos e os grupos ANOVA – dois fatores, teste Tukey $p < 0.05$.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 30 - Dados obtidos por MicroCT para os grupos de 15 e 60 dias, avaliando a superfície óssea/volume ósseo (bs/bv)

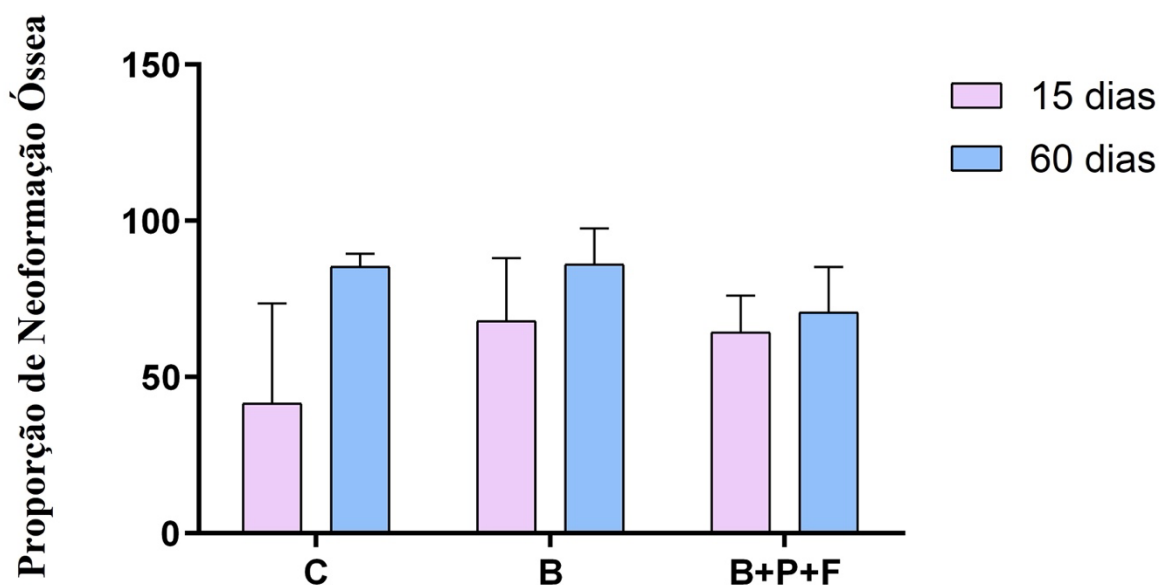


Legenda: Asterisco (*) representa diferenças estatísticas significativas, comparações intergrupos teste T $p < 0.05$.
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.4 Análise histomorfométrica

A análise histomorfométrica foi realizada, com a intenção de avaliar quantitativamente a extensão da ponte óssea. Podemos observar que a área onde houve formação de ponte óssea são semelhantes em ambos os grupos (Figura 15). Com isso, na análise intergrupo em ambos os períodos, 15 e 60 dias não houve diferença estatística no parâmetro de Neoformação óssea (NA), sendo estatisticamente semelhantes entre si ($p>0,05$). Além disso, no período de 60 dias ambos os grupos apresentaram médias semelhantes (Figura 31).

Figura 31 – Gráfico representativo da comparação da proporção de neoformação óssea



Legenda: Comparações entre os períodos e os grupos ANOVA – dois fatores, teste Tukey $p<0.05$.
Fonte: Elaborado pelo autor.

6 DISCUSSÃO

O desafio da engenharia tecidual óssea é de desenvolver um biomaterial ideal que promove a formação de um novo osso com uma resistência adequada. Posto isto, o objetivo do presente estudo foi de desenvolver e avaliar um vidro bioativo associado com polímero e fibra de carbono, vistas à obtenção de material com potencial de enxerto ósseo sintético.

O biovidro é considerado um material promissor, devido à sua degradabilidade controlável e tendência a estimular a formação de novos tecidos (Kumari et al., 2022; Vafa et al., 2021). A composição original, padrão do biovidro 45S5 é de; 45%-SiO₂, 24,5%-Na₂O, 24,5%-CaO e 6%- P₂O₅ (Hench 2006), o qual se difere dos biomateriais testados, pois foi possível observar, por meio da análise química XPS, os picos de selênio e de bório.

Considerando os elementos diversos apresentados no vidro bioativo estudado, o selênio é um oligoelemento, o qual tem um papel crucial na regulação da proliferação e diferenciação de células-tronco (Zhou et al., 2023). Estudos sugerem que suplementação à base de selênio pode ser utilizada como estimulador de tecido ósseo (Hu et al., 2020). O bório também é considerado um oligoelemento, sendo utilizado para reparo e substituição óssea (Hoppe et al., 2011; Zeimaran et al., 2015). Ademais, quando associado ao biovidro desempenha um papel importante no aumento da proliferação de osteoblastos (Wu et al., 2011).

Em contrapartida na análise do EDS não foi detectada a presença de selênio e bório. Isso pode ser explicado pela variação de sensibilidade entre as diferentes técnicas utilizadas. Visto que a análise XPS mede a química com uma profundidade de 10nm, aumentando sua sensibilidade exponencialmente em direção à superfície (Chen 2006).

No presente estudo, foram realizados testes *in vitro* em células-troncos mesenquimais da medula óssea alveolar provenientes de ratos machos adultos para avaliar a viabilidade celular. Testes de citotoxicidade são considerados cruciais no desenvolvimento de um biomaterial, uma vez que sua função é avaliar a viabilidade das células em relação as amostras, portanto, é um teste precursor para a toxicidade

humana e para a triagem geral de produtos químicos (Clemedson e Ekwall, 199; Scheers et al., 2001).

Os materiais são considerados citotóxicos quando a viabilidade celular é reduzida em mais de 30% ISO 10993-5 (Barrioni et al., 2019; Naruphontjirakul et al., 2018). Nos diferentes períodos testados (3 e 7 dias), os biomateriais não foram tóxicos. No período mais longo, houve uma redução da viabilidade celular dos grupos experimentais, similar ao estudo De Araújo et al 2023, que avaliou o biovidro 45S5 incorporado com o fármaco teriparatida em células mesenquimais e apresentou viabilidade celular mais atenuada em períodos mais longos.

A adsorção de proteína é uma análise fundamental, pois determina as funções celulares em relação ao biomaterial. Com isso, foi possível observar que o grupo B+P apresentou diferença estatística em relação à adsorção de proteína, coincidindo com o estudo de Misra et al., 2008, que demonstrou maior adsorção de proteínas em nanopartículas de biovidro combinado com um polímero natural. Entretanto, o grupo B+P+F não apresentou um resultado tão satisfatório, possivelmente devido à disposição das partículas de vidro bioativo nas fibras, as quais podem estar distribuídas de forma menos uniforme, não estando presente em toda a superfície da fibra ou localizadas no interior, deste modo, não promovendo contato com as células (Fraczek-Szczypta et al., 2015).

Osteoblastos são células responsáveis pela deposição de matriz óssea, e o processo de formação óssea é denominado osteogênese. Dessa maneira, é essencial que o biomaterial provoque tal processo, utilizando-se um marcador como a fosfatase alcalina para tal. Neste estudo, os materiais experimentais não influenciaram a atividade de fosfatase alcalina ao décimo dia. Isso pode estar relacionado com o tempo de análise, visto que o estudo Farwa et al., 2023 utilizou vidro bioativo com dois tipos de polímeros sintéticos em diversas quantidades e carregados de irisina, tais grupos só exibiram aumento estatisticamente significativo de ALP aos quatorze dias.

Um dos pilares para a obtenção de um biomaterial ideal é apresentar uma biocompatibilidade *in vivo*, ou seja, não provocar inflamações agudas e nem crônicas. Com isso, em complementação aos ensaios *in vitro* foi realizada a implantação do biomaterial no dorso dos animais para avaliação da resposta inflamatória em dois períodos: 7 e 14 dias. Além disso, materiais à base de carbono podem estar relacionados à toxicidade sistêmica aguda no hospedeiro (Maciel et al., 2023; Li et al.,

2019). O selênio, quando presente em concentração acima do necessário, passa a ter efeito prejudicial (Hu et al., 2020). Assim, neste estudo, foram removidos os rins, coração, fígado e baço para análise histológica. Logo após a remoção, não foi observado edema ou sangramentos em excesso nos órgãos, indicando que os grupos experimentais demonstraram normalidade. A estrutura celular e parênquimas dos órgãos coincidiram com as do grupo controle, sugerindo que os materiais testados não causaram toxicidade aguda e nem sistêmica nos animais (Maciel et al., 2023).

Quanto aos ensaios *in vivo* em tibia, para a avaliação da reparação óssea, na análise histológica descritiva, no período de 15 dias observou menor quantidade de tecido ósseo neoformado. Em relação ao período de 60 dias, notou-se um aumento da espessura de tecido ósseo neoformado, pois ocorreu o fechamento do defeito em todos os grupos, exceto no grupo B+P+F. Isso pode estar relacionado com a disposição das partículas cerâmicas nas fibras e com a fraca adesão interfacial entre a superfície da fibra de carbono e as moléculas do polímero, causada pela hidrofobicidade e inércia química do carbono, ou seja, é necessário realizar tratamentos químicos na superfícies da fibra de carbono para melhorar suas propriedades mecânicas e biológicas (Wu et al., 2022; Sharma et al., 2014). Ademais, as fibras de carbono, quando usadas como suporte para regeneração de tecidos, podem permanecer nos novos tecidos mesmo após a regeneração estar completa. Isso explica a presença de fibras de carbonos nos defeitos em ambos os períodos (Aoki et al., 2009).

A capacidade de regeneração óssea é uma característica essencial para que um biomaterial seja classificado como promissor. Uma forma de analisar a qualidade e quantidade óssea por ele formada é por meio da microtomografia computadorizada. Embora seja uma análise precisa e considerada padrão-ouro, ela não deve ser utilizada como um indicador isolado, pois a qualidade óssea também está diretamente relacionada ao sucesso clínico dos tratamentos (Balbinot et al., 2019; Parsa et al., 2015). As análises do presente estudo abrangeram os seguintes parâmetros: complexidade, volume e densidade óssea.

Apesar dos grupos testados não terem se sobressaído frente a outro, estudos devem ser desenvolvidos, com o propósito de aperfeiçoar o biomaterial. Uma vez que no estudo de Zhang et al., 2023, foi desenvolvido um *scaffold* de vidro bioativo com mesoporos funcionalizado com partículas nanométricas de fosfato tricálcico, o qual

demonstrou aumento significativo na formação e crescimento de novos ossos em defeitos críticos. Com isso, comparando-se ao grupo controle, o qual era realizado apenas o defeito crítico e ao grupo do vidro bioativo com mesoporos., foi possível observar aumento nos parâmetros de percentual de volume ósseo – fração óssea (*bv/tv*) e densidade mineral óssea (*DMO*) no grupo de vidro bioativo com mesoporos funcionalizado com partículas nanométricas de fosfato tricálcico.

Na análise hismorfométrica intragrupo, observou-se a neoformação óssea. Em ambos os períodos, não houve diferença estatística ($p>0,05$). Esses resultados correspondem ao estudo de Li et al., (2019), o qual implantou cerâmica bioativa revestida com o polímero sintético policaprolactona contendo nanopartículas de vidros bioativos em tíbias de ovinos. O estudo demonstrou formação óssea no local do defeito, sem diferenças significativas entre os grupos. Em contrapartida, o estudo de Zheng et al., (2023), desenvolveu um hidrogel composto de vidro bioativo com mesoporos, fibroína de seda e alginato de sódio, com objetivo de reparar defeitos ósseos lacunares. Quando comparado ao biomaterial constituído apenas por fibroína de seda, o hidrogel com vidro bioativo, mesoporos, fibroína de seda e alginato de sódio apresentou diferenças estatísticas, resultando em maior neoformação óssea.

Polímeros naturais e sintéticos estão sendo amplamente combinados com cerâmicas bioativas e vidros bioativos para aprimorar a reparação óssea (Vahidi et al., 2024), uma vez que esses materiais possuem propriedades biocompatíveis e resistência mecânica (Kashirina et al., 2019). No entanto, os polímeros naturais podem ter sua estrutura comprometida quando exposto a altas temperaturas. Assim, como a técnica de desenvolvimento do biomaterial foi por meio de fusão, envolvendo altas temperaturas, consequentemente infere-se que influenciou negativamente as propriedades finais do biomaterial (Kashirina et al., 2019). Uma vez que no estudo de Zheng et al., (2023), obteve resultados satisfatórios em relação à regeneração óssea *in vivo*, utilizando o método de fundição de solvente-lixiviação, que não envolve aquecimento na produção do biomaterial. Além disso, este era composto por vidro bioativo e alginato, um polímero natural.

Considerando as limitações do estudo e pelo comportamento apresentado pelas modalidades de tratamento, sugere-se que, para explorar o potencial de aplicação clínica deste novo biomaterial, sejam realizadas modificações em sua formulação e/ou composição, além de novos estudos. Essas ações são necessárias

para viabilizar e proporcionar perspectivas futuras de uma melhor resposta em relação à biologia óssea, elucidando sua resistência mecânica. No entanto, este estudo pode ser visto como o primeiro passo para o desenvolvimento de um biomaterial nacional, inovador, com potencial para enxerto ósseo sintético, que ainda pode ser aprimorado até que seu desempenho pleno seja alcançado.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados, conclui-se que o biomaterial demonstrou biocompatibilidade celular e sistêmica, além de demonstrar propriedades osteoindutoras devido à presença de neoformação óssea, principalmente nos períodos iniciais do processo de reparação. Embora as modalidades de tratamentos testadas tenham propriedades de promoção óssea, para a proposta de um novo vidro bioativo associado ao polímero e funcionalizado com fibra de carbono, novos estudos devem ser realizados para melhor elucidar a biocompatibilidade óssea e a resistência mecânica, sendo necessário aperfeiçoar o processo de síntese do biomaterial para sua aplicação clínica.

REFERÊNCIAS

- Abbasi Z, Bahrololoum ME, Bagheri R, Shariat MH. Characterization of the bioactive and mechanical behavior of dental ceramic/sol–gel derived bioactive glass mixtures. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2016 Feb;54:115–22.
- Ali M, Ume Farwa, Park SS, Kim YS, Lee BT. Physico-biological and in vivo evaluation of irisin loaded 45S5 porous bioglass granules for bone regeneration. *Biomaterials advances*. 2023 Apr 1;147:213326–6.
- Aoki K, Haniu H, Kim YA, Saito N. The Use of Electrospun Organic and Carbon Nanofibers in Bone Regeneration. *Nanomaterials*. 2020 Mar 20;10(3):562.
- Aoki K, Usui Y, Narita N, Nobuhide Ogiwara, Norio Iashigaki, Nakamura K, et al. A Thin Carbon-Fiber Web as a Scaffold for Bone-Tissue Regeneration. *Small*. 2009 Jun 30;5(13):1540–6.
- B Aksakal, M Demirel. In vitro study of antimicrobial and cell viability on newly synthesized bioglass-based bone grafts: Effects of selenium and silver additions. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers Part H, Journal of engineering in medicine*. 2018 Sep 7;232(10):1039–47.
- Baino F, Hamzehlou S, Kargozar S. Bioactive Glasses: Where Are We and Where Are We Going? *Journal of Functional Biomaterials*. 2018 Mar 19;9(1):25.
- Baino F, Novajra G, Miguez-Pacheco V, Boccaccini AR, Vitale-Brovarone C. Bioactive glasses: Special applications outside the skeletal system. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 2016 Jan;432:15–30.
- Baino F, Novajra G, Vitale-Brovarone C. Bioceramics and Scaffolds: A Winning Combination for Tissue Engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2015 Dec 17;3.
- Bernabé PFE, Melo LGN, Cintra LTA, Gomes-Filho JE, Dezan Jr E, Nagata MJH. Bone healing in critical-size defects treated with either bone graft, membrane, or a combination of both materials: a histological and histometric study in rat tibiae. *Clinical Oral Implants Research*. 2011 Mar 28;23(3):384–8.
- Bharadwaz A, Jayasuriya AC. Recent trends in the application of widely used natural and synthetic polymer nanocomposites in bone tissue regeneration. *Materials Science & Engineering C, Materials for Biological Applications* 2020 May 1;110:110698.
- Borges LF, Gutierrez PS, Marana HRC, Taboga SR. Picrosirius-polarization staining method as an efficient histopathological tool for collagenolysis detection in vesical prolapse lesions. *Micron*. 2007 Aug;38(6):580–3.

Breno Rocha Barrioni, Norris E, Li S, Parichart Naruphontjirakul, Jones JR, Pereira MM. Osteogenic potential of sol–gel bioactive glasses containing manganese. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2019 Jul 1;30(7).

Cannio M, Bellucci D, Roether JA, Boccaccini DinoN, Cannillo V. Bioactive Glass Applications: A Literature Review of Human Clinical Trials. *Materials*. 2021 Sep 20;14(18):5440.

Cardoso GBC, Chacon EL, Maia LRB, Zavaglia CA de C, Cunha MR da. The Importance of Understanding Differences in a Critical Size Model: a Preliminary In Vivo Study Using Tibia and Parietal Bone to Evaluate the Reaction with Different Biomaterials. *Materials Research*. 2018;22.

Chacko NL, Abraham S, Rao HNS, Sridhar N, Moon N, Barde DH. A Clinical and Radiographic Evaluation of Periodontal Regenerative Potential of PerioGlas®: A Synthetic, Resorbable Material in Treating Periodontal Infrabony Defects. *Journal of international oral health*; 2014 Jun 1;6(3):20–6.

Chatzipetros E, Christopoulos P, C Donta, KI Tosios, E Tsiambas, D Tsiourvas, et al. Application of nano-hydroxyapatite/chitosan scaffolds on rat calvarial critical-sized defects: A pilot study. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*. 2018 Jan 1;

Chen Q, Kurosh Rezwan, Armitage D, Nazhat SN, Boccaccini AR. The surface functionalization of 45S5 Bioglass®-based glass-ceramic scaffolds and its impact on bioactivity. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2006 Nov 1;17(11):979–87.

Cheng D, Xie R, Tang T, Jia X, Cai Q, Yang X. Regulating micro-structure and biomineralization of electrospun PVP-based hybridized carbon nanofibers containing bioglass nanoparticles via aging time. *RSC Advances*. 2016;6(5):3870–81.

Chuang W, Jiao Geng-sheng, Bing-liang L, Lei P, Ying F, Ni G, et al. Dispersion of carbon fibers and conductivity of carbon fiber-reinforced cement-based composites. *Ceramics International*. 2017 Dec 1;43(17):15122–32.

Clemedson C, Ekwall B. Overview of the Final MEIC Results: I. The In Vitro--In Vitro Evaluation. *Toxicology in Vitro*. 1999 Aug;13(4-5):657–63.

Christian Gomes Moura C, Cristina Cunha T, Oliveira Crema V, Dechichi P, Carlos Gabrielli Biffi J. A study on biocompatibility of three endodontic sealers: intensity and duration of tissue irritation. *Iran Endod J*. 2014 Spring;9(2):137-43. Epub 2014 Mar 8. PMID: 24688584; PMCID: PMC3961592.

El Bialy I, Jiskoot W, Reza Nejadnik M. Formulation, Delivery and Stability of Bone Morphogenetic Proteins for Effective Bone Regeneration. *Pharmaceutical Research*. 2017 Mar 24;34(6):1152–70.

Fernandes JS, Gentile P, Pires RA, Reis RL, Hatton PV. Multifunctional bioactive glass and glass-ceramic biomaterials with antibacterial properties for repair and regeneration of bone tissue. *Acta Biomaterialia*. 2017 Sep;59:2–11.

Ferrando A, Part J, Baeza J. Treatment of Cavitary Bone Defects in Chronic Osteomyelitis: Bioactive glass S53P4 vs. Calcium Sulphate Antibiotic Beads. *Journal of Bone and Joint Infection*. 2017;2(4):194–201.

Fraczek-Szczypta A, Rabiej S, Szparaga G, Pabjanczyk-Wlazole E, Krol P, Brzezinska M, et al. The structure and properties of the carbon non-wovens modified with bioactive nanoceramics for medical applications. *Materials Science & Engineering C, Materials for Biological Applications*. 2015 Jun 1;51:336–45.

Gabriela, Castelo V, Deise Ponzoni, Fabrício Mezzomo Collares. Bone healing with niobium-containing bioactive glass composition in rat femur model: A micro-CT study. *Dental Materials*. 2019 Oct 1;35(10):1490–7.

Ge J, Yang C, Wang Y, Zheng J, Hua H, Zhu J. Comparison of different grafting materials for treatment of bone defect distal to the molar in canine. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*. 2018 Mar 25;20(4):444–54.

Gerhardt LC, Boccaccini AR. Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Materials*. 2010 Jul 6;3(7):3867–910.

Gilchrist T, Glasby MA, Healy DM, Kelly G, Lenihan DV, McDowall KL, et al. In vitro nerve repair — in vivo. The reconstruction of peripheral nerves by entubulation with biodegradable glass tubes — a preliminary report. *British Journal of Plastic Surgery*. 1998;51(3):231–7.

Gillam DG, Tang JY, Mordan NJ, Newman HN. The effects of a novel BioglassR dentifrice on dentine sensitivity: a scanning electron microscopy investigation. *Journal of Oral Rehabilitation*. 2002 Apr;29(4):305–13.

Goel A, Kapoor S, Raghu Raman Rajagopal, Pascual MJ, Kim HW, José M.F. Ferreira. Alkali-free bioactive glasses for bone tissue engineering: A preliminary investigation. 2012 Jan 1;8(1):361–72.

Graziela Garrido Mori, Ligia Moraes Teixeira, Bretas D, Lacerda Jacomini, Silva. Biocompatibility Evaluation of Biodentine in Subcutaneous Tissue of Rats. *Journal of Endodontics*. 2014 Sep 1;40(9):1485–8.

Guo X, Song P, Lu F, Yan Q, Bai Y, He J, et al. Research Progress of Design Drugs and Composite Biomaterials in Bone Tissue Engineering. *International Journal of Nanomedicine*. 2023 Jul 1;Volume 18:3595–622.

Hench LL, Jones JR. Bioactive Glasses: Frontiers and Challenges. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2015 Nov 30;3.

Hench LL, Paschall HA. Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1973 May;7(3):25–42.

Hench LL. The story of Bioglass®. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2006 Nov;17(11):967–78.

Hoppe A, Güldal NS, Boccaccini AR. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials*. 2011 Apr;32(11):2757–74.

Hoppe A, Güldal NS, Boccaccini AR. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials*. 2011 Apr;32(11):2757–74.

Hu M, Fang J, Zhang Y, Wang X, Zhong W, Zhou Z. Design and evaluation a kind of functional biomaterial for bone tissue engineering: Selenium/mesoporous bioactive glass nanospheres. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2020 Nov;579:654–66.

Jahan K, Manickam G, Tabrizian M, Murshed M. In vitro and in vivo investigation of osteogenic properties of self-contained phosphate-releasing injectable purine-crosslinked chitosan-hydroxyapatite constructs. *Scientific Reports*. 2020 Jul 14;10(1).

Jones JR. Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta biomaterialia*. 2015;23 Suppl:S53-82.

Kashirina A, Yao Y, Liu Y, Leng J. Biopolymers as bone substitutes: a review. *Biomaterials Science*. 2019 Sep 24;7(10):3961–83.

Kumari S, Singh D, Srivastava P, Singh BN, Mishra A. Generation of graphene oxide and nano-bioglass based scaffold for bone tissue regeneration. *Biomedical Materials*. 2022 Sep 30;17(6):065012.

Li Y, Wang D, Qin W, Jia H, Wu Y, Ma J, et al. Mechanical properties, hemocompatibility, cytotoxicity and systemic toxicity of carbon fibers/poly(ether-ether-ketone) composites with different fiber lengths as orthopedic implants. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2019 Aug 29;30(18):1709–24.

Lizzi F, Villat C, Attik N, Jackson P, Grosogeat B, Goutaudier C. Mechanical characteristic and biological behaviour of implanted and restorative bioglasses used in medicine and dentistry: A systematic review. *Dental Materials*. 2017 Jun;33(6):702–12.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 1951 Nov 1;193(1):265–75.

Luz GM, Mano JF. Chitosan/bioactive glass nanoparticles composites for biomedical applications. *Biomedical Materials*. 2012 Sep 12;7(5):054104.

Maciel CCM, Torquato LC, Chelin Suárez EA, Pereira KA, Jardini MAN, Borges ALS, et al. Carbon fiber: Characterization and evaluation of the inflammatory response and toxicity in rats. *Journal of Biomedical Materials Research Part B, Applied Biomaterials* [Internet]. 2023 Nov; 111(11):1956–65.

Mahmoudian M, Ganji F. Vancomycin-loaded HPMC microparticles embedded within injectable thermosensitive chitosan hydrogels. *Progress in Biomaterials*. 2017 Apr 26;6(1-2):49–56.

Meinberg EG, Clark D, Miclau KR, Marcucio R, Miclau T. Fracture repair in the elderly: Clinical and experimental considerations. *Injury*. 2019 Jun;50:S62–5.

Messora MR, Nagata H, R. C. M. Dornelles, S. R. M. Bomfim, F. A. C. Furlaneto, De N, et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma activated by two different methods. A histologic and histometric study in rat calvaria. *Journal of periodontal research*. 2008 Nov 2;43(6):723–9.

Milad Vahidi, Rizkalla AS, Kibret Mequanint. Extracellular Matrix-Surrogate Advanced Functional Composite Biomaterials for Tissue Repair and Regeneration. *Advanced Healthcare Materials* 2024 Jul 22.

Misra SK, Mohn D, Brunner TJ, Stark WJ, Philip SE, Roy I, et al. Comparison of nanoscale and microscale bioactive glass on the properties of P(3HB)/Bioglass® composites. *Biomaterials*. 2008 Apr;29(12):1750–61.

Ning F, Cong W, Qiu J, Wei J, Wang S. Additive manufacturing of carbon fiber reinforced thermoplastic composites using fused deposition modeling. *Composites Part B: Engineering*. 2015 Oct;80:369–78.

Nunes CMM, Ferreira CL, Bernardo DV, Oblack GB, Longo M, Santamaria MP. The influence of LLLT applied on applied on calvarial defect in rats under effect of cigarette smoke. *Journal of Applied Oral Science*. 2019;27.

Parichart Naruphontjirakul, Porter AE, Jones JR. In vitro osteogenesis by intracellular uptake of strontium containing bioactive glass nanoparticles. *Acta Biomaterialia*. 2018 Jan 1;66:67–80.

Park SS, Ume Farwa, Kim HD, Kim YS, Lee BT. Bone formation by Irisin-Poly vinyl alcohol modified bioglass ceramic beads in the rabbit model. *Journal of materials science Materials in medicine*. 2024 Mar 25;35(1).

Parsa A, Ibrahim N, Hassan B, van der Stelt P, Wismeijer D. Bone quality evaluation at dental implant site using multislice CT, micro-CT, and cone beam CT. *Clinical Oral Implants Research*. 2013 Dec 11;26(1):e1–7.

Peng Z, Zhao T, Zhou Y, Li S, Li J, Leblanc RM. Bone Tissue Engineering via Carbon-Based Nanomaterials. *Advanced Healthcare Materials*. 2020 Jan 24;9(5):1901495.

Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. Boutron I, editor. PLOS Biology. 2020 Jul 14;18(7):e3000410.

Pereira R dos S, Menezes JD, Bonardi JP, Griza GL, Okamoto R, Hochuli-Vieira E. Histomorphometric and immunohistochemical assessment of RUNX2 and VEGF of Biogran™ and autogenous bone graft in human maxillary sinus bone augmentation: A prospective and randomized study. Clinical Implant Dentistry and Related Research. 2017 Jun 13;19(5):867–75.

Prasad S S, Ratha I, Adarsh T, Anand A, Sinha PK, Diwan P, et al. In vitro bioactivity and antibacterial properties of bismuth oxide modified bioactive glasses. Journal of Materials Research. 2017 Dec 4;33(2):178–90.

Puvaneswary S, Raghavendran HB, Talebian S, Murali MR, A Mahmud S, Singh S, et al. Incorporation of Fucoidan in β -Tricalcium phosphate-Chitosan scaffold prompts the differentiation of human bone marrow stromal cells into osteogenic lineage. Scientific Reports. 2016 Apr 12;6(1).

Rasouli Ghahroudi AA, Rokn AR, Kalhori KAM, Khorsand A, Pournabi A, Pinheiro ALB, et al. Effect of low-level laser therapy irradiation and Bio-Oss graft material on the osteogenesis process in rabbit calvarium defects: a double blind experimental study. Lasers in Medical Science. 2013 Aug 3; 29(3):925–32.

Rather HA, Jhala D, Vasita R. Dual functional approaches for osteogenesis coupled angiogenesis in bone tissue engineering. Materials Science and Engineering: C. 2019 Oct;103:109761.

Ribeiro C, Alvares L, Almeida V, Tiago, Paulo Noronha Lisboa-Filho, Okamoto R, et al. The Local Release of Teriparatide Incorporated in 45S5 Bioglass Promotes a Beneficial Effect on Osteogenic Cells and Bone Repair in Calvarial Defects in Ovariectomized Rats. Journal of Functional Biomaterials 2023 Feb 9;14(2):93–3.

Scheers EM, Ekwall B, Dierickx PJ. In vitro long-term cytotoxicity testing of 27 MEIC chemicals on Hep G2 cells and comparison with acute human toxicity data. Toxicology in Vitro. 2001 Apr;15(2):153–61.

Schwartzman JD, Schwartzman JD, et al. Multifunctional Scaffolds for Bone Repair following Age-Related Biological Decline: Promising Prospects for Smart Biomaterial-Driven Technologies. Biomaterials. 2024 Dec 1;311:122683–3.

Sharma M, Gao S, Mäder E, Sharma H, Wei LY, Bijwe J. Carbon fiber surfaces and composite interphases. Composites Science and Technology. 2014 Oct;102:35–50.

Sheikh Z, Hamdan N, Ikeda Y, Gryn timer M, Ganss B, Glogauer M. Natural graft tissues and synthetic biomaterials for periodontal and alveolar bone reconstructive applications: a review. Biomaterials research. 2017; 21:9.

Sohrabi K, Saraiya VM, Laage TA, Harris ME, M.B. Blieden, Karimbux NY. An Evaluation of Bioactive Glass in the Treatment of Periodontal Defects: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Clinical Trials. 2012 Apr 1;83(4):453–64.

Souza LPL, Lopes JH, Ferreira FV, Martin RA, Bertran CA, Camilli JA. Evaluation of effectiveness of 45S5 bioglass doped with niobium for repairing critical-sized bone defect in in vitro and in vivo models. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2019 Nov 7;108(3):446–57.

Tai BJ, Bian Z, Jiang H, Greenspan DC, Zhong J, Clark AE, et al. Anti-gingivitis effect of a dentifrice containing bioactive glass (NovaMinR) particulate. Journal of Clinical Periodontology. 2006 Feb;33(2):86–91.

Terms and Conditions | NC3Rs EDA [Internet]. eda.nc3rs.org.uk. [cited 2022 Jul 8]. Available from: <https://eda.nc3rs.org.uk/eda/login/auth>

Thrivikraman G, Athirasala A, Twohig C, Boda SK, Bertassoni LE. Biomaterials for Craniofacial Bone Regeneration. Dental Clinics of North America. 2017 Oct;61(4):835–56.

Touri R, Moztafarzadeh F, Sadeghian Z, Bizari D, Tahriri M, Mozafari M. The Use of Carbon Nanotubes to Reinforce 45S5 Bioglass-Based Scaffolds for Tissue Engineering Applications. BioMed Research International. 2013;2013:1–8.

Vafa E, Bazargan-Lari R, Bahrololoom ME. Synthesis of 45S5 bioactive glass-ceramic using the sol-gel method, catalyzed by low concentration acetic acid extracted from homemade vinegar. Journal of Materials Research and Technology. 2021 Jan;10:1427–36.

Vasconcellos LMR, Santana-Melo GF, Silva E, Pereira VF, Araújo JCR, Silva ADR, et al. Electrospun Poly(butylene-adipate-co-terephthalate)/Nano-hydroxyapatite/Graphene Nanoribbon Scaffolds Improved the In Vivo Osteogenesis of the Neoformed Bone. Journal of Functional Biomaterials. 2021 Feb 5;12(1):11.

Vitale-Brovarone C, Baino F, Verné E. High strength bioactive glass-ceramic scaffolds for bone regeneration. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2008 Oct 21;20(2):643–53.

Wei H, Cui J, Lin K, Xie J, Wang X. Recent advances in smart stimuli-responsive biomaterials for bone therapeutics and regeneration. Bone Research. 2022 Feb 23;10(1).

Wenz B, Oesch B, Horst M. Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. Biomaterials. 2001 Jun;22(12):1599–606.

Wong SK, Min M, Chin K, Soelaiman IN. A Review of the Application of Natural and Synthetic Scaffolds in Bone Regeneration. Journal of Functional Biomaterials. 2023 May 20;14(5):286–6.

Wu C, Miron R, Sculean A, Kaskel S, Doert T, Schulze R, et al. Proliferation, differentiation and gene expression of osteoblasts in boron-containing associated with dexamethasone deliver from mesoporous bioactive glass scaffolds. *Biomaterials*. 2011 Oct;32(29):7068–78.

Wu Y, Wang K, Neto V, Peng Y, Valente R, Ahzi S. Interfacial behaviors of continuous carbon fiber reinforced polymers manufactured by fused filament fabrication: A review and prospect. *International Journal of Material Forming*. 2022 Mar 10;15(3).

Yang YG. CD47 in Xenograft Rejection and Tolerance Induction. *Xenotransplantation*. 2010;17(4):267–73.

Yin P, Yuan JW, Liu LH, Xiao T, Lei T. Effect of ZrO₂ on the bioactivity properties of gel-derived CaO-P₂O₅-SiO₂-SrO glasses. *Ceramics International*. 2017 Sep;43(13):9691–8.

Zeimaran E, Pourshahrestani S, Djordjevic I, Pingguan-Murphy B, Kadri NA, Towler MR. Bioactive glass reinforced elastomer composites for skeletal regeneration: A review. *Materials Science and Engineering: C*. 2015 Aug;53:175–88.

Zeeshan R, Mutahir Z, Iqbal H, Ali M, Iqbal F, Ijaz K, et al. Hydroxypropylmethyl cellulose (HPMC) crosslinked chitosan (CH) based scaffolds containing bioactive glass (BG) and zinc oxide (ZnO) for alveolar bone repair. *Carbohydrate Polymers*. 2018 Aug;193:9–18.

Zhang K, Alaohali A, Sawangboon N, Sharpe PT, Brauer DS, Gentleman E. A comparison of lithium-substituted phosphate and borate bioactive glasses for mineralised tissue repair. *Dental Materials*. 2019 Jun;35(6):919–27.

Zhang C, Ren Y, Kong W, Liu Y, Li H, Han Y, et al. Photocurable 3D-printed PMBG/TCP biphasic scaffold mimicking vasculature for bone regeneration. *International Journal of bioprinting*. 2023 Jun 2;9(5):767–7.

Zheng A, Wang X, Xin X, Peng L, Su T, Cao L, et al. Promoting lacunar bone regeneration with an injectable hydrogel adaptive to the microenvironment. *Bioactive Materials*. 2023 Mar;21:403–21.

Zhou Q, Chen W, Gu C, Liu H, Hu X, Deng L, et al. Selenium-modified bone cement promotes osteoporotic bone defect repair in ovariectomized rats by restoring GPx1-mediated mitochondrial antioxidant functions. *Regenerative Biomaterials*. 2023 Jan 1;10.

APÊNDICE A – Cálculo Amostral

WORKSHEET 1

Poder e Tamanho de Amostra

Experimento Fatorial Completo Geral

$\alpha = 0,05$ Desvio padrão assumido = 8,37

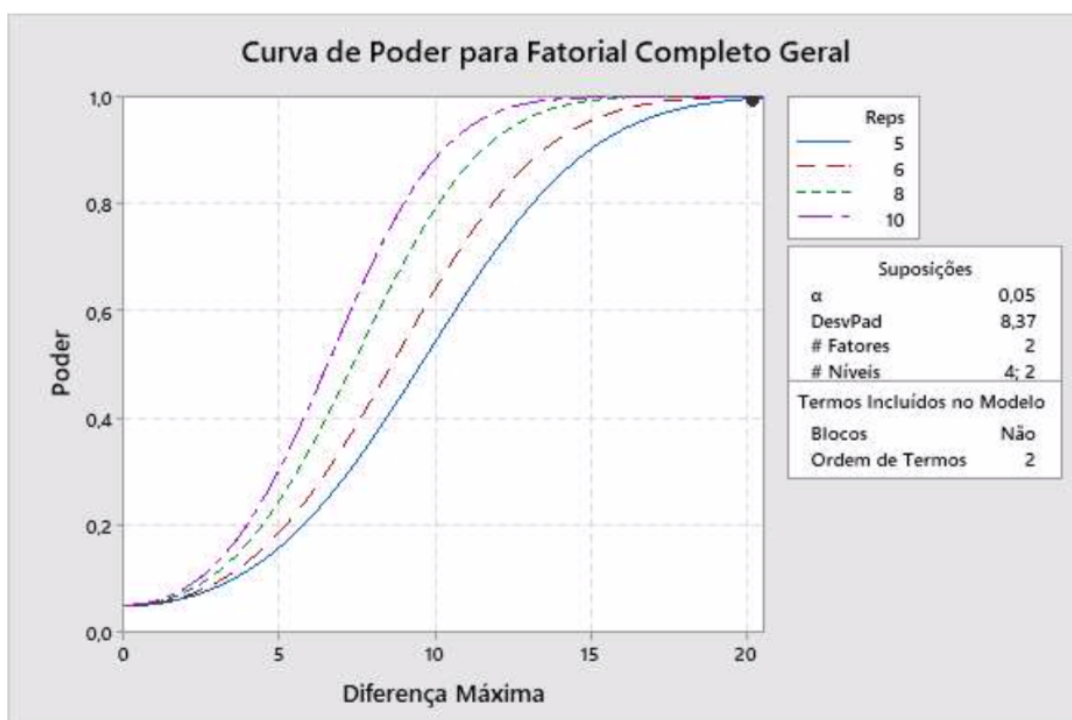
Fatores: 2 Número de níveis: 4; 2

Incluir termos no modelo através de ordem: 2

Não incluindo blocos no modelo.

Resultados

Diferença Máxima	Reps	Total de Ensaios	Poder
20,23	5	40	0,99453
20,23	6	48	0,99898
20,23	8	64	0,99997
20,23	10	80	1,00000



ANEXO A —Certificado do Comitê de Ética



CERTIFICADO
CEUA – Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo registrado sob o nº 09/2022, intitulado:- **“Biovidro com fibra de carbono funcionalizado com nióbio: Desenvolvimento e interações biológicas in vitro e in vivo”**, sob a responsabilidade de **ANDREA CARVALHO DE MARCO**, tendo como colaboradores:- **NATALY DOMINGUES ALMEIDA, CLARISSA CARVALHO MARTINS MACIEL, LETÍCIA CAVASSINI TORQUATO E KAUÊ ALBERTO PEREIRA** e que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA – ICT – CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS-UNESP), em reunião de 29/07/2022.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	01/09/2022 a 06/12/2023
Espécie/linhagem/raça	Ratos adultos /Rattus norvegicus
Nº de Animais	57
Peso/Idade	300g/90 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central – Campus de Botucatu-UNESP
Compromisso/Relatório(s)	Final:- Envio para a CEUA:- 06/01/2024

São José dos Campos, 29 de julho de 2022


Prof. Dra LUANA MAROTTA REIS DE VASCONCELLOS
VICE – COORDENADORA EM EXERCÍCIOS

Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas
 CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028 / 9076
 Fax (12) 3947-9028 / carlos.guedes@unesp.br/ andrea.marco@unesp.br

ANEXO B —Certificado do Comitê de Ética



CERTIFICAMOS, que o protocolo registrado sob o nº 02/2023, intitulado:- **BIOVIDRO FUNCIONALIZADO COM NIÓBIO E FIBRA DE CARBONO: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E TOXICIDADE EM RATOS**, sob a responsabilidade de **ANDREA CARVALHO DE MARCO**, tendo como colaboradores:- Nátaly Domingues Almeida, Luiz Augusto Rodrigues dos Santos, Clarissa Carvalho Martins Maciel, e Leticia Cavassini Torquato e que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA – ICT – CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS-UNESP)**, em reunião de 20/03/2023.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	20/03/2023 a 01/02/2024
Espécie/linhagem/raça	Ratos Heterogênico Wistar
Nº de Animais	42 ratos
Peso/Idade	90 dias / 300 grs.
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central – Campus de Botucatu-UNESP

COMPROMISSOS:-

Relatório científico	PERÍODO	ENVIO PARA A CEUA
FINAL	20/03/2023 a 01/02/2024	01/03/2024

Obs:- 01) O não cumprimento dos prazos já está implicando na impossibilidade de análise de novos protocolos pela CEUA/ICT_CSJC, caso não haja solicitação de prorrogação do prazo para entrega do relatório, com justificativa.

02) Será enviado via Secretaria da CEUA-ICT-CSJC-UNESP, aviso de alerta para envio do RC

São José dos Campos, 20 de março de 2023

Profa. Dra. Luana Marotta Reis de Vasconcellos
Vice-Coordenadora em Exercício

Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028 / 9076
Fax (12) 3947-9028 / carlos.guedes@unesp.br/ andrea.marco@unesp.br