



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



MARIANA COELHO BRITO

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO *IN VIVO* DE
FORMULAÇÃO CONTENDO NANOHIĐROXIAPATITA PARA
O TRATAMENTO DE LESÕES ÓSSEAS**

Feira de Santana, BA

2022

MARIANA COELHO BRITO

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO *IN VIVO* DE
FORMULAÇÃO CONTENDO NANOHIĐROXIAPATITA PARA
O TRATAMENTO DE LESÕES ÓSSEAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito final para a obtenção do título de Mestra em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Souza Silva

Coorientador: Dr. Fabio Moysés Lins Dantas

Feira de Santana, BA

2022

Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

B875d Brito, Mariana Coelho
Desenvolvimento e avaliação *in vivo* de formulação contendo Nanohidroxiapatita para o tratamento de lesões ósseas / Mariana Coelho Brito. –,2022.
80p.: il.

Orientador: Fabrício Souza Silva
Coorientador: Fábio Moysés Lins Dantas
Dissertação(mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2022.

1. Lesão óssea - Osteoporose. 2. Nanohidroxiapatita. 3. Alginato de sódio. 4. Consolidação óssea. I. Silva, Fabrício Souza, orient. II. Dantas, Fábio Moysés Lins, coorient. III. Universidade Estadual de Feira de Santana. IV. Título.

CDU: 57.081

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela bondade, generosidade e todas as bênçãos derramadas na minha vida.

Aos meus pais, Thania e José, por toda a compreensão, dedicação e incentivo ao longo de todos esses anos, e meu irmão, Marcos Henrique, pelo carinho e cumplicidade. Eu não teria chegado até aqui sem vocês.

À Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF) e Instituto Nacional de Tecnologia (INT) por fornecer todas as ferramentas necessárias para a realização deste trabalho.

A Peixoto, do Biotério Central da UNIVASF, por disponibilizar prontamente os animais, e John Leno, por todo o suporte logístico para a realização dos experimentos, acomodação e manutenção dos animais.

Ao Prof. Dr. Ricardo, por abraçar este trabalho e se fazer presente em todas as etapas cruciais para a realização dos protocolos.

Ao meu co-orientador, Dr. Fabio Dantas, por me receber tão bem e me tirar da minha zona de conforto, expandindo meus horizontes e proporcionando experiências extremamente proveitosas.

Ao meu querido orientador, Prof. Dr. Fabrício, eu agradeço pela confiança, incentivo, dedicação e paciência. Pela oportunidade de aprendizado através da pesquisa e pela parceria que vai além dela, nesses quase 10 anos de jornada.

A toda a equipe de técnicos, professores e pesquisadores do Laboratório de Farmacologia Experimental (LAFEX), grupo que tenho muito orgulho em fazer parte e desejo que continue evoluindo sempre mais. Em especial, aos meus amigos e companheiros de pesquisa: Cícero André, Olivaneide Frazão, Pedro Modesto e Tiago Ribeiro, minha eterna gratidão por toda a ajuda, incentivo e amizade durante a realização desse trabalho. Vocês compartilharam comigo muito mais do que experiências de aprendizado.

A todos que caminharam ao meu lado e contribuíram, direta ou indiretamente, para que esse momento chegasse. Aos que estiveram perto ou longe, apoiando minhas decisões, me motivando e tornando esta caminhada mais leve, essa conquista também é de vocês.

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

8° 26' 21" S 40° 45' 46" W

“Ama-se mais o que se conquista com esforço.”

Benjamin Disraeli

RESUMO

Os defeitos ósseos podem se desenvolver a partir de diversas origens e, considerando o elevado impacto socioeconômico envolvido na recuperação de pacientes acometidos por essas lesões, a busca por materiais que promovam uma densificação óssea veloz e uma estabilização mecânica eficaz têm sido cada vez maior. Assim, a produção de um gel de alginato de sódio contendo nanohidroxiapatita apresenta-se como uma inovação tecnológica de alto nível em termos de biomateriais. Após a produção e caracterização, o gel foi avaliado em modelos animais de lesões ósseas no fêmur e osso parietal. Foram utilizados ratos Wistar machos, e fêmeas previamente ovariectomizadas para mimetizar um contexto de fratura traumática e por osteoporose, respectivamente. O efeito da aplicação do gel também foi averiguado mediante a dosagem de marcadores hepáticos e renais, que evidenciaram a ausência de efeitos nocivos a nível sistêmico. A ação local foi observada a partir da análise histopatológicas da amostra, onde foi possível verificar, pela primeira vez, que a formulação contendo alginato de sódio e nanohidroxiapatita se mostrou eficaz em estimular a formação óssea na região dos defeitos em osso compacto e esponjoso. Foi observado o crescimento de porções de pelo menos 100 μm de tecido neoformado em todos os grupos tratados. Os dados apontam para uma formulação com potencial utilização em diversos contextos clínicos de recuperação de fraturas pela alta biocompatibilidade e baixo custo. Entretanto, é necessária a realização de estudos posteriores para delinear o perfil farmacológico e obter informações essenciais para o monitoramento e desenvolvimento de novos materiais com ação osteoindutora.

Palavras-chave: Lesão óssea. Osteoporose. Nanohidroxiapatita. Alginato de sódio. Consolidação óssea.

ABSTRACT

Bone defects can develop from different origins and, considering the high socioeconomic impact involved in the recovery of patients affected by injuries, the search for materials that promote rapid bone densification and effective mechanical stabilization has been increasing. Thus, the production of a sodium alginate gel containing nanohydroxyapatite presents itself as a high-level technological innovation in terms of biomaterials. After production and characterization, the gel was evaluated in animal models of femur and parietal bone lesions. Male and previously ovariectomized female Wistar rats were used to mimic a context of traumatic fracture and osteoporosis, respectively. The effect of the application of the gel was also investigated by measuring hepatic and renal markers, which showed the absence of harmful effects at a systemic level. The local action was observed from the histopathological analysis of the sample, where it was possible to verify, for the first time, that the formulation containing sodium alginate and nanohydroxyapatite proved to be effective in stimulating bone formation in the region of defects in compact and cancellous bone. Growth of at least 100 μm portions of neoformed tissue was observed in all treated groups. The data point to a formulation with potential use in several clinical contexts of fracture recovery due to its high biocompatibility and low cost. However, further studies are needed to outline the pharmacological profile and obtain essential information for the monitoring and development of new materials with osteoinductive action.

Keywords: Bone lesion. Osteoporosis. Nanohydroxyapatite. Sodium alginate. Bone consolidation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ad libitum	À vontade
Akt/PKB	Proteína quinase B
ALT	Alanina amino transferase
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato amino transferase
BET	Área superficial específica
BMP	Proteínas morfogenéticas ósseas
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
e.p.m.	Erro padrão da média
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
FTIR	Espectroscopia de infravermelho
HAP	Hidroxiapatita
HE	Hematoxilina-eosina
ICLAS	International Council for Laboratory Animal Science
IFN- γ	Interferon- γ
IGF	Fator de crescimento insulínico
IL	Interleucina
<i>in situ</i>	Local
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MSC	Célula tronco mesenquimal
NH	Grupo teste
NHAP	Nanohidroxiapatita
OVX	Ovariectomizado
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PMN	Leucócito polimorfonuclear
PTH	Paratormônio

PVA	Poliacetato de vinila
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
TGA	Análise termogravimétrica
TGF- β	Fator de crescimento transformador- β
TGO	Transaminase glutâmica oxalacética
TGP	Transaminase glutâmica pirúvica
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
UNIVASF	Universidade Federal do Vale do São Francisco
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação histológica de uma porção de tecido ósseo e seus principais constituintes.	17
Figura 2 - Etapas do processo de consolidação secundária de fraturas ósseas, seu padrão temporal relativo e principais moléculas envolvidas.	23
Figura 3 - Esquematização do processo proposto para síntese da hidroxiapatita por co-precipitação.	27
Figura 4 - Divisão dos animais e grupos experimentais.	33
Figura 5 - Etapas de concentração e purificação dos cristais de nanohidroxiapatita.	39
Figura 6 - Curva de TGA para a amostra de nanohidroxiapatita sintetizada.	40
Figura 7 - Curva de DSC para a amostra de nanohidroxiapatita sintetizada.	41
Figura 8 - Resultado da análise da área superficial da nanohidroxiapatita sintetizada.	42
Figura 9 - Espectro da nanohidroxiapatita produzida neste estudo antes do tratamento em ultrassom.	43
Figura 10 - Espectro da nanohidroxiapatita da literatura.	44
Figura 11 - Imagem da nanohidroxiapatita sintetizada antes e depois de ser submetida ao ultrassom, com medição do tamanho de partículas.	45
Figura 12 - Gel de alginato de sódio, cristais de nanohidroxiapatita e formulação final após a mistura dos dois componentes.	46
Figura 13 - Animais tratados com gel de alginato de sódio 2% (controle negativo), gel de alginato de sódio 2% e nanohidroxiapatita 10% (grupo teste) ou Bio-Oss® (controle positivo), em procedimentos cirúrgicos de lesão no fêmur e osso parietal.	48
Figura 14 - Análise histopatológica de porções de fêmur de ratos Wistar machos após 2 semanas do procedimento cirúrgico de lesão.	54
Figura 15 - Análise histopatológica de porções de fêmur de ratos Wistar machos após 4 semanas do procedimento cirúrgico de lesão.	55
Figura 16 - Análise histopatológica de porções de fêmur de ratos Wistar machos após 8 semanas do procedimento cirúrgico de lesão.	56
Figura 17 - Análise histopatológica de porções de fêmur de ratas Wistar	59

fêmeas após 2 semanas do procedimento cirúrgico de lesão.

Figura 18 - Análise histopatológica de porções de fêmur de ratas Wistar fêmeas após 4 semanas do procedimento cirúrgico de lesão. 60

Figura 19 - Análise histopatológica de porções de fêmur de ratas Wistar fêmeas após 8 semanas do procedimento cirúrgico de lesão. 61

Figura 20 - Análise histopatológica de porções de osso parietal de ratos Wistar machos após 2 semanas do procedimento cirúrgico de lesão. 64

Figura 21 - Análise histopatológica de porções de osso parietal de ratos Wistar machos após 4 semanas do procedimento cirúrgico de lesão. 65

Figura 22 - Análise histopatológica de porções de osso parietal de ratos Wistar machos após 8 semanas do procedimento cirúrgico de lesão. 66

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE O TECIDO ÓSSEO	15
2.2 FRATURAS E MECANISMO DE CONSOLIDAÇÃO ÓSSEA	20
2.3 NANOHIĐROXIAPATITA E REGENERAÇÃO ÓSSEA	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 SÍNTESE DOS CRISTAIS DE NANOHIĐROXIAPATITA	27
3.1.1 Solubilização do poliacetato de vinila	27
3.1.2 Preparo dos sistemas para a precipitação da hidroxiapatita por nanoemulsão	28
3.1.2.1 Sistema 1 (água/fosfato)	28
3.1.2.2 Sistema 2 (acetato/cálcio)	28
3.1.3 Processo de injeção e reação	29
3.1.4 Purificação do material sintetizado	29
3.1.5 Caracterização da hidroxiapatita	30
3.1.5.1 Análise termogravimétrica	30
3.1.5.2 Calorimetria exploratória diferencial	30
3.1.5.3 Determinação da área superficial específica	30
3.1.5.4 Análise por espectroscopia de infravermelho	31
3.1.5.5 Caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura	31
3.2 OBTENÇÃO DA FORMULAÇÃO FINAL	31
3.2.1 Gel de alginato de sódio 2%	31
3.2.2 Mistura com a nanohidroxiapatita	32
3.3 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS	32
3.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO E LESÃO	33
3.4.1 Lesão no fêmur	33
3.4.2 Lesão no osso parietal	34
3.4.3 Ovariectomia bilateral	35
3.5 ANÁLISE BIOQUÍMICA DE MARCADORES HEPÁTICOS E RENAIŠ	35
3.5.1 Transaminase glutâmica oxalacética	36
3.5.2 Transaminase glutâmica pirúvica	36

3.5.3 Albumina	37
3.5.4 Ureia	37
3.5.5 Creatinina	37
3.6 EUTANÁSIA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL	38
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO DA NANOHIIDROXIAPATITA E OBTENÇÃO DO PRODUTO FINAL	39
4.1.1 Análise termogravimétrica (TGA)	39
4.1.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	41
4.1.3 Determinação da área superficial específica (BET)	42
4.1.4 Análise por espectroscopia de infravermelho (FTIR)	43
4.1.5 Caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	45
4.1.6 Obtenção do produto final	46
4.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS DE LESÃO	47
4.3 ANÁLISE BIOQUÍMICA DE MARCADORES HEPÁTICOS	48
4.4 ANÁLISE BIOQUÍMICA DE MARCADORES RENAIIS	51
4.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS LESÕES ÓSSEAS	53
4.5.1 Lesão no fêmur	53
4.5.2 Lesão no osso parietal	63
5 CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS	70
ANEXO A – Autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais da UNIVASF	79

1 INTRODUÇÃO

O osso é um tecido heterogêneo composto por uma fase mineral ou inorgânica, uma fase orgânica (colágeno tipo I, proteínas e lipídios) e água. A fração relativa de cada um desses constituintes presentes em um dado osso varia com a idade, localização, sexo, etnia e estado de saúde. Assim, a quantia, o arranjo adequado e as características de cada um desses componentes (quantidade e qualidade) definem as propriedades do tecido (BOSKEY, 2013).

Durante a vida humana, o osso sofre formação e reabsorção para crescer ou mudar de forma. Os osteoclastos e osteoblastos são as principais células que executam a reabsorção do osso velho ou danificado e a formação do novo tecido consecutivamente (KATSIMBRI, 2017). O processo de formação predomina até a massa óssea atingir um pico. Em seguida ocorre uma fase de equivalência entre formação e reabsorção, até o momento em que a reabsorção começa a exceder a formação e a massa óssea total diminui lentamente. A reabsorção apresenta-se mais intensa em idosos e mulheres no período pós-menopausa. (KATSIMBRI, 2017; LOPES et al., 2018).

A tendência de fraturar um osso depende da porção de tecido mineralizado presente, sua composição, aspectos das ligações cruzadas de colágeno, morfologia, microarquitetura e presença de microfissuras (BOSKEY, 2013). Embora algumas fraturas se curem espontaneamente, grande parte delas acaba não sendo consolidadas ou gerando complicações que estão associadas à mortalidade significativa, incapacidade física, estresse emocional e altos custos médicos. À medida que a população mundial envelhece e aumenta o número de pacientes com condições médicas complexas, espera-se que a frequência de fraturas aumente, ampliando ainda mais a carga socioeconômica dessas lesões (BONAFEDE; ESPINDLE; BOWER, 2012; SHAPIRO et al., 2018).

A consolidação de uma fratura óssea é um processo complexo, orquestrado e regenerativo que envolve um número crucial de células progenitoras, inflamatórias, endoteliais e hematopoiéticas, e em inúmeros casos, a sinalização prejudicada e ou falta de células osteocondutoras leva a um potencial regenerativo insuficiente e à necessidade de aumentar a reparação óssea utilizando outros meios (PEREZ et al., 2018).

Fatores como a alta prevalência de traumas, o consequente declínio da qualidade de vida do indivíduo fraturado, a morbidade prolongada que resulta do elevado risco de complicações e o custo financeiro com hospitalizações e intervenções cirúrgicas dispendiosas e altamente invasivas tornam imprescindível a busca por novas terapias alternativas que atuem na regeneração de defeitos ósseos (TATARA; MIKOS, 2016). Com isso, as substâncias osteogênicas têm sido cada vez mais investigadas, como é o caso da hidroxiapatita sintética (GRADO et al., 2018; LI et al., 2018).

Essa cerâmica, além de apresentar-se em sua forma natural, pode ser sintetizada usando técnicas variadas. Por mais que a hidroxiapatita seja capaz de promover a densificação óssea, uma limitação conhecida da sua utilização é a baixa resistência mecânica, que também é um fator limitante para a recuperação das fraturas. Para isso, são utilizados materiais de reforço para formar produtos com nível de estabilização mecânica maior, de maneira a permitir uma ligação sólida e firme dos cristais de hidroxiapatita com o tecido ósseo (SIDDIQUI; PICKERING; MUCALO, 2018).

Considerando o potencial da nanohidroxiapatita, esse estudo tem a finalidade de desenvolver um gel baseado em sais de alginato de sódio e nanohidroxiapatita para tratamento *in situ* de lesões ósseas, avaliando a influência da formulação sobre a capacidade de regeneração óssea de ratos submetidos a lesões em osso compacto e esponjoso. A investigação da sua atividade farmacológica em modelos animais de lesão pode indicar uma possibilidade de investimento para a indústria farmacêutica como uma nova alternativa terapêutica para pacientes lesionados, trazendo uma maior qualidade de vida à população, fortalecendo o desenvolvimento tecnológico regional e agregando valor às pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos, além de apresentar-se como uma contribuição social e econômica relevante para a sociedade no aspecto de saúde pública.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE O TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é o componente principal do esqueleto. Trata-se de um tecido conjuntivo de matriz extracelular mineralizada, metabolicamente ativo, constituído por um grupo heterogêneo de células em diferentes estágios de diferenciação. Ele exerce importantes funções no organismo, como sustentação e locomoção, suporte e proteção de outros órgãos e tecidos moles adjacentes, armazenamento de cálcio, fosfato e outros íons, além de comportar e proteger a medula óssea (GONZÁLEZ, 2019). A matriz óssea apresenta em sua composição uma porção orgânica e uma porção inorgânica. A parte orgânica da matriz é formada majoritariamente de colágeno tipo I, que representa mais de 90% de sua constituição, e por pequena quantidade de glicosaminoglicanos, proteoglicanos, glicoproteínas adesivas e fatores de crescimento (UNAL; CREECY; NYMAN, 2018).

As proteínas ósseas não colágenas como a osteocalcina, osteopontina e osteonectina desempenham papéis importantes, por se tratarem de componentes expressos tanto em ossos maduros, quanto em ossos em desenvolvimento. Pelo fato de interagirem diretamente com várias células, elas podem atuar como mediadoras biológicas, modulando a atividade de outras proteínas, proteases e fatores de crescimento da matriz óssea. Essas propriedades influenciam na fisiologia normal do tecido ósseo e nos processos de remodelação e regeneração do osso (LICINI; VITALE-BROVARONE; MATTIOLI-BELMONTE, 2019).

Na parte inorgânica da matriz óssea, os íons presentes em maior parte são o fosfato e o cálcio, que formam os cristais de hidroxiapatita. Em pequenas quantidades também é possível encontrar magnésio, sódio, potássio, citrato e bicarbonato. Isoladamente, a hidroxiapatita apresenta uma baixa resistência mecânica e alta fragilidade, mas em associação às fibras colágenas proporciona rigidez e resistência ao tecido ósseo (VIGUET-CARRIN; GARNERO; DELMAS, 2005).

Os ossos são compostos por três principais tipos celulares, derivados de duas linhagens distintas: os osteoblastos e osteócitos, oriundos de células osteoprogenitoras de origem mesenquimal (linhagem osteoblástica); e os osteoclastos, provenientes de monócitos produzidos na medula óssea (linhagem osteoclástica). Cada uma dessas células contribui ativa e especificamente para a

manutenção da homeostase do tecido (BUCK; DUMANIAN, 2012; OFTADEH et al., 2015).

Os osteoblastos são células presentes na superfície do osso, que atuam ativamente na síntese da fase orgânica da matriz óssea e no seu processo de mineralização, além de ter influência sobre a função de diversas células do tecido ósseo. Morfologicamente, os osteoblastos são mononucleados e apresentam formato levemente alongado ou cuboide, com basofilia citoplasmática variável, a depender do nível de atividade em que se encontram. Seu conteúdo intracelular é caracterizado por dispor de múltiplas vesículas secretoras, além de um retículo endoplasmático rugoso abundante e aparelho de Golgi proeminente (FAKHRY, 2013; CAPULLI; PAONE; RUCCI, 2014).

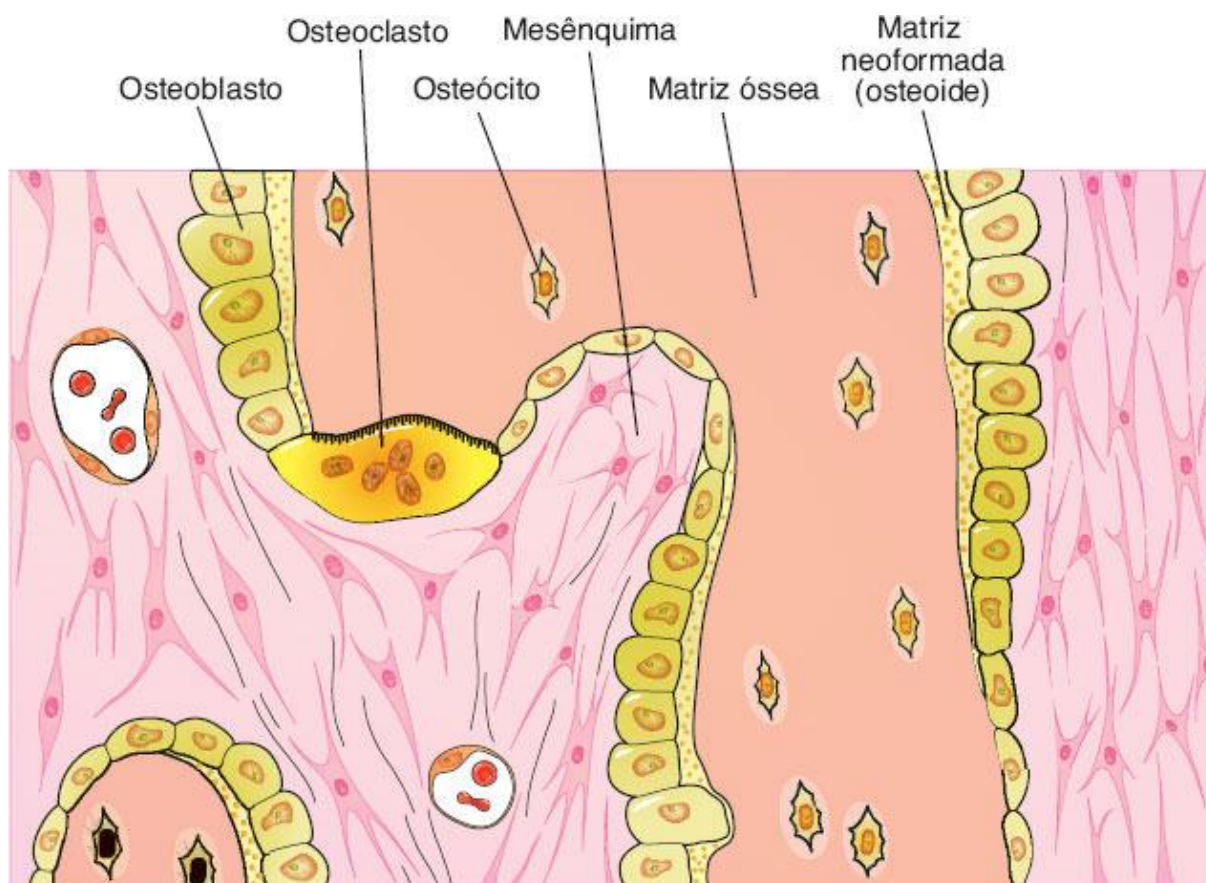
Os osteócitos são células de vida longa encontradas em abundância no tecido ósseo, e desempenham diversas funções importantes. Eles estão localizados dentro de lacunas, rodeados de matriz óssea mineralizada. A morfologia dessas células varia de acordo com o local em que estão localizadas, podendo apresentar forma arredondada ou alongada (SCHAFFLER et al., 2013). Por se tratarem de derivados da diferenciação dos osteoblastos, os osteócitos sofrem mudanças estruturais significativas, como a redução do tamanho e do número de organelas, além da diminuição na síntese e secreção proteica (CAPULLI; PAONE; RUCCI, 2014).

Os osteoclastos são originados da união de monócitos da linhagem de células-tronco da medula óssea. Eles estão localizados na superfície do tecido ósseo, e se caracterizam por serem células grandes, móveis e multinucleadas, com conteúdo citoplasmático de aspecto granuloso e basofilia variando de acordo com seu grau de maturidade celular (CHARLES; ALIPRANTIS, 2014). A **Figura 1** esquematiza a histologia de uma trabécula óssea, indicando os componentes celulares do tecido.

O revestimento da superfície externa do tecido ósseo é constituído por uma camada de tecido conjuntivo rico em fibroblastos, fibras de colágeno e células osteoprogenitoras que compõem o periósteo (LI et al., 2016). A superfície interna do osso, seu canal medular e cavidades, é revestida pelo endósteo. Ele é formado por células osteogênicas que junto com o periósteo desempenham papel relevante no crescimento e nutrição do tecido (HART et al., 2020).

Macroscopicamente, podemos classificar o osso em compacto ou esponjoso. O primeiro é caracterizado por apresentar massa sólida e sem cavidades, enquanto

o osso esponjoso possui cavidades intercomunicantes estruturadas em forma de feixes, denominadas trabéculas ou espículas. Nos ossos longos, a porção cilíndrica ou diáfise é majoritariamente constituída de osso compacto, enquanto o tecido esponjoso encontra-se mais presente nas extremidades ou epífises (ORYAN;



MONAZZAH; BIGHAM-SADEGH, 2015).

Figura 1: Representação histológica de uma porção de tecido ósseo e seus principais constituintes.

Fonte: JUNQUEIRA; CARNEIRO; ABRAHAMSOHN, 2017.

Do ponto de vista histológico, o tecido ósseo pode ser categorizado de acordo com o seu nível de maturidade e arranjo celular. O osso primário ou imaturo encontra-se em fase de desenvolvimento e caracteriza-se por apresentar fibras de colágeno dispostas em várias direções, sem uma estruturação bem definida. Já o osso secundário ou maduro tem as fibras colágenas dispostas em lamelas planas ou anelares, fazendo com que os osteócitos se organizem em fileiras (BUCK; DUMANIAN, 2012; HART et al., 2020).

Apesar da sua aparência inerte, o osso é um órgão altamente dinâmico e complexo, que sofre influência de fatores fisiológicos, nutricionais e físicos. O tecido ósseo está em constante estado de remodelação, que compreende as etapas de

formação e reabsorção (FLORENCIO-SILVA et al, 2015). A formação óssea é o processo pelo qual os ossos mudam de forma ou tamanho em resposta a influências fisiológicas ou forças mecânicas que são encontradas pelo esqueleto, enquanto a reabsorção ocorre para que o osso possa manter sua força e homeostase mineral (SALHOTRA et al., 2020).

Muitos fatores são importantes para que o tecido ósseo mantenha seu equilíbrio. Fatores de crescimento, prostaglandinas e citocinas produzidas pelas células ósseas participam ativamente da manutenção da homeostase. Outras substâncias que tem ação a nível sistêmico também estão envolvidas nesse processo. Podemos destacar o papel crucial da atuação do paratormônio (PTH), estrogênio, androgênio, calcitonina, calcitriol e glicocorticoides, que influenciam na fisiologia do tecido ósseo (FLORENCIO-SILVA et al, 2015).

A síntese da matriz óssea mediada pelos osteoblastos se dá pelas etapas de deposição dos componentes orgânicos e sua posterior mineralização. Uma vez que os componentes orgânicos são secretados, as vesículas de matriz são liberadas da membrana apical dos osteoblastos e se ligam a proteoglicanos que mobilizam íons de cálcio para serem armazenadas nas vesículas. Em seguida, os proteoglicanos são degradados por enzimas secretadas pelos osteoblastos, fazendo com que o cálcio seja liberado e atravesse os canais da membrana das vesículas (MURSHED, 2018).

Concomitantemente a esses processos, a fosfatase alcalina é secretada pelos osteoblastos para atuar na degradação de compostos contendo fosfato, liberando esses íons dentro da vesícula de matriz. Uma vez agrupados, os íons de fosfato e cálcio formam os cristais de hidroxiapatita. Essas etapas constituem a fase vesicular do processo de mineralização da matriz óssea. A supersaturação de cristais de hidroxiapatita dentro das vesículas faz com que haja a ruptura dessas estruturas e subsequente dispersão desse material pela matriz circundante, concluindo assim a fase fibrilar da mineralização (MURSHED, 2018). Após esse estágio, os osteoblastos maduros podem se transformar em osteócitos, ou sofrer apoptose (SCHAFFLER et al., 2013).

O corpo celular dos osteócitos maduros permanece totalmente aprisionado nas lacunas matriz mineralizada, enquanto seu citoplasma apresenta prolongamentos que formam vários canalículos. Estes, por sua vez, se ligam a outros osteócitos vizinhos através de junções comunicantes, facilitando o transporte

de oxigênio, nutrientes, íons e moléculas sinalizadoras entre eles (MCNAMARA et al., 2009). Essa rede celular interconectada também faz com que os osteócitos atuem como sensores capazes de identificar cargas mecânicas e pressões, transformando estímulos em sinais bioquímicos capazes de influenciar na fisiologia do tecido ósseo. Os osteócitos apoptóticos também controlam o processo de reabsorção óssea ao liberar fatores quimiotáticos, atraindo osteoclastos que irão englobá-los (BELLIDO, 2013; PLOTKIN, 2014).

Durante a reabsorção óssea, os osteoclastos se polarizam e reorganizam a estrutura da sua membrana de modo a expressar diferentes domínios que, em contato com a matriz mineralizada do osso, são capazes de liberar prótons e enzimas que permitem a dissolução dos cristais de hidroxiapatita e da porção proteica do tecido, levando à degradação óssea. Os produtos dessa reabsorção são endocitados e posteriormente secretados pela membrana plasmática (CHARLES; ALIPRANTIS, 2014).

A síntese, proliferação, diferenciação e atividade dos osteoblastos, osteócitos e osteoclastos deve ocorrer de maneira adequada, tendo em vista a complexidade das etapas que resultam na remodelação, reconstrução ou substituição de porções do osso. Dessa forma, a homeostase óssea depende do bom funcionamento e de ações conjuntas e orquestradas de todas as células que constituem o tecido (SIMS; GOOI, 2008; KENKRE; BASSETT, 2018).

Quando há um aumento anormal na síntese ou problemas relacionados ao mecanismo de atuação dos osteoclastos, a reabsorção excede a formação, levando a uma diminuição da densidade óssea. Esse efeito pode ser oriundo de fatores fisiológicos, patológicos ou congênitos (OWEN; REILLY, 2018). Além do processo de envelhecimento ser inevitável e irreversível, a redução significativa dos níveis de estrogênio em mulheres na menopausa deve ser levada em consideração como um agravante para a perda óssea e o surgimento de doenças, como a osteoporose (FENG; MCDONALD, 2011).

O estrogênio desempenha função importante na homeostase do tecido ósseo ao inibir a apoptose de osteócitos e osteoblastos. Além disso, ele também é capaz de regular a síntese, diminuir a ativação e estimular a apoptose dos osteoclastos, prevenindo o excesso de reabsorção óssea (FALONI et al., 2012; KHOSLA; OURSLER; MONROE, 2012). Além desses fatores fisiológicos, os defeitos ósseos podem se desenvolver a partir de diferentes origens, como infecção, tumor, trauma,

cirurgia, etiologia congênita, e assim por diante (KATSIMBRI, 2017; LOPES et al., 2018; OWEN; REILLY, 2018).

2.2 FRATURAS E MECANISMO DE CONSOLIDAÇÃO ÓSSEA

As fraturas são consideradas um rompimento parcial ou total do osso e podem ser classificadas segundo as causas como traumáticas, patológicas ou de estresse. Além de acometer de forma aleatória e frequente as pessoas em diferentes faixas etárias, as fraturas apresentam elevada incidência em mulheres no período pós-menopausa, devido à osteoporose, e em idosos, pelo maior número de quedas e fragilidade dos tecidos ósseo e muscular (ORWIG; CHAN; MAGAZINER, 2006; BRASIL, 2013).

Na ortopedia, as fraturas também são classificadas de acordo com o traço, podendo ser consideradas simples, em cunha ou cominutivas. O rompimento pode se apresentar de maneira transversa, longitudinal, oblíqua ou espiral. No que diz respeito ao comprometimento da articulação, as lesões podem ser intra ou extra-articulares. E, tendo em vista o dano ao tecido mole, elas são classificadas como fratura exposta ou fechada (ORYAN; MONAZZAH; BIGHAM-SADEGH, 2015).

Em condições normais, o osso é capaz de suportar cargas e absorver a energia que é conferida a ele. As fraturas traumáticas ocorrem em virtude algum impacto, queda ou esmagamento, que podem ser considerados traumas de alta ou baixa energia. Quando as fraturas acontecem em resposta a esforços leves ou de maneira espontânea, devido a alguma fragilidade na estrutura do tecido em consequência de diversas patologias, chamamos de fraturas patológicas. Já as de estresse, são aquelas resultantes de pressões frequentes e desgastes repetitivos (ORYAN; MONAZZAH; BIGHAM-SADEGH, 2015).

Além do dano ao próprio tecido ósseo, as lesões também podem prejudicar significativamente a pele, os músculos, nervos, vasos sanguíneos e órgãos adjacentes. Isso pode dificultar o tratamento da fratura, além de ocasionar problemas temporários e/ou permanentes ao indivíduo que sofre a lesão. A restauração da maioria dos tecidos é alcançada através da produção de tecido cicatricial para substituir a área lesada, que pode ter aspecto diferente ou interferir na sua função normal. Em contrapartida, o osso produz tecido ósseo verdadeiro no seu processo de recuperação (COPUROGLU; CALORI; GIANNODIS, 2013; SATHYENDRA; DAROWISH, 2013).

O processo de consolidação óssea é único e natural. Para que essa cicatrização ocorra de maneira adequada, é necessária uma série de ações ordenadas e concomitantes de vários tipos celulares presentes no organismo que tem a capacidade de induzir cascatas osteogênicas. A depender do tipo, local e gravidade da fratura, a recuperação de uma lesão óssea pode levar de dias a meses. Esse período pode se estender ainda mais, de acordo com o contexto específico de cada paciente (MARUYAMA et al., 2020).

Os eventos celulares e moleculares são estritamente regulados durante a cascata de cicatrização óssea, que pode acontecer de maneira primária (direta) ou secundária (indireta). A consolidação óssea primária é um mecanismo menos comum que apresenta pouca ou nenhuma resposta inflamatória e envolve a remodelação direta, sem formação de tecido externo. Para isso, é necessário que haja uma fixação rígida para impedir o deslocamento de fragmentos da fratura (ORYAN; MONAZZAH; BIGHAM-SADEGH, 2015; COTTRELL et al., 2016).

Na cicatrização direta, os ósteons (ou sistemas de Havers) dispostos ao longo do osso cruzam a lacuna da fratura e se proliferam até que ela seja preenchida. Os osteoclastos dispostos na matriz óssea abrem caminho para a formação de novos vasos sanguíneos que fornecem células endoteliais e mesenquimais para dar origem aos osteoblastos. Esses eventos resultam na formação de unidades de remodelação discretas, restabelecendo a continuidade mecânica do tecido (SATHYENDRA; DAROWISH, 2013).

A consolidação secundária inclui as fases inflamatória, reparativa e de remodelação. Imediatamente após o dano ósseo, inicia-se uma resposta inflamatória intensa que envolve a secreção significativa de diversas moléculas. Devido à ruptura dos vasos sanguíneos que é provocada pelo trauma, os osteócitos perdem sua fonte de nutrição e sofrem alterações necróticas e/ou degenerativas, gerando um hematoma. Este, por sua vez, coagula dentro e ao redor das extremidades da fratura, servindo de molde para a formação do calo ósseo (MARUYAMA et al., 2020).

Para iniciar a cascata inflamatória, diversas células são recrutadas, incluindo as interleucinas (IL) como a IL-1, IL-6, IL-11 e IL-18, e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), que tem seus níveis elevados significativamente. Esses mediadores têm efeito quimiotático em outras células pró-inflamatórias, atraindo leucócitos polimorfonucleares (PMNs) para o sítio da lesão (ADAMOPOULOS, 2018). Em

seguida, os macrófagos se infiltram para fagocitar as áreas necróticas, contribuindo para a regeneração por meio da liberação de diversas moléculas e fatores de crescimento como as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), fator de crescimento transformador- β (TGF- β), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF), que darão início aos processos de angiogênese e osteogênese (MAJIDINIA; SADEGHPOUR; YOUSEFI, 2017).

Esses fatores de crescimento são responsáveis pela migração, recrutamento e proliferação das células-tronco mesenquimais, que se diferenciam em angioblastos, osteoblastos, fibroblastos e condroblastos. Assim, o local da lesão é preenchido por um granuloma reparador derivado das células endoteliais, fibroblastos e osteoblastos. Em condições adequadas, a resposta inflamatória é breve, atingindo um pico em até 48 horas e desaparecendo uma semana após a fratura (MARUYAMA et al., 2020).

No estágio de reparação do processo de consolidação, o calo ósseo é formado à medida em que ocorre o aumento da vascularização e o restabelecimento da matriz de colágeno. Essa fase envolve a participação do periósteo e endósteo via indução dos processos de ossificação intramembranosa e endocondral. De modo geral, as células tronco mesenquimais (MSC) se diferenciam em condrócitos, células formadoras de cartilagem (PAJARINEN et al., 2019).

Os condrócitos se proliferam para criar um arcabouço celular que serve de apoio à matriz cartilaginosa que é secretada para preencher a região da fratura. Após essa etapa, eles sofrem uma diferenciação hipertrófica que estimula uma neovascularização e mineraliza essa matriz para que o calo mole assuma gradualmente a forma de calo cartilaginoso, promovendo estabilidade para a região lesionada. Em uma ação mediada pelo TNF- α , macrófagos, osteoclastos e condroclastos são recrutados afim de reabsorver a cartilagem mineralizada e estimular a apoptose dos condrócitos hipertróficos, evidenciando o final da fase de calo mole (MARUYAMA et al., 2020).

A etapa de remodelação envolve a mineralização e substituição do calo por osso mineralizado. À medida em que o calo cartilaginoso é removido, a produção de BMP-3, BMP-4, BMP-7 e BMP-8 aumenta, fazendo com que os osteoblastos sejam recrutados. Eles estimulam a formação de um calo duro que se inicia nas regiões periféricas e, progressivamente substitui o cartilaginoso completamente. Essa matriz

óssea inicialmente irregular é posteriormente convertida em osso lamelar (SATHYENDRA; DAROWISH, 2013).

Nessa terceira fase, os osteoclastos, osteoblastos e demais células ósseas agem em função de esculpir o osso devolvendo a sua forma, tamanho e funcionalidade adequados, restaurando a sua resistência mecânica e estabilidade. A fase é considerada completa quando todo o canal medular é recomposto, mas o processo de substituição e reparo do tecido seguem continuamente, e pode durar meses ou anos (CLAES; RECKNAGEL; IGNATIUS, 2012).

De modo geral, os mecanismos envolvidos na consolidação de fraturas ósseas apresentam inúmeras semelhanças com os processos de formação e reabsorção do esqueleto saudável. Ambos são regulados por vários marcadores pró-inflamatórios e elevação nos níveis de IL-1, IL-6, IL-11, TNF- α , interferon- γ (IFN- γ) e PTH, que desempenham papéis cruciais na osteogênese e consequente cicatrização e força do tecido lesionado (SALHOTRA et al., 2020).

A **Figura 2** esquematiza de maneira resumida as fases do processo de cicatrização óssea indireta, bem como os principais marcadores envolvidos. Quando a consolidação está ocorrendo em osso esponjoso, existem algumas diferenças no mecanismo pelo fato de as células estarem sempre próximas de regiões vascularizadas. Isso faz com que a substituição e remodelação ocorram na superfície das trabéculas, fenômeno conhecido como substituição rastejante (ORYAN; MONAZZAH; BIGHAM-SADEGH, 2015).

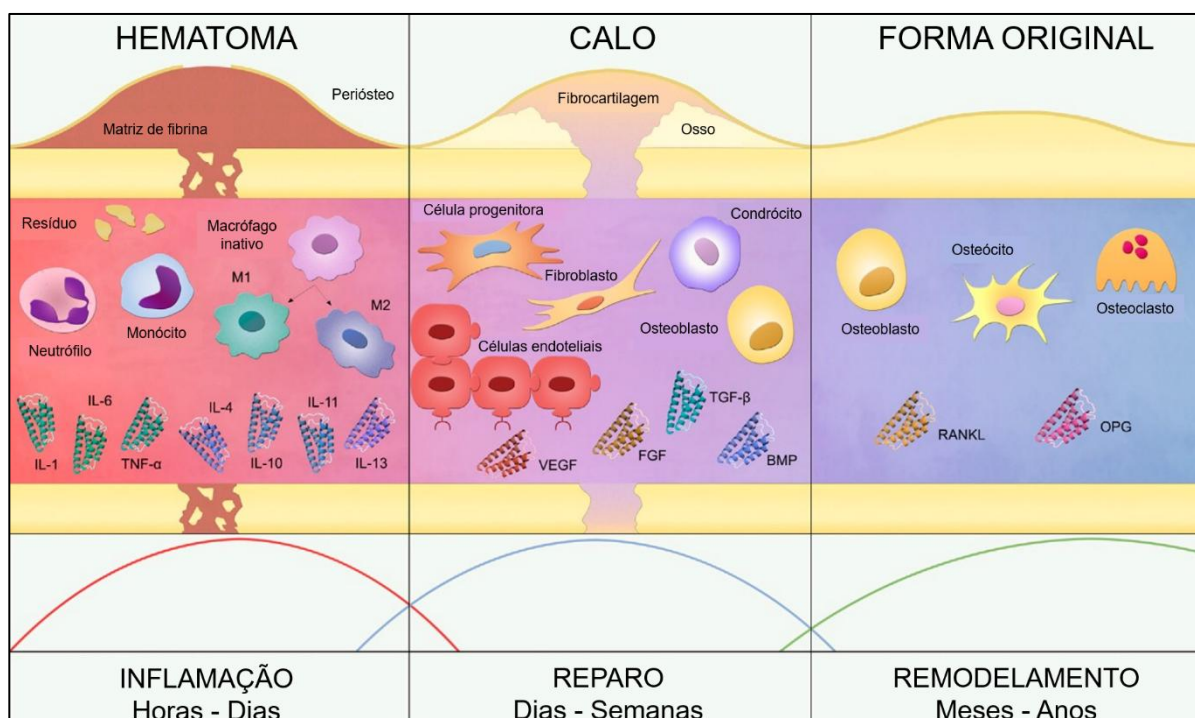


Figura 2: Etapas do processo de consolidação secundária de fraturas ósseas, seu padrão temporal relativo e principais moléculas envolvidas.

Fonte: adaptado de LAFUENTE-GRACIA et al., 2021.

Com o envelhecimento da população, o risco de sofrer qualquer fratura aos 50 anos de idade é de 53% entre as mulheres e 21% entre os homens. As lesões por osteoporose, especificamente, têm elevada prevalência em indivíduos do sexo feminino devido à fragilidade óssea decorrente da menopausa. Na América Latina, cerca de 19% das mais de 800 mil fraturas provocadas pela doença são na região do quadril, que está associada a um elevado nível de mortalidade (KLOP et al., 2016; AZIZIYEH et al., 2019).

Tendo em vista as particularidades de cada caso e as características de cada indivíduo que é acometido por uma lesão óssea, podemos considerar a ocorrência de complicações quando elas não são tratadas adequadamente. Uma fratura pode levar a quadros infecciosos, principalmente quando o osso é exposto, e necrose, devido à interrupção do fluxo sanguíneo no local. A atrofia muscular, o surgimento de trombos, a consolidação incorreta do tecido e até mesmo a não-união da lesão também são consequências que acontecem durante o tratamento (COPUROGLU; CALORI; GIANNOUDIS, 2013).

Além das consequências físicas, os impactos na saúde mental e na economia reforçam a necessidade da investigação progressiva de fatores de risco associados aos traumas, melhoria no acesso ao diagnóstico e tratamento, e alternativas para suprir a demanda por materiais bioativos que atuem efetivamente no processo de consolidação de fraturas (PINHEIRO et al., 2010; TOOSI; BEHRAVAN; BEHRAVAN, 2018).

2.3 NANOHIĐROXIAPATITA E REGENERAÇÃO ÓSSEA

Tradicionalmente, as abordagens biológicas para reparo ósseo envolvem o uso de autoenxertos e aloenxertos de osso esponjoso. Atualmente, as cerâmicas de fosfato de cálcio vêm se destacando como substitutos promissores para estimular a remodelação óssea ou regeneração de defeitos ortopédicos. Dentre esses materiais, a hidroxiapatita (HAP) é o principal componente da fase mineral da matriz óssea e apresenta excelente osteocondutividade e osteoindutividade, possibilitando a adesão e proliferação de células osteoblásticas (GRADO et al., 2018; LI et al., 2018).

Trata-se de um fosfato de cálcio estável e insolúvel, com fórmula molecular $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e estrutura cristalina hexagonal. Os métodos de síntese da HAP são amplamente explorados, uma vez que ela pode ser obtida por síntese hidrotérmica, precipitação e hidrólise, ou até utilizando recursos naturais, como ossos bovinos, ossos de peixes, conchas marinhas e cascas de ovo (VIANA et al., 2020).

A solubilidade da molécula de HAP pode ser modificada tanto de acordo com características alheias à própria substância, como tamanho, forma e porosidade, quanto pela presença de outros compostos orgânicos. Outra característica marcante da hidroxiapatita é a porosidade, responsável pela sua capacidade de adsorver aminoácidos, enzimas e proteínas. Isso favorece a formação de ligações diretas entre a HAP e os tecidos, fazendo com que ela seja importante em vários processos fisiológicos (SIDDIQUI; PICKERING; MUCALO, 2018).

As diferenças entre a HAP sintética e a biológica estão relacionadas basicamente à estequiometria e composição desses materiais. O fosfato de cálcio biogênico não é estequiométrico e pode apresentar diversas substituições iônicas em sua estrutura, sendo o íon carbonato (CO_3^{2-}) comumente encontrado no lugar da hidroxila. Geralmente, a HAP biológica é deficiente em íons cálcio em até 10% e tem baixa cristalinidade (CESTARI et al., 2021).

Apesar de apresentar características como bioatividade, biocompatibilidade, boa adesão ao tecido, osteocondução, endurecimento progressivo, reabsorção controlável e baixa toxicidade, a HAP tem baixa resistência mecânica. Esse problema está intrinsecamente relacionado a complicações no processo de consolidação de fraturas, e limita sua utilização a locais de pouco esforço. Assim, a maioria dos estudos atualmente buscam por maneiras de reforçar a microestrutura da matriz da HAP, utilizando-se de diversos materiais para formar compósitos e conferir maior tenacidade aos produtos (BONAN et al., 2014; RAMESH; MORATTI; DIAS, 2017).

Nos últimos anos, o estudo das partículas nanoestruturadas tem aumentado significativamente nas mais diversas áreas de pesquisa. A nanotecnologia lida com a matéria em escala molecular e atômica, entre 1 e 100 nanômetros, caracterizada por apresentar comportamento quântico. Naturalmente, o tecido ósseo está estruturado em dimensões que vão do macro ao nano, e com o avanço da nanotecnologia e as crescentes buscas por biomateriais eficazes na consolidação

óssea, a capacidade modulação do tamanho e morfologia dos cristais de HAP é de grande interesse clínico e tecnológico (VIEIRA et al., 2017; SEVERINO et al., 2019).

A hidroxiapatita nanoestruturada tem se mostrado cada vez mais eficiente no que diz respeito à celeridade com que essa nanopartícula pode promover a regeneração do osso. O desenvolvimento de materiais bioativos adequados para promover a regeneração óssea a partir da nanohidroxiapatita se fundamenta na estreita distribuição de tamanho dos cristais, elevado grau de pureza, e alta especificidade da sua área superficial. As propriedades mecânicas da nanopartícula também são úteis para minimizar o problema da falta de resistência e durabilidade dos revestimentos de HAP atendendo às exigências clínicas da sua utilização em fraturas de alto impacto (ŠUPOVÁ, 2014; AWASTHI et al., 2021).

Além da elevada osteocondutividade da nanohidroxiapatita, essa nanoestrutura é capaz de impulsionar a atividade dos osteoblastos, além de facilitar a interação com o endotélio vascular, e propiciar a formação de ligações covalentes estáveis com a matriz circundante. Considera-se que essa fase inorgânica sintética é capaz de induzir o crescimento ósseo devido à sua estrutura porosa, que reduz o tempo de densificação do tecido e promove a estabilização mecânica (LEE et al., 2014; HE et al., 2015).

Entre as diversas opções para o uso da nanoHAP em estudos de consolidação óssea, a incorporação desses cristais a um gel pode ser uma alternativa viável. O alginato de sódio é um polissacarídeo natural, de fórmula química $\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_6$, extraído de algas marrons. É um sal orgânico que atua modificando propriedades como a viscosidade, estabilidade, e capacidade de ligações entre as moléculas com quem interage. O diâmetro das partículas do gel de alginato de sódio pode variar do macro ao nano, e por se tratar de um material biocompatível, atóxico e biodegradável, ele é amplamente utilizado para encapsular materiais, sejam eles alimentícios, farmacêuticos, agrícolas ou biomédicos (GRIMAUDO et al., 2019; SEVERINO et al., 2019).

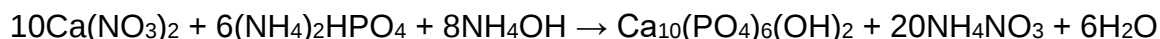
A busca por preparações para aplicações biomédicas é uma questão crítica que desafia a ciência e engenharia de materiais dos dias atuais, especialmente quando se trata do desenvolvimento de materiais de baixo custo a serem usados *in vivo*, que apresentem uma maior resistência mecânica. Dessa forma, os estudos de reparação óssea em modelos animais tendem a fornecer material experimental denso, permitindo a realização de testes mais extensos e fundamentais para a

busca por opções terapêuticas (ZHOU; LEE, 2011; ATMACA; AYDIN; MUSAOĞLU, 2013).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SÍNTESE DOS CRISTAIS DE NANOHIĐROXIAPATITA

A reação por co-precipitação foi o método utilizado no presente estudo por permitir a formação de uma única fase cristalina, de tamanho manométrico, seguindo a reação abaixo:



O processo sugerido neste protocolo está brevemente esquematizado na **Figura 3** e descrito detalhadamente nos próximos tópicos. Trata-se de uma síntese em emulsão onde um reagente encontra-se na fase dispersa e o outro na fase dispersora. Este processo permite a obtenção e precipitação de nanopartículas de HAP utilizando fosfato e hidróxido de amônio, nitrato de cálcio e poliacetato de vinila

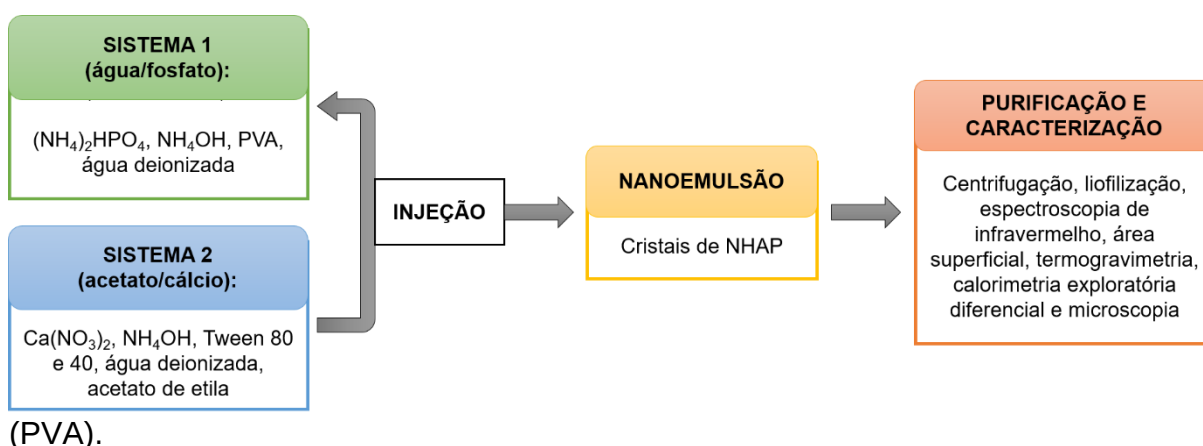


Figura 3: Esquematização do processo proposto para síntese da hidroxiapatita por co-precipitação. $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ = fosfato de amônio dibásico; NH_4OH = hidróxido de amônio; PVA = poliacetato de vinila; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ = nitrato de cálcio; NHAP = nanohidroxiapatita.

3.1.1 Solubilização do poliacetato de vinila

Em um béquer de 1 L, foram adicionados 360 mL de água saturada com acetato de etila. Em seguida, o recipiente foi colocado em um banho-maria sobre uma placa de aquecimento a 70 °C (IKA® RCT basic). Após atingir a temperatura adequada, foram acrescentados 36 g de poliacetato de vinila (MW: 9.000-10.000, 80% hidrolisado, Sigma-Aldrich®) sob agitação magnética (250 rpm) para obter uma solução de PVA 10%. A mistura foi mantida sob agitação e aquecimento por, no

mínimo, 30 minutos para solubilização do polímero. Em seguida, o béquer foi vedado e a solução foi reservada para resfriamento e posterior utilização.

3.1.2 Preparo dos sistemas para a precipitação da hidroxiapatita por nanoemulsão

3.1.2.1 Sistema 1 (água/fosfato)

Em um Erlenmeyer de 250 mL, foram adicionados 16,08 g de dihidrogenofosfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$, MERCK®, 99% pureza] e 40 mL de água destilada. Foi utilizado o MS2 Minishaker IKA® a 2500 rpm para acelerar a dissolução, sendo o pH final da solução medido com o auxílio de tiras, e a temperatura deve ser aferida com uso de termômetro do tipo laser point. A essa solução, foram adicionados 40 mL de hidróxido de amônio (NH_4OH) 25% p/v obtido por meio de diluição em capela de exaustão de NH_4OH P.A. (MERCK®). A solução de fosfato e hidróxido de amônio foi vertida no béquer que continha o PVA 10% sob um sistema de agitação mecânica (RW 20.n IKA®) de hélice simples. A solução foi armazenada em frasco de vidro de 500 mL com tampa rosqueada, devidamente identificado, e deixado em repouso por pelo menos 12 horas antes da injeção.

3.1.2.2 Sistema 2 (acetato/cálcio)

Em um Erlenmeyer de 250 mL, foram adicionados 80 mL de água destilada e 47,98 g de nitrato de cálcio tetra-hidratado $[(\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O})]$ P.A. (Dinâmica®). A agitação da mistura foi feita no Minishaker a 2500 rpm até a completa dissolução do sal, o que levou em média 15 minutos. Foram adicionados à solução de cálcio 20 mL de NH_4OH 25% p/v e. Foram pesados 39,72 g de Tween 80 (MERCK®) e 16,00 g de Tween 40 (Sigma-Aldrich®) juntos em um béquer de 250 mL. Para solubilizar os tensoativos foi utilizado um volume de 20 mL de água destilada e 100 mL de acetato de etila saturado com água, agitando com bastão de vidro.

Em um béquer de 1 L foram colocados 200 mL de acetato de etila saturado com água, em seguida foi montado o sistema de agitação mecânica com hélice simples, para que fossem acrescentados a solução básica de cálcio e o mix de tensoativos preparados inicialmente, sob agitação constante durante 3 minutos a 200 rpm. O pH e a temperatura final da mistura foram registrados, o sistema foi

armazenado em um frasco de vidro de 500 mL com tampa rosqueada, devidamente identificado, e deixado em repouso por pelo menos 12 horas antes da injeção.

3.1.3 Processo de injeção e reação

O sistema 2 foi mantido no frasco de vidro destampado, sob um sistema de ultra agitação (Ultra Turrax T-18 IKA®, haste S18N-196/07.205255) centralizado, com velocidade de 20.000 rpm. O sistema 1 foi transferido para o recipiente do banho circulador contendo um sistema de ultra agitação (Ultra Turrax T-25 IKA®, haste S25N-/07.199824) centralizado, na mesma velocidade de agitação. Este foi mantido em banho de gelo (Banho Termostatizado, Julabo®) a 20 °C, sendo a temperatura interna do sistema monitorada por meio de laser point.

O sistema de injeção foi montado com uma bomba peristáltica (TE-BP-01, TECNAL®), mangueira de silicone e agulha de Gauge n° 21 (0,71 mm Ø externo). Em seguida, foi iniciado o processo de injeção do sistema 2 sobre o sistema 1, a uma velocidade de 30%, sob agitação vigorosa do ultradispersor. Após a injeção, o sistema foi mantido sob ultra agitação pelo mesmo tempo necessário para o fim do processo. Finalizado o tempo de dispersão, a nanoemulsão contendo os cristais co-precipitados de nanohidroxiapatita permaneceu em agitação mecânica com hélice âncora a 100 rpm por 24 horas.

3.1.4 Purificação do material sintetizado

O material bruto obtido foi centrifugado em rotação com velocidade de 9.500 rpm durante 30 minutos a 10 °C (Centrífuga Hettich®, ROTINA 420 R) para separar o sobrenadante. Para isto, a nanoemulsão teve sua massa igualmente distribuída entre os recipientes da centrífuga, previamente pesados e identificados, e o processo decorreu seguindo as especificações do fabricante para o processo de centrifugação. Após o ciclo inicial de 30 minutos, o sobrenadante foi transferido para vidros com tampa rosqueada, identificado e reservado.

Para dar início ao processo de purificação, foi adicionada acetona P.A. (Dinâmica®) à hidroxiapatita de forma que a massa dos recipientes fosse igual. Os frascos foram tampados e agitados no Minishaker durante 3 minutos a 2500 rpm para serem redispersados à solução. Quando era necessário, utilizava-se também uma espátula para desprender resíduos presos à parede dos frascos. Inicialmente,

as amostras foram submetidas a três ciclos de centrifugação (dois ciclos de 5 minutos e um de 10 minutos de duração) a 10 °C e velocidade de 9.500 rpm, sendo a acetona substituída ao final de cada ciclo. Após a retirada de acetona da terceira centrifugação, o material foi mantido em dessecador com vácuo (Bomba Diafragma Edwards®) por 24 horas.

Para finalizar o arraste de impurezas por acetona, a hidroxiapatita sintetizada foi colocada em um béquer de 500 mL e misturada com 200 mL de acetona. Depois de homogeneizar o material com um bastão de vidro, a mistura foi submetida à ultradispersão com mini turrax (Ultra Turrax T-10 IKA® basic) a 30.000 rpm até que as partículas estivessem uniformes. Em seguida, a solução foi centrifugada durante 1 hora a 9.500 rpm e 10 °C e deixada em repouso no dessecador com vácuo por mais 24 horas para completa evaporação do solvente. Para garantir que o material estivesse completamente seco e concentrado, a hidroxiapatita foi liofilizada.

3.1.5 Caracterização da hidroxiapatita

3.1.5.1 Análise termogravimétrica

Na termogravimetria, a variação da massa do material (perda ou ganho) foi determinada em função da temperatura. Para a realização desse protocolo foi utilizado o equipamento da marca NETZSCH, modelo STA 409 PC/PG. As condições para o ensaio seguiram uma faixa de temperatura de 30 °C a 800 °C, com uma taxa de aquecimento igual a 10 °C/min⁻¹. Foram utilizados aproximadamente 10 mg de amostra, e o resultado obtido foi plotado numa curva.

3.1.5.2 Calorimetria exploratória diferencial

Para o ensaio de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram utilizados aproximadamente 9 mg de amostra no equipamento TA Instruments, modelo Q100. A faixa estudada foi de 25 °C a 375 °C, com o objetivo de medir a variação de energia da amostra, podendo determinar a temperatura de fusão, cristalização e entalpia da substância.

3.1.5.3 Determinação da área superficial específica

Na caracterização da área superficial específica (BET) foi utilizada a técnica de adsorção/dessorção física de nitrogênio a -196 °C, usando um equipamento

Micromeritics ASAP 2020[®]. Na realização da análise foram utilizadas massas de aproximadamente 200 mg de amostra, previamente tratadas em estufa a 150 °C por 24 horas. O pré-tratamento *in situ* que antecede a análise consiste no aquecimento da amostra a 150°C, sob vácuo.

3.1.5.4 Análise por espectroscopia de infravermelho

Para a análise de espectroscopia de infravermelho (FTIR), foi utilizado o espectrômetro de infravermelho Thermo Nicolet Nexu 470[®]. Todos os espectros foram obtidos por reflectância na faixa de 400 a 4000 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹, 64 varreduras, ganho 2 e abertura 100.

3.1.5.5 Caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura

A análise seguiu o método de preparo por individualização, no qual 0,01 g da amostra foi colocada em 10 mL de acetona contidos em tubo de ensaio e disperso por 1 minuto em um agitador. Com auxílio de uma micropipeta, foi retirada uma alíquota de 0,1 mL e adicionada sob uma fita de carbono previamente fixada no stub. O stub foi condicionado por 24 horas em dessecador com vácuo. Para o estudo morfológico de materiais deve-se optar sempre pelo não revestimento de sua superfície. Entretanto, devido a questões de má condução elétrica e adesividade da amostra, se fez necessário o uso do revestimento.

Neste estudo foi utilizado o revestimento em ouro, visando um tempo mínimo de revestimento. Sua utilização reflete em dois fatores, a saber, a qualidade da imagem e o detalhamento morfológico do objeto em análise em altas ampliações. Neste último, embora possa haver uma boa qualidade de imagem, nem sempre isso irá corresponder a um detalhamento da superfície ou da morfologia em análise.

3.2 OBTENÇÃO DA FORMULAÇÃO FINAL

3.2.1 Gel de alginato de sódio 2%

Em um béquer de 100 mL foram adicionados 0,1 g de hidróxido de sódio P.A. (NaOH, micropérolas, Dinâmica[®]), posteriormente solubilizado em 60 mL de água destilada. A mistura foi deixada sob agitação magnética até que estivesse completamente solubilizada e, em seguida, foi reservada. Em um béquer de 2 L, foram aquecidos 940 mL de água destilada na manta (IKA[®] RCT basic) com

termostato (IKA® ETS-D5) ajustado para 40 °C. O sistema de agitação mecânica (IKA® RW 20.n) com hélice simples foi montado, e após a água atingir a temperatura requerida, a solução de NaOH foi adicionada.

Num vidro de relógio foram pesados 20,0 g de alginato de sódio (ácido algínico de sódio, FMC Biopolymer) e adicionado ao sistema acima descrito aos poucos, com o auxílio de uma espátula. A mistura foi mantida sob agitação constante a uma velocidade de 320 rpm durante 30 minutos, para permitir a completa solubilização do alginato. Após obter uma preparação homogênea, foi aguardado o tempo necessário para o resfriamento do gel, sendo o conteúdo transferido para um frasco com tampa, previamente identificado, e armazenado à temperatura ambiente (± 25 °C).

3.2.2 Mistura com a nanohidroxiapatita

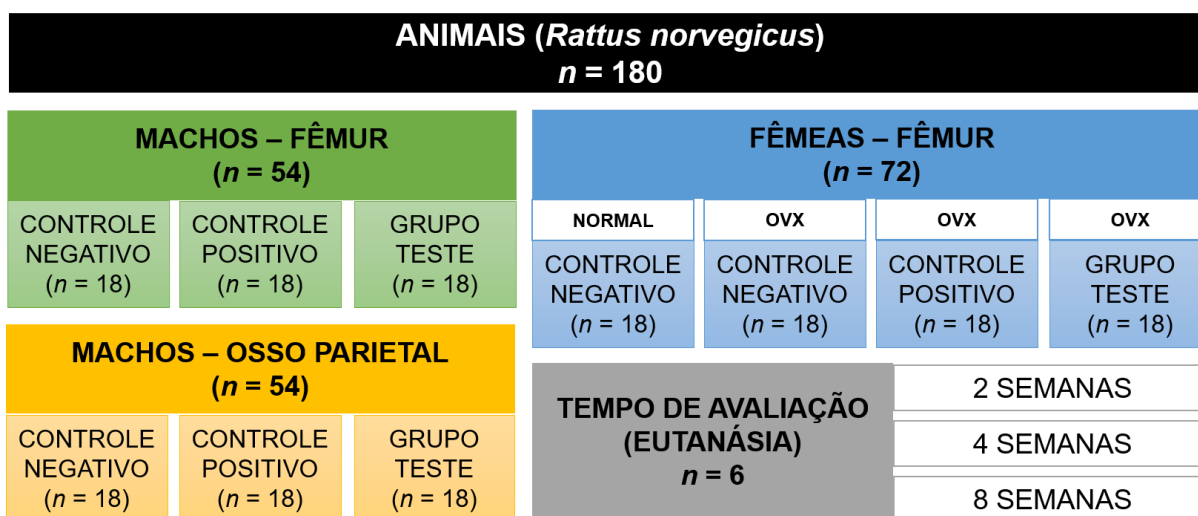
Depois de testadas diversas concentrações, tendo em vista a viscosidade do produto final e as circunstâncias em que este seria utilizado, a preparação escolhida para os testes em modelo animal foi uma mistura de gel de alginato de sódio 2% e nanohidroxiapatita 10%. Para tanto, 24 horas antes da realização das cirurgias, 5,0 g de gel foram misturados a 0,5 g de nanohidroxiapatita com o auxílio de um minimixer por um período de 10 minutos, até que fosse obtido um produto consistente e homogêneo. Posteriormente, o material foi identificado e armazenado à temperatura ambiente.

3.3 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os protocolos experimentais foram desenvolvidos nas dependências do Laboratório de Farmacologia Experimental, localizado no Campus Centro da UNIVASF, em Petrolina – PE. Todas as metodologias respeitam os critérios éticos de experimentação animal preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA), International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS) e Lei no. 11.794, de 8 de outubro de 2008. Além disso, este trabalho foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da universidade (CEUA-UNIVASF) tendo certificado de autorização com registro nº 0008/301019 (**Anexo A**).

Foram utilizados ratos machos e fêmeas (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, com 6 a 8 semanas de idade e peso variando de 170 a 300 g. Esses animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), mantidos em salas com exaustor, caixas de polipropileno forradas com maravalha, ciclo claro-escuro de 12 horas, água e ração *ad libitum*, e temperatura de 21 ± 1 °C.

Os ratos machos ($n = 108$) foram subdivididos em grupos de 18 animais de acordo com o tipo de tratamento, sendo 6 animais para cada tempo de avaliação, que foi de 2, 4 e 8 semanas. Eles foram submetidos à lesão cirúrgica no fêmur e no osso parietal, afim de avaliar as possíveis diferenças da cicatrização em osso cortical e trabecular. As fêmeas ($n = 72$) também foram divididas em subgrupos de 18 ratas, sendo três grupos previamente ovariectomizados (OVX) com o objetivo de mimetizar uma condição de osteoporose. O fêmur das fêmeas foi lesionado cirurgicamente, e os tempos de avaliação foram os mesmos. A **Figura 4**



esquematiza a divisão dos animais de acordo com os grupos.

Figura 4: Divisão dos animais e grupos experimentais.

3.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO E LESÃO

3.4.1 Lesão no fêmur

Para a realização da cirurgia, os animais foram anestesiados com uma mistura composta de cloridrato de cetamina (75 mg/kg), cloridrato de xilazina (10 mg/kg), midazolam (0,5 mg/kg), e morfina (3 mg/kg), por via intraperitoneal. Uma

vez anestesiados, os ratos foram tricotomizados de maneira a permitir a visualização do campo cirúrgico, que foi desinfectado com álcool 70%.

O acesso cirúrgico ao fêmur teve início por meio de uma incisão longitudinal de aproximadamente 2 cm em pele e músculo com lâmina de bisturi nº 21. Uma vez exposta a musculatura da área, a fáscia foi seccionada no mesmo sentido da incisão cutânea. Em seguida, as fibras teciduais foram divulsionadas com o auxílio de uma pinça de dissecação até a visualização da superfície óssea. Uma broca odontológica diamantada foi conectada a um motor de baixa rotação (Micromotor Marathon 3 Champion, Talmax®) para perfurar o fêmur, em ângulo reto, enquanto o tecido era irrigado manualmente com solução salina estéril.

A lesão foi criada na região de maior extensão látero-medial do terço médio do osso, com aproximadamente 2 mm de comprimento e profundidade suficiente para chegar ao canal medular. O defeito crítico foi tratado de acordo com o grupo experimental: gel de alginato de sódio 2% (controle negativo); nanohidroxiapatita 10% incorporada em gel de alginato de sódio 2% (grupo teste); ou Bio-Oss® (controle positivo).

Ao final do tratamento, foi feita uma sutura simples, com agulha e fio específicos, respeitando os planos das estruturas, promovendo a união das camadas musculares (com fio estéril e absorvível, Catgut cromado 4-0) e, por fim, do tecido cutâneo (com fio de sutura de Nylon preto, 5-0). Os cuidados pós-operatórios incluíram tratamento antimicrobiano com injeções subcutâneas de ampicilina (25 mg/kg), uma vez ao dia, por 3 dias, e tratamento analgésico e anti-inflamatório por via oral com ibuprofeno (15 mg/kg/dia), por 5 dias. Além disso, foi feito o acompanhamento do peso e temperatura dos animais durante os primeiros 5 dias do pós-operatório afim de avaliar aspectos relacionados à recuperação (estresse, perda de peso, alterações significativas de temperatura).

3.4.2 Lesão no osso parietal

Para realizar o procedimento, a anestesia geral foi induzida por injeção intraperitoneal de uma mistura de cetamina (75 mg/kg), xilazina (10 mg/kg), midazolam (0,5 mg/kg), e morfina (3 mg/kg). Após tricotomizar e desinfectar o campo cirúrgico com álcool 70%, foi feita uma incisão cutânea longitudinal mediana de aproximadamente 2 cm, sendo a musculatura e o mucoperiósteo expostos e dissecados.

Com o auxílio de uma broca odontológica diamantada conectada ao micromotor, uma lesão óssea redonda e simétrica de aproximadamente 3 mm foi feita na parte dorsal do osso parietal, em ângulo reto, sob irrigação com sor fisiológico estéril. De maneira semelhante ao protocolo descrito anteriormente, os tratamentos foram feitos de acordo com o grupo experimental: gel de alginato de sódio 2% (controle negativo); nanohidroxiapatita 10% incorporada em gel de alginato de sódio 2% (grupo teste); ou Bio-Oss® (controle positivo).

Depois de suturar a incisão com fio de Nylon preto 5-0, reposicionando os tecidos adjacentes, os ratos foram acomodados individualmente e submetidos aos mesmos cuidados pós-operatórios descritos em 3.4.1. Durante todo o período de avaliação, após a realização de ambos os protocolos, os animais foram mantidos em condições normais, com livre acesso à água e ração, respeitando o ciclo biológico claro-escuro de 12 horas e a rotina de higienização das caixas.

3.4.3 Ovariectomia bilateral

Diferentemente dos ratos machos que foram submetidos diretamente à lesão, as fêmeas foram anteriormente sujeitas a um procedimento cirúrgico de remoção bilateral dos ovários 4 semanas antes do defeito no fêmur. Esse protocolo foi realizado com a intenção de promover uma depleção hormonal, simulando as alterações que ocorrem após a menopausa. Para a realização da cirurgia, as ratas foram anestesiadas por via intraperitoneal com uma combinação de cetamina (75 mg/kg), xilazina (10 mg/kg), midazolam (0,5 mg/kg), e morfina (3 mg/kg). Elas foram dispostas em decúbito lateral para a tricotomia manual e assepsia cutânea dos flancos direito e esquerdo com álcool.

Uma pequena incisão foi feita com o bisturi através da pele e da musculatura da parede abdominal afim de identificar, expor e dissecar os ovários. Para evitar sangramentos, as extremidades das tubas uterinas e artérias anexas foram presas por uma ligadura feita com fio estéril absorvível, e então foi realizada a remoção dos ovários por meio de uma clivagem. As tubas foram reposicionadas e a sutura foi feita de acordo com os planos estruturais, utilizando Catgut cromado 4-0 para a camada muscular e Nylon 5-0 na camada cutânea. A manutenção e tratamento antimicrobiano, analgésico e anti-inflamatório dos animais após a cirurgia foi feito de maneira semelhante ao que foi descrito nos tópicos anteriores.

3.5 ANÁLISE BIOQUÍMICA DE MARCADORES HEPÁTICOS E RENAIIS

Decorrido o tempo de avaliação de cada grupo (2, 4 ou 8 semanas), seis ratos de cada um deles foram anestesiados com uma mistura de midazolam (5 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) por via intraperitoneal, e uma coleta de sangue foi realizada para dosar marcadores de função hepática e renal (transaminase glutâmico oxalacética, transaminase glutâmico pirúvica, albumina, ureia e creatinina). A amostra foi coletada com o auxílio de uma micropipeta após a segmentação da veia subclávia dos animais, obtendo em média 4 mL de sangue de cada um deles.

O material foi transferido imediatamente para um tubo de coleta à vácuo com ativador de coágulo (tampa vermelha, Vacuplast®). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a uma velocidade de 3500 rpm durante 10 minutos, para completa retração do coágulo. O soro foi cuidadosamente aspirado do tubo e transferido para um Eppendorf e devidamente congelado até a quantificação dos marcadores.

3.5.1 Transaminase glutâmica oxalacética

Para a determinação de TGO no soro dos animais foi utilizado um teste cinético (Bioclin® REF-K048) que tem como princípio de ação observar a reação mediada pela TGO, que catalisa a transferência do grupo amino do aspartato para o cetoglutarato, formando glutamato e oxalacetato. O reagente de trabalho foi preparado utilizando 4 partes do substrato para 1 parte da coenzima, sendo 1 mL desse reagente misturados com 100 µL do soro. Após a mistura, foi feita uma leitura inicial, disparando o cronômetro, seguida de repetições após 1, 2 e 3 minutos. Toda a avaliação foi feita em cubetas de vidro imersas em banho-maria a 37 °C, e as leituras realizadas em espectrofotômetro UV/VIS (Even®, modelo GTA-96) com comprimento de onda em 340 nanômetros. As médias das diferenças de absorbância por minuto ($\Delta A/\text{min}$) foram calculadas, e a dosagem de TGO na amostra foi obtida seguindo o cálculo descrito a seguir:

$$\text{TGO (U/L)} = \Delta A/\text{min} \times 1746$$

3.5.2 Transaminase glutâmica pirúvica

O teste cinético (Bioclin® REF-K049) utilizado para a determinação de TGP na amostra se baseou na reação de transferência do grupo amino da alanina para o α -

cetoglutarato, formando piruvato e glutamato. De maneira semelhante à determinação anterior, o reagente de trabalho foi preparado utilizando 4 partes do substrato para 1 parte da coenzima. Após a mistura de 1 mL do reagente de trabalho com 100 µL de amostra, foi realizada uma leitura inicial seguida de repetições após 1, 2 e 3 minutos. As condições de reação foram as mesmas descritas em 3.5.1, inclusive o comprimento de onda em que foi realizada a leitura e a fórmula utilizada para determinar a quantidade de TGP no soro.

3.5.3 Albumina

Para realizar a dosagem de albumina foi realizado um teste colorimétrico (Bioclin® REF-K040) que utiliza o Verde de Bromocresol. Na presença da albumina, ele forma um complexo corado diferente do seu aspecto original, exibindo um espectro que permite a dosagem da proteína. Nesse protocolo, foi feita uma mistura de 2,5 mL do reagente de cor com 10 µL de soro. Após a homogeneização, o conteúdo das cubetas foi deixado em repouso por 5 minutos, sendo a leitura realizada no espectrofotômetro com comprimento de onda em 630 nm e os valores obtidos por meio do cálculo abaixo, sendo os resultados expressos em grama por decilitro (g/dL).

$$\text{Albumina (g/dL)} = \frac{\text{Absorbância da Amostra} \times 3,8}{\text{Absorbância do Padrão}}$$

3.5.4 Ureia

A determinação de ureia na amostra é feita por meio de um teste enzimático colorimétrico (Bioclin® REF-K047) baseado na sua reação de hidrólise mediada pela urease, que resulta na formação de íons amônio e carbonato. Em meio alcalino, a amônia forma um composto esverdeado, cuja cor é proporcional à concentração de ureia presente no soro. Nas cubetas de vidro, foram adicionados 1 mL do reagente de trabalho e 10 µL de amostra, que foram homogeneizados e colocados em banho-maria 37 °C por 5 minutos. Passado esse período, foi adicionado ao sistema 1 mL do oxidante de trabalho, que foi também homogeneizado e mantido em banho-maria na mesma temperatura e pelo período de tempo e submetidos à leitura em 600 nm. Os resultados foram expressos em miligrama por decilitro (mg/dL), de acordo com a fórmula descrita abaixo:

$$\text{Ureia (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância da Amostra}}{\text{Absorbância do Padrão}} \times 70$$

3.5.5 Creatinina

Um teste colorimétrico baseado na cinética de tempo fixo (Bioclin® REF-K016) foi utilizado para dosar os níveis séricos de creatinina. Nele, a creatinina reage com o ácido pícrico para formar um complexo de cor amarelo-avermelhado. A sua quantificação é realizada através de duas leituras nos primeiros minutos da reação. Para isso, 1 mL de reagente de trabalho previamente homogeneizado foi colocado em cubetas dispostas em banho-maria a 37 °C, seguidas da adição de 100 µL de amostra. A absorbância foi verificada em 510 nm após 30 e 90 segundos da mistura. Os cálculos utilizados para obtenção dos resultados, expressos em mg/dL, estão apresentados em seguida.

$$\text{Absorbância da Amostra} = \text{Absorbância final} - \text{Absorbância inicial}$$

$$\text{Fator de Calibração} = \frac{\text{Concentração do Padrão (3 mg/dL)}}{\text{Absorbância do Padrão}}$$

$$\text{Creatinina (mg/dL)} = \text{Absorbância da Amostra} \times \text{Fator de Calibração}$$

3.6 EUTANÁSIA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL

Após a coleta de sangue, os animais receberam uma injeção letal de tiopental (120 mg/kg) por via intraperitoneal para dar prosseguimento à coleta do material histológico. As peças ósseas foram removidas e fixadas em formaldeído a 10% por 48 horas. Após a fixação, elas foram submetidas à descalcificação em solução de ácido nítrico 3% por 14 dias, desidratação em álcool, clarificação em xilol e inclusão em parafina histológica para obtenção dos cortes longitudinais na região da fratura, que foram corados com hematoxilina e eosina. A análise computadorizada das imagens histológicas foi realizada utilizando o programa ImageJ® 1.8.0, marcando estruturas importantes do tecido e quantificando sempre que possível a área de osso neoformado e matriz mineralizada através de uma contagem de pixels, mensurando o comprimento do tecido em micrômetros.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados numéricos obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.), e n representa o número de animais utilizados ou experimentos realizados em um dado protocolo. Utilizou-se um n de 6 animais em cada análise, e os valores foram comparados estatisticamente pela análise de variância de uma via (ANOVA one-way) com pós-teste de Dunnett, com o auxílio do programa Graph-Pad Prism[®] versão 6.0, sendo as diferenças entre as médias consideradas significantes quando o valor calculado de p foi menor que 0,05.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO DA NANOHIIDROXIAPATITA E OBTENÇÃO DO PRODUTO FINAL

Ambos os sistemas foram submetidos à ultra-agitação constante, e o sistema 2 foi solubilizado e injetado no sistema 1 com o auxílio de uma bomba peristáltica. O processo de injeção teve duração de 12 minutos, e foi observada a formação de uma nanoemulsão de aspecto leitoso. Para conter a formação de espuma, foram adicionados 20 mL de etanol (P.A., Alphatec®). Ao final do processo de injeção, a nanoemulsão permaneceu sob agitação no Turrax por mais 12 minutos. Em seguida, o Turrax foi substituído por uma âncora, que agitou a preparação por 24 horas a 100 rpm, com temperatura constante de 20 °C.

Após esse período, foi possível observar que a espuma desapareceu, e o produto da reação não apresentou alterações quanto ao seu aspecto físico. À medida em que o líquido era agitado, já era possível observar os pequenos cristais de HAP sendo arrastados pela âncora. Após a realização do processo de purificação



descrito em 3.1.4, o material (**Figura 5**) seguiu para a etapa de caracterização.

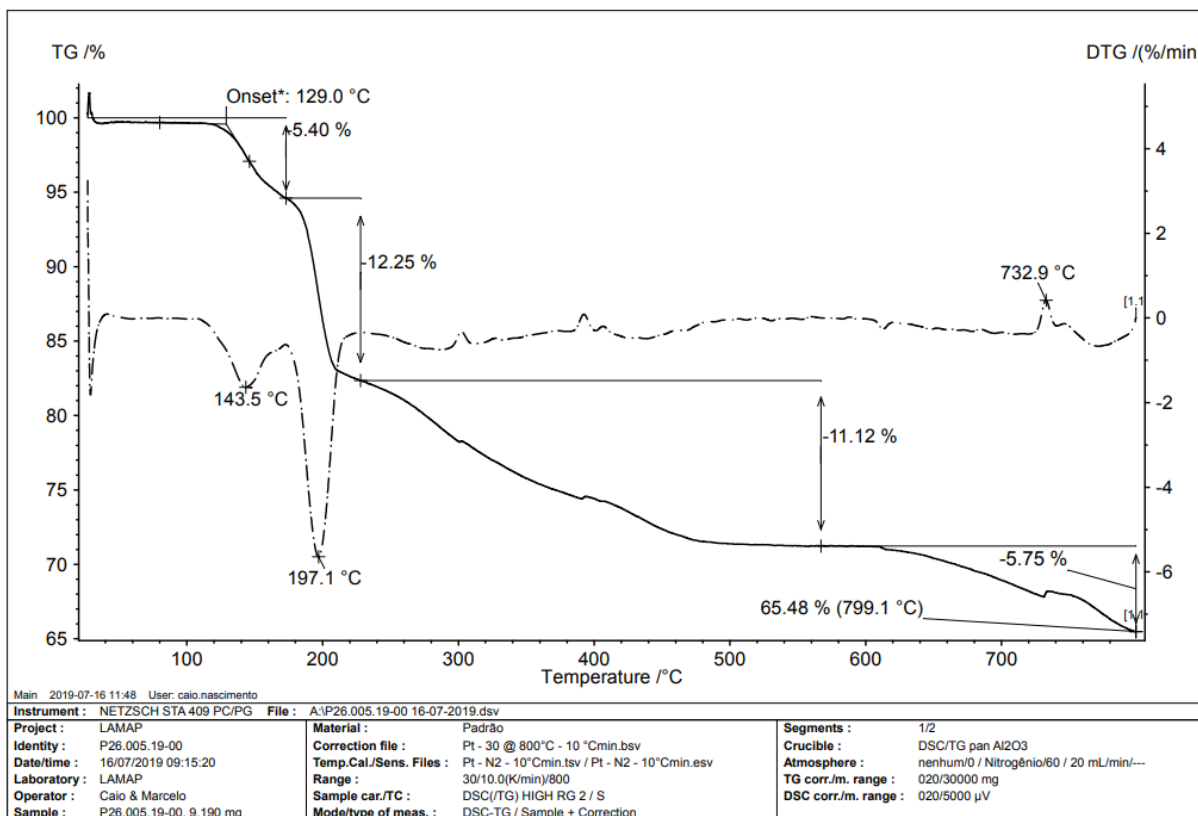
Figura 5: Etapas de concentração e purificação dos cristais de nanohidroxiapatita.

4.1.1 Análise termogravimétrica (TGA)

A termogravimetria é uma análise que fornece informações sobre a estabilidade e composição dos materiais. O gráfico apresenta a variação de massa em função da temperatura. No eixo das ordenadas é possível observar essas

alterações de massa de maneira quantitativa (curva TG), e os picos derivados dessa primeira curva, que mostram as áreas proporcionais em que a amostra sofreu variação (curva DTG) (BLANCO; SIRACUSA, 2021).

O resultado da análise de TGA é apresentado na **Figura 6**. A amostra de hidroxiapatita exibiu uma redução da massa inicial em 5,40% próxima de 129 °C que pode estar relacionada à perda da água fisicamente adsorvida na superfície da matriz cerâmica com a consequente absorção de energia. A segunda e terceira perdas significantes de massa ocorreram próximas de 220 °C (12,25%) e 570 °C (11,12%) que correspondem, provavelmente, à perda de material orgânico e de



água estrutural (SOFRONIA et al., 2014).

Figura 6: Curva de TGA para a amostra de nanohidroxiapatita sintetizada.

É possível observar que a degradação da massa continuou ocorrendo até que, ao final do experimento, restaram 65,48% da massa inicial. De acordo com outros estudos, a hidroxiapatita apresenta estabilidade significativa em relação à temperatura. As perdas de massa apresentam um somatório em torno de 3%, divergente dos resultados obtidos nesse estudo, onde o somatório dos eventos

resulta em 34,5% de perda, outro indicativo consistente da presença de impurezas na amostra (YEONG; WANG; NG, 2001; UDAYAKANTHA et al., 2015).

É importante mencionar que a degradação térmica do PVA ocorre através de um mecanismo combinado de vários eventos sequenciais. De acordo com a literatura, a maior perda de massa ocorre entre 240 °C e 360 °C, onde predominam as características de degradação da estrutura do polímero, e uma pequena redução também é encontrada entre 360 °C e 450 °C, que está associada à decomposição e carbonização do polímero (FIGUEIREDO; ALVES; BORGES, 2014). Dessa maneira, podemos supor que o PVA está presente em grande quantidade na amostra sintetizada.

4.1.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Este protocolo foi executado para avaliar a diferença no fluxo de calor associado às transições que o material sofre. A técnica permite observar mudanças químicas e físicas da substância, que englobam processos de absorção ou liberação de calor (BLANCO; SIRACUSA, 2021). A **Figura 7** mostra a curva de DSC para a amostra de nanohidroxiapatita obtida nesse estudo. Foram verificados picos endotérmicos em 171 e 191 °C, que apresentam elevado valor de entalpia e podem estar associados com a saída de água quimicamente ligada e uma elevada cristalinidade do material, respectivamente.

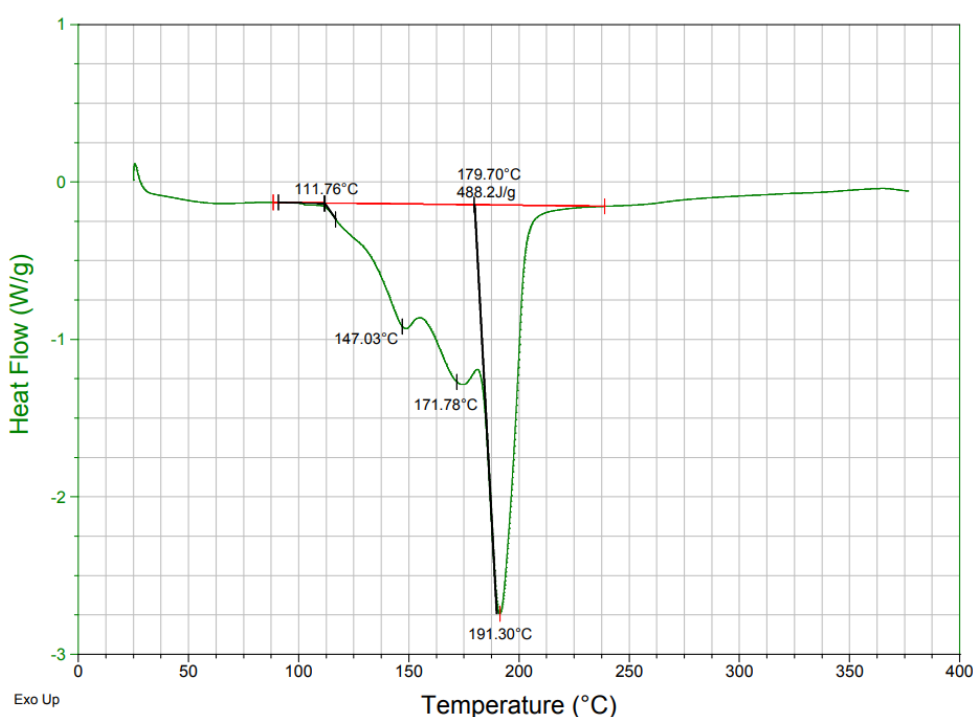


Figura 7: Curva de DSC para a amostra de nanohidroxiapatita sintetizada.

Como foi verificada a presença de PVA na amostra, é interessante apontar o que a literatura prediz sobre a análise térmica do polímero. No caso do PVA, é verificada uma temperatura de fusão entre 187 °C e 200 °C, onde tem início a sua decomposição (MINHAS et al., 2013; SKWAREK et al., 2017). Paralelamente às demais análises térmicas, a HAP sintetizada também foi submetida a uma gravimetria por calcinação de 0,50 g de amostra em 1000 °C durante 1 hora. A massa calcinada ficou em 36,12%, corroborando com os estudos de TGA.

4.1.3 Determinação da área superficial específica (BET)

O método de BET descreve a adsorção de moléculas de um gás sobre a superfície da matéria em estudo. Mediante a exposição do produto ao nitrogênio, as propriedades adsorptivas permitem calcular a extensão da sua superfície, estabelecendo uma correlação direta com a uniformidade da molécula, sua porosidade e o tamanho da partícula. É crucial na etapa de controle de qualidade de uma preparação, principalmente quando se trata de um material cerâmico, uma vez que essas propriedades podem afetar diretamente seu desempenho (BRUNAUER; EMMETT; TELLER, 1938).

O resultado obtido para o cálculo de área superficial foi $0,3572 \pm 0,0804 \text{ m}^2/\text{g}$, como mostra a **Figura 8**. É um valor muito aquém do esperado para uma nanopartícula que, somado aos resultados anteriores que indicam uma maior aglomeração das partículas e contaminação com resíduos da síntese. Portanto, se

BET Surface Area Report		
BET Surface Area: $0.3752 \pm 0.0804 \text{ m}^2/\text{g}$		
Slope: $12.252374 \pm 2.454619 \text{ g/cm}^3$		
STP		
Y-Intercept: $-0.650936 \pm 0.385189 \text{ g/cm}^3 \text{ STP}$		
C: -17.822710		
Qm: $0.0862 \text{ cm}^3/\text{g STP}$		
Correlation Coefficient: 0.9447399		
Molecular Cross-Sectional Area: 0.1620 nm^2		
Relative Pressure (P/Po)	Quantity Adsorbed ($\text{cm}^3/\text{g STP}$)	$1/[Q(Po/P - 1)]$
0.057365747	0.1872	0.325138
0.112924534	0.1860	0.684359
0.140366594	0.2016	0.810094
0.175355492	0.1758	1.209429
0.237972674	0.1207	2.586837

fez necessária a redispersão da nanohidroxiapatita em água destilada para um tratamento físico em ultrassom (modelo UP400S), na potência máxima, por 12 minutos.

Figura 8: Resultado da análise da área superficial da nanohidroxiapatita sintetizada.

4.1.4 Análise por espectroscopia de infravermelho (FTIR)

Essa análise se baseia na absorção e transmissão de energia que ocorre quando a radiação infravermelha alcança a amostra, onde cada ligação vibra em uma energia diferente, absorvendo comprimentos de onda específicos e criando um espectro particular e característico para cada molécula (TIERNAN; BYRNE; KAZARIAN, 2020). Seguindo as etapas de caracterização da nanohidroxiapatita, a amostra foi submetida à técnica de FTIR, e a **Figura 9** mostra o espectro do material sintetizado antes de ser submetido ao tratamento em ultrassom. As bandas em destaque estão descritas na **Tabela 1**, com indicação dos respectivos grupos característicos.

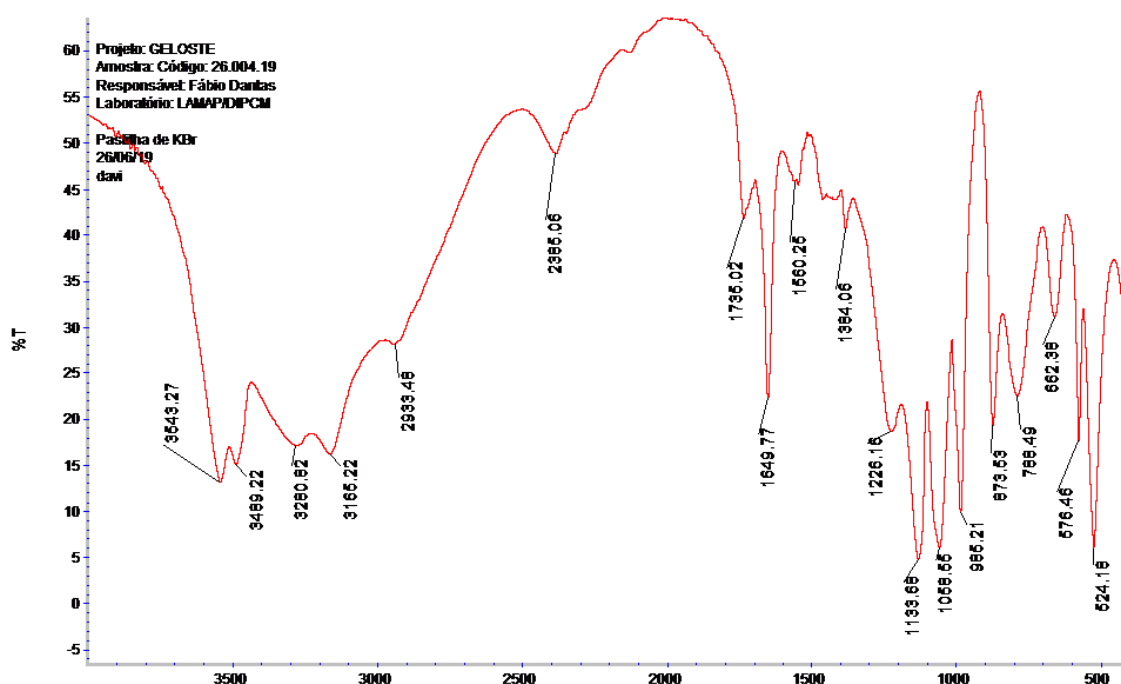


Figura 9: Espectro da nanohidroxiapatita produzida neste estudo antes do tratamento em ultrassom.

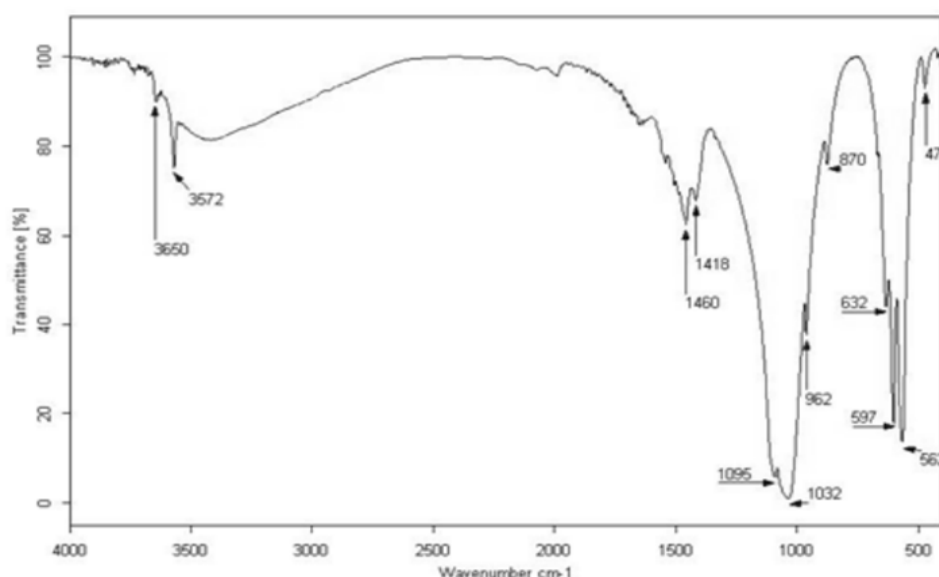
Tabela 1: Descrição das bandas de absorção do material sintetizado.

NÚMERO DE ONDA (cm-1)	GRUPO CARACTERÍSTICO
3543	Vibração OH de moléculas de água
3489	Estiramento -OH
1649	Deformação H-O-H de H ₂ O

1133	Estiramento assimétrico P-O
1068	Estiramento assimétrico P-O
986	Estiramento simétrico de P-O
630	Estiramento OH
602	Deformação O-P-O em HPO_4^{2-}
576	Deformação angular assimétrica O-P-O

Analisando de maneira pontual, alguns estudos já publicados afirmam que são esperadas as seguintes bandas para HAP: em torno de 3571 cm^{-1} indicando a presença do estiramento da ligação O-H estrutural; e 1172 , 1088 , 1025 e 963 cm^{-1} indicando a presença dos grupos PO_4^{3-} , que são tipicamente descritas para esse fosfato de cálcio. Bandas com comprimentos de onda próximos de 3449 e 1640 cm^{-1} correspondem a moléculas de água fisicamente ligadas à superfície da substância (KONGSRI et al., 2013).

Comparando o espectro do material produzido com uma nanohidroxiapatita da literatura (ZAMANI; SALAH; MOBASHERPOUR, 2013), a **Figura 10**, é possível observar a presença de inúmeras bandas que certamente estão associadas aos resíduos da síntese. Dentre os materiais que podem estar presentes na hidroxiapatita sintetizada nesse estudo estão o PVA, Tween 80, Tween 40 e acetato



de etila.

Figura 10: Espectro da nanohidroxiapatita da literatura.

Fonte: ZAMANI; SALAH; MOBASHERPOUR, 2013.

A presença desses materiais não é considerada um fator completamente desfavorável, uma vez que para estabelecer a incorporação adequada dos cristais

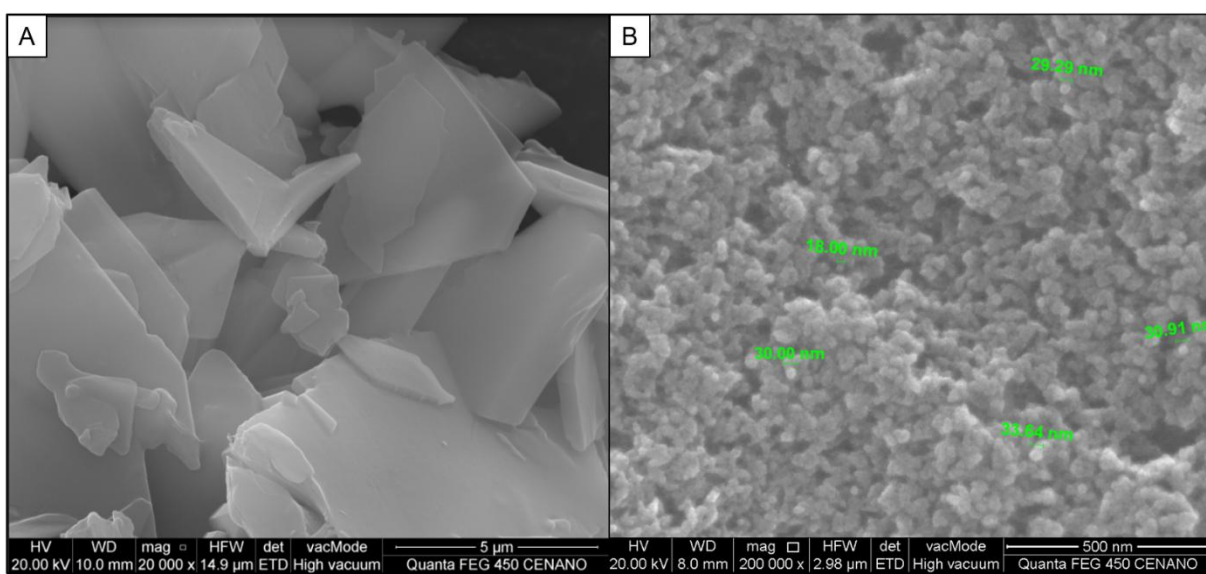
de nanohidroxiapatita à base em que foi formulado o produto final, é imprescindível a presença de tensoativos, principalmente os poliméricos não-iônicos. Ainda assim, a utilização da técnica de tratamento em ultrassom além de proporcionar uma desaglomeração da amostra, se mostrou eficiente no processo de purificação do material sintetizado.

Esse método de ultrassom permite a produção de cavitação no meio aquoso, onde a amostra se encontra, induzindo assim a formação, crescimento e colapso de microbolhas, devido às ondas de choque (GEDANKEN, 2004). Essa agitação provoca a dissolução e precipitação de sólidos que reduz o tamanho de partícula, influenciando e auxiliando na obtenção de nanocristais (BARBOSA et al., 2013).

4.1.5 Caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens geradas pela MEV possibilitam a realização de diversas análises de natureza estrutural ou química de vários sistemas. O princípio da técnica envolve a interação entre a amostra e o feixe de elétrons disparado durante o ensaio, que fazem uma varredura na superfície das moléculas. A energia dos elétrons secundários ou retroespalhados é captada durante essa interação pelo detector do equipamento, que gera imagens de alta ampliação e alta definição da amostra (DUARTE et al., 2003).

As estruturas de escala micrométrica e nanométrica são amplamente avaliadas utilizando microscopia de varredura. A **Figura 11** ilustra a morfologia apresentada antes **(A)** e depois da amostra ser submetida ao ultrassom, com medição do tamanho de partícula **(B)**. Na primeira imagem, uma hidroxiapatita aglomerada, densa, na forma de lâminas, que destoa do resultado esperado, que é um sistema particulado em nível nanométrico. A forma nanoestruturada do material



só ficou evidente após o tratamento com ultrassom, onde foi possível observar partículas menores que 35 nanômetros.

Figura 11: Imagem da nanohidroxiapatita sintetizada antes (A) e depois (B) de ser submetida ao ultrassom, com medição do tamanho de partículas.

4.1.6 Obtenção do produto final

A adição do alginato de sódio ao sistema descrito em 3.2.1 formou um gel de viscosidade moderada, com pH final em torno de 8,0, aparência límpida e amarelada. Esse foi o veículo do produto final, também utilizado neste estudo como controle negativo. A preparação foi feita sempre 24 horas antes dos procedimentos cirúrgicos de lesão óssea. Uma vez preparada a base da formulação, 5 g de gel foram pesados e separados para serem misturados com 0,5 g de nanohidroxiapatita. A incorporação foi feita com um minimixer e, conforme ilustra a **Figura 12**, o aspecto do produto final se apresentou como uma preparação consistente, com maleabilidade suficiente para preencher os defeitos ósseos.

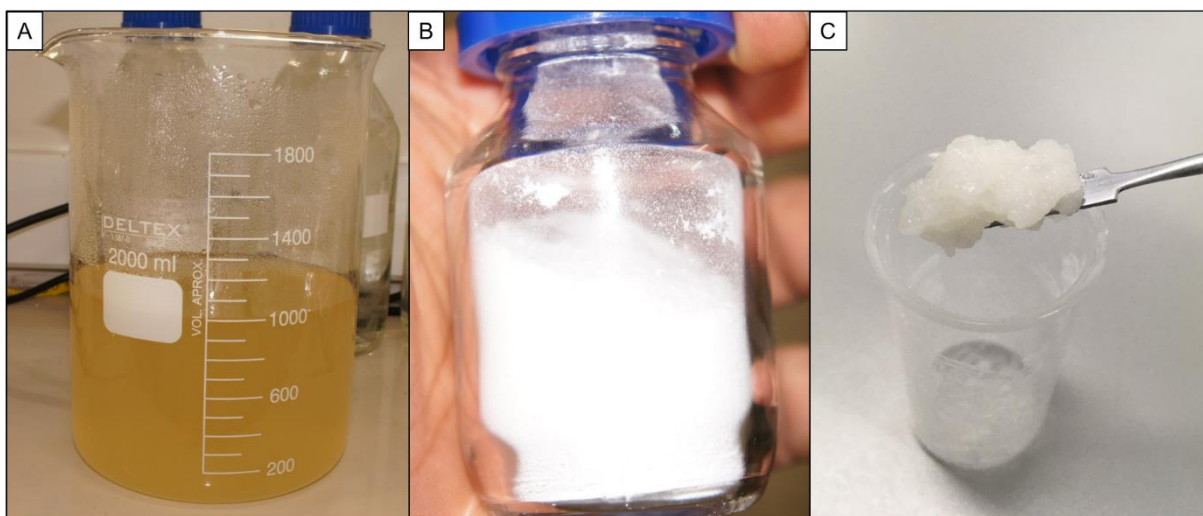


Figura 12: Gel de alginato de sódio (A), cristais de nano hidroxiapatita (B) e formulação final (C) após a mistura dos dois componentes.

O alginato é um polissacarídeo amplamente conhecido pela sua capacidade de suporte para o crescimento celular e, na formulação, a intenção é que ele atuasse como um veículo que auxiliasse no preenchimento dos poros e permitisse gerar o ambiente aquoso de migração celular. A nanohidroxiapatita, por sua vez, seria capaz de potencializar os processos de fixação e diferenciação celular, além de servir como fonte de cálcio e fósforo devido a sua elevada capacidade de

bioabsorção. Dessa forma, o restabelecimento do tecido pode ocorrer por meio do confinamento do gel dentro dos poros, e a escolha da concentração se baseou na processabilidade do material.

Para fins de comparação, a substância escolhida para o grupo controle positivo foi um substituo ósseo mundialmente utilizado no ramo da odontologia. O Bio-Oss® é conhecido pela excelente osteocondutividade e suas partículas apresentam uma superfície ultraporosa, que permitem uma regeneração eficiente do tecido, tendo sua eficácia confirmada em diversos estudos científicos. É um material de fácil manuseio e aplicação que, devido às suas propriedades hidrófilas, em contato com soro fisiológico ou sangue é facilmente moldado, aderindo bem ao defeito ósseo (ORSINI et al., 2005; JUNG et al., 2012).

4.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS DE LESÃO

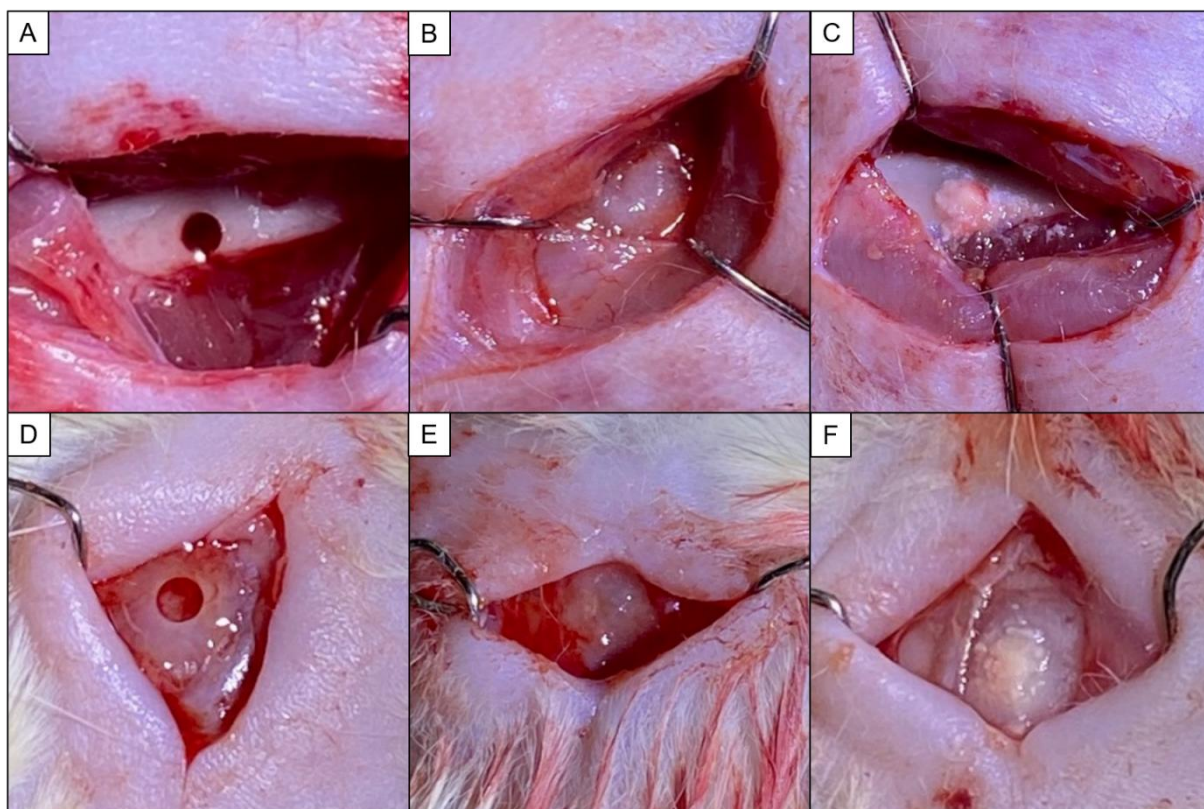
De modo geral, as cirurgias de lesão ocorreram sem nenhuma intercorrência, com duração de 20 a 30 minutos por animal. Também não foi notado nenhum sinal de complicação no pós-operatório dos animais fraturados, tendo em vista que poucas horas após a realização do procedimento, todos os animais já conseguiam se movimentar com facilidade e se alimentar normalmente.

Na **Figura 13** é possível observar a representação do aspecto da lesão mediante o tratamento com o gel de alginato de sódio 2% (controle negativo), nanohidroxiapatita 10% incorporada em gel de alginato de sódio 2% (grupo teste) ou Bio-Oss® (controle positivo), respectivamente. Os defeitos ósseos no fêmur são apresentados na **Figura 13A, B e C**, enquanto a **Figura 13D, E e F** representam as lesões no osso parietal. Por se tratar de um procedimento invasivo que requer um bom acompanhamento, concomitante ao tratamento analgésico, anti-inflamatório e antimicrobiano também foram registradas as variações de peso e temperatura observadas nos primeiros dias de pós-operatório dos animais.

O peso corporal se manteve constante e sem alterações significativas tanto para os machos quanto para as fêmeas, em ambos os tipos de lesão, evidenciando que o procedimento cirúrgico e o processo de recuperação correram dentro do esperado. As medições de temperatura foram realizadas com termômetro do tipo laser point direcionado para a cabeça. Este método tem a limitação de apresentar muita variação, uma vez que não há contato cutâneo direto, como é o caso do uso

da via retal validado e padronizado por Tomazetti e colaboradores (2005) para modelos animais de atividade antipirética.

A avaliação da temperatura com o termômetro infravermelho foi uma alternativa rápida e sem contato, para que os animais não fossem submetidos a nenhum estresse adicional em demasia, além do que já é avaliado no estudo. Foram



observadas muitas variações de temperatura para ambos os sexos, mas é comum que os animais apresentem perda de calor corpóreo em cirurgias de lesão, que pode explicar as primeiras medições sempre em níveis baixos para todos os grupos, já que o registro do primeiro dia foi feito logo após a indução do defeito ósseo (VIALLE et al., 2002).

Figura 13: Animais tratados com gel de alginato de sódio 2% (controle negativo) (A e D); nanohidroxiapatita 10% incorporada em gel de alginato de sódio 2% (grupo teste) (B e E) ou Bio-Oss® (controle positivo) (C e F), em procedimentos cirúrgicos de lesão no fêmur e osso parietal.

4.3 ANÁLISE BIOQUÍMICA DE MARCADORES HEPÁTICOS

Com o intuito de avaliar se as substâncias utilizadas para o tratamento dos defeitos ósseos eram capazes de gerar algum dano ao fígado, foram realizados os testes de função hepática por meio da dosagem de marcadores como o TGO ou aspartato amino transferase (AST), TGP ou alanina amino transferase (ALT) e

albumina. O nível sérico desses biomarcadores hepáticos foi analisado utilizando kits laboratoriais com procedimentos já padronizados pelo fabricante.

Utilizando pequenas amostras de soro dos animais, foi possível obter a quantificação dessas substâncias, que pode ser observada na **Tabela 2**. Ela apresenta as médias e erro padrão para machos e fêmeas de acordo com o tipo de lesão que sofreram, respeitando os grupos experimentais e o tempo de duração de cada experimento. Os valores para cada animal foram agrupados e comparados com seu respectivo controle negativo.

Tabela 2: Quantificação de biomarcadores hepáticos presentes nas amostras dos animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos de lesão óssea.

LOCAL DA LESÃO E DURAÇÃO DO EXPERIMENTO	GRUPO	TGO/AST (U/L)	TGP/ALT (U/L)	ALBUMINA (g/dL)
Fêmur ♂ (2 semanas)	CN	159,68 ± 4,81	60,58 ± 2,25	2,21 ± 0,09
	NH	170,64 ± 12,55	70,90 ± 4,21	2,32 ± 0,12
	CP	195,02 ± 6,36*	68,48 ± 3,16	2,28 ± 0,12
Fêmur ♂ (4 semanas)	CN	171,01 ± 16,22	68,48 ± 10,70	2,20 ± 0,06
	NH	167,84 ± 6,56	81,48 ± 3,17	2,35 ± 0,09
	CP	142,88 ± 12,63	72,45 ± 6,45	2,08 ± 0,09
Fêmur ♂ (8 semanas)	CN	164,89 ± 6,38	77,40 ± 3,59	2,17 ± 0,10
	NH	139,09 ± 9,88	59,65 ± 6,84	2,36 ± 0,08
	CP	192,25 ± 10,38	67,12 ± 10,27	2,31 ± 0,13
Fêmur ♀ (2 semanas)	CN	126,10 ± 7,58	52,18 ± 7,67	2,77 ± 0,17
	ØCN	120,18 ± 5,71	48,79 ± 8,63	2,79 ± 0,26
	ØNH	123,95 ± 13,40	62,27 ± 12,02	2,46 ± 0,03
	ØCP	118,68 ± 8,41	51,99 ± 13,64	2,30 ± 0,11
Fêmur ♀ (4 semanas)	CN	122,20 ± 14,72	60,43 ± 9,81	2,80 ± 0,09
	ØCN	118,53 ± 5,77	74,98 ± 18,77	2,90 ± 0,13
	ØNH	109,13 ± 7,06	39,63 ± 2,68	2,48 ± 0,09
	ØCP	107,57 ± 7,34	62,08 ± 12,02	2,57 ± 0,09
Fêmur ♀ (8 semanas)	CN	148,51 ± 5,68	57,91 ± 12,31	2,62 ± 0,19
	ØCN	122,12 ± 13,89	82,64 ± 5,17	2,67 ± 0,21
	ØNH	115,62 ± 11,36	51,21 ± 6,24	2,66 ± 0,10
	ØCP	124,94 ± 5,50	45,29 ± 10,13	2,63 ± 0,06
Osso parietal ♂ (2 semanas)	CN	113,98 ± 6,40	62,95 ± 3,82	2,16 ± 0,09
	NH	149,38 ± 11,39	63,14 ± 5,45	2,30 ± 0,09
	CP	133,76 ± 22,64	77,69 ± 9,56	2,28 ± 0,05
Osso parietal ♂ (4 semanas)	CN	135,90 ± 13,15	63,24 ± 4,81	2,27 ± 0,11
	NH	161,26 ± 8,20	72,55 ± 3,38	2,36 ± 0,06
	CP	134,05 ± 15,96	75,75 ± 5,19	2,39 ± 0,09
Osso parietal ♂ (8 semanas)	CN	160,29 ± 11,29	66,63 ± 5,29	2,34 ± 0,05
	NH	150,25 ± 14,17	81,86 ± 7,69	2,14 ± 0,09

	CP	147,15 ± 7,56	83,42 ± 7,06	2,41 ± 0,08
--	----	---------------	--------------	-------------

Os dados estão apresentados como média ± e.p.m. ($n = 6$). ♂ = machos; ♀ = fêmeas; Ø = fêmeas ovariectomizadas 4 semanas antes da lesão; CN = grupo tratado com gel de alginato de sódio 2% (controle negativo); NH = grupo tratado nanohidroxiapatita 10% incorporada em gel de alginato de sódio 2% (grupo teste); CP = grupo tratado com Bio-Oss® (controle positivo); * = $p < 0,05$ (ANOVA *one-way* com pós-teste de Dunnett: controle vs tratamentos, de acordo com o tempo).

Os resultados apresentados sugerem, considerando a maioria dos grupos analisados, que a utilização dos tratamentos não provocou alterações relevantes no funcionamento do fígado dos animais. Todavia, um aumento da atividade enzimática de TGO/AST foi observado no grupo de machos com lesão no fêmur tratados com Bio-Oss® e submetidos à eutanásia após 2 semanas do procedimento, obtendo uma média de $195,02 \pm 6,36$ U/L, que apresenta uma diferença significativa quando comparado estatisticamente à média do controle negativo do mesmo período experimental ($159,68 \pm 4,81$ U/L).

O fígado é um órgão que desempenha diversas funções vitais e apresenta uma elevada heterogeneidade anatômica e funcional. Ele atua diretamente na síntese, regulação do metabolismo, armazenamento, degradação e excreção de várias substâncias, além de auxiliar os sistemas imunológico e endócrino (TREFTS; GANNON; WASSERMAN, 2017). Devido ao seu papel crucial na manutenção do equilíbrio entre as funções do organismo, a avaliação do seu desempenho é muito importante, principalmente quando se trata da busca por novas substâncias terapêuticas (GOODMAN, 2017).

Histologicamente, esse órgão cavitário está organizado em lóbulos que são constituídos por hepatócitos. Estes, por sua vez, são células epiteliais polarizadas e parenquimatosas presentes em abundância e de maior importância do ponto de vista funcional do fígado (TREFTS; GANNON; WASSERMAN, 2017). Quando ocorre o rompimento de um hepatócito em decorrência de alguma hepatopatia, as transaminases são liberadas na corrente sanguínea, permitindo a identificação e avaliação de dano ao tecido (GOODMAN, 2017).

Apesar de a enzima TGO/AST ser considerada uma substância indicadora de lesão hepática aguda por se encontrar livre no citoplasma e nas mitocôndrias dos hepatócitos, ela também é expressa em vários outros tecidos, como cérebro, coração, músculos e pâncreas. Em contrapartida, a TGP/ALT, está presente primariamente no citosol das células hepáticas, sendo considerado um marcador

mais específico para o tecido (THRALL et al., 2015; KWO; COHEN; LIM, 2017; CHURCH et al., 2018). Por esse motivo, o aumento isolado no nível de AST verificado nesse estudo não é suficiente para caracterizar uma lesão ao fígado.

Além disso, a ausência de outros estudos que indiquem alterações semelhantes provocadas pelo uso do Bio-Oss® e a ausência de mudança nos níveis de ALT dos animais reforçam que o aumento da atividade enzimática observada pode estar relacionado a uma limitação do próprio método e possíveis disfunções metabólicas e/ou genéticas pré-existentes.

Outra maneira comumente utilizada para avaliar a função hepática é a quantificação de albumina, uma proteína plasmática sintetizada unicamente pelo fígado (FANALI et al., 2012). Trata-se de um metabólito abundante e responsável pela manutenção da pressão osmótica do plasma sanguíneo, além de atuar como um transportador para diversos tipos de substâncias (NISHI; YAMASAKI; OTAGIRI, 2020). A albumina é um bom indicador de dano hepato-celular crônico, considerando que a redução nos seus níveis só é constatada quando o comprometimento do órgão já está bastante avançado. Além de disfunções hepáticas, alterações na concentração de albumina sérica podem ocorrer em situações de quadros inflamatórios orgânicos (SPINELLA; SAWHNEY; JALAN, 2015).

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, o tratamento de animais submetidos à procedimentos cirúrgicos de lesão com gel de alginato de sódio, nanohidroxiapatita ou Bio-Oss® não provocam alterações significativas nos níveis séricos de biomarcadores hepáticos que sejam capazes de caracterizar uma lesão ao fígado. Os dados contribuem para o princípio da biocompatibilidade e ausência de toxicidade esperada para os produtos que possam vir a ser utilizados como substitutos ósseos.

4.4 ANÁLISE BIOQUÍMICA DE MARCADORES RENAIIS

Prosseguindo com a investigação por possíveis efeitos indesejados dos tratamentos utilizados nesse estudo a nível sistêmico, foi realizada uma dosagem de marcadores renais. De maneira semelhante, os dados foram obtidos por meio de técnicas já padronizadas pelo fabricante do kit de análise bioquímica. A função renal foi avaliada pela quantificação sérica de ureia e creatinina nas amostras dos animais. Essa verificação é de suma importância, uma vez que os rins também

garantem a homeostase do organismo através da excreção de diversas substâncias, cruciais para a regulação metabólica.

Os valores de ureia e creatinina são apresentados na **Tabela 3**, onde é possível observar a média e erro padrão dos resultados obtidos para machos e fêmeas fraturados. Os dados estão dispostos de acordo com o grupo experimental, separados por tipo de lesão, sendo cada tratamento comparado estatisticamente com o grupo controle negativo do seu respectivo período experimental.

Tabela 3: Quantificação de biomarcadores renais presentes nas amostras dos animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos de lesão óssea.

LOCAL DA LESÃO E DURAÇÃO DO EXPERIMENTO	GRUPO	UREIA (mg/dL)	CREATININA (mg/dL)
Fêmur ♂ (2 semanas)	CN	45,67 ± 1,77	0,40 ± 0,06
	NH	45,20 ± 3,43	0,54 ± 0,06
	CP	49,58 ± 2,07	0,47 ± 0,03
Fêmur ♂ (4 semanas)	CN	47,81 ± 3,53	0,55 ± 0,05
	NH	52,25 ± 1,07	0,53 ± 0,03
	CP	48,20 ± 2,24	0,56 ± 0,05
Fêmur ♂ (8 semanas)	CN	45,25 ± 0,31	0,48 ± 0,02
	NH	50,59 ± 2,22	0,60 ± 0,05
	CP	40,68 ± 1,60	0,67 ± 0,10
Fêmur ♀ (2 semanas)	CN	46,20 ± 2,34	0,57 ± 0,07
	ØCN	52,88 ± 1,43	0,64 ± 0,06
	ØNH	47,80 ± 2,04	0,74 ± 0,06
	ØCP	40,60 ± 3,04	0,61 ± 0,09
Fêmur ♀ (4 semanas)	CN	47,84 ± 2,10	0,70 ± 0,02
	ØCN	55,10 ± 4,75	0,76 ± 0,06
	ØNH	39,59 ± 1,20	0,64 ± 0,07
	ØCP	56,27 ± 2,02	0,70 ± 0,04
Fêmur ♀ (8 semanas)	CN	47,66 ± 2,90	0,63 ± 0,05
	ØCN	53,83 ± 2,50	0,66 ± 0,06
	ØNH	51,76 ± 1,72	0,73 ± 0,07
	ØCP	49,86 ± 1,08	0,79 ± 0,05
Osso parietal ♂ (2 semanas)	CN	49,49 ± 4,14	0,57 ± 0,07
	NH	46,89 ± 1,87	0,57 ± 0,03
	CP	45,31 ± 1,38	0,60 ± 0,05
Osso parietal ♂ (4 semanas)	CN	41,46 ± 2,74	0,55 ± 0,02
	NH	44,07 ± 1,39	0,62 ± 0,02
	CP	47,32 ± 1,08	0,51 ± 0,06
Osso parietal ♂ (8 semanas)	CN	45,77 ± 3,13	0,63 ± 0,02
	NH	43,82 ± 3,45	0,50 ± 0,04
	CP	38,73 ± 1,90	0,64 ± 0,04

Os dados estão apresentados como média $\pm$ e.p.m. ($n = 6$). ♂ = machos; ♀ = fêmeas; Ø = fêmeas ovariectomizadas 4 semanas antes da lesão; CN = grupo tratado com gel de alginato de sódio 2% (controle negativo); NH = grupo tratado nanohidroxiapatita 10% incorporada em gel de alginato de sódio 2% (grupo teste); CP = grupo tratado com Bio-Oss® (controle positivo).

Os rins são órgãos que compõem o sistema excretor e estão localizados na porção posterior da cavidade abdominal. Eles desempenham diversas funções, entre elas a filtração, produção e secreção de hormônios, regulação do pH e do equilíbrio iônico, regulação da osmolaridade celular, regulação do metabolismo ósseo, depuração de toxinas e metabólitos, entre outros. Entre os testes de função renal, a dosagem dos marcadores de filtração glomerular é altamente precisa e extensivamente utilizada (HOKAMP; NABITY, 2016; RADI, 2019).

A ureia é um dos principais metabólitos resultantes do catabolismo proteico, sendo majoritariamente eliminada por via renal. Entretanto, ela é considerada um marcador fraco da taxa de filtração glomerular devido a sua capacidade de retornar ao plasma por difusão passiva. Por isso, alterações observadas nos níveis de ureia podem estar relacionadas a causas renais ou não-renais. A técnica enzimática-colorimétrica de dosagem de ureia sérica apresenta poucas limitações, mas pelo fato de a concentração do metabólito poder ser afetada por outras variáveis, é importante que sua determinação seja feita sempre em conjunto com a creatinina para confirmar assertivamente as alterações na função renal (SODRÉ; COSTA; LIMA, 2007).

A creatinina, por sua vez, é produzida e eliminada sem sofrer interferências do metabolismo proteico, configurando assim um índice mais seguro para a confirmação de problemas nefrológicos. Apesar de não apresentar uma constante de depuração, por depender da massa muscular do indivíduo e da concentração inicial do analito, a creatinina continua sendo um dos biomarcadores mais utilizados na prática clínica para determinar a eficiência da filtração glomerular (SODRÉ; COSTA; LIMA, 2007; ZHANG; PARIKH, 2019).

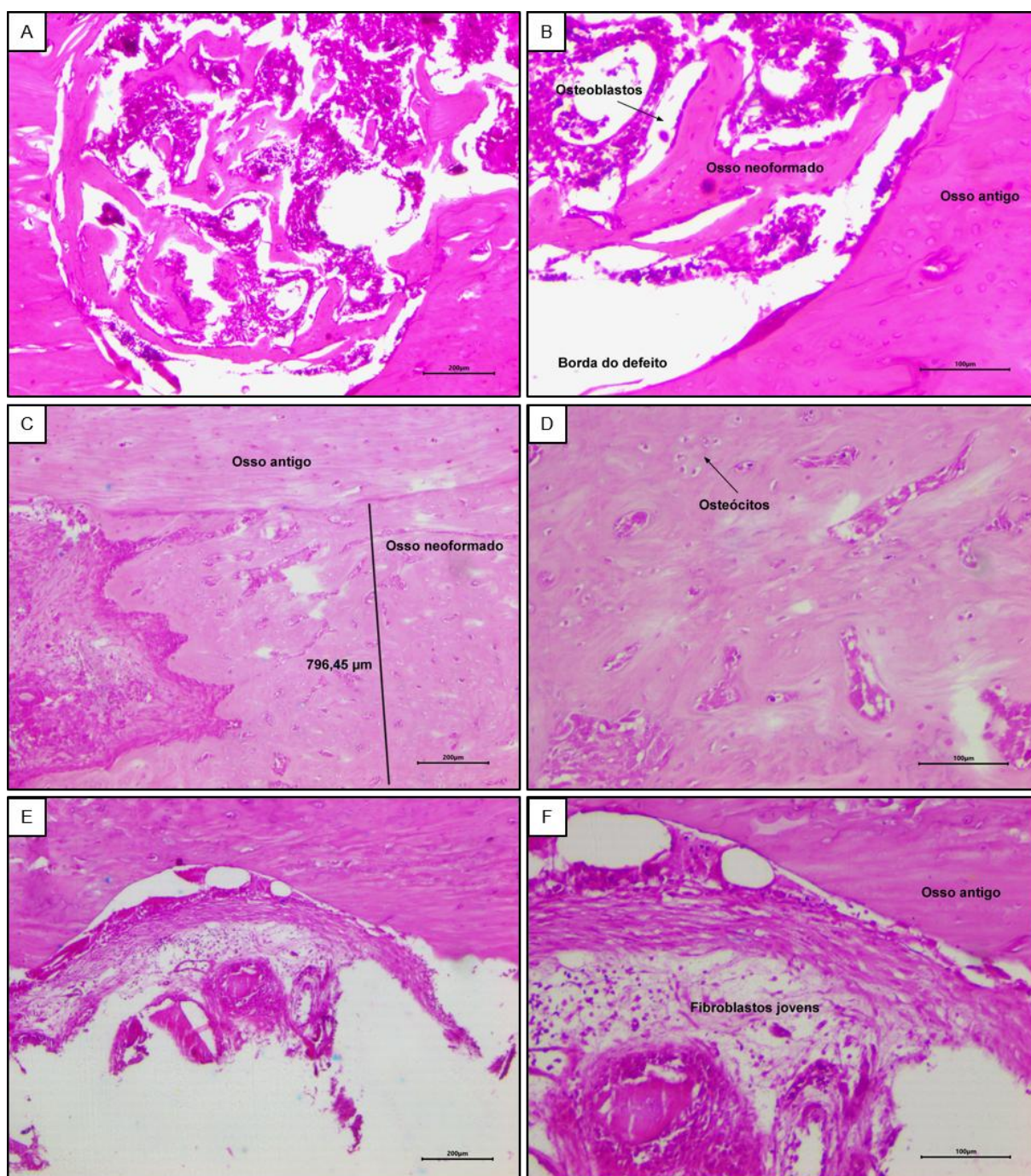
Analisando estatisticamente os dados obtidos nesse estudo, não foi possível verificar nenhuma diferença significativa quando comparados os valores de ureia e creatinina dos animais tratados com o grupo controle negativo, que recebeu apenas o veículo. Esses achados apontam que, a utilização do alginato de sódio, nanohidroxiapatita ou Bio-Oss® nesse contexto e concentrações específicas não representam risco de causar nefrotoxicidade. O resultado de todas as análises

bioquímicas já era esperado, por se tratar de uma aplicação *in situ* para ação local na recuperação das fraturas, sem alterações e efeitos relevantes a nível sistêmico.

4.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS LESÕES ÓSSEAS

4.5.1 Lesão no fêmur

Ao final do período de avaliação experimental, após a eutanásia dos animais, as peças ósseas foram removidas com o auxílio de um disco conectado ao



micromotor. Depois de todas as etapas do processamento, os cortes foram analisados em microscópio óptico, nas objetivas de 40 e 100×, sendo uma imagem representativa de cada grupo disposta na **Figuras 14, 15 e 16** para os ratos machos, de acordo com a duração do protocolo experimental.

Figura 14: Análise histopatológica de porções de fêmur de ratos Wistar machos após 2 semanas do procedimento cirúrgico de lesão. Lâminas coradas hematoxilina e eosina (HE). A e B = animal tratado

com gel de alginato de sódio 2% (controle negativo); C e D = animal tratado com nanohidroxiapatita 10% incorporada em gel de alginato de sódio 2% (grupo teste); E e F = animal tratado com Bio-Oss® (controle positivo). Todas as imagens apresentadas estão em um aumento de 40 (coluna esquerda) e 100× (coluna direita).

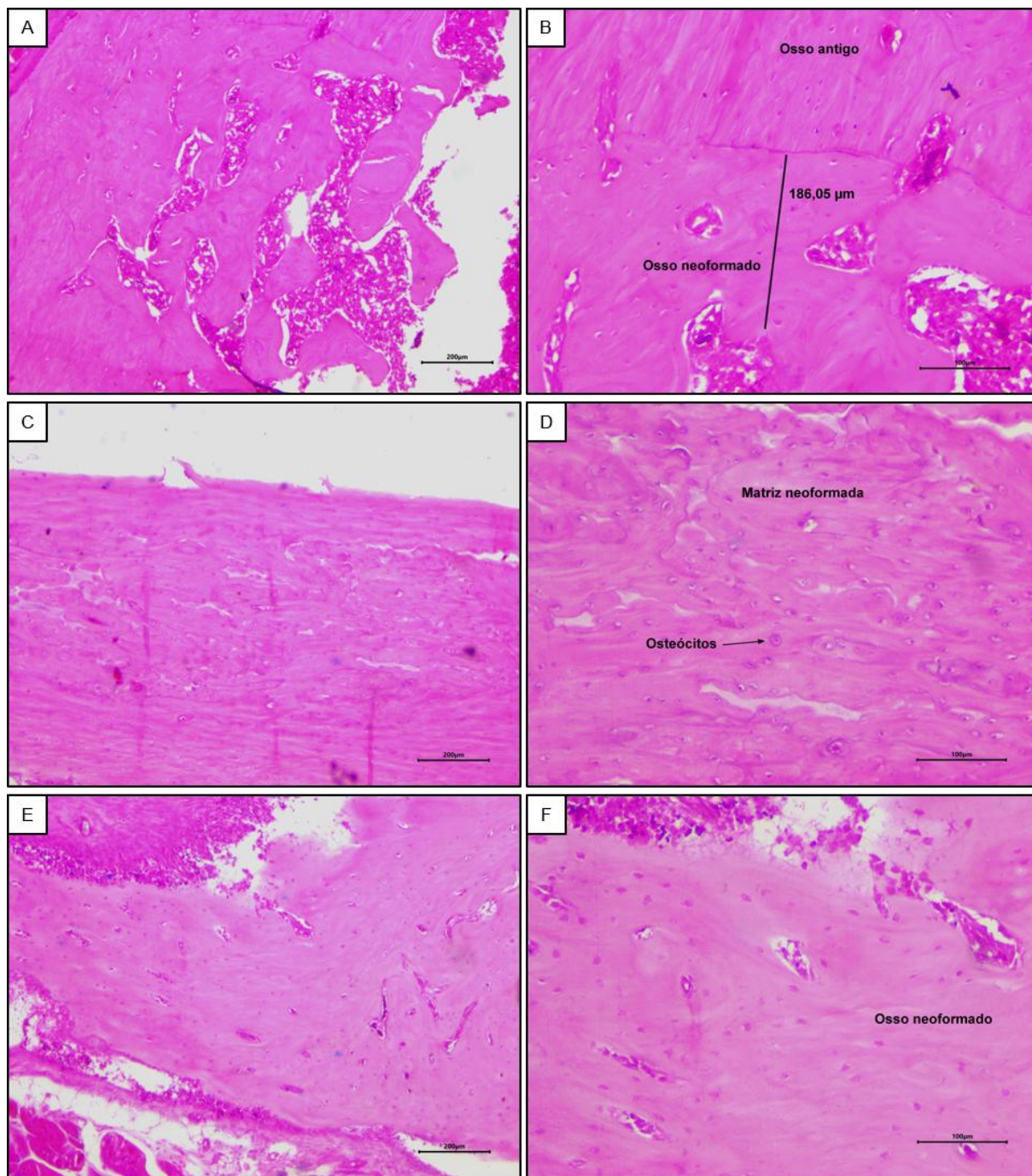


Figura 15: Análise histopatológica de porções de fêmur de ratos Wistar machos após 4 semanas do procedimento cirúrgico de lesão. Lâminas coradas hematoxilina e eosina (HE). A e B = animal tratado com gel de alginato de sódio 2% (controle negativo); C e D = animal tratado com nanohidroxiapatita 10% incorporada em gel de alginato de sódio 2% (grupo teste); E e F = animal tratado com Bio-Oss® (controle positivo). Todas as imagens apresentadas estão em um aumento de 40 (coluna esquerda) e 100× (coluna direita).

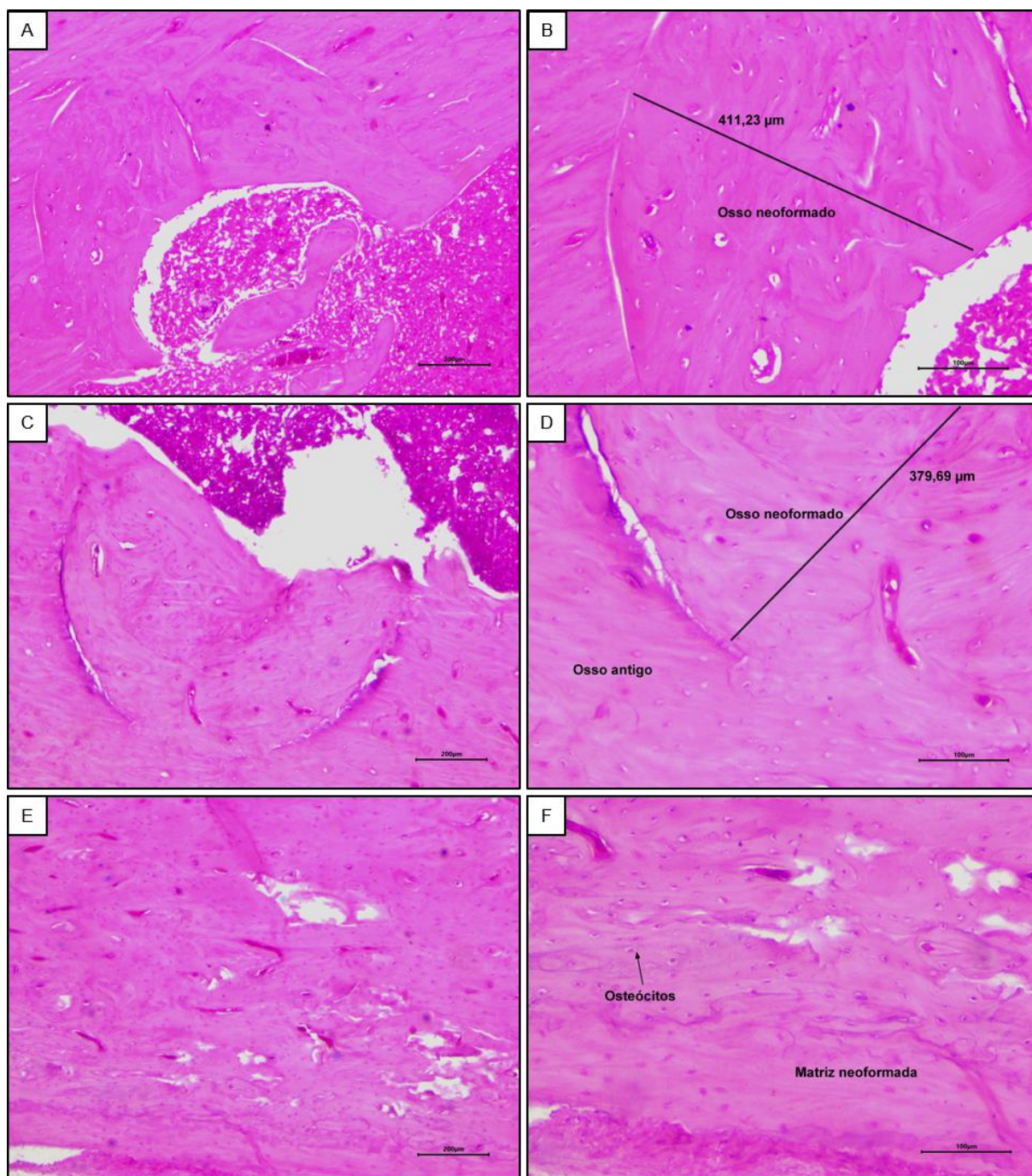


Figura 16: Análise histopatológica de porções de fêmur de ratos Wistar machos após 8 semanas do procedimento cirúrgico de lesão. Lâminas coradas hematoxilina e eosina (HE). A e B = animal tratado com gel de alginato de sódio 2% (controle negativo); C e D = animal tratado com nanohidroxiapatita 10% incorporada em gel de alginato de sódio 2% (grupo teste); E e F = animal tratado com Bio-Oss® (controle positivo). Todas as imagens apresentadas estão em um aumento de 40 (coluna esquerda) e 100× (coluna direita).

Nos animais avaliados após 2 semanas do procedimento de lesão, existe uma grande diferença qualitativa dos defeitos entre os grupos. No grupo controle negativo, tratado apenas com gel de alginato (veículo da formulação), são observadas inúmeras trabéculas ósseas imaturas rodeadas de osteoblastos. Quando é avaliada a lesão do grupo que recebeu o gel de alginato com nanohidroxiapatita (grupo teste), no mesmo tempo experimental, a presença de tecido neoformado é pronunciada (796,45 μm), indicando a eficácia da preparação em promover a consolidação tecidual. Já nos animais tratados com o enxerto comercial Bio-Oss®, é notada a presença de grande quantidade de tecido fibrilar, sem grande quantidade de osso neoformado, quando comparado aos demais grupos do mesmo período (**Figura 14**).

É esperado que quanto maior o tempo de avaliação, mais potente será o efeito de cicatrização óssea. Para os animais do grupo controle negativo avaliados após 4 semanas houve formação de uma porção de pelo menos 186,05 μm de tecido ósseo, partindo da extremidade da lesão. No mesmo período experimental, praticamente não é possível delimitar as bordas da lesão do grupo teste, que é caracterizado pela abundante matriz neoformada repleta de osteócitos. Porções de tecido fibrilar denso e frouxo ainda são observados no grupo controle positivo, mas a quantidade de tecido ósseo formado já é predominante (**Figura 15**).

Para as amostras do último tempo de avaliação, as bordas do defeito ósseo ainda estão marcadas e é notada a presença de material fibrilar denso em partes do grupo controle negativo e grupo teste. As porções de osso neoformado quantificadas para esses grupos foram de 411,23 μm e 379,69 μm , respectivamente. O grupo controle positivo do mesmo período é caracterizado por uma matriz imatura com osteócitos e osteoclastos, sem muita evidência das extremidades da lesão (**Figura 16**).

De forma geral, a maneira mais comum de reparo de uma fratura em um osso longo envolve o mecanismo de ossificação endocondral. Nesse processo, a matriz cartilaginosa sofre calcificação progressiva. Ocorre uma invasão de capilares sanguíneos e células osteogênitoras, que se transformam em osteoblastos que depositarão a matriz sobre a superfície cartilaginosa (BERENDSEN; OLSEN, 2015). Nesse sentido, o ideal é que as substâncias estudadas como novos enxertos sirvam como guia ou molde para o crescimento de novas células ósseas, estimulando a

ativação de vias importantes e fornecendo suporte mecânico para as substâncias (EL-RASHIDY et al., 2017).

De acordo com Schlickewei e Schlickewei (2007), os substitutos ósseos podem ser definidos como combinações sintéticas, orgânicas ou inorgânicas que podem substituir um auto ou aloenxerto no tratamento de um defeito. Os esforços em busca desses substitutos são direcionados para materiais cerâmicos biomiméticos com elevada biocompatibilidade e que favoreçam a osteointegração (KALITA; BHARDWAJ; BHATT, 2007). A utilização de compostos com hidroxiapatita e alginato tem ganhado força devido a organização estrutural do polissacarídeo contribuir para a formação de estruturas estáveis na presença de íons cálcio (ZHENG, 1997).

A aplicação de um implante contendo hidroxiapatita, colágeno e alginato em um estudo de Sotome e colaboradores (2004) com fêmur de ratos Wistar machos evidenciou que o compósito é capaz de promover formação óssea, além de servir como carreador de proteínas morfogenéticas e diversas substâncias importantes para o crescimento do tecido. Além disso, estudos *in vitro* envolvendo preparações à base de alginato e HAP mostram a eficácia de sua aplicação na biomineralização da polpa dentária (SANCILIO et al., 2018), que é outra área de grande interesse para o estudo de substitutos ósseos. A nanohidroxiapatita incorporada a outros materiais ou com substituições na sua estrutura básica apresenta relevante potencial osteocondutor. Esses materiais híbridos são amplamente estudados, com eficácia documentada em ossos como fêmur (JIN et al., 2016) e tíbia (CALASANS-MAIA et al., 2007).

A preparação utilizada nesse estudo demonstra, pela primeira vez, a capacidade de facilitar a mineralização da matriz óssea. Entretanto, não é possível estabelecer uma correlação temporal desse potencial osteoindutor sem realizar estudos de padronização do processamento histológico das amostras, tendo em vista que muitas variáveis podem afetar os resultados, como a profundidade dos cortes histológicos e a intensidade da coloração.

No intuito de avaliar a eficácia do biomaterial sob uma condição de osteopenia, o experimento também foi realizado em ratas previamente ovariectomizadas com a intenção de que o tecido ósseo desses animais fosse afetado direta e indiretamente pelas alterações hormonais do período pós-

menopausa. Também foi utilizado um grupo controle negativo que não passou pela cirurgia de castração para comparar a estrutura óssea mediante o defeito. Nas **Figuras 17, 18 e 19** são observados os cortes histológicos representativos das fêmeas com lesão no fêmur, agrupados por tempo experimental e tratamentos, apontando estruturas importantes e com aumentos de 40 e 100× (coluna esquerda e direita, respectivamente).

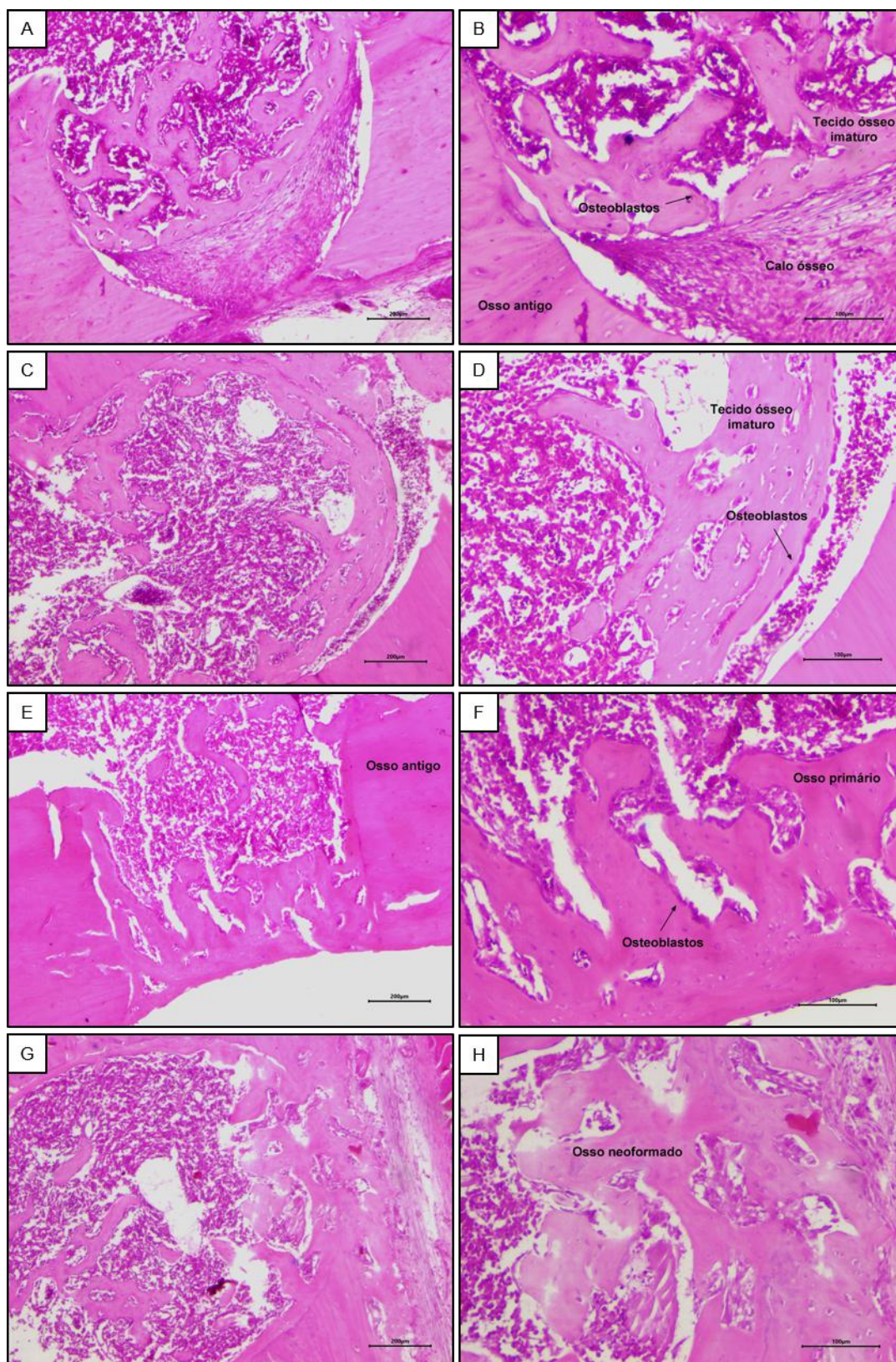


Figura 17: Análise histopatológica de porções de fêmur de ratas Wistar fêmeas após 2 semanas do procedimento cirúrgico de lesão. Lâminas coradas hematoxilina e eosina (HE). A e B = rata tratada com gel de alginato de sódio 2% (controle negativo); C e D = rata OVX tratada com gel de alginato de sódio 2% (controle negativo); E e F = rata OVX tratada com nanohidroxiapatita 10% incorporada em gel de alginato de sódio 2% (grupo teste); G e H = rata OVX tratada com Bio-Oss® (controle positivo).

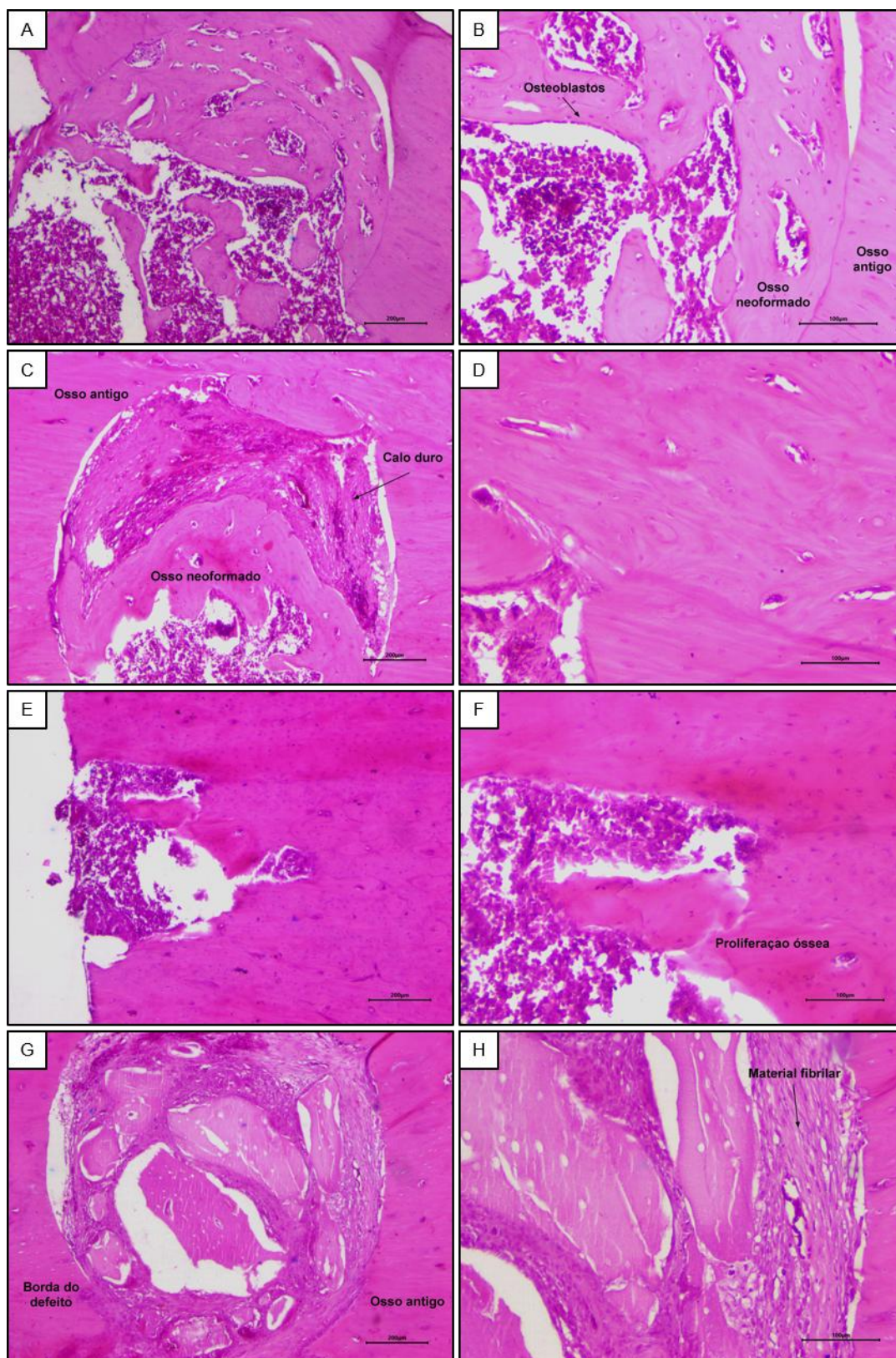


Figura 18: Análise histopatológica de porções de fêmur de ratas Wistar fêmeas após 4 semanas do procedimento cirúrgico de lesão. Lâminas coradas hematoxilina e eosina (HE). A e B = rata tratada com gel de alginato de sódio 2% (controle negativo); C e D = rata OVX tratada com gel de alginato de sódio 2% (controle negativo); E e F = rata OVX tratada com nanohidroxiapatita 10% incorporada em gel de alginato de sódio 2% (grupo teste); G e H = rata OVX tratada com Bio-Oss® (controle positivo).

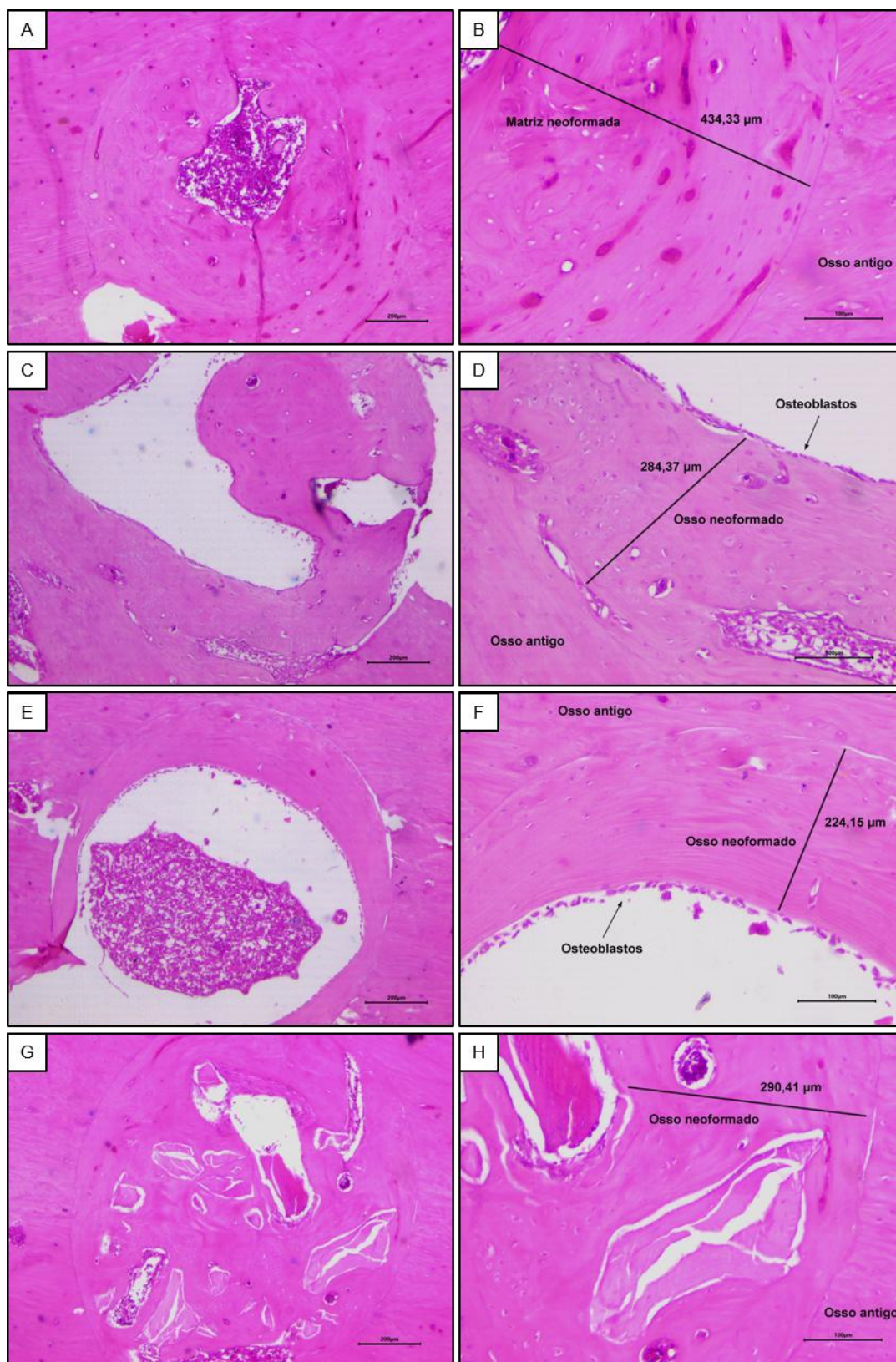


Figura 19: Análise histopatológica de porções de fêmur de ratas Wistar fêmeas após 8 semanas do procedimento cirúrgico de lesão. Lâminas coradas hematoxilina e eosina (HE). A e B = rata tratada com gel de alginato de sódio 2% (controle negativo); C e D = rata OVX tratada com gel de alginato de sódio 2% (controle negativo); E e F = rata OVX tratada com nanohidroxiapatita 10% incorporada em gel de alginato de sódio 2% (grupo teste); G e H = rata OVX tratada com Bio-Oss® (controle positivo).

De modo semelhante ao que foi visto anteriormente, a regeneração óssea é possível de ser observada em todos os grupos, com evolução temporal desse processo de cicatrização mais perceptível. Nos grupos avaliados após 2 semanas, o infiltrado celular é muito mais intenso do que nos demais. Tanto o grupo controle negativo normal quanto o grupo ovariectomizado de mesmo tratamento apresentam trabéculas imaturas rodeadas por osteoblastos e células fibrilares características do calo mole. O grupo teste e controle positivo também são marcados pela presença de osso imaturo com lamelas irregulares (**Figura 17**).

Com 4 semanas de experimentação, o grupo de fêmeas ovariectomizadas do controle negativo contém uma porção fibrilar densa, que compõe o calo duro, além de osteoclastos na borda do defeito. O controle negativo normal ainda apresenta majoritariamente um material fibrilar frouxo. Nos grupos ovariectomizados e tratados com a preparação contendo nanohidroxiapatita as extremidades da lesão são quase imperceptíveis, mas ainda há resquícios de infiltrado celular em regiões de recente proliferação óssea. As ratas castradas tratadas com Bio-Oss® têm os limites da lesão ainda muito evidentes, mas com muito material denso para a formação da matriz (**Figura 18**).

No último grupo de imagens é possível quantificar porções da matriz óssea neoformada, sendo 434,33 μm para o controle negativo normal, 284,37 μm para o controle negativo de ratas castradas, 224,15 μm para as ratas ovariectomizadas tratadas com nanohidroxiapatita e 290,41 μm para as ratas castradas que receberam o enxerto comercial (**Figura 19**). Na borda da matriz óssea neoformada é possível observar uma grande quantidade de osteoblastos (**Figura 19D**). Esse arranjo celular osteoblástico também é verificado na **Figura 19F**.

Apesar da presença de tecido regenerado em todos os grupos ao redor da fratura, ao considerar a análise histopatológica dos controles negativos nos três períodos de avaliação, é possível perceber que a retirada dos ovários influencia na capacidade e celeridade de cicatrização dos ossos lesionados. Esses resultados corroboram com estudos prévios, que afirmam que a perda óssea já pode ocorrer após 30 dias da castração (WRONSKI; DANN; HORNER, 1989; LI; SHEN; WRONSKI, 1997).

A consolidação óssea mediada por hidroxiapatita nesse contexto de depleção hormonal já é um efeito amplamente relatado na literatura. Diversos estudos apontam as propriedades osteoindutoras desse fosfato de cálcio em associação com

outras substâncias quando utilizada em ensaios para tratar defeitos no fêmur de coelhos e ratas. Interessantemente, também são utilizados animais mais velhos que são submetidos à ovariectomia e com diferentes períodos de avaliação pós-cirúrgica (ŠIRKA et al., 2018; QAYOOM; TEOTIA; KUMAR, 2019; DEDE et al., 2021).

A questão da resistência mecânica, um problema conhecido do uso da hidroxiapatita em estruturas de alto impacto, não foi passível de ser mensurada neste trabalho, uma vez que as peças não foram submetidas à diferentes condições de carga nos períodos experimentais em que foram avaliadas. Mesmo com as limitações das técnicas utilizadas, a nanohidroxiapatita 10% incorporada em gel de alginato de sódio 2% foi capaz de promover uma rápida consolidação do defeito ósseo no fêmur. Esses achados inéditos servem como base para testes posteriores, utilizando diferentes concentrações do produto avaliado e outras técnicas, como a indução de defeitos mais críticos. Isso permite avaliar a formulação em diversos contextos para que se obtenha um material de amplamente funcional.

4.5.2 Lesão no osso parietal

Partindo para um arranjo morfológico diferente do osso compacto, as análises da capacidade de cicatrização óssea também foram realizadas em osso esponjoso. Nas **Figuras 20, 21 e 22** são apresentados os cortes representativos dos grupos de ratos machos submetidos à lesão óssea no osso parietal. Os dados estão agrupados de acordo com o período de duração do protocolo (2, 4 e 8 semanas) e os diferentes tratamentos utilizados.

Diante das imagens apresentadas, é possível perceber a presença marcante de material fibrilar denso e frouxo. Nos grupos de animais avaliados após 2 semanas do procedimento cirúrgico, a infiltração desse material celular é marcante. Com a utilização da mistura de alginato de sódio com nanohidroxiapatita já é observada formação de pelo menos 171,74 µm de tecido ósseo com pequenos osteócitos já envoltos em matriz mineralizada (**Figura 20D**). No grupo tratado com o enxerto comercial é visível a divisão entre o calo duro e o calo mole, fatores que precedem a deposição da matriz (**Figura 20F**).

Nos cortes representativos dos grupos eutanasiados após 4 semanas, o avanço temporal do processo de cicatrização é perceptível. A lesão do grupo tratado apenas com o gel de alginato de sódio (veículo) aparece completamente preenchida por células fibrilares (**Figura 21A e B**) enquanto o grupo teste e o grupo tratado com

Bio-Oss® apresentam 186,44 μm e 134,93 μm de osso neoformado, respectivamente (Figura 21D e F).

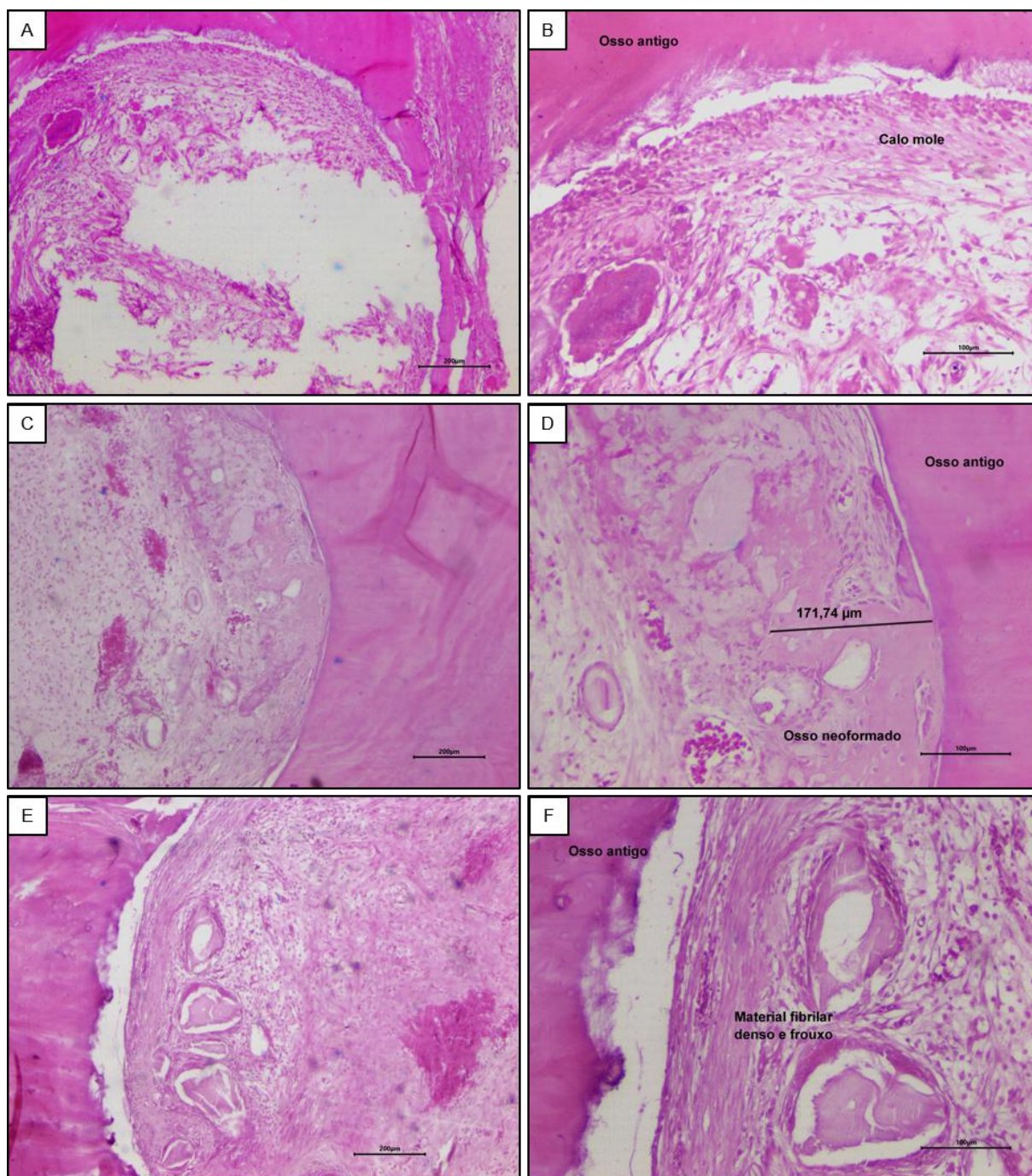


Figura 20: Análise histopatológica de porções de osso parietal de ratos Wistar machos após 2 semanas do procedimento cirúrgico de lesão. Lâminas coradas hematoxilina e eosina (HE). A e B = animal tratado com gel de alginato de sódio 2% (controle negativo); C e D = animal tratado com nanohidroxapatita 10% incorporada em gel de alginato de sódio 2% (grupo teste); E e F = animal tratado com Bio-Oss® (controle positivo). Todas as imagens apresentadas estão em um aumento de 40 (coluna esquerda) e 100 $\times$ (coluna direita).

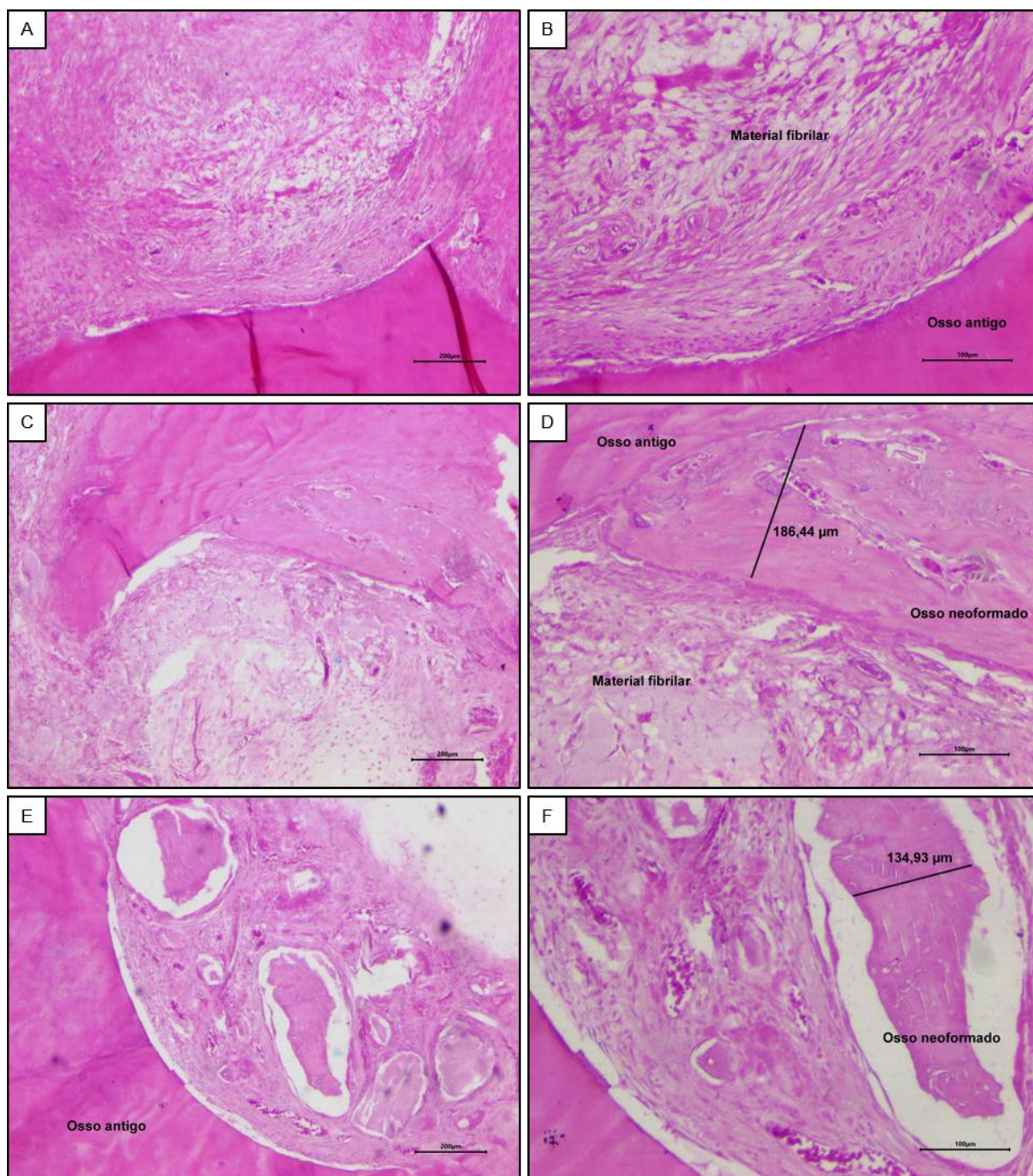


Figura 21: Análise histopatológica de porções de osso parietal de ratos Wistar machos após 4 semanas do procedimento cirúrgico de lesão. Lâminas coradas hematoxilina e eosina (HE). A e B = animal tratado com gel de alginato de sódio 2% (controle negativo); C e D = animal tratado com nanohidroxiapatita 10% incorporada em gel de alginato de sódio 2% (grupo teste); E e F = animal tratado com Bio-Oss® (controle positivo). Todas as imagens apresentadas estão em um aumento de 40 (coluna esquerda) e 100× (coluna direita).

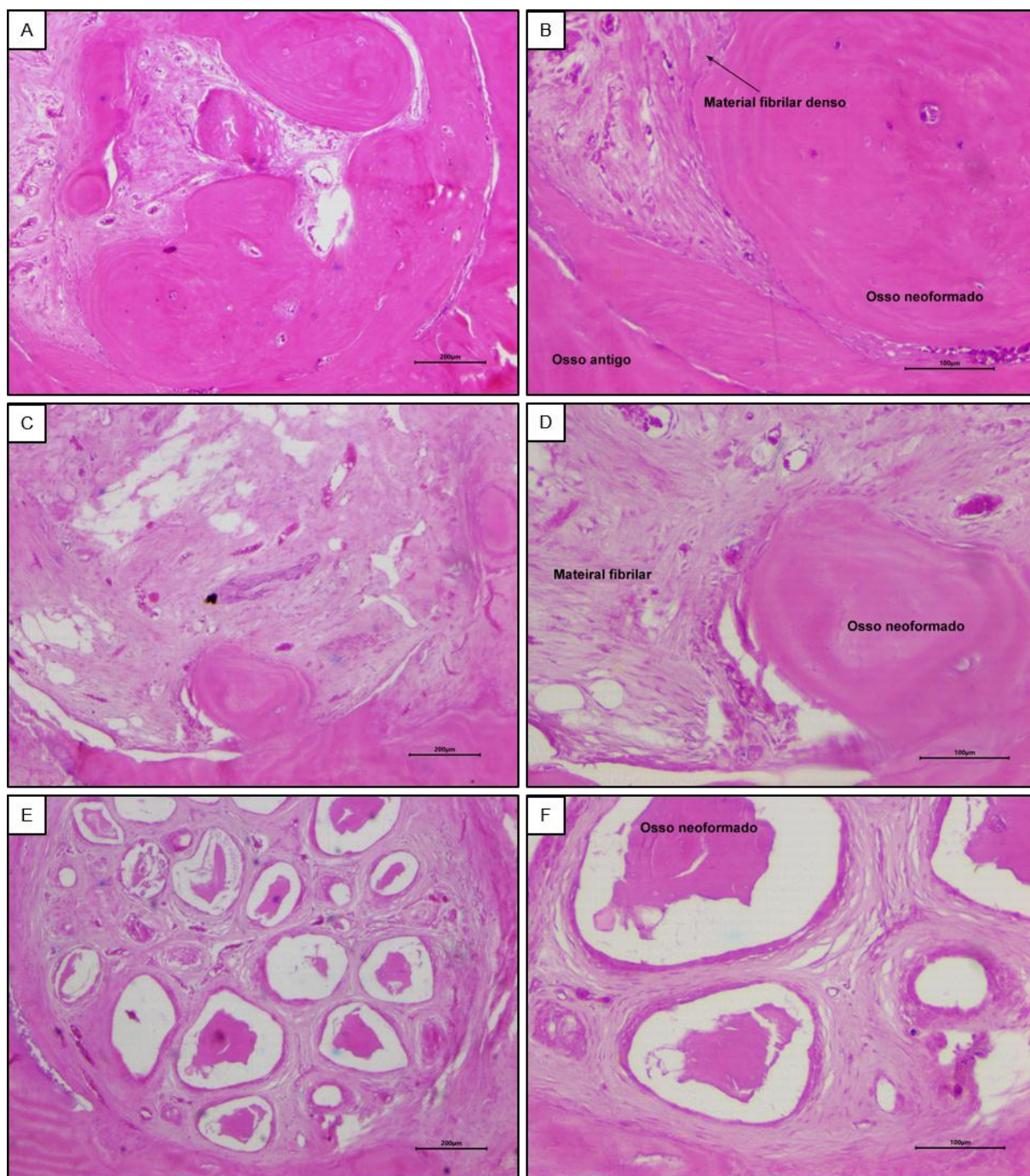


Figura 22: Análise histopatológica de porções de osso parietal de ratos Wistar machos após 8 semanas do procedimento cirúrgico de lesão. Lâminas coradas hematoxilina e eosina (HE). A e B = animal tratado com gel de alginato de sódio 2% (controle negativo); C e D = animal tratado com nanohidroxiapatita 10% incorporada em gel de alginato de sódio 2% (grupo teste); E e F = animal tratado com Bio-Oss® (controle positivo). Todas as imagens apresentadas estão em um aumento de 40 (coluna esquerda) e 100× (coluna direita).

Esse padrão de intensidade cicatricial proporcional ao tempo de avaliação parece ser interrompido no período experimental de 8 semanas, onde o grupo controle negativo detém grande parte de tecido mineralizado em torno da lesão (**Figura 22B**). Os demais grupos desse mesmo tempo de avaliação são representados por conter trabéculas ósseas com aspecto mais irregular (**Figura 22D e F**). A disposição das células na calota craniana e a intensidade da coloração dificultam a identificação de outras estruturas celulares importantes, como osteoblastos e osteoclastos.

O processo de formação óssea responsável pelo desenvolvimento do osso parietal é conhecido como ossificação intramembranosa, como o próprio nome sugere, ele acontece no interior de membranas mesenquimais em vários centros que crescem radialmente e acabam se fundindo. O mesênquima se diferencia em osteoblastos, que dão origem à matriz mineralizada (BERENDSEN; OLSEN, 2015). Esse padrão imprime ao osso a característica esponjosa, e é nitidamente observado nas imagens analisadas.

Assim como em outros protocolos e estruturas ósseas, os compósitos contendo nanohidroxiapatita também tem eficácia comprovada em danos cirúrgicos realizados no osso parietal de ratos, reforçando sua potencial utilização como um substituto ósseo (CHATZIPETROS et al., 2018). Mesmo com as desvantagens e limitações do desenvolvimento de uma pesquisa nessa dimensão, os resultados aqui obtidos apontam para um material eficaz e de favorável custo-benefício.

Fazendo um apanhado geral, diversos mecanismos celulares e moleculares podem estar envolvidos no reparo dessas lesões. Essas vias desempenham funções cruciais no desenvolvimento, crescimento, proliferação e diferenciação de substâncias importantes (MAJIDINIA; SADEGHPOUR; YOUSEFI, 2017). Podemos citar a via dos ligantes tipo Jag e receptores Notch que promovem osteoblastogênese por interação direta com biomateriais (DISHOWITZ et al., 2013) e a sinalização mediada pelas BMPs que tem a capacidade de induzir a ossificação endocondral (GIMBLE et al., 1995).

Outras vias de interesse são a da β -catenina regulada pelas proteínas tipo Wnt; a via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e proteína quinase B (Akt/PKB); a sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), fatores de crescimento como o insulínico (IGF), FGF e PDGF, além da própria sinalização do cálcio (MAJIDINIA; SADEGHPOUR; YOUSEFI, 2017). No entanto, antes de partir

para uma determinação dos possíveis mecanismos de ação, muitos estudos prévios devem ser realizados.

Para todos os desenhos experimentais aqui apresentados, o limite entre os tecidos pré-existentes e o material neoformado pode ser observado com clareza devido à disposição das lamelas. Isso se deve ao fato de que um osso maduro, que é depositado gradual e fisiologicamente, tende a ser melhor organizado estruturalmente (MARSELL; EINHORN, 2011). O esperado é que com o tempo, o osso recém-formado adquira uma conformação semelhante, tornando-se indistinguível do osso antigo e sem sinais de tecido cicatricial, características de uma regeneração em condições adequadas.

Outra aplicação importante desse compósito que deve ser futuramente investigada é a capacidade de atuar como nanocarreador de substâncias, para que outras moléculas ativas possam ser incorporadas, elevando a funcionalidade do material e otimizando a ação de fármacos já utilizados e peptídeos estimuladores da formação óssea (NAYAK et al., 2019). De modo geral, o processo de cicatrização óssea propriamente dito e as etapas que antecedem a mineralização da matriz ocorreram sem que houvessem necroses ou respostas inflamatórias exacerbadas para todos os protocolos aqui apresentados e materiais testados. A nível sistêmico também não foram observadas alterações marcantes em decorrência do uso do material, comprovando sua biocompatibilidade.

A dispendiosidade dos cimentos ósseos comercializados atualmente e o efeito cicatrizante pouco pronunciado nos animais tratados com o Bio-Oss®, que é referência no mercado, reforçam que a nanohidroxiapatita 10% incorporada em gel de alginato de sódio 2% apresenta-se, pela primeira vez, como uma alternativa eficiente para reparar lesões em osso compacto e esponjoso que possibilita uma produção em massa com custo relativamente baixo. Os dados aqui apresentados podem servir como um guia para a padronização de novas metodologias e investigações, adequando as pesquisas para que estas estejam cada vez mais próximas da prática clínica, que requer uma recuperação funcional, além da estrutural.

5 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados apontam para a obtenção de uma hidroxiapatita nanoparticulada, mesmo com impurezas no material decorrentes do processo de síntese. De acordo com o que foi observado, o tratamento físico da amostra com ultrassom em alta potência contribui para o processo de desaglomeração e purificação do material. Os estudos continuam sendo realizados no sentido de obter uma molécula cada vez mais pura e uniforme, além da busca por processos que viabilizem uma possível produção em larga escala futuramente.

Quanto aos testes *in vivo*, as análises bioquímicas e histopatológicas das amostras obtidas demonstraram que a aplicação dos materiais não causa danos a nível local e sistêmico. Mesmo com as limitações do estudo, a preparação contendo nanohidroxiapatita e alginato de sódio se mostrou eficaz em promover a consolidação óssea em lesões no fêmur e no osso parietal. Esse fato corrobora com a capacidade já conhecida de fixação e estimulação da diferenciação de células ósseas. Contudo, sem a padronização do método é difícil estabelecer uma correlação temporal desse efeito.

Sendo assim, a realização de estudos adicionais permitirá a obtenção de dados mais uniformes, que auxiliarão no delineamento de uma série de novos testes que envolvam a incorporação de fármacos à preparação, além de avaliações de resistência mecânica do osso fraturado. Isso pode elevar a aplicabilidade desse biomaterial que já apresenta grande potencial para acelerar o tempo de recuperação de fraturas.

REFERÊNCIAS

ADAMOPOULOS, I. E. Inflammation in bone physiology and pathology. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 30, n. 1, p. 59-64, 2018.

ATMACA, H; AYDIN, A.; MUSAOĞLU, R. Modelo experimental de osteoporose: comparação entre ovariectomia e toxina botulínica tipo A. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 21, n. 6, p. 340-343, 2013.

AWASTHI, S. et al. A review on hydroxyapatite coatings for the biomedical applications: experimental and theoretical perspectives. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 9, n. 2, p. 228-249, 2021.

AZIZIYEH, R. et al. The burden of osteoporosis in four Latin American countries: Brazil, Mexico, Colombia, and Argentina. **Journal of Medical Economics**, v. 22, n. 7, p. 638-644, 2019.

BARBOSA, M. C. et al. The effect of ultrasonic irradiation on the crystallinity of nano-hydroxyapatite produced via the wet chemical method. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 5, p. 2620-2625, 2013.

BELLIDO, T. Osteocyte-driven bone remodeling. **Calcified Tissue International**, v. 94, n. 1, p. 25-34, 2013.

BERENDSEN, A. D.; OLSEN, B. R. Bone development. **Bone**, v. 80, p. 14-18, 2015.

BLANCO, I.; SIRACUSA, V. The use of thermal techniques in the characterization of bio-sourced polymers. **Materials**, v. 14, n. 7, p. 1686-1706, 2021.

BONAFEDE, M.; ESPINDLE, D.; BOWER, A. G. The direct and indirect costs of long bone fractures in a working age US population. **Journal of Medical Economics**, v. 16, n. 1, p. 169-178, 2012.

BONAN, R. et al. Métodos de reforço microestrutural da hidroxiapatita. **Cerâmica**, v. 60, n. 355, p. 402-410, 2014.

BOSKEY, A. L. Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects. **Bonekey Reports**, v. 2, p. 1-11, 2013.

BOUXSEIN, M. L. et al. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **Journal of Bone And Mineral Research**, v. 25, n. 7, p. 1468-1486, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Executiva. Secretaria de Atenção à Saúde. **Glossário temático: traumatologia e ortopedia**. 2. ed Brasília: Ministério da Saúde, 2013. 52 p.

BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. Adsorption of gases in multimolecular layers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 60, n. 2, p. 309-319, 1938.

BUCK, D. W.; DUMANIAN, G. A. Bone biology and physiology. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 129, n. 6, p. 1314-1320, 2012.

CALASANS-MAIA, M. et al. Stimulatory effect on osseous repair of zinc-substituted hydroxyapatite: histological study in rabbits tibia. **Key Engineering Materials**, v. 361-363, p. 1269-1272, 2007.

CAPULLI, M.; PAONE, R.; RUCCI, N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 561, p. 3-12, 2014.

CAULEY, J. A. Estrogen and bone health in men and women. **Steroids**, v. 99, p. 11-15, 2015.

CESTARI, F. et al. Nano-hydroxyapatite derived from biogenic and bioinspired calcium carbonates: synthesis and *in vitro* bioactivity. **Nanomaterials**, v. 11, n. 2, p. 264-78, 2021.

CHARLES, J. F.; ALIPRANTIS, A. O. Osteoclasts: more than 'bone eaters'. **Trends in Molecular Medicine**, v. 20, n. 8, p. 449-459, 2014.

CHATZIPETROS, E. et al. Application of nano-hydroxyapatite/chitosan scaffolds on rat calvarial critical-sized defects: a pilot study. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 23, n. 5, p. e625-e632, 2018.

CHURCH, R. J. et al. Candidate biomarkers for the diagnosis and prognosis of drug-induced liver injury: an international collaborative effort. **Hepatology**, v. 69, n. 2, p. 760-773, 2018.

CLAES, L.; RECKNAGEL, S.; IGNATIUS, A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 8, n. 3, p. 133-143, 2012.

COPUROGLU, C.; CALORI, G. M.; GIANNOUDIS, P. V. Fracture non-union: who is at risk?, **Injury**, v. 44, n. 11, p. 1379-1382, 2013.

COTTRELL, J. A. et al. The biology of bone and ligament healing. **Foot and Ankle Clinics**, v. 21, n. 4, p. 739-761, 2016.

DEDE, E. Ç. et al. Boron nano-hydroxyapatite composite increases the bone regeneration of ovariectomized rabbit femurs. **Biological Trace Element Research**, v. 200, n. 1, p. 183-196, 2021.

DISHOWITZ, M. I. et al. Jagged1 immobilization to an osteoconductive polymer activates the Notch signaling pathway and induces osteogenesis. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 102, n. 5, p. 1558-1567, 2013.

DUARTE, L. C. et al. Aplicações de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e sistema de energia dispersiva (EDS) no estudo de gemas: exemplos brasileiros. **Pesquisas em Geociências**, v. 30, n. 2, p. 3-15, 2003.

- EL-RASHIDY, A. A. et al. Regenerating bone with bioactive glass scaffolds: a review of *in vivo* studies in bone defect models. **Acta Biomaterialia**, v. 62, p. 1-28, 2017.
- FAKHRY, M. Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. **World Journal of Stem Cells**, v. 5, n. 4, p. 136-148, 2013.
- FALONI, A. P. S. et al. Structural and functional changes in the alveolar bone osteoclasts of estrogen-treated rats. **Journal of Anatomy**, v. 220, n. 1, p. 77-85, 2012.
- FANALI, G. et al. Human serum albumin: from bench to bedside. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 33, n. 3, p. 209-290, 2012.
- FENG, X.; MCDONALD, J. M. Disorders of bone remodeling. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 6, n. 1, p. 121-145, 2011.
- FIGUEIREDO, K. C. S; ALVES, T. L. M.; BORGES, C. P. Myoglobin entrapment in poly(vinyl alcohol) dense membranes. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, n. 3, p. 747-756, 2014.
- FLORENCIO-SILVA, R. et al. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-17, 2015.
- GEDANKEN, A. Using sonochemistry for the fabrication of nanomaterials. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 11, n. 2, p. 47-55, 2004.
- GIMBLE, J. M. et al. Bone morphogenetic proteins inhibit adipocyte differentiation by bone marrow stromal cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 58, n. 3, p. 393-402, 1995.
- GONZÁLEZ, M. S. Skeletal cartilage and bone formation, composition, and function in small mammals, birds, and reptiles. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 22, n. 2, p. 123-134, 2019.
- GOODMAN, Z. D. Phenotypes and pathology of drug-induced liver disease. **Clinics in Liver Disease**, v. 21, n. 1, p. 89-101, 2017.
- GRADO, G. F. et al. Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management. **Journal of Tissue Engineering**, v. 9, p. 1-18, 2018.
- GRIMAUDO, M. A. et al. Nanogels for regenerative medicine. **Journal of Controlled Release**, v. 313, p. 148-160, 2019.
- HART, N. H. et al. Biological basis of bone strength: anatomy, physiology and measurement. **Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions**, v. 20, n. 3, p. 347-371, 2020.
- HE, Y. et al. Ectopic osteogenesis and scaffold biodegradation of nano-hydroxyapatite-chitosan in a rat model. **Plos One**, v. 10, n. 8, p. 1-15, 2015.

HOKAMP, J. A.; NABITY, M. B. Renal biomarkers in domestic species. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 45, n. 1, p. 28-56, 2016.

JIN, S. et al. Enhancement of osseointegration of artificial ligament by nano-hydroxyapatite and bone morphogenic protein-2 into the rabbit femur. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 13, n. 3, p. 284-296, 2016.

JUNG, R. E. et al. Long-term outcome of implants placed with guided bone regeneration (GBR) using resorbable and non-resorbable membranes after 12-14 years. **Clinical Oral Implants Research**, v. 24, n. 10, p. 1065-1073, 2012.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J.; ABRAHAMSOHN, P. **Histologia Básica: texto e atlas**. 13^a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

KALITA, S. J.; BHARDWAJ, A.; BHATT, H. A. Nanocrystalline calcium phosphate ceramics in biomedical engineering. **Materials Science and Engineering: C**, v. 27, n. 3, p. 441-449, 2007.

KATSIMBRI, P. The biology of normal bone remodelling. **European Journal of Cancer Care**, v. 26, n. 6, p. 1-5, 2017.

KENKRE, J. S.; BASSETT, J. H. D. The bone remodelling cycle. **Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine**, v. 55, n. 3, p. 308-327, 2018.

KHOSLA, S.; OURSLER, M. J. O.; MONROE, D. G. Estrogen and the skeleton. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 23, n. 11, p. 576-581, 2012.

KLOP, C. et al. The epidemiology of mortality after fracture in England: variation by age, sex, time, geographic location, and ethnicity. **Osteoporosis International**, v. 28, n. 1, p. 161-168, 2016.

KONGSRI, S. et al. Nanocrystalline hydroxyapatite from fish scale waste: preparation, characterization and application for selenium adsorption in aqueous solution. **Chemical Engineering Journal**, v. 215-216, p. 522-532, 2013.

KWO, P. Y.; COHEN, S. M.; LIM, J. K. ACG Clinical Guideline: evaluation of abnormal liver chemistries. **American Journal of Gastroenterology**, v. 112, n. 1, p. 18-35, 2017.

LAFUENTE-GRACIA, L. et al. Towards *in silico* models of the inflammatory response in bone fracture healing. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, p. 1-22, 2021.

LEE, J. S. et al. *In vivo* study of chitosan-natural nano hydroxyapatite scaffolds for bone tissue regeneration. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 67, p. 360-366, 2014.

LI, M. et al. An overview of graphene-based hydroxyapatite composites for orthopedic applications. **Bioactive Materials**, v. 3, n. 1, p. 1-18, 2018.

LI, M.; SHEN, Y.; WRONSKI, T. J. Time course of femoral neck osteopenia in ovariectomized rats. **Bone**, v. 20, n. 1, p. 55-61, 1997.

LI, N. et al. Periosteum tissue engineering - a review. **Biomaterials Science**, v. 4, n. 11, p. 1554-1561, 2016.

LICINI, C.; VITALE-BROVARONE, C.; MATTIOLI-BELMONTE, M. Collagen and non-collagenous proteins molecular crosstalk in the pathophysiology of osteoporosis. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 49, p. 59-69, 2019.

LOPES, D. et al. Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies. **Biomaterials**, v. 185, p. 240-275, 2018.

MACKAY, D. L. et al. Reduced bone loss in a murine model of postmenopausal osteoporosis lacking complement component 3. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 36, n. 1, p. 118-128, 2017.

MAJIDINIA, M.; SADEGHPOUR, A.; YOUSEFI, B. The roles of signaling pathways in bone repair and regeneration. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 4, p. 2937-2948, 2017.

MARSELL, R.; EINHORN, T. A. The biology of fracture healing. **Injury**, v. 42, n. 6, p. 551-555, 2011.

MARUYAMA, M. et al. Modulation of the Inflammatory Response and Bone Healing. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, p. 1-14, 2020.

MCGOVERN, J. A.; GRIFFIN, M.; HUTMACHER, D. W. Animal models for bone tissue engineering and modelling disease. **Disease Models & Mechanisms**, v. 11, n. 4, p. 1-14, 2018.

MCNAMARA, L. M. et al. Attachment of osteocyte cell processes to the bone matrix. **The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology**, v. 292, n. 3, p. 355-363, 2009.

MINHAS, M. et al. Synthesis of chemically cross-linked polyvinyl alcohol-co-poly (methacrylic acid) hydrogels by copolymerization; a potential graft-polymeric carrier for oral delivery of 5-fluorouracil. **Daru Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 21, n. 1, p. 1-9, 2013.

MURSHED, M. Mechanism of bone mineralization. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 8, n. 12, p. 1-11, 2018.

NAYAK, A. K. et al. Hydroxyapatite-alginate based Matrices for drug delivery. **Current Pharmaceutical Design**, v. 25, n. 31, p. 3406-3416, 2019.

NISHI, K.; YAMASAKI, K.; OTAGIRI, M. Serum albumin, lipid and drug binding. **Subcellular Biochemistry**, v. 94, p. 383-397, 2020.

OFTADEH, R. et al. Biomechanics and mechanobiology of trabecular Bone: a review. **Journal of Biomechanical Engineering**, v. 137, n. 1, p. 108021-1080215, 2015.

ORSINI, G. Maxillary sinus augmentation with Bio-Oss® particles: a light, scanning, and transmission electron microscopy study in man. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 74, n. 1, p. 448-457, 2005.

ORWIG, D. L.; CHAN, J.; MAGAZINER, J. Hip fracture and its consequences: differences between men and women. **Orthopedic Clinics of North America**, v. 37, n. 4, p. 611-622, 2006.

ORYAN, A.; MONAZZAH S.; BIGHAM-SADEGH, A. Bone injury and fracture healing biology. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 28, n. 1, p. 57-71, 2015.

OWEN, R.; REILLY, G. C. *In vitro* models of bone remodelling and associated disorders. **Frontiers In Bioengineering And Biotechnology**, v. 6, p. 1-22, 2018.

PAJARINEN, J. et al. Mesenchymal stem cell-macrophage crosstalk and bone healing. **Biomaterials**, v. 196, p. 80-89, 2019.

PEREZ, J. R. et al. Tissue engineering and cell-based therapies for fractures and bone defects. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 6, p. 1-23, 2018.

PINHEIRO, M. M. et al. O impacto da osteoporose no Brasil: dados regionais das fraturas em homens e mulheres adultos - The Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 2, p. 113,127, 2010.

PLOTKIN, L. I. Apoptotic osteocytes and the control of targeted bone resorption. **Current Osteoporosis Reports**, v. 12, n. 1, p. 121-126, 2014.

QAYOOM, I.; TEOTIA, A. K.; KUMAR, A. Nanohydroxyapatite based ceramic carrier promotes bone formation in a femoral neck canal defect in osteoporotic rats. **Biomacromolecules**, v. 21, n. 2, p. 328-337, 2019.

RADI, Z. A. Kidney pathophysiology, toxicology, and drug-induced injury in drug development. **International Journal of Toxicology**, v. 38, n. 3, p. 215-227, 2019.

RAMESH, N.; MORATTI, S. C.; DIAS, G. J. Hydroxyapatite-polymer biocomposites for bone regeneration: a review of current trends. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 106, n. 5, p. 2046-2057, 2017.

SALHOTRA, A. et al. Mechanisms of bone development and repair. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 11, p. 696-711, 2020.

SANCILIO, S. et al. Alginate/hydroxyapatite-based nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering improve dental pulp biomineralization and differentiation. **Stem Cells International**, v. 2018, p. 1-13, 2018.

SATHYENDRA, V.; DAROWISH, M. Basic science of bone healing. **Hand Clinics**, v. 29, n. 4, p. 473-481, 2013.

SCHAFFLER, M. B. et al. Osteocytes: master orchestrators of bone. **Calcified Tissue International**, v. 94, n. 1, p. 5-24, 2013.

SCHLICKWEI, W.; SCHLICKWEI, C. The use of bone substitutes in the treatment of bone defects - the clinical view and history. **Macromolecular Symposia**, v. 253, n. 1, p. 10-23, 2007.

SEVERINO, P. et al. Alginate nanoparticles for drug delivery and targeting. **Current Pharmaceutical Design**, v. 25, n. 11, p. 1312-1334, 2019.

SHAPIRO, G. et al. Recent advances and future of gene therapy for bone regeneration. **Current Osteoporosis Reports**, v. 16, n. 4, p. 504-511, 2018.

SIDDIQUI, H.; PICKERING, K.; MUCALO, M. A review on the use of hydroxyapatite-carbonaceous structure composites in bone replacement materials for strengthening purposes. **Materials**, v. 11, n. 10, p. 1813-1845, 2018.

SIMS, N. A.; GOOI, J. H. Bone remodeling: multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 19, n. 5, p. 444-451, 2008.

ŠIRKA, A. et al. Calcium sulphate/hydroxyapatite carrier for bone formation in the femoral neck of osteoporotic rats. **Tissue Engineering Part A**, v. 24, n. 23-24, p. 1753-1764, 2018.

SKWAREK, E. et al. Hydroxyapatite composites with multiwalled carbon nanotubes. **Adsorption Science & Technology**, v. 35, n. 5-6, p. 534-544, 2017.

SODRÉ, F. L.; COSTA, J. C. B.; LIMA, J. C. C. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 5, p. 329-337, 2007.

SOFRONIA, A. M. et al. Thermal and structural characterization of synthetic and natural nanocrystalline hydroxyapatite. **Materials Science and Engineering**, v. 43, p. 153-163, 2014.

SOTOME, S. et al. Synthesis and *in vivo* evaluation of a novel hydroxyapatite/collagen–alginate as a bone filler and a drug delivery carrier of bone morphogenetic protein. **Materials Science and Engineering: C**, v. 24, n. 3, p. 341-347, 2004.

SPINELLA, R.; SAWHNEY, R.; JALAN, R. Albumin in chronic liver disease: structure, functions and therapeutic implications. **Hepatology International**, v. 10, n. 1, p. 124-132, 2015.

ŠUPOVÁ, M. Isolation and preparation of nanoscale bioapatites from natural sources: a review. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 14, n. 1, p. 546-563, 2014.

TATARA, A. M.; MIKOS, A. G. Tissue engineering in orthopaedics. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 98, n. 13, p. 1132-1139, 2016.

THRALL M.A. et. al. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

TIERNAN, H.; BYRNE, B.; KAZARIAN, S. G. ATR-FTIR spectroscopy and spectroscopic imaging for the analysis of biopharmaceuticals. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 241, p. 118636-118647, 2020.

TOMAZETTI, J. et al. Baker yeast-induced fever in young rats: characterization and validation of an animal model for antipyretics screening. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 147, n. 1, p. 29-35, 2005.

TOOSI, S.; BEHRAVAN, N.; BEHRAVAN, J. Nonunion fractures, mesenchymal stem cells and bone tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 106, n. 9, p. 2552-2562, 2018.

TREFTS, E.; GANNON, M.; WASSERMAN, D. H. The liver. **Current Biology**, v. 27, n. 21, p. 1147-1151, 2017.

UDAYAKANTHA, K. S. M. et al. Biocompatible nano hydroxyapatite-curcumin bi-coated antibacterial activated carbon for water purification. **Rsc Advances**, v. 5, n. 79, p. 64696-64703, 2015.

UNAL, M.; CREECY, A.; NYMAN, J. S. The role of matrix composition in the mechanical behavior of bone. **Current Osteoporosis Reports**, v. 16, n. 3, p. 205-215, 2018.

VIALLE, E. et al. Avaliação da hipotermia em ratos submetidos a lesão medular experimental. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 37, n. 7, p. 299-302, 2002.

VIANA, J. R. et al. Análise comparativa da síntese de hidroxiapatita via estado sólido. **Revista Matéria**, v. 25, n. 1, p. 1-13, 2020.

VIEIRA, S. et al. Nanoparticles for bone tissue engineering. **Biotechnology Progress**, v. 33, n. 3, p. 590-611, 2017.

VIGUET-CARRIN, S.; GARNERO, P.; DELMAS, P. D. The role of collagen in bone strength. **Osteoporosis International**, v. 17, n. 3, p. 319-336, 2005.

WRONSKI, T. J.; DANN, L. M.; HORNER, S. L. Time course of vertebral osteopenia in ovariectomized rats. **Bone**, v. 10, n. 4, p. 295-301, 1989.

YEONG, K. C. B.; WANG, J.; NG, S. C. Mechanochemical synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite from CaO and CaHPO₄. **Biomaterials**, v. 22, n. 20, p. 2705-2712, 2001.

ZAMANI, S.; SALAH, E.; MOBASHERPOUR, I. Removal of nickel from aqueous solution by nano hydroxyapatite originated from persian gulf corals. **Canadian Chemical Transactions**, v. 1, n. 3, p. 173-190, 2013.

ZHANG, W. R.; PARIKH, C. R. Biomarkers of acute and chronic kidney disease. **Annual Review of Physiology**, v. 81, n. 1, p. 309-333, 2019.

ZHENG, H. Interaction mechanism in sol-gel transition of alginate solutions by addition of divalent cations. **Carbohydrate Research**, v. 302, n. 1-2, p. 97-101, 1997.

ZHOU, H.; LEE, J. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 7, p. 2769-2781, 2011.

ANEXOS

ANEXO A – Autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais da UNIVASF



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
MINISTÉRIO DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Certificado de autorização

Certificamos que o projeto intitulado: "DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE FORMULAÇÃO CONTENDO NANOHIPOXIPATITA PARA O TRATAMENTO DE LESÕES ÓSSEAS", registrada com o nº 0008/301019, sob a responsabilidade de **Fabrizio Souza Silva** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - 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 aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF, em 30/10/2019.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	10/12/2019 a 10/02/2021
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i>
Nº de animais	180
Peso/Idade	250 a 350g/ 6 a 8 semanas
Sexo	M 108; F 72
Origem	Biotério Central da UNIVASF

Em: 10/04/2020

KARINE VIEIRA ANTUNES
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/UNIVASF