

UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA
DOUTORADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

Lílian Melo de Miranda Fortaleza

Estudo *in vivo* da reparação óssea guiada com membrana biológica de poliestireno, colágeno e norbixina fotobiomodulada com LED

SÃO JOSÉ DOS CAMPOS, SP
2022

Lílian Melo de Miranda Fortaleza

Estudo *in vivo* da reparação óssea guiada com membrana biológica de poliestireno, colágeno e norbixina fotobiomodulada com LED

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Luís Eduardo Silva Soares.

SÃO JOSÉ DOS CAMPOS, SP
2022

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Fortaleza, Lílian Melo de Miranda
Estudo in vivo da reparação óssea guiada com membrana biológica de poliestireno, colágeno e norbixina fotobiomodulada com LED / Lílian Melo de Miranda Fortaleza; orientador, Luís Eduardo Silva Soares. - São José dos Campos, SP, 2022.
1 CD-ROM, 76 p.

Tese (Doutorado) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.

Inclui referências

1. Engenharia Biomédica. 2. hidroxiapatita. 3. membrana biocompatível. 4. fotobiomodulação. 5. espectroscopia Raman. I. Soares, Luís Eduardo Silva, orient. II. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. III. Título.

Eu, Lílian Melo de Miranda Fortaleza, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 6 de Abril de 2022.

Lílian melo de miranda fortaleza

Autor(a) da Obra

Data da defesa: 16 / 02 / 22

LÍLIAN MELO DE MIRANDA FORTALEZA

“ESTUDO *In vivo* DA REPARAÇÃO ÓSSEA GUIADA COM MEMBRANA BIOLÓGICA DE POLIESTIRENO, COLÁGENO E NORBIXINA FOTOBIMODULADA COM LED.”

Tese aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba – Univap, pela seguinte banca examinadora:

PROF.^a DR.^a LUCIANA BARROS SANT'ANNA

PROF. DR. LUÍS EDUARDO SILVA SOARES

PROF.^a DR.^a JULIANA FERREIRA STRIXINO

PROF.^a DR.^a NAYANA PINHEIRO MACHADO DE FREITAS COELHO - UESPI

PROF. DR. ANTÔNIO LUIZ MARTINS MAIA FILHO - UESPI

Prof.^a Dr.^a Lúcia Vieira

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 16 de fevereiro 2022.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, a seu filho Jesus Cristo, e à Maria Santíssima, que sempre estiveram presentes nos grandes momentos de dificuldades, sendo minha força, refúgio e refrigério da alma.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, pela cura física e espiritual, por ter me levantado, restituído minhas forças e me mostrado a luz e caminho a seguir. A ti, toda honra e glória, Senhor.

À meu marido Mairton José de Alencar Fortaleza, pelo companheirismo e às minhas filhas Monique Melo Fortaleza e Melissa Melo Fortaleza, por serem sementes de amor e motivação diária.

Aos meus pais, Eurimar Nunes de Miranda e Rita Melo de Miranda, por serem família amorosa e sempre presente em minha vida.

À minha querida irmã Sheila Melo de Miranda pelo carinho, incentivo e orações.

Ao Prof. Prof. Dr. Luís Eduardo Silva Soares pela competência, empenho, dedicação e paciência na condução da orientação.

À Adrielle Martins Monteiro Alves pela amizade, companheirismo e auxílio no desenvolvimento da pesquisa.

Ao NPBio-UESPI (Núcleo de Biotecnologia e Biodiversidade da Universidade Estadual do Piauí), na pessoa do Prof. Dr. Antônio Luiz Maia Filho, pela dedicação e auxílio nas etapas da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Gustavo Oliveira de Meira Gusmão pela análise Raman, pela dedicação, tempo, paciência e empenho na construção do segundo artigo.

Aos Prof. do IFPI Dr. Charlyton Luis Sena da Costa e Vicente Galber Freitas Viana por ceder a membrana para o desenvolvimento desta tese.

À Profa. Dra. Renata Amadei Nicolau, pelo empréstimo do LED para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Bartolomeu Cruz Viana, pela análise MEV.

Ao Prof. Dr. Raurys Alencar de Oliveira pela análise estatística.

Ao Prof. Msc. José Zilton Lima Verde Santos pelas análises histológicas.

À Daniel Cabral Leão Ferreira pelo auxílio na execução das cirurgias.

À Francisca Lusiane, Auriane e Jéssica pelas contribuições na execução das etapas iniciais da pesquisa.

RESUMO

Biomateriais de diversas composições associados ou não à fotobiomodulação vem sendo utilizados como recurso para favorecer e estimular o reparo ósseo. O objetivo do presente estudo foi analisar, *in vivo*, o processo de reparação óssea guiada pela membrana de poliestireno com colágeno e norbixina (MPSCN) e fotobiomodulada por diodo emissor de luz (LED). Para esta pesquisa, 40 ratos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: C= controle; M= membrana; LED= LED; MLED= LED + membrana e subdivididos em 2 subgrupos de eutanásia (15 e 30 dias). Um defeito ósseo foi criado na calvária de cada animal. Os grupos LED e MLED foram submetidos à fotobiomodulação com LED, imediatamente ao pós-operatório ($\lambda = 945$ nm, P= 48 mW, área do feixe de 0.5 cm^2 e $t=150\text{s}$), em dias alternados subsequentes ao pós-operatório até a eutanásia. A fluência de energia foi de 30 J/cm^2 . Os fragmentos de ossos foram analisados por microscopia óptica (análise histológica), espectroscopia Raman e Microscopia eletrônica de varredura (MEV). A análise estatística foi descritiva, inicialmente realizado o teste de normalidade Kolmogorov Smirnov, e os dados paramétricos foram analisados pelo teste ANOVA para comparação entre grupos, seguido do teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95% e nível de significância $p < 0,05$. O uso da MPSCN reduziu o processo inflamatório, serviu de arcabouço e favoreceu a neoformação óssea. Ao associá-la com o LED ocorreu remodelação óssea, porém, de maneira desorganizada e irregular. A fotobiomodulação com LED influenciou positivamente a formação óssea com aumento na deposição de hidroxiapatita, nos diferentes intervalos de tempo, sendo maior no final do experimento, resultando em osso mais compacto e linear. O uso simultâneo da MPSCN e fotobiomodulação não apresentou efetividade.

Palavras-chave: hidroxiapatita; membrana biocompatível; fotobiomodulação LED; espectroscopia Raman; MEV; histológico; osso.

**In vivo study of guided bone repair with biological membrane of polystyrene,
collagen, norbixin and photobiomodulated with LED**

ABSTRACT

Biomaterials of different compositions associated or not with photobiomodulation have been used as a resource to promote and stimulate bone repair. The aim of the present study was to analyze, *in vivo*, the bone repair process guided by the polystyrene membrane with collagen and norbixin (MPSCN) and photobiomodulated by light emitting diode (LED). For this research, 40 rats were randomly divided into four groups: C = control; M = membrane; LED = LED; MLED = LED + membrane and subdivided into 2 subgroups of euthanasia (15 and 30 days). A bone defect was created in the calvaria of each animal. The LED and MLED groups were subjected to photobiomodulation with LED, immediately after the operation ($\lambda = 945 \text{ nm}$ and $P = 48 \text{ mW}$, beam area of 0.5 cm^2 and $t = 150\text{s}$), on alternate days after the operation until euthanasia. The energy fluency was 30 J / cm^2 . The bone fragments were analyzed by optical microscopy (histological analysis), Raman spectroscopy and scanning electron microscopy (SEM). The statistical analysis was descriptive, initially the Kolmogorov Smirnov normality test, and the parametric data were analyzed using the ANOVA test for comparison between groups, followed by the Tukey test, with a 95% confidence interval and significance level $p < 0, 05$. The use of MPSCN reduced the inflammatory process, served as a framework and favored bone neoformation. When associating it with the LED, bone remodeling occurred, however, in a disorganized and irregular manner. Photobiomodulation with LED positively influenced bone formation with increased deposition of hydroxyapatite, at different time intervals, being greater at the end of the experiment, resulting in more compact and linear bone. The simultaneous use of MPSCN and photobiomodulation was not effective.

Keywords: hydroxyapatite; biocompatible membrane; LED photobiomodulation; Raman spectroscopy; scanning electron microscopy (SEM); bone; histological;

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP- trifosfato de adenosina

(β -TCP)- beta fosfato tricálcico

Ca- cálcio

CELAPO- laboratório IP&D/Centro de laserterapia e fotobiologia

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

DE- densidade de energia

EDS- espectroscopia de dispersão de energia

EDX- Espectroscopia de Fluorescência de Raios- X por energia dispersiva

ERK- ativação de sinais extracelulares

ERO-espécies reativas de oxigênio

FBM- Fotobiomodulação

FBT-

AsGaAL - Arseneto de gálio alumínio

HA - hidroxiapatita

HE - hematoxilina eosina

IV- infravermelho

LED- diodo emissor de luz

MEV- microscopia eletrônica de varredura

MBO- membranas bovinas orgânicas

MPSCN- membrana de poliestireno, colágeno e elastina

MTA- mineral trióxido agregado

NADH- desidrogenase dinucleotídeo adenina nicotinamida

NPBIO- UESPI- Núcleo de Biotecnologia e Biodiversidade da Universidade Estadual do Piauí

P- potássio

POM- proteínas ósseas morfogenéticas

PS- poliestireno

ROG- regeneração óssea guiada

UV- ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Figura esquemática ilustrando o tecido ósseo e suas estruturas	20
Figura 2- Figura esquemática descrevendo as fases de cicatrização óssea secundária: 1- Fase Inflamatória; 2- Fase de Reparação; 3- Fase de Reparação; 4- Fase de Remodelação	21
Figura 3- Fotografia de sementes de urucum	26
Figura 4- Fluxograma das etapas realizadas na pesquisa.....	39
Figura 5- Amostras da Membrana de Poliestireno, Colágeno e Norbixina (MPSCN) utilizada no estudo.	41
Figura 6- Sequência de fotos ilustrando o procedimento cirúrgico e implantação da MPSCN: Região tricotomizada e incisão na região occipital (A); criação do defeito crítico com broca de trefina (B); defeito crítico (C); implantação da MPSCN (D); e sutura com fio seda (E).	43
Figura 7- Imagens ilustrativas do Protótipo de LED (945 nm) usado na pesquisa (A) e do colimador (B).	44
Figura 8- Imagens ilustrativas do ponto de aplicação da Fotobiomodulação com LED em defeito crítico de calvária de ratos (A) e aplicação do LED no defeito crítico da calvária de ratos (B).	45
Figura 9- Organograma da amostra de tecido com defeito ósseo, dividido em partes encaminhadas para as diferentes técnicas de análise.....	46
Figura 10- Superfície óssea próxima ao local do defeito ósseo nos tempos experimentais de 15 dias (A, C) e 30 dias (B,D). Fotomicrografias mostrando a aparência do tecido ósseo nos grupos C (controle) e M (membrana), para ambos os períodos, 15 e 30 dias. (coloração de hematoxilina e eosina; ampliação original × 40). IN, infiltrado inflamatório; IB, osso intacto; NF, osso neoformado; R, remodelação. As bordas do defeito ósseo foram delineadas para facilitar a identificação.	50
Figura 11- Superfície óssea próxima ao local do defeito ósseo nos tempos experimentais de 15 dias (A, C) e 30 dias (B, D). Fotomicrografias mostrando a aparência do tecido ósseo nos grupos LED e MLED, para ambos os períodos, 15 e 30 dias. (coloração de hematoxilina e eosina; ampliação original × 40). IN, infiltrado inflamatório; IB, osso intacto; NF, osso neoformado; R, remodelação. As bordas do defeito ósseo foram delineadas para facilitar a identificação.....	51
Figura 12- Microscopia eletrônica de varredura da MPSCN. A: 60X; B: 1000X; C: 2000X	53
Figura 13- Micrografias eletrônicas de varredura da superfície óssea perto do local do defeito nos grupos C (controle) e M (membrana), nos tempos experimentais de 15 e 30 dias (ampliação ×200). As bordas do defeito ósseo (setas amarelas) e a área da lesão (asteriscos) ainda são visíveis. Após 15 dias, no grupo controle (C) e no grupo membrana (M) observam-se ainda as bordas do defeito ósseo (A, setas; C, setas); e a área da lesão (A, asteriscos; C, asteriscos). Após 30 dias, observou-se no controle (C) e membrana (M), uma superfície óssea compacta na área da lesão (B, asteriscos; D, asteriscos); e borda do defeito ósseo ainda visível (B, setas; D, setas).....	54
Figura 14- Micrografias eletrônicas de varredura da superfície óssea perto do local do defeito ósseo nos grupos LED e MLED (membrana/LED), nos tempos experimentais de 15 e 30 dias (ampliação ×200). Com 15 dias a área da lesão (asteriscos), foi identificada no grupos LED e MLED (A, asteriscos; C, asteriscos) e a	

borda da lesão (A, setas; C, setas). Com 30 dias, uma camada de osso compacto foi identificada no grupo LED (B, asteriscos); e no grupo MLED é visível a área da lesão com uma fina camada de deposição óssea (D, asteriscos) e a borda da lesão permanece visível (D, setas)..... 55

Figura 15- Espectros Raman dos defeitos do tecido ósseo nos grupos. Osso, B; controle, C; membrana, M ;LED, diodo emissor de luz FBM; e MLED, membrana + LED (A) após 15 dias (B) 30 dias. Espectros representativos mostrando o ν_1 -PO₄³⁻ pico de vibração (958 cm⁻¹) dos grupos para ambos os períodos. 57

Figura 16- Gráficos de barras dos desvios médios e padrão da área integrada do pico ν_1 -PO₄³⁻ pico vibracional (~ 958 cm⁻¹) entre grupos. Osso, B; controle, C; membrana, M; LED, diodo emissor de luz FBM; e MLED, membrana + LED: (A) após 15 dias (B) após 30 dias..... 57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Estado da arte do efeito da fotobiomodulação e biomateriais no processo de reparo ósseo em modelo animal.....	34
Quadro 2 - Distribuição dos grupos do estudo.....	41
Quadro 3 - Parâmetros do equipamento de FBM utilizado.....	45
Quadro 4 - Análise estatística dos valores da área integrada dos espectros Raman relacionados ao componente fosfato $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ ($\sim 960\text{ cm}^{-1}$) entre os grupos experimentais após o 15º e 30º dia de tratamento comparados com LED.....	58

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 JUSTIFICATIVA	18
3 OBJETIVOS	19
3.1 Geral.....	19
3.2 Específicos.....	19
4 REVISÃO DE LITERATURA	20
4.1 Tecido ósseo, modelação, remodelação e reparação óssea.....	20
4.2 Modelo Experimental e Tamanho Crítico do defeito.....	22
4.3 Regeneração óssea guiada.....	23
4.4 Aplicação da fotobiomodulação no reparo ósseo.....	26
4.5 Biomodulação e biomateriais.....	30
4.6 Espectroscopia Raman.....	35
4.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	36
5 MATERIAIS E MÉTODOS	38
5.1 Delineamento do estudo e Aspectos Éticos.....	40
5.2 Local do Estudo.....	40
5.3 Amostra.....	40
5.4 Grupos experimentais.....	40
5.5 Obtenção da Membrana.....	41
5.6 Procedimento Cirúrgico.....	41
5.7 Protocolo de fotobiomodulação LED.....	43
5.8 Eutanásia e distribuição das amostras.....	46
5.9 Análise histológica.....	47
5.10 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	47
5.11 Análise por Espectroscopia Raman.....	47
5.12 Análise estatística.....	48
6 RESULTADOS	49
6.1 Análise Histológica.....	49
6.2 Análise por Microscopia Eletrônica.....	52
6.3 Análise por Espectroscopia Raman.....	55
7 DISCUSSÃO	59
8 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS	65
ANEXO A- DECLARAÇÃO CEUA-UESPI	76
ANEXO B- ARTIGO 1	77
ANEXO C- ARTIGO 2	78

1 INTRODUÇÃO

A alta frequência de acidentes de trânsito ocasiona efeitos negativos sobre a saúde da população pela gravidade das lesões teciduais e ósseas decorrentes, sendo considerado um dos mais importantes problemas de saúde pública. Estima-se que, entre 20 a 50 milhões de pessoas, a cada ano, sofram ferimentos não fatais, evoluindo com certo grau de deficiência e/ou morbidade, e em torno de 1,25 milhões morrem em acidentes de trânsito em todo o mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

A população brasileira tem apresentado um ganho de sobrevida generalizado que pode ser acompanhado de comorbidades que acarretam incapacidade funcional à pessoa idosa pela maior chance de quedas e traumas; e conseqüentemente fraturas nessa população (CAMARGOS, 2019).

Os defeitos ósseos podem ocorrer por causas multifatoriais, tais como, trauma, infecção, tumor e osteólise periprotética (SANTOS *et al.*, 2019). O autoenxerto, geralmente, é o mais indicado para o tratamento dos defeitos ósseos, no entanto, as deficiências reconhecidas nos enxertos ósseos autógenos para o tratamento destas condições conduziram estudos voltados para o desenvolvimento de novos substitutos ósseos (NAUTH; SCHEMITSCH, 2012; ANAND *et al.*, 2019).

O tecido ósseo é especializado com características específicas para o processo de consolidação óssea, que depende do equilíbrio existente entre formação e reabsorção. Várias condições determinam o reparo no tecido ósseo, dentre elas, a irrigação sanguínea, a estabilidade mecânica e o tamanho da lesão. Em algumas situações, o processo regenerativo do osso apresenta-se limitado, e surge a possibilidade do uso de recursos para auxiliar o processo (KIM *et al.*, 2020).

O desenvolvimento de novos biomateriais com o objetivo de imitar as características do enxerto ósseo autólogo tem crescido nos últimos anos. Estudos *in vitro* e investigações clínicas vêm demonstrando que alguns destes substitutos ósseos podem estimular a consolidação (EMARA; DIAB; EMARA, 2015). A engenharia de tecidos vem se desenvolvendo através do uso de vários biomateriais para o tratamento de defeitos ósseos, como membranas biológicas (PINHEIRO *et al.*, 2009; GUIMARÃES *et al.*, 2011; MAIORANE *et al.*, 2011; TOSTA *et al.*, 2013; GERBI *et al.*, 2018; KASUYA *et al.*, 2018).

O uso bem-sucedido de membranas biológicas no tratamento de defeitos ósseos tem sido creditado ao seu potencial para manter e estabilizar o coágulo sanguíneo e na capacidade de isolar células epiteliais, com o princípio da regeneração de tecido ósseo guiada (ROG) (SHEIKH *et al.*, 2016). As membranas biocompatíveis estão sendo usadas com o intuito de proporcionar estrutura de suporte para a neoformação óssea, manter a concentração dos fatores estimulantes da osteogênese e reparação tecidual; e servir de proteção da região do defeito ósseo contra a invasão dos tecidos moles adjacentes que se proliferam (COSTA *et al.*, 2016).

As membranas usadas para ROG devem apresentar biocompatibilidade para prevenir reações adversas com o tecido circundante e com o organismo; integração do tecido para favorecer a incorporação no tecido circundante e permitir uma progressiva integração das fibras de colágeno; permeabilidade seletiva para proliferação de células osteogênicas; função de criação de espaço a fim de fornecer espaço para um coágulo de sangue estável para regeneração óssea (CALCIOLARI *et al.*, 2018).

Os polímeros são materiais orgânicos contendo ligações simples e duplas alternadas em sua cadeia carbônica principal (SHERMAN; XIAO; PERCEC, 2017, KHANSARY *et al.*, 2017). Os polímeros apresentam boa biocompatibilidade, flexibilidade, biodegradação, processabilidade, e baixo custo de fabricação em relação a outros tipos de biomateriais, e a partir deles, pode-se produzir membranas poliméricas atóxicas que podem ser eliminadas por vias metabólicas normais (DOS SANTOS; MARINHO; MIGUEL, 2013).

O colágeno é um polímero que apresenta baixa imunogenicidade, boa capacidade hemostática, ação quimiotática em células regenerativas, como fibroblastos e osteoblastos e boa estabilidade dimensional sendo usados na preparação de membranas biocompatíveis (ZHANG *et al.*, 2017; SBRICOLI *et al.*, 2020). A elastina é um polímero altamente insolúvel que confere elasticidade a diferentes tecidos do corpo (BOLAGH; MITHIEUX; WEISS, 2016). Membranas com colágeno e elastina representam uma nova alternativa terapêutica para o reparo ósseo (SANTOS *et al.*, 2019).

A norbixina é um composto do qual se obtém polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, extraído do urucum, planta da América (MAGESTE *et al.*, 2012). Os extratos do urucum têm sido empregados na área da saúde com efeitos

antimicrobiológicos (IROBI; MOO-YOUNG; ANDERSON, 1996) anti-hemorrágicos e cicatrizantes (LIMA *et al.*, 2001); anti-inflamatórios (CAPELLA *et al.*, 2016); osteoindutores (NISHIED *et al.*, 2015); não citotóxico (MONTE *et al.*, 2016); e para arcabouço ósseo (ALVES *et al.*, 2018).

O poliestireno (PS) é um polímero sintético citocompatível, não biodegradável, usado para preparar membranas e biomateriais biocompatíveis para uso no processo de regeneração óssea, cuja função é revestir o composto e impedir a sua degradação. É amplamente usado como substrato para cultura de células, pois tem a capacidade de oferecer grande área de superfície capaz de garantir a infiltração, propagação e proliferação de células oferecendo uma solução promissora, assim como uma superfície para a regeneração óssea em grandes defeitos ósseos (SERAFIM *et al.*, 2014). As fibras promovem proliferação e diferenciação celular *in vitro* e sua porosidade interconectada também promove a angiogênese que é responsável pelo transporte de células osteoprogenitoras, oxigênio e nutrientes para o sítio enxertado (BAKER *et al.*, 2006; SERAFIM *et al.*, 2014; TERRANOVA *et al.*, 2016).

A fotobiomodulação, pelo seu efeito fotoquímico nos tecidos, promove uma alteração química conhecida como fotobioestimulação, que influencia a liberação de diversos fatores de crescimento envolvidos na formação de células epiteliais, fibroblastos, colágeno e proliferação vascular, tornando-se uma terapia que promove a cicatrização de feridas e redução da dor, estimula a síntese de enzimas que agem nos lisossomos e mitocôndrias, aumenta o metabolismo celular, facilitando a angiogênese e síntese de colágeno (ESCUDERO *et al.*, 2020).

A fotobiomodulação para a estimulação tanto do reparo quanto da cicatrização óssea apresenta-se vantajosa, por ser um método não invasivo, de baixo custo, em comparação com outros tratamentos. Vários estudos experimentais indicaram efeitos benéficos do uso da fotobiomodulação no aumento do metabolismo ósseo e consolidação da fratura (PINHEIRO *et al.*, 2014; SOARES *et al.*, 2014; SOARES *et al.*, 2015; PINHEIRO *et al.*, 2017; ALVES *et al.*, 2018).

Pinheiro *et al.*, (2014), demonstraram em seu estudo, por meio da análise por Espectroscopia Raman, que a fotobiomodulação com laser ou com LED associadas ao uso de biomaterial resultou no aumento da deposição de colágeno tipo I e da mineralização óssea. Além disso, são recursos relativamente seguros, do ponto de

vista físico e biológico, e apresentam custos relativamente baixos com técnicas de aplicação simples.

Os lasers diodos emissores de luz (LEDs) emitem luz em uma largura de banda mais ampla do que o laser que pode impactar a capacidade do dispositivo de LED para atingir tecido com energia eficiente. Uma diferença significativa entre lasers e LED é a forma como a energia da luz é fornecida, os LEDs oferecem um fornecimento muito mais suave dos mesmos comprimentos de onda de luz em comparação com lasers e substancialmente menor produção de energia (LOPES *et al.*, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2017).

No entanto, apesar do crescimento de relatos de sucesso de diferentes aplicações de fotobiomodulação, em diversas áreas, a sua utilização na reparação óssea, associada ao uso de biomateriais, necessita de mais estudos (PINHEIRO *et al.*, 2014).

Nesse sentido, objetiva-se com o presente estudo, analisar o processo de reparação óssea guiada pela membrana de poliestireno com colágeno e norbixina, fotobiomodulada ou não por LED.

2 JUSTIFICATIVA

Na literatura, as informações sobre os efeitos e propriedades biológicas da membrana de norbixina e colágeno em tecidos animais são escassas e ainda há número reduzido e não conclusivos de estudos sobre a associação do uso do LED e membranas biocompatíveis.

O uso de membranas, a fotobiomodulação ou a associação destes, apresenta perspectivas promissoras para o processo reparo ósseo.

O estudo pode ser justificado levando em consideração a falta de estudos comparativos do uso da fotobiomodulação associada às membranas no processo de reparo ósseo e o interesse pelo entendimento da interação de membranas biológicas de poliestireno com colágeno e norbixina. Além disso há necessidade de conhecimento de métodos terapêuticos que estimulem o reparo ósseo e a consolidação de fraturas, por meio da análise de cortes histopatológicos e testes mutagênicos.

Outro ponto relevante é questionar se membranas biológicas de poliestireno com colágeno e norbixina estimuladas por LED poderão otimizar o processo de reparo ósseo. As membranas poliméricas, como a da presente pesquisa, apresentam boa biocompatibilidade, flexibilidade, biodegradação, processabilidade, fácil aplicabilidade e baixo custo de fabricação em relação a outros tipos de biomateriais e membranas comerciais.

O trabalho apresenta importância social, econômica e científica, uma vez que, os achados da pesquisa podem representar alternativas terapêuticas reconstrutivas em condições clínicas relacionadas aos defeitos ósseos.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Analisar o processo de reparação óssea guiada pela membrana de poliestireno com colágeno e norbixina fotobiomulada ou não por LED.

3.2 Específicos

Verificar, por meio da Espectroscopia Raman, a influência da membrana de poliestireno com colágeno e norbixina associada ou não à fotobiomodulação com LED, na deposição da matriz orgânica e inorgânica nos defeitos ósseos em ratos;

Analisar por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), quanto à morfologia, a influência da membrana de poliestireno com colágeno e norbixina associada ou não à fotobiomodulação com LED, na capacidade de regeneração guiada dos defeitos ósseos em ratos;

Avaliar, histopatologicamente, a ação da membrana de poliestireno com colágeno e norbixina associada ou não à fotobiomodulação com LED, em defeitos ósseos na calvária de ratos.

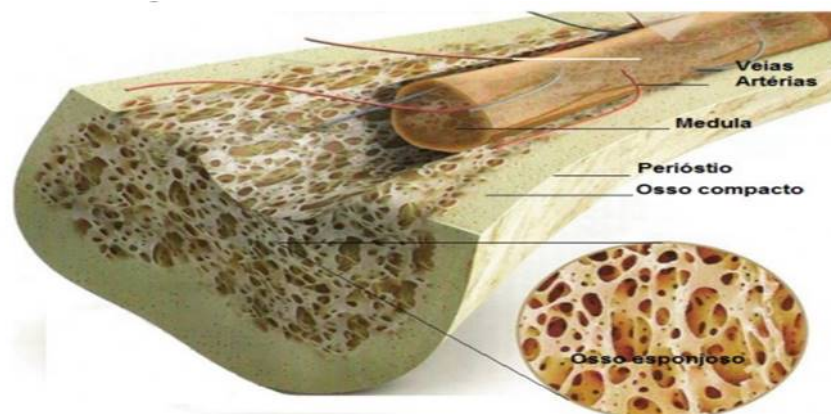
4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Tecido ósseo, modelação, remodelação e reparação óssea

O osso é uma estrutura rígida que apresenta integração bioquímica de componentes inorgânicos e orgânicos. A porção orgânica, que corresponde a 25% do peso do tecido ósseo, é constituída de colágeno tipo I, proteoglicanos e proteínas sem colágeno. O conteúdo inorgânico é, principalmente, composto por cálcio e fósforo sob a forma de hidroxiapatita com pequenas quantidades de magnésio, fluoreto, e de sódio (PINHEIRO; GERBI, 2006; PINHEIRO *et al.*, 2010).

A estrutura óssea é constituída por osso compacto (80%) e esponjoso (20%) (RANG; DALE; RITTER, 2001). O osso cortical corresponde à parte densa e compacta organizada em ostéons ou sistema de Havers; e o esponjoso possui lamelas dispostas irregularmente, formando trabéculas, e as cavidades existentes entre as trabéculas são preenchidas por medula óssea, produtora de células sanguíneas. Assim, o osso trabecular é metabolicamente mais ativo e também mais afetado por fatores que levam à perda óssea (TORTORA; GRAWBOSKI, 2008).

Figura 1- Figura esquemática ilustrando o tecido ósseo e suas estruturas



Fonte: adaptado (KONIG; LIEBICH, 2016)

Várias células ósseas estão envolvidas no processo de formação, modelação e remodelação envolvendo atividade osteoblástica e osteoclástica (STANDRING, 2009).

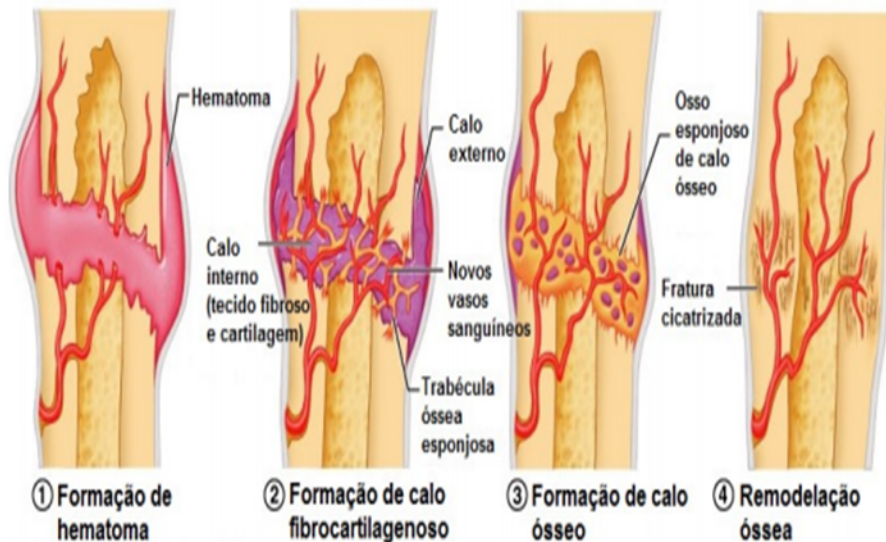
Em condições fisiológicas, o processo de remodelação óssea ocorre especialmente pela carga que o osso é submetido durante as atividades

(GRANJEIRO; TAGA, 2005). Esse aspecto é conceituado pela Lei de Wolf que determina a relação entre a intensidade das forças aplicadas com o estímulo ao processo de neoformação e reabsorção (CARVALHO; LUPPINO; MENDES, 2002).

A regeneração óssea representa uma série de eventos biológicos desencadeados por mediadores e componentes celulares que levam ao recrutamento, proliferação e difusão de células (EINHORN; GERSTENFELD, 2014).

O reparo do tecido ósseo é dividido em fase de cicatrização óssea primária e cicatrização óssea secundária. A fase de cicatrização secundária é dividida em fase inflamatória, reparadora e remodeladora (Fig. 2) (DUTTON, 2012; GRIFFON, 2014).

Figura 2- Figura esquemática descrevendo as fases de cicatrização óssea secundária: 1- Fase Inflamatória; 2- Fase de Reparação; 3- Fase de Reparação; 4- Fase de Remodelação



Fonte: DUTTON, 2012; GRIFFON, 2014

A fase de reparação está intimamente relacionada ao processo de angiogênese, que constitui etapa crucial para a osteogênese. O estágio inicial do processo de reparo ósseo é caracterizado pela proliferação próxima à fratura de células do periósteo, as quais são precursoras dos osteoblastos responsáveis pela sedimentação da substância entre as células (CROCI *et al*, 2003). A fase reparadora finaliza com a reabsorção de células desnecessárias e com o calo ósseo sendo formado sobre tensão (ROBBINS, 2001).

Na fase remodeladora, o calo ósseo é reabsorvido e remodelado, neste processo atuam as células osteoclásticas e osteoblásticas, conhecidas como

unidade óssea multicelular, cuja interação entre absorção e deposição óssea são os aspectos responsáveis pela remodelação (BETTI, 2004).

As causas dos defeitos ósseos são multifatoriais, exigindo-se, muitas vezes, procedimentos cirúrgicos para a reparação. No entanto, podem ocorrer falhas nos processos biológicos e cirúrgicos de consolidação óssea levando à não união dessas estruturas (SANTOS *et al.*, 2019).

Em algumas situações, o processo regenerativo do osso apresenta-se limitado, necessitando de um método para preencher os defeitos ósseos e surge a possibilidade do uso de recursos para auxiliar o processo (KIM *et al.*, 2020).

4.2 Modelo Experimental e Tamanho Crítico do defeito

O defeito ósseo de tamanho crítico, em estudos experimentais, deve ser aquele que durante o período da pesquisa não ocorrerá a reparação espontânea da lesão (GOSAIN *et al.*, 2000). Podem ocorrer variações no diâmetro do defeito crítico de 2 a 9 mm (MESSORA *et al.*, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2014; TOKER *et al.*, 2012; CUNHA *et al.*, 2014; PINHEIRO *et al.*, 2017).

Vários modelos experimentais animais foram usados para avaliar o processo de consolidação óssea, com defeitos ósseos realizados em diferentes regiões como tibia de ratos (OLIVEIRA *et al.*, 2012; PINHEIRO *et al.*, 2013; PINTO *et al.*, 2013; SOARES *et al.*, 2014), fêmur de ratos (BROWN *et al.*, 2011); em tibia de coelhos (MAIA FILHO *et al.*, 2013); crâniomadibulofacial (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986; GOSAIN *et al.*, 2000); calvária de ratos (ALMEIDA *et al.*, 2014; SBRANA, 2015; ALVES *et al.*, 2018; OHSUGI *et al.*, 2018; KASUYA *et al.*, 2018).

A escolha do animal deve se basear na complexidade do manuseio clínico e da sedação; além do menor custo, assim, os animais de pequeno porte, como os ratos, apresentam maiores vantagens quando comparados aos de grande porte (MENDES *et al.*, 2001).

A localização anatômica da calvária óssea permite a confecção de defeito ósseo uniforme com padrão adequado para análise histológica e com capacidade para implantação de biomateriais (DONOS *et al.*, 2004).

4.3 Regeneração óssea guiada

O tecido ósseo é especializado com características para o processo de consolidação óssea, a qual depende do equilíbrio entre formação e reabsorção óssea. Várias condições determinam o reparo do tecido ósseo, dentre elas, a irrigação sanguínea, a estabilidade mecânica e o tamanho da lesão. Em algumas situações, o processo regenerativo do osso encontra-se limitado, e surge a possibilidade do uso de recursos para auxiliar o processo (KIM *et al.*, 2020).

Os defeitos podem ser decorrentes de fatores genéticos, traumas e procedimentos cirúrgicos, e em muitas situações, existe a necessidade de métodos coadjuvantes para auxiliar o processo de reparo ósseo (SANTOS *et al.*, 2019). Diversos materiais tem sido usados para estimular a osteogênese ou até mesmo guiar ou direcionar o processo de consolidação óssea (MARTINEZ; PINHEIRO; RAMALHO, 2008; PINHEIRO *et al.*, 2013; PINHEIRO *et al.*, 2014; SOARES *et al.*, 2015).

O tratamento considerado padrão-ouro no processo de reparação óssea corresponde aos enxertos ósseos autólogos, baseado no enxerto de fragmentos ósseos próprios, metais como as ligas de titânio e as biocerâmicas. O enxerto autólogo apresenta células osteogênicas e fatores osteoindutores essenciais que estão presentes no osso humano, o que constitui sua principal vantagem. No entanto, existem desvantagens, dentre elas, a dificuldade de obtenção do material, a quantidade reduzida e alta morbidade do paciente. Assim, torna-se necessário o desenvolvimento e o uso de outros materiais (SALGADO; COUTINHO; REIS, 2004). A regeneração óssea guiada (ROG) funciona como uma barreira por meio de membranas restauráveis ou não, sintéticas ou biológicas, impedindo migração dos tecidos moles sobre o tecido ósseo (CHEN; JIN, 2010; TOBITA; MIZUNO, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2011; CHANG *et al.*, 2015; COSTA *et al.*, 2016).

O uso da ROG associada ao uso de biomateriais é considerado benéfico para o reparo ósseo e, atualmente, têm-se buscado substâncias que possam ser utilizadas em engenharia de tecidos para o desenvolvimento de biomateriais para serem aplicados no processo de renovação e recuperação óssea (HENDOW *et al.*, 2016).

Os biomateriais são definidos como compostos de origem natural ou sintética, que podem substituir, de forma transitória ou permanente diversos tecidos, que

constituem os órgãos dos seres vivos, estimulando reações químicas e biológicas favoráveis às suas funções (CARVALHO *et al.*, 2004). Devem ser utilizados para a difusão de nutrientes, fatores de crescimento e outros agentes biologicamente ativos no domínio da regeneração de tecidos e apresentar combinação de moléculas de sinalização celular e andaimes para aumentar a capacidade de regeneração da articulação natural e restaurar a estrutura e função saudável (RATNER; BRYANT, 2004; GUASTALDI; APARECIDA, 2010).

O conhecimento das propriedades mecânicas, físicas e químicas do material a ser usado para a fabricação do biomaterial é de fundamental importância, visto que, as membranas são usadas para criar um microambiente favorável de reparação de cartilagem articular (VLEGGERT-LANKAMP *et al.*, 2007).

As membranas utilizadas para a realização da ROG podem ser classificadas em não absorvíveis ou absorvíveis. A membrana deve ser biocompatível, inerte, semipermeável, mecanicamente resistente, esterilizável, não alergênica e não carcinogênica (JAKUS; SHAPIRO; HALL, 2008). Um material biocompatível é aquele que causa menor rejeição pelo tecido vivo contribuindo para adesão e a migração de células dentro das suas estruturas em relação aos polímeros sintéticos, além de apresentarem menor custo (LI *et al.*, 2015).

As biocerâmicas à base de fosfato de cálcio são as mais usadas como substitutos ósseos, podendo ser fabricadas em diferentes composições e formas. Elas podem ser usadas sozinhas ou em associação com uso de uma membrana (ROG) (PINHEIRO *et al.*, 2011; PINHEIRO *et al.*, 2014).

A biocompatibilidade, a bioatividade e as características de osteocondução são as propriedades mais importantes das biocerâmicas à base de fosfato de cálcio, das quais, as mais usadas são a hidroxiapatita (HA) e o β -fosfato tricálcico (β -TCP). A HA é estável no fluido corporal, já o β -TCP é muito solúvel. A dissolução é uma característica fundamental para a absorção/incorporação de materiais utilizados como substitutos ósseos. A dissolução da HA no corpo humano após o enxerto é baixa para alcançar os resultados desejados na neoformação óssea. Alterando-se sua composição (como a adição de β -TCP) e seu método de fabricação, poderia ser modificada a velocidade de reabsorção da HA, que pode indicar uma otimização da incorporação do implante pelo organismo (STEIN; SILVA; SILVA, 2009).

Os compostos de colágeno, por corresponder a um componente orgânico do osso, apresentam-se como substância osteocondutora (BHAKTA *et al.*, 2013). O

colágeno é um biomaterial com várias vantagens em virtude de sua baixa citotoxicidade, biocompatibilidade e pouca antigenicidade (ROCHA; GOISSIS; ROSSI, 2002).

A norbixina (C₂₄H₂₈O₄) é um produto extraído das sementes de urucum (Fig. 3), da qual obtém-se polímeros biodegradáveis e biocompatíveis (MAGESTE *et al.*, 2012).

Monte *et al.*, (2016) realizou um estudo *in vivo*, em ratos, para determinar o potencial genotóxico da membrana de colagénio, norbixina e poliestireno onde puderam demonstrar o efeito não citotóxico da mesma, evidenciando assim a segurança para a sua aplicabilidade *in vivo*.

Estudos tem demonstrado efeitos positivos do uso de polímeros derivados do urucum, como aumento do processo cicatricial da pele (CAPELLA *et al.*, 2016); propriedades antioxidantes.

Figura 3- Fotografia de sementes de urucum



Fonte: Fabri e Teramoto, 2015

4.4 Aplicação da fotobiomodulação no reparo ósseo

A modulação de processos biológicos vem sendo usada a partir de intervenções com a fototerapia, sendo denominado atualmente como fotobiomodulação (FBM) (HASLERUD *et al.*, 2017). A fotobiomodulação constitui o efeito da luz sobre processos moleculares e bioquímicos que normalmente ocorrem nos tecidos, como, por exemplo, na cicatrização de feridas e no reparo ósseo (PINHEIRO; BRUGNERA JUNIOR; ZANIN, 2010).

A FBM consiste na aplicação de luz utilizando-se um equipamento de laser ou diodo emissor de luz e vem sendo utilizada para reabilitação de lesões, promoção da regeneração tecidual, redução da inflamação e o alívio da dor em geral (HUANG *et al.*, 2009).

O laser exerce efeitos sobre as reações celulares, tais como, aumento da síntese de adenosina trifosfato (ATP), transporte de elétrons e redução do pH celular (KARU, 1989; CAMERON *et al.*, 1999) e estas alterações nas membranas celulares e bioquímicas podem aumentar a atividade de macrófagos, fibroblastos, linfócitos (PASSARELLA *et al.*, 1985; YOUNG *et al.*, 1989), síntese de DNA, aumento na deposição de cálcio e da função das células de perióstio (YAMADA, 1991), além de, aumento de osteoblastos e da função dos osteócitos e melhora da neovascularização (MANDAIR; MORRIS, 2011).

Estudos *in vitro* com células osteoblásticas demonstraram que a FBM com laser é capaz de aumentar a atividade mitocondrial, a síntese de DNA e RNA (OLIVEIRA *et al.*, 2018), a expressão do gene de osteopontina e a atividade da fosfatase alcalina (ALP) (YAIOTA *et al.*, 2000).

Oliveira *et al.*, (2012), em estudo comparativo com objetivo de comparar a fotobiomodulação com laser e ultrassom no reparo ósseo associado ao uso de um suporte (arcabouço) de biosilicato, por meio de análise histológica e morfométrica, evidenciaram que a FBM com laser não foi capaz de melhorar as propriedades bioativas dos arcabouços de biosilicato. No entanto, ao ser usado isoladamente, o laser este estimulou a neoformação óssea.

De Oliveira *et al.*, (2018), em estudo com objetivo de avaliar os efeitos do laser na cicatrização de defeitos ósseos enxertados por biomateriais de origem xenogênica, aloplástica e coágulos, concluíram que a FBM melhorou o potencial osteocondutor dos enxertos.

Análises, por meio da Espectroscopia Raman, do processo de reparação óssea em fraturas fotobiomoduladas com laser associado ao uso de biomaterial, demonstraram que a FBM aumentou a cicatrização óssea independente da presença do biomaterial (SOARES *et al.*, 2013), a proliferação dos osteoblastos, a deposição de colágeno, o aumento da deposição de hidroxapatita de cálcio e a neoformação óssea (PINHEIRO *et al.*, 2013; PINHEIRO *et al.*, 2014).

Os mecanismos biológicos envolvidos na melhora do crescimento do tecido ósseo irradiado por laser ainda não são claramente entendidos. Apesar do sucesso observado em vários estudos, com diferentes fontes de luz, por meio de modelos diversos, o conhecimento do processo de regeneração óssea e interações de luz ainda é limitado. Alguns autores sugerem que o comprimento de onda próximo do infravermelho é o mais adequado para a reparação de osso, devido à sua maior profundidade de penetração no tecido ósseo quando comparado à luz visível (PINHEIRO; GERBI, 2006; PINHEIRO *et al.*, 2013; PINHEIRO *et al.*, 2014).

O êxito da terapia depende da aplicação adequada de todos os parâmetros, o que inclui comprimento de onda, densidade de energia, tempo de aplicação, densidade de potência e potência (BELANGER, 2012). A dosagem empregada no tecido para ação terapêutica localiza-se entre 1 a 6 J/cm², na qual a densidade de energia usada para regeneração tecidual é de 3 a 6 J/cm² (AGNES, 2011).

Altas densidades de energia e tempos prolongados de exposição podem inibir as respostas biológicas (CHUANG *et al.*, 2012). Pacheco *et al.*, (2013), demonstraram que densidades de energia de 90 e 150 J/cm² não estimulam a produção de células osteoblásticas e a fosfatase alcalina.

Os diodos emissores de luz (LEDs) são dispositivos semicondutores de estado sólido que tem a capacidade de transformar a corrente elétrica em espectro estreito de luz incoerente, apresenta vários comprimentos de onda, que variam de radiação ultravioleta (UV), para visível, até próximo do infravermelho (IV) (PINHEIRO *et al.*, 2012).

A emissão de luz do LED é diferente dos lasers, que produzem emissão estimulada e amplificada de radiação (WHELAN; BUCHMANN, DHOKALIA, 2003). Inicialmente, se atribuía os efeitos do laser à coerência, mas foi mostrado que fontes não coerentes como os LEDs também alcançavam resultados semelhantes (KARU *et al.*, 2008). O laser irradia ftons de maneira coerente e colimada, já a luz emitida pelo LED é não coerente e não colimada (MATTOS *et al.*, 2015).

Evidências científicas demonstram que a FBM com LED ocasiona efeitos biológicos similares ao laser, no entanto, a forma das ondas eletromagnéticas formadas são diferentes (TAKHTFOOLADI *et al.*, 2015). A fotobiomodulação com laser e LED exercem efeitos biomoduladores do espectro visíveis da luz, produzido espécies reativas de oxigênio (ERO) ou fotoestimulando grupos flavinas ligadas à cadeia de transporte de elétrons mitocondriais desidrogenase dinucleotídeo adenina nicotinamida (NADH) (HUANG *et al.*, 2009).

Os LEDs usados na FBM são os que emitem luz visível, ou próximo do infravermelho e têm demonstrado eficácia na proliferação celular, na síntese de colágeno, fibroblasto e angiogênese (NASCIMENTO *et al.*, 2019). A fotobiomodulação por LED depende de aspectos como comprimento de onda, densidade de energia, potência, modo de emissão, tempo, além de parâmetros clínicos como número de pontos irradiados, modo de aplicação, área tecidual irradiada e tempo de tratamento (LIMA; SÉRGIO; FONSECA, 2019).

Pesquisas *in vitro* e *in vivo*, com diferentes comprimentos de onda demonstraram a influência da terapia com LED na reparação de tecidos e sugerem que os efeitos do LED sejam semelhantes ao laser (VINCK *et al.*, 2005; WEISS *et al.*, 2005; DESMET *et al.*, 2006; HIGUCHI *et al.*, 2007).

Nesse sentido, os LEDs apresentam grande potencial de ação e podem exercer uma boa relação custo benefício. A terapia com LED aumenta a síntese de RNA, DNA e ATP, maior proliferação celular, aumento na produção de fibroblastos e síntese de colágeno (KARU; KOLIAKOV, 2005).

Estudos recentes mostram que a fotobiomodulação com LED acelerou o processo de reparo ósseo, com neoformação óssea, presença de trabeculado ósseo e aumento na deposição de colágeno (PINHEIRO *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2016). Essas características são observadas em diversos estudos onde foi utilizada a FBM laser com parâmetros semelhantes e métodos de avaliação que incluíram a análise histológica por microscopia de luz e espectroscopia Raman (MARTINEZ; PINHEIRO; RAMALHO, 2008; PINHEIRO *et al.*, 2009; 2010; 2011; 2012; 2013). É possível que o mecanismo envolvido no reparo ósseo usando laser e LED seja similar, com a absorção da luz pelo citocromo-C oxidase presente na membrana mitocondrial (WEISS, 2005; AL-WATBAN; ANDRES, 2006).

Estudo realizado com objetivo de comparar dois espectros de irradiação com laser e LED, na proliferação e diferenciação de osteoblastos, demonstrou que ambos modulam o metabolismo dos osteoblastos humanos, com aumento dessa proliferação por mecanismo dependente ou não da ativação de sinais extracelulares (ERK) e marcadores de diferenciação osteogênica. O LED aumenta a expressão de colágeno do tipo I, e incrementa a síntese de RNA, em diferentes doses, já o laser aumenta a mineralização dependendo da dose e do tempo (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Diamantino *et al.*, (2017), em estudo com objetivo de analisar a eficácia do LED com comprimento de onda de 945 nm no reparo ósseo de ratos diabéticos e não diabéticos, pela análise por Espectroscopia de Fluorescência de Raios- X por energia dispersiva (EDX), Microscopia Eletrônica de varredura (MEV), análise histomorfométrica e densitometria óssea verificaram que a terapia com LED influenciou positivamente a formação óssea nos estágios iniciais do reparo ósseo, sem causar mudanças na densidade óptica e volume de tecido nas fases finais. Ao final do estudo não foi observada influência da terapia com LED na porcentagem de cálcio ou fósforo, razão Ca / P.

A fotobiomodulação com LED representa uma alternativa segura no processo de reparo tecidual, mas os efeitos biológicos, usos clínicos de diferentes tipos de comprimento de onda não estão bem caracterizados (MAMALIS; GARCHA; JAGDE, 2015). Não existem protocolos definidos com parâmetros terapêuticos do LED. Novas pesquisas são necessárias para se determinar a fluência de luz, potência, densidade de energia, comprimento de onda e analisar os efeitos da interação da luz LED com os tecidos (SACONO *et al.*, 2008).

4.5 Biomodulação e biomateriais

A Regeneração óssea guiada (ROG) tem eficácia de regeneração limitada em defeitos com reabsorção óssea vertical (PINHEIRO *et al.*, 2011), o que justifica o uso dessa terapia associados à terapia de fotobiomodulação (GERBI *et al.*, 2018).

O uso de biomateriais para melhorar a capacidade do organismo e promover o reparo ósseo é bem fundamentado na literatura (PINHEIRO *et al.*, 2011; BHAKTA, 2013; MAIA FILHO *et al.*, 2013; MAIA FILHO *et al.*, 2014). Várias pesquisas, com modelos animais, já comprovaram que o uso da FBM laser associada ou não ao uso de diferentes tipos de biomateriais aumenta a cicatrização óssea (LOPES *et al.*, 2005; LOPES *et al.*, 2007; LOPES *et al.*, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2013; SOARES *et al.*, 2013; ALVES *et al.*, 2018), assim como a FBM LED (PINHEIRO *et al.*, 2014; SOARES *et al.*, 2014; SOARES *et al.*, 2015; PINHEIRO *et al.*, 2017; PINHEIRO *et al.*, 2018).

Estudo realizado com sessenta ratos *Wistar*, divididos em 4 grupos, com objetivo de avaliar os efeitos histológicos do laser associada a enxertos autógenos de osso sobre a regeneração de defeitos ósseos, usando FBM laser com comprimento de onda (λ) 830 nm; área do feixe (Φ)= 0.5 cm²; densidade de energia de 10 J/cm²; e potência de 50 mW, divididos em quatro pontos, aplicado em dias alternados, mostrou remodelação óssea quantitativa e qualitativamente mais evidente nos grupos fotobiomodulados e nos fotobiomodulados associados com enxerto ósseo (WEBER *et al.*, 2006).

Pinheiro *et al.*, (2009), em estudo para avaliar o efeito de fotobiomodulação do laser infravermelho sobre a incorporação de hidroxiapatita (HA; ~960 cm⁻¹) e a qualidade do tecido ósseo neoformado ao redor de implantes dentários, através de espectroscopia Raman e Microscopia de Varredura (MEV), respectivamente, evidenciaram aumento significativo na concentração de hidroxiapatita entre os espécimes do grupo fotobiomodulado (λ) 830nm (sete sessões a cada 48 horas de intervalo, 21,5 J/cm² por ponto, 10 mW, Φ = 0.0028 cm², 86 J por sessão) e do grupo controle nos 30 e 45 dias após as cirurgias.

Martinez, Pinheiro, Ramalho (2008), avaliaram, histologicamente, o efeito do laser no processo de reparo ósseo de defeitos criados em fêmur de ratos *Wistar albinus* tratados ou não com proteínas ósseas morfogenéticas (POM) e membranas

bovinas orgânicas (MBO). A FBM com laser ($\lambda 830$ nm, 40 mW, $\Phi = 0,6$ mm) totalizou 16J por sessão, em períodos de 15, 21 e 30 dias. Os grupos fotobiomodulados apresentaram um incremento na deposição de fibras colágenas (15 e 21 dias), aumento do osso trabeculado bem organizado no final do período experimental de 30 dias, evidenciando-que o uso de POMs e MBO possuem um efeito sinérgico aos efeitos fotobiomoduladores do laser no processo de reparo ósseo.

Pinheiro *et al.*, (2012), analisaram histologicamente e morfometricamente, o uso do LED em defeitos ósseos de ratos tratados com mineral trióxido agregado (MTA), POMs e ROG com os parâmetros ($\lambda 850 \pm 10$ nm, 150 mW, $\Phi = 0,5$ cm², densidade de energia de 16 J/cm², dose total do tratamento de 112 J/cm²) com aplicações repetidas a cada 48 horas. O uso do LED reduziu drasticamente a inflamação, quando usado sozinho, no entanto, a sua utilização em associação com MTA e/ou POM/ROG aumentou a gravidade da reação inflamatória. Quanto à reabsorção óssea, um resultado menos significativo foi visto quando a luz LED foi associada com o MTA/POM/ROG. Já em relação à deposição de colágeno e neoformação óssea foi observado aumento quando a luz LED foi associada com a MTA/POM.

Pinheiro *et al.*, (2013), avaliaram, por meio da espectroscopia Raman, o reparo de fraturas tratadas com miniimplantes associadas ou não com laser infravermelho ($\lambda 780$ nm, 50mW, 16J/cm², $\phi = 0,05$ cm², emissão contínua); e enxerto de fosfo-cerâmica Bifásica e β -trifosfato de cálcio e ROG. A espectroscopia Raman mostrou diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,001$). Os grupos FBM com laser e tratados com a cerâmica apresentaram um aumento da proliferação osteoblástica, deposição de colágeno, incremento na deposição e neoformação óssea quando comparado ao grupo não irradiado. Em conclusão, os resultados da investigação foram clinicamente importantes, pois a análise espectral do componente ósseo (~ 958 cm⁻¹) evidenciou aumento dos níveis de HA em locais fraturados usando a associação da luz de laser a um enxerto de cerâmica.

O uso do laser com comprimento de onda de 780 nm, densidade de energia de 5 J/cm², associado ao uso de biomaterial em defeito ósseo de ratos demonstrou neoformação óssea e deposição de colágeno em estágio mais avançado de maturação óssea (SOARES *et al.*, 2013).

Soares *et al.*, (2014) e Pinheiro *et al.*, (2017) realizaram estudos semelhantes com objetivo de comparar a influência da FBM Laser e LED no reparo de defeitos

ósseos cirúrgicos enxertados com hidroxiapatita (HA) microgranular sintética mais fosfato de beta-tricálcio (FBT), pela análise Raman. Soares *et al.*, (2014), evidenciaram que o uso do LED promove melhor reparação óssea ao se avaliar componentes orgânicos e inorgânicos do osso, nos defeitos ósseos sem o biomaterial.

Pinheiro *et al.*, (2017), concluíram que o biomaterial é capaz de estimular a produção da nova matriz óssea, mas ao associá-lo com a fototerapia LED, esta passa a inibir a formação da matriz óssea. Os autores afirmam que ao se avaliar os resultados nos grupos enxertados com HA, a reparação foi maior nos grupos irradiados por laser.

Soares *et al.*, (2015), em estudo com objetivo de avaliar, histologicamente, o efeito da associação de HA com LED no reparo ósseo de fêmur de ratos, mostraram que a FBM com LED foi eficaz na modulação positiva do processo de reparação óssea, independente do uso de biomaterial.

Pinheiro *et al.*, (2018), em estudo com análise por espectroscopia Raman, com objetivo de avaliar o reparo de fraturas de tíbias de coelho tratadas com osteossíntese com fio e uso ou não de laser ou LED e MTA, evidenciaram que, a FBM laser e LED associados ao MTA, foram eficazes no reparo, aumentando a síntese de colágeno, criando um arcabouço de carbonato de cálcio e a subsequente deposição de hidroxiapatita.

Santos *et al.*, (2019), em estudo com o objetivo de analisar a regeneração em defeitos ósseos com membrana de colágeno e elastina fotobiomodulados com laser, observaram o efeito bioestimulador no recrutamento, proliferação e diferenciação das células ósseas e o efeito biomodulador na remodelação óssea. Ao combinar o laser com membrana de colágeno e elastina, observaram aumento do volume ósseo.

Apesar do crescimento das aplicações bem sucedidas da FBM com LED em diversas áreas, seu uso no reparo ósseo e associado a enxerto de biomateriais precisa ser mais estudado (PINHEIRO *et al.*, 2012; 2013).

No quadro 1, encontram-se relacionados alguns estudos que utilizam a fototerapia associada à biomateriais como método auxiliar no processo de reparo ósseo.

Quadro 1 - Estado da arte do efeito da fotobiomodulação e biomateriais no processo de reparo ósseo em modelo animal.

Autor (ano)	Fototerapia (nm) /biomaterial	Dosimetria	Efeito
Martinez, (2008)	LBI (830) + POM + MBO P= 0,04 W	DE= 4 J/cm ²	+
Pinheiro et al., (2009)	LBI (830) + HA P= 0,07 W	DE= 5 J/cm ²	+
Pinheiro et al., (2012)	LED (850)+MTA/POM P= 0,15 W	DE= 16 J/cm ²	+
Pinheiro et al., (2013)	LBI (780) + cerâmica bifásica P= 0,07 W	DE= 5 J/cm ²	+
Pinheiro et al., (2014)	LBI (780)/LED(850)+ HA+FBT	DE= 5 J/cm ²	+
Soares et al., (2013)	LBI (780) + HA P= 0,07 W	DE= 5 J/cm ²	+
Soares et al., (2014)	LBI (780)/LED(850)+ HA+FBT P= 0,07/0,15 W	DE= 5 J/cm ²	+
Soares et al., (2015)	LED (850) + HA + (β-TCP). P= 0,15 W	DE= 20 J/cm ²	+
Pinheiro et al., (2017)	LBI (780)/ LED (850) + HA + FBT. P=0,7/0,15 W	DE= 5,1 J/cm ²	+
Gerbi et al., (2018)	AsGaAl (830) P= 0,4 W Membrana biológica bovina Proteínas ósseas morfogenéticas (POM)	DE= 6 J/cm ²	+
Alves et al., (2018)	AsGaAl (780nm) P= 0,6 W MPSCN	DE= 6 J/cm ²	Laser + Laser/ MPSCN -
Oliveira et al., (2018)	AsGaAl (880nm) P= 0,6 W biomateriais de origem xenogênica, aloplástica e coágulos	DE=4 J/cm ²	+
Pinheiro et al., (2018)	LBI (780)/LED(850)+ MTA P=0,7/0,15 W	DE=5,1 J/cm ²	+
Santos et al., (2019)	AsGaAl (930nm) P= 0,1 W Membrana de colágeno e elastina	DE= 4 J/cm ²	+

Legenda: POM (proteínas morfogenéticas); MBO (membranas bovinas orgânicas); HA (hidroxiapatita); MTA (mineral trióxido agregado); FBT (fosfato beta-tricálcico); AsGaAl (arseneto de gálio alumínio); MPSCN (membrana de poliestireno, colágeno e norbixina); LBI (laser de baixa intensidade); DE (densidade de energia); LED (diodo emissor de luz).

4.6 Espectroscopia Raman

A qualidade da cicatrização do reparo ósseo pode ser avaliada de diferentes maneiras, além das técnicas tradicionais como histopatologia, morfometria, microscopia eletrônica de varredura, Raio-X e tomografia, atualmente, também pode ser utilizada a Espectroscopia Raman.

A Espectroscopia Raman foi demonstrada experimentalmente criada por Chandrasekhara Venkata Raman, na Índia em 1928, pela observação do efeito Raman, processo fundamental de troca de energia entre a luz e a matéria. Constitui uma técnica de natureza vibracional e vem sendo amplamente usada para avaliar componentes minerais e da matriz de colágeno do osso, podendo ser usada para medidas não-invasivas em animais vivos (MANDAIR; MORRIS, 2015).

As posições dos picos geradas pelos espectros da espectroscopia Raman refletem a variação de energia da luz laser dispersa medida que interage com subunidades moleculares específicas dentro da amostra e a intensidade de dispersão dos picos é proporcional à prevalência da subunidade. A impressão digital do material é gerada com informações quantitativas da composição da amostra. As propriedades físico-químicas do tecido ósseo com resolução menor do que 5 μm são detectadas pela Espectroscopia Raman identificando características microscópicas (LANE et al., 2006).

Informações química e estrutural sobre colágeno são identificadas no espectro do osso (MANDAIR; MORRIS, 2015) com a apresentação sobre a espinha dorsal do peptídeo de colágeno nas bandas (1666 - 1667 cm^{-1}), que corresponde à amida I e (1247 - 1248 cm^{-1}) equivalente amida III (1247 - 1248 cm^{-1}) (BARTH; ZSCHERP, 2002).

A espectroscopia Raman foi aplicada anteriormente em um estudo sobre reparo ósseo com fotobiomodulação com laser ou LED, associados ao uso de hidroxiapatita + fosfato de Beta-tricálcio. Os picos avaliados foram 854/881 cm^{-1} (colágeno tipo II / colágeno do tipo I, relacionadas com a qualidade do colágeno e colágeno ligação cruzada), entre mineral e matriz: 960/854 cm^{-1} e 960/1454 cm^{-1} (HA, relacionada com a quantidade de mineralização relacionado com a matriz do colagénio), e composição óssea: 1070/960 cm^{-1} e 1070/1077 cm^{-1} e as posições e largura de banda de 960 cm^{-1} (maturação óssea / HA cristalinidade). A gradual

deposição de HA evidenciou os melhores resultados na consolidação óssea (PINHEIRO *et al.*, 2014).

Além de avaliar a neoformação óssea, a espectroscopia Raman permite avaliar a resistência e as propriedades mecânicas do osso, por meio dos picos Raman referentes aos diversos constituintes da matriz orgânica e conteúdo inorgânico do osso. A resistência depende da quantidade de mineralização e do grau de cristalinidade, da distribuição ótima dos diferentes tamanhos e formas dos cristais (MANDAIR; MORRIS, 2015). O pico Raman mais usado para verificar a cristalinidade mineral é a banda primária do fosfato em torno de $\sim 960 \text{ cm}^{-1}$ (AKKUS; ADAR; SCHAFFLER, 2004; AWONUSI; MORRIS, TECKLENBURG, 2007).

A maturidade mineral e o índice de cristalinidade são critérios usados para avaliação da qualidade óssea. A maturidade corresponde à transformação progressiva da superfície imatura e um uma estrutura de apatita madura e estável, uma vez que, o índice de cristalinidade mineral está relacionado ao tamanho e aos tipos de hidroxiapatita (FARLAY; PANCZER; REY, 2010). O pico Raman $\sim 960 \text{ cm}^{-1}$ refere-se à hidroxiapatita fosfatada, enquanto o pico $\sim 1070 \text{ cm}^{-1}$ refere-se à substituição do fosfato pelo carbonato na molécula da hidroxiapatita.

4.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é um método que fornece rapidamente informações sobre a morfologia e a identificação de elementos químicos de uma amostra sólida. A principal razão de sua utilidade é a alta resolução que pode ser obtida quando as amostras são observadas (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

A análise por MEV permite a visualização de imagens com alta ampliação (até 300.000 X) e resolução, possibilitando a observação e o registro de imagens tridimensionais (PICON *et al.*, 2006).

Pesquisas demonstraram a capacidade da análise por MEV em observar arquitetura óssea, a neoformação óssea em casos de maturação e reparação (LOPES *et al.*, 2007; CRUZ *et al.*, 2007).

Estudo realizado com o objetivo de avaliar as quantidades de cálcio (Ca) e fósforo (P) por espectroscopia de dispersão de energia (EDS) em três pontos distintos usando o MEV como instrumento de análise para o tecido ósseo em três

grupos experimentais: controle (procedimento de cirurgia sem implante de cerâmica), grupo implantes Al_2O_3 não revestidos e grupo implantes Al_2O_3 revestido com apatita revelou maiores níveis de Ca e P nos grupos que foram aplicados cerâmica associada à hidroxiapatita. As micrografias obtidas por MEV da superfície do implante cerâmico com o osso após 30 dias da cirurgia evidenciaram uma área mais homogênea no grupo cerâmica+hidroxiapatita do que nos outros tratamentos, onde pôde ser notado um aspecto de osso compacto e sem o relevo do material implantado (MAIA FILHO *et al.*, 2013).

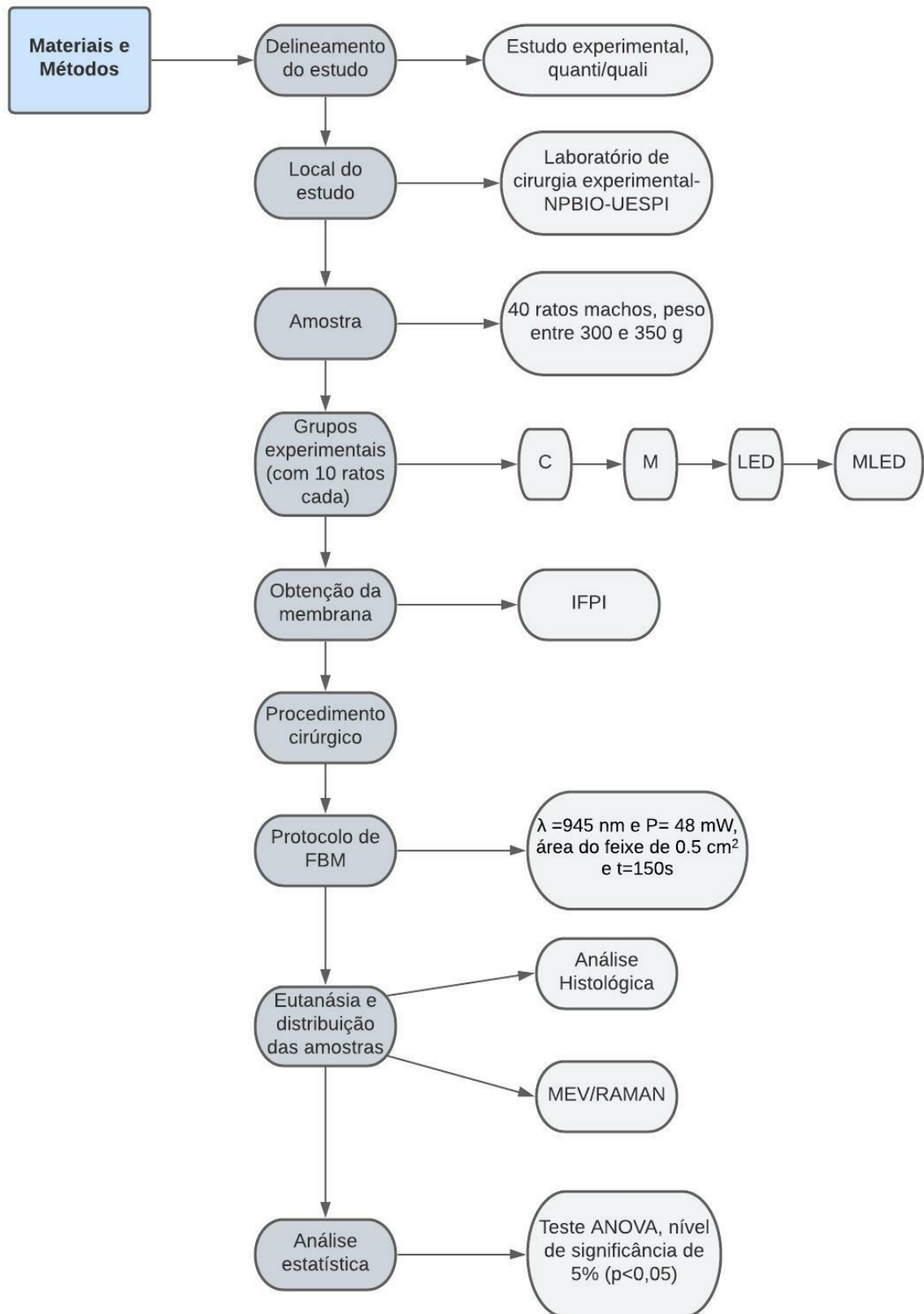
Alves *et al.*, (2018), evidenciaram, em estudo de reparação óssea em calvária de ratos, por análise MEV e histológica, que a fotobiomodulação com LBI diminuiu o processo inflamatório e melhorou a resposta biológica do tecido ósseo, estimulando a deposição de osso recém-formado no local da lesão.

Santos *et al.*, (2019), concluíram por análise histológica e MEV que o protocolo de biomodulação com laser foi capaz de acelerar a regeneração óssea em defeitos em fêmur de ratos, principalmente quando associado ao biomaterial polimérico.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia empregada neste estudo foi dividida em etapas e o fluxograma abaixo sumariza as etapas metodológicas adotadas nesta tese. (Fig.4)

Figura 4- Fluxograma das etapas realizadas na pesquisa.



Fonte: Autor.

5.1 Delineamento do estudo e Aspectos Éticos

Tratou-se de um estudo experimental, com abordagem quantitativa/qualitativa com o objetivo de verificar *in vivo* o processo de reparação óssea guiada pela MPNSC quando fotobiomodulada por LED.

O protocolo de pesquisa foi submetido à análise e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) da Universidade Estadual do Piauí (UESPI), sob o número de protocolo 08649/2016 (ANEXO A).

5.2 Local do Estudo

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Cirurgia Experimental do Núcleo de Biotecnologia e Biodiversidade da Universidade Estadual do Piauí (NPBIO-UESPI).

5.3 Amostra

No estudo foram usados 40 ratos machos wistar (*Rattus norvegicus, albinus*), com peso entre 300 e 350g, clinicamente saudáveis, obtidos no Biotério Núcleo de Biotecnologia e Biodiversidade da Universidade Estadual do Piauí (NPBIO-UESPI). Os animais foram mantidos em espaço acusticamente isolado, dentro de gaiolas de polipropileno, com ração e água *ad libitum*, em condições adequadas de temperatura (19 °C) e com luz (ciclo de 12h de ciclo claro-escuro). Todas as recomendações do Comitê de ética em pesquisa animal foram obedecidas, no que diz respeito ao conforto e bem-estar dos animais.

5.4 Grupos experimentais

Os 40 animais foram aleatoriamente divididos em quatro grupos, cada um contendo 10 ratos, em dois períodos de tempo de eutanásia (15 e 30 dias) (Quadro 2).

Foram divididos em C (controle - defeito ósseo e sem membrana), M (defeito ósseo e membrana), LED (defeito ósseo estimulado com LED), MLED (defeito ósseo, LED e membrana). Cada grupo contou com 10 animais, onde 5 foram eutanasiados com 15 dias e 5 com 30 dias de tratamento (Quadro 2).

Quadro 2 - Distribuição dos grupos do estudo

Grupo	Membrana	LED	Eutanásia (dia)	N
C	-	-	15 e 30	10
M	X	-	15 e 30	10
LED	-	X	15 e 30	10
MLED	X	X	15 e 30	10

Grupo C- Controle; Grupo M - Defeito e membrana; Grupo LED - Defeito e LED; Grupo MLED- Defeito, membrana e LED.

5.5 Obtenção da Membrana

A membrana de poliestireno, colágeno e norbixina (MPSCN) (Fig.5), utilizada no presente estudo, foi obtida em parceria com pesquisadores do Mestrado em Ciências de Materiais do Instituto Federal do Piauí (IFPI). As características de produção da membrana foram previamente descritas por Alves *et al.* (2018).

Figura 5- Amostras da Membrana de Poliestireno, Colágeno e Norbixina (MPSCN) utilizada no estudo.



Fonte: Alves *et al.*, 2018

5.6 Procedimento Cirúrgico

Todos os animais receberam pré-tratamento, por via subcutânea, de atropina na dosagem de 0,04 mL para cada 100g de peso corpóreo, seguido de repouso de 15 minutos para o procedimento anestésico. Por via intramuscular, foi administrado Ketalar (cloridrato de cetamina 10%; Instituto Biochimico Indústria Farmacêutica LTDA) com a dosagem de 0,1ml para cada 100g de peso corpóreo; Xilazin

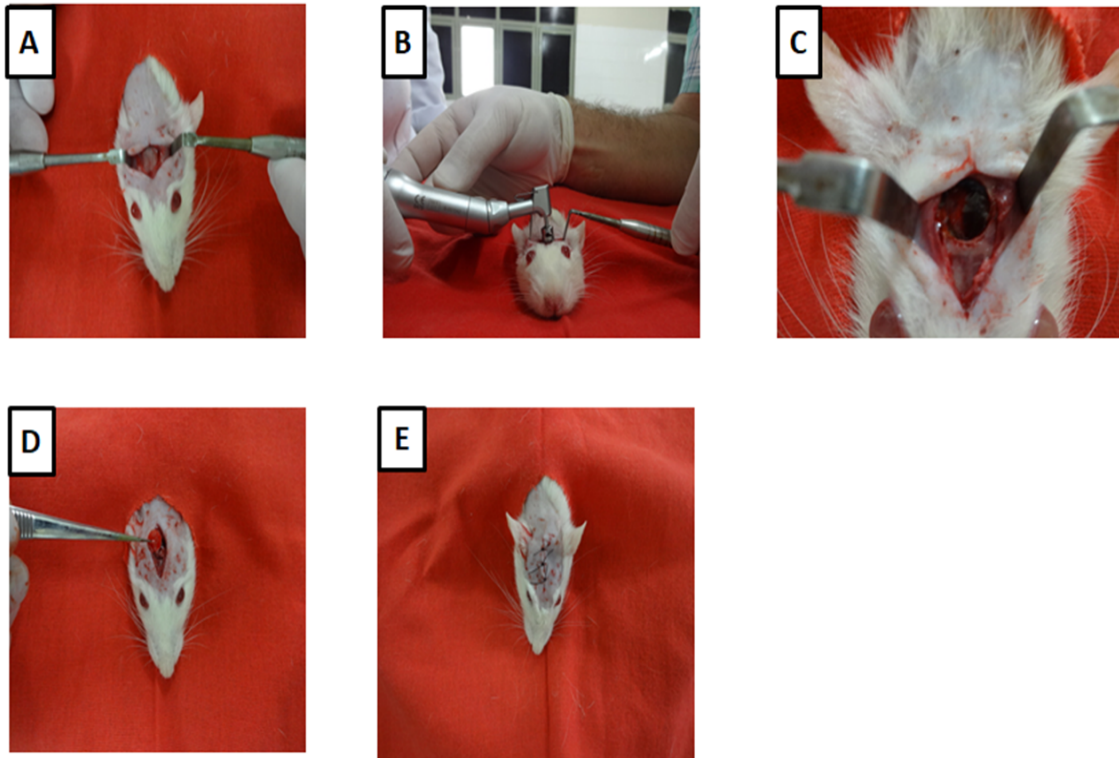
(cloridrato de xilazina 2%; Syntec) com dose de 0,1mL para cada 100g de peso corpóreo, usando uma seringa de insulina de 1 m L para cada animal.

Posteriormente ao procedimento anestésico, o animal foi posicionado em decúbito dorsal na prancha cirúrgica e realizado a tricotomia e limpeza da pele. Uma incisão de 0,5 cm na região occipital foi realizada com tesoura cirúrgica seguida de divulsão com pinça Kelly (Fig. 6a). Logo após criou-se defeito crítico de 08 mm na calvária do rato (Fig. 6b) com uso de broca trefina (DSP Biomedical, Campo Largo, Paraná, Brasil).

Em todos os animais dos grupos M e MLED, o fragmento da MPSCN foi colocado no local do defeito crítico. Os demais animais dos grupos C e LED não receberam membrana ou qualquer material no local do defeito crítico; e em todos os grupos, foi realizado a sutura com fio monofilamento de seda 4-0.

Após o procedimento cirúrgico, os ratos foram mantidos em gaiolas de cinco animais. Durante os três primeiros dias do experimento, os animais receberam medicação analgésica (50 mg/kg de 12 em 12 horas de dipirona) (Ultrafarma, Teresina, Piauí, Brasil).

Figura 6- Sequência de fotos ilustrando o procedimento cirúrgico e implantação da MPSCN: Região tricotomizada e incisão na região occipital (A); criação do defeito crítico com broca de trefina (B); defeito crítico (C); implantação da MPSCN (D); e sutura com fio seda (E).



Fonte: Autor

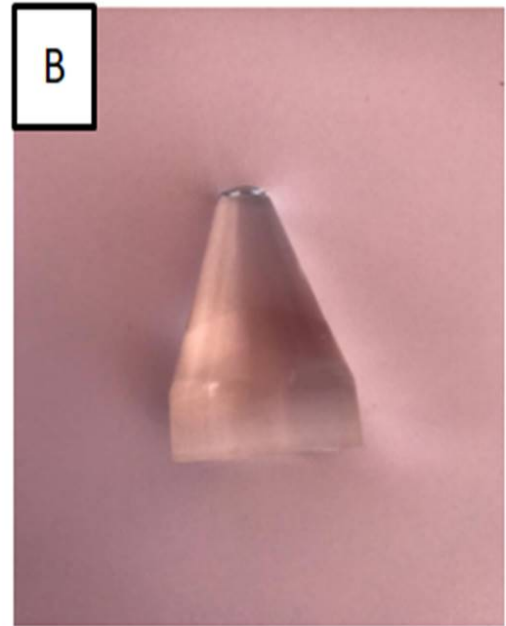
5.7 Protocolo de fotobiomodulação LED

Foi utilizado um LED Protótipo cedido pelo laboratório IP&D/Centro de laserterapia e fotobiologia (CELAPO), com comprimento de onda de 945 nm, potência de 48 mW, área de colimador igual a 0,5 cm² (Fig. 7).

A fotobiomodulação LED, nos grupos LED e MLED, foi realizada sobre a incisão cirúrgica, perpendicularmente e em contato com a pele, em um único ponto (Fig. 8), imediatamente após a cirurgia, e em dias alternados após a cirurgia até a eutanásia. A sonda foi protegida por uma película translúcida. Os parâmetros de biomodulação por LED estão descritos no Quadro 3.

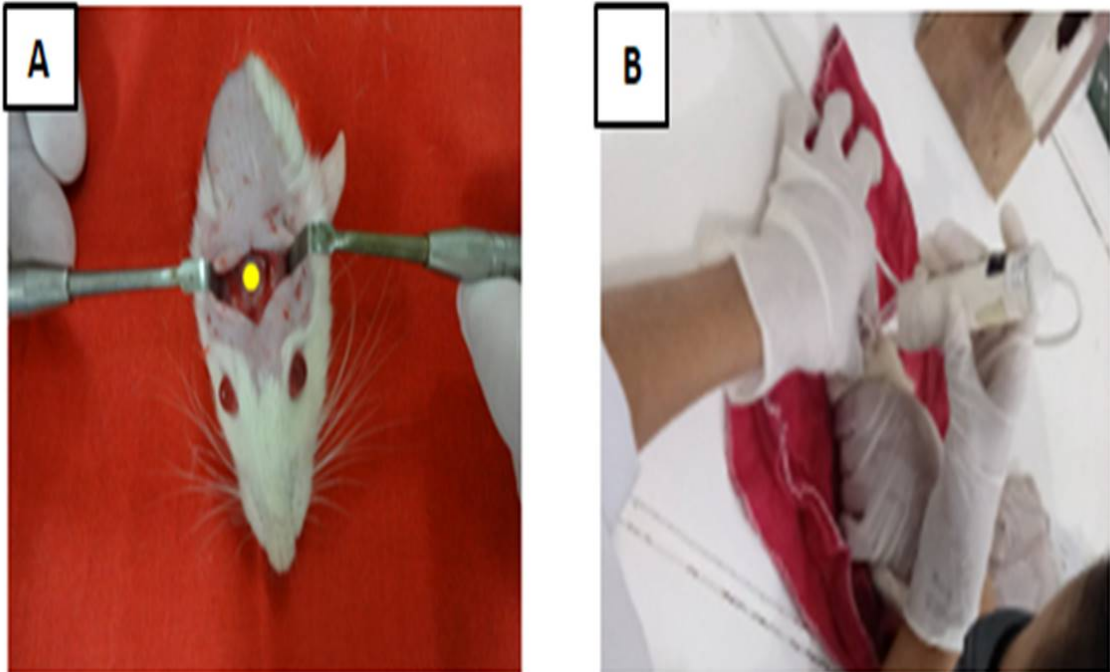
Anteriormente à fotobiomodulação dos animais, a potência do equipamento de LED foi aferida usando um medidor de potência (MODEL 13 PEM/J, MellesGriot, Holanda). O procedimento de fotobiomodulação obedeceu às recomendações de biossegurança para utilização de terapia fotobiomoduladora, com uso de óculos protetor opaco para o pesquisador.

Figura 7- Imagens ilustrativas do Protótipo de LED (945 nm) usado na pesquisa (A) e do colimador (B).



Fonte: Autor

Figura 8- Imagens ilustrativas do ponto de aplicação da Fotobiomodulação com LED em defeito crítico de calvária de ratos (A) e aplicação do LED no defeito crítico da calvária de ratos (B).



Fonte: Autor

Quadro 3 - Parâmetros do equipamento de FBM utilizado.

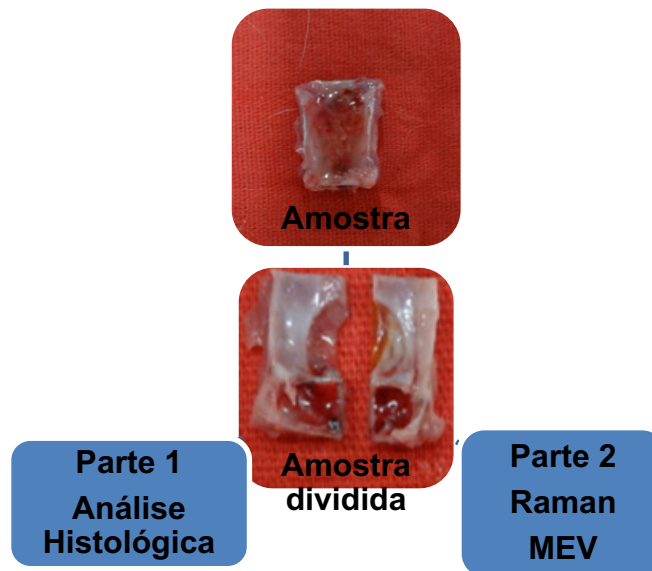
Parâmetros / Equipamento	LED
Registro da ANVISA N°	-
Comprimento de onda (nm)	945+- 20
SAEF	3
Energia (J)	6
Potência de saída (mW)	48
Potência de saída W)	0.048
Frequência (Hz)	Contínua
Aplicação	Contato
Área do feixe (cm ²)	0,04
Densidade de Energia (J/cm ²)	144
Número de pontos	1
Densidade de potência (W/cm ²)	0,04
Tempo de irradiação (s) por ponto (s)	150

Legenda: *SAEF – potência x tempo de irradiação por ponto x número de pontos/ área total irradiada.

5.8 Eutanásia e distribuição das amostras

Os animais foram eutanasiados, nos períodos de 15 e 30 dias, por excesso de anestesia (tionembusal sódico) (Ultrafarma, Teresina, Piauí, Brasil), de acordo com as orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1991). Uma amostra do tecido com o defeito ósseo foi dividida longitudinalmente, em duas partes. Metade das amostras foi encaminhada para a análise por Microscopia óptica e a outra metade para Espectroscopia Raman e MEV (Fig. 9).

Figura 9- Organograma da amostra de tecido com defeito ósseo, dividido em partes encaminhadas para as diferentes técnicas de análise.



Fonte: Autor

5.9 Análise histológica

As amostras foram mantidas em solução de formol neutro a 10% por 48 horas, e em solução de ácido fórmico 20% por 7 dias, para descalcificação. Posteriormente foram submetidas ao processo de desidratação em etanol (70-100%), diafanização em xilol, e incluídas em parafina (CAPUTO, GITIRANA, MANSO, 2010). Após a obtenção dos blocos, foi realizado um corte longitudinal de 05 micrômetros de espessura, que foram submetidos à coloração pela hematoxilina-eosina (HE), para análise por microscopia de luz (Olympus, Opitical CoLtda, Tokyo, Japão, ampliação de x 31). As lâminas foram numeradas de acordo com o número do animal e subgrupo ao qual pertenciam.

A análise descritiva foi feita por análise cega, por um patologista. Os parâmetros analisados no processo de reparo foram as alterações inflamatórias, grau de reparação e remodelação dos tecidos.

5.10 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras foram submetidas ao processo de desidratação em etanol (10%, 50%, 70%, 80% e 100%) por 10 minutos em cada etapa, em seguida submetidas ao processo de secagem em estufa a 60 °C (DEDAVI, GOMES, MACHADO, 2007). Posteriormente, as amostras foram pulverizadas com uma fina camada de ouro na ordem de 2 nm em uma metalizadora à vácuo, (modelo K550X, EMITECH, MHz Electronics, Inc.) e analisadas no microscópio eletrônico de varredura (MEV EVO MA 10, Carl STM Zeiss TM). As imagens foram capturadas com um aumento de 200x.

5.11 Análise por Espectroscopia Raman

Utilizou-se um sistema Raman (Bruker, modelo Senterra) acoplado a um detector (CCD-Charge Coupled Device), com radiação de excitação laser com comprimento de onda de 785 nm e objetiva de 40x.

A coleta do sinal Raman foi realizada por um CCD e o registro feito computador, na qual a potência incidente na amostra era de 20 mW. Cada espectro foi obtido com 2 integrações de 10 segundos/cada (20 segundos por espectro). A

resolução espacial axial foi de 5 μm , e foi coletado um ponto na região cortical no interior do defeito ósseo em todos os grupos.

Para ter um parâmetro para o controle positivo, no grupo controle, além do ponto na região cortical do defeito, foi coletado também um ponto na região cortical óssea normal. Após a coleta dos espectros, um ajuste polinomial de quarta ordem foi executado para cada espectro na região entre 900-1200 cm^{-1} e 2700-3500 cm^{-1} para eliminar a fluorescência utilizando o software PeakFit (Systat Software, Inc.) e o programa Origin. Para identificar as modificações dos componentes minerais do osso formado realizou-se o cálculo da área do pico em 960 cm^{-1} para caracterizar alterações de componentes minerais de osso neoformado (ALVES *et al.*, 2018).

5.12 Análise estatística

A análise dos dados descritivos foi feita por meio das médias mais ou menos desvio padrão. Para a comparação entre os grupos e inferência foi realizado o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni. O nível de significância foi de 5% ($p < 0,05$). Os resultados foram analisados e expostos em gráficos e tabelas no software estatístico GraphPadPrism 5.0 (Graphpad Software, Inc.). A análise histológica e análise das micrografias obtidas por MEV foram feitas apenas qualitativamente.

6 RESULTADOS

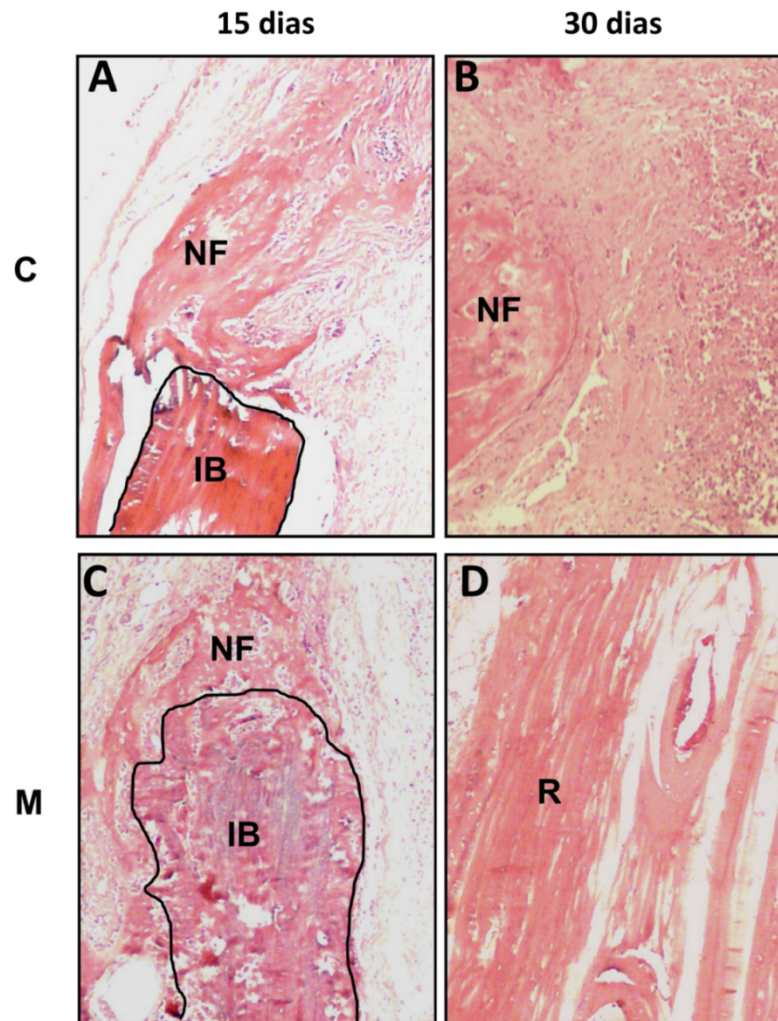
6.1 Análise Histológica

No primeiro intervalo experimental (15 dias), fibras colágenas são vistas ao longo dos defeitos experimentais, com trabéculas ósseas imaturas não lamelares, apenas nas extremidades do defeito cirúrgico. A espessura da calvária original não foi reestabelecida em nenhum grupo neste período. No grupo C (Fig. 10A) e M (Fig. 10C), LED (Fig.11A) e MLED (Fig. 11C) observou-se neoformação óssea, com extensões variáveis. Nas amostras do grupo LED (Fig. 11A), a neoformação óssea ocorreu em direção ao centro da lesão. No grupo MLED (Fig.11C) ocorreu uma pequena formação de osso trabecular com distribuição irregular.

Após 30 dias, observa-se que no grupo C (Fig. 10B) ocorreu neoformação óssea e no grupo M (Fig. 10D), remodelação óssea demonstrado pelo fechamento dos defeitos ósseos, no entanto, o tecido ósseo apresentava-se imaturo e lamelar, em ambos os grupos. No grupo LED (Fig. 11B) verificou-se um processo de remodelação óssea mais acentuado do que nos demais, no qual o defeito cirúrgico foi completamente preenchido por osso organizado e maduro.

No grupo MLED (Fig. 11D), observou-se pequena quantidade de remodelação óssea, apresentando-se de maneira irregular e desorganizada sem fechamento do defeito cirúrgico.

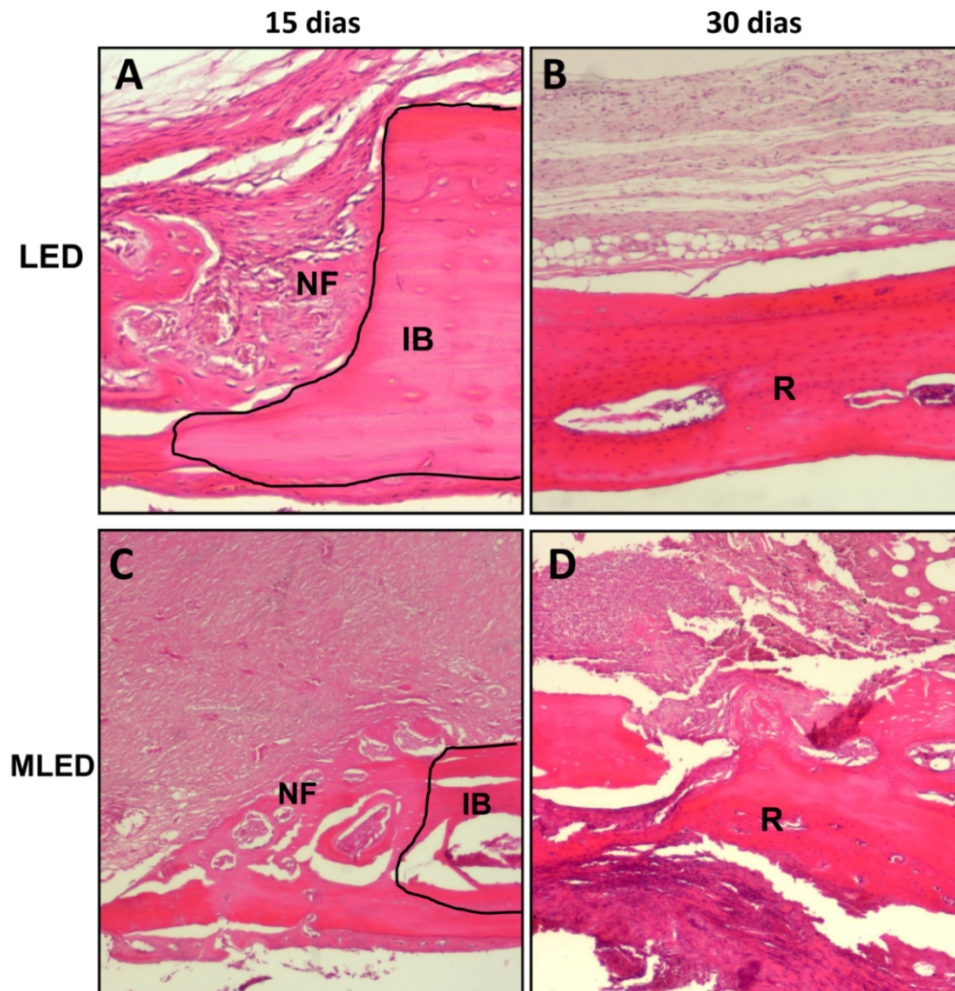
Figura 10- Superfície óssea próxima ao local do defeito ósseo nos tempos experimentais de 15 dias (A, C) e 30 dias (B,D). Fotomicrografias mostrando a aparência do tecido ósseo nos grupos C (controle) e M (membrana), para ambos os períodos, 15 e 30 dias. (coloração de hematoxilina e eosina; ampliação original $\times 40$). IN, infiltrado inflamatório; IB, osso intacto; NF, osso neoformado; R, remodelação. As bordas do defeito ósseo foram delineadas para facilitar a identificação.



Legenda: Osso intacto (IB); osso neoformado (NF); remodelação (R).

Fonte: Autor

Figura 11- Superfície óssea próxima ao local do defeito ósseo nos tempos experimentais de 15 dias (A, C) e 30 dias (B, D). Fotomicrografias mostrando a aparência do tecido ósseo nos grupos LED e MLED, para ambos os períodos, 15 e 30 dias. (coloração de hematoxilina e eosina; ampliação original $\times 40$). IN, infiltrado inflamatório; IB, osso intacto; NF, osso neoformado; R, remodelação. As bordas do defeito ósseo foram delineadas para facilitar a identificação.



Legenda: Osso intacto (IB); osso neoformado (NF); remodelação (R).

Fonte: Autor

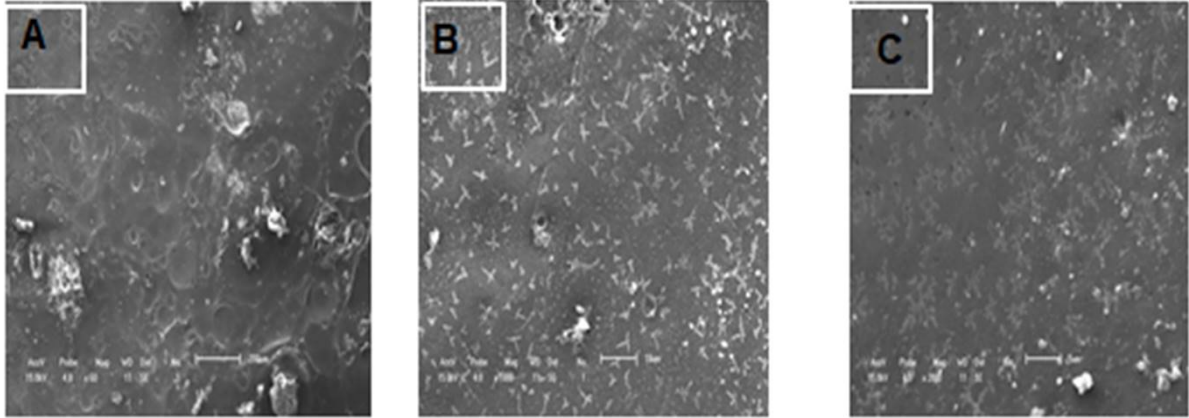
6.2 Análise por Microscopia Eletrônica

A MPSCN, utilizada no presente estudo, apresenta superfície homogênea (Fig. 12). Após 15 dias, no grupo controle (C) e membrana (M), as bordas do defeito ósseo são claramente observadas (Fig. 13A, Fig. 13C; setas) e a área da lesão apresenta-se delimitada e recoberta por tecido ósseo neoformado fino, de aspecto trabecular (Fig.13A, Fig.13C; asteriscos). Com 30 dias, a borda do defeito apresenta-se menor, porém ainda evidente (Fig. 13B, Fig. 13D; setas) e preenchida por tecido ósseo mais compacto (Fig. 13B, Fig. 13D; asteriscos).

Os grupos LED (Fig. 14A, asteriscos) e MLED (Fig. 14C, asteriscos), com 15 dias, mostraram superfície lisa na área da lesão com uma fina camada de osso depositada no defeito ósseo. No período de 30 dias, o grupo LED (Fig. 14B), apresentou osso mais compacto, fechando completamente a borda da lesão; já o MLED (Fig. 14D, setas) permaneceu com a borda da lesão evidente.

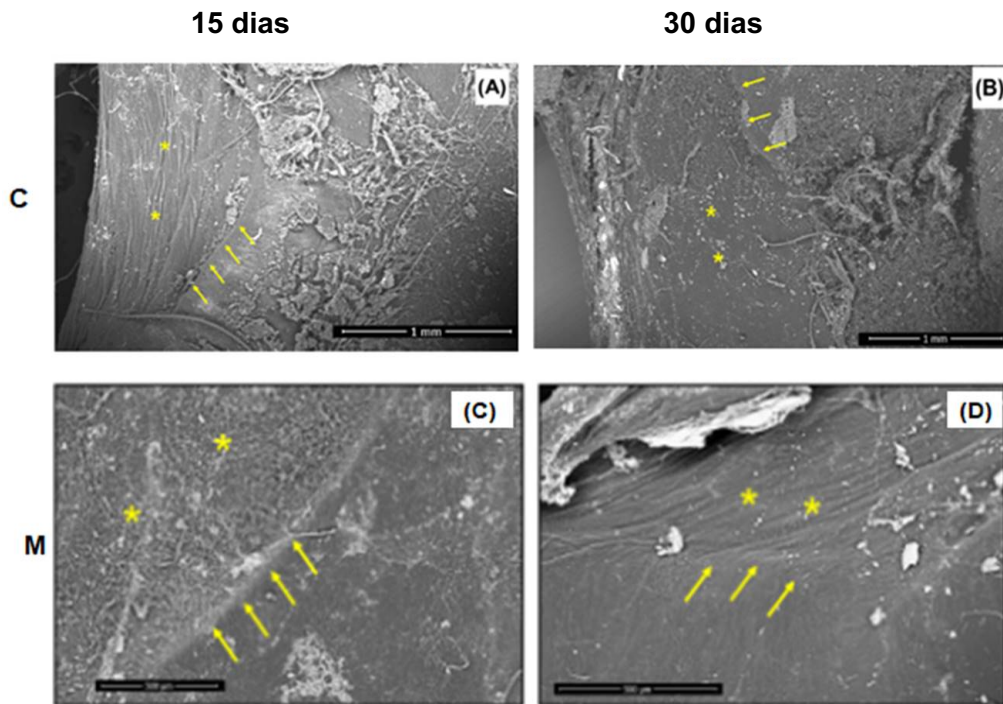
O processo de maturação óssea foi maior no grupo fotobiomodulado com LED quando comparado aos grupos C, M, e MLED, nos dois intervalos de tempo. Aos 30 dias, nos grupos C (Fig. 13B), M (Fig. 13D), e LED (Fig. 13B), a imagem MEV sugere que o tecido ósseo tem maior e melhor maturação em relação aos grupos de animais eutanasiados aos 15 dias com melhor tecido ósseo cortical e medular, delineado e menos poroso, com menor espaçamento entre as trabéculas.

Figura 12- Microscopia eletrônica de varredura da MPSCN. A: 60X; B: 1000X; C: 2000X



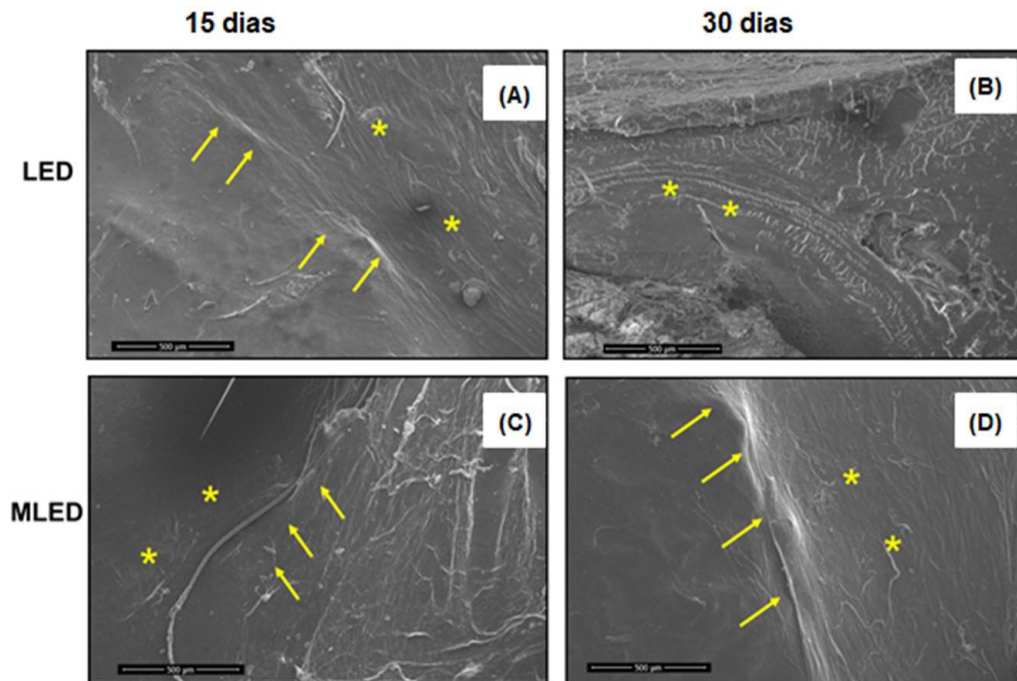
Fonte: Autor

Figura 13- Micrografias eletrônicas de varredura da superfície óssea perto do local do defeito nos grupos C (controle) e M (membrana), nos tempos experimentais de 15 e 30 dias (ampliação $\times 200$). As bordas do defeito ósseo (setas amarelas) e a área da lesão (asteriscos) ainda são visíveis. Após 15 dias, no grupo controle (C) e no grupo membrana (M) observam-se ainda as bordas do defeito ósseo (A, setas; C, setas); e a área da lesão (A, asteriscos; C, asteriscos). Após 30 dias, observou-se no controle (C) e membrana (M), uma superfície óssea compacta na área da lesão (B, asteriscos; D, asteriscos); e borda do defeito ósseo ainda visível (B, setas; D, setas).



Fonte: Autor

Figura 14- Micrografias eletrônicas de varredura da superfície óssea perto do local do defeito ósseo nos grupos LED e MLED (membrana/LED), nos tempos experimentais de 15 e 30 dias (ampliação $\times 200$). Com 15 dias a área da lesão (asteriscos), foi identificada no grupos LED e MLED (A, asteriscos; C, asteriscos) e a borda da lesão (A, setas; C, setas). Com 30 dias, uma camada de osso compacto foi identificada no grupo LED (B, asteriscos); e no grupo MLED é visível a área da lesão com uma fina camada de deposição óssea (D, asteriscos) e a borda da lesão permanece visível (D, setas).



Fonte: Autor

6.3 Análise por Espectroscopia Raman

O conteúdo de HA do osso mostrou uma gradação clara com o aumento da área de fosfato na ordem B> LED> M> MLED> C por 15 dias (Fig. 15A) e B> LED> M> C> MLED por 30 dias (Fig. 15B).

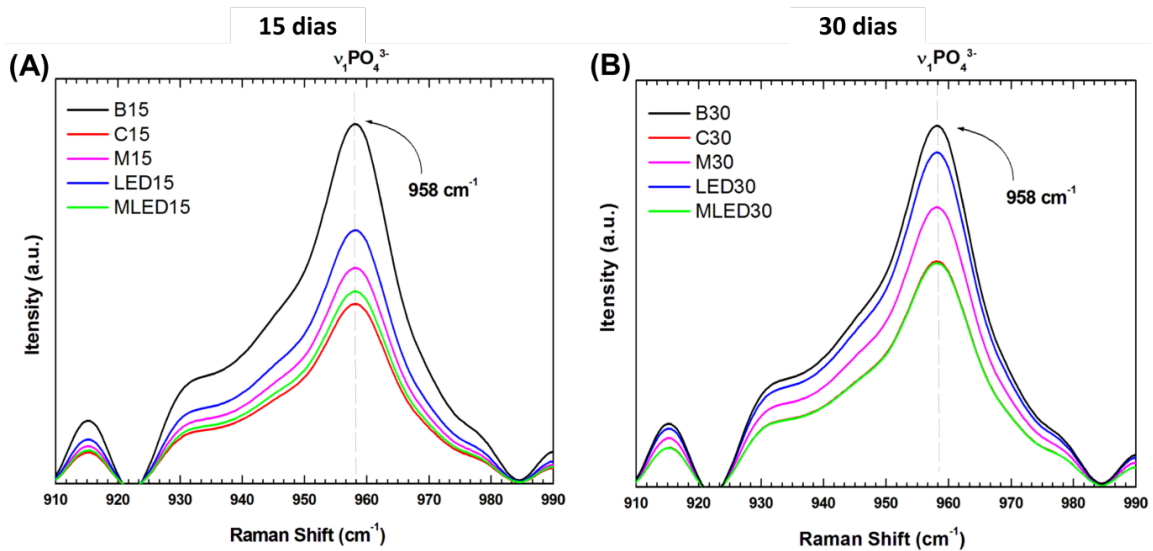
O grupo LED PBM apresentou a maior intensidade de pico (Figs. 16 A, B), próxima à intensidade de pico do osso cortical normal, nos dois períodos de avaliação; e os grupos C e MLED apresentaram as menores intensidades em comparação ao osso cortical normal (Figs. 16 A, B).

A análise estatística dos dados do pico de fosfato no 15º dia mostrou uma área de pico significativamente maior no grupo LED PBM do que nos grupos C, M e MLED ($p < 0,001$) (Fig. 16A; Quadro 4). No entanto, não houve diferença estatística

entre as áreas dos grupos C e M; C e MLED; M e MLED ($p > 0,05$); (Fig. 16B; Quadro 4). A área integrada do grupo B foi estatisticamente superior a todos os outros grupos ($p < 0,001$); Fig. 16; Quadro 4).

Após o período de 30 dias, foram observadas diferenças estatísticas significativas na área integrada do pico de fosfato entre o grupo C e os grupos LED ($p < 0,001$), M ($p < 0,01$) e B ($p < 0,001$) com menor área para o grupo C (Fig. 16B; Quadro 4). O grupo MLED apresentou uma área integrada estatisticamente menor que B e M ($p < 0,001$; Fig. 16B; Quadro 4). Grupos C e MLED; LED e M; LED e B mostraram áreas semelhantes do pico de fosfato entre si, sem diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) (Fig. 16B, Quadro 4).

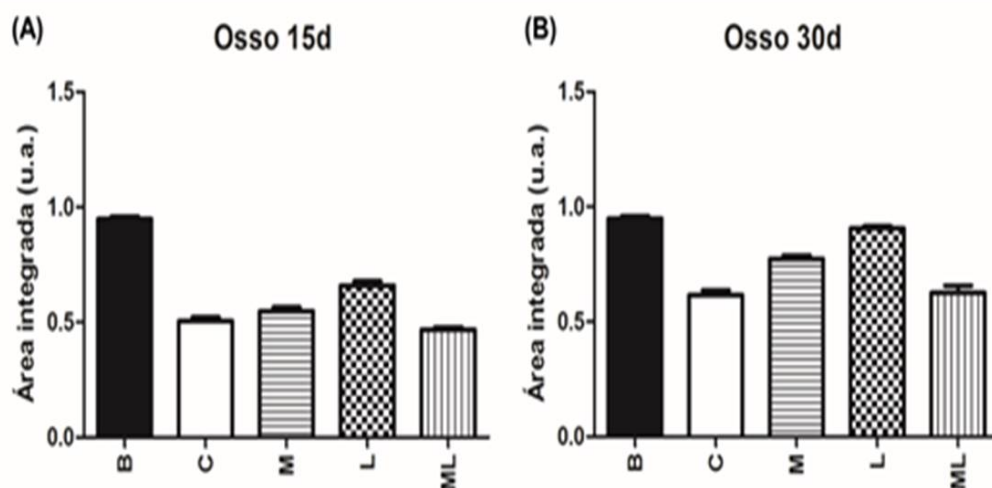
Figura 15- Espectros Raman dos defeitos do tecido ósseo nos grupos. Osso, B; controle, C; membrana, M ;LED, diodo emissor de luz FBM; e MLED, membrana + LED (A) após 15 dias (B) 30 dias. Espectros representativos mostrando o $\nu_1\text{-PO}_4^{3-}$ pico de vibração (958 cm^{-1}) dos grupos para ambos os períodos.



Legenda: Osso intacto(B), Controle (C), Membrana (M), LED e Membrana + LED (MLED).

Fonte: Autor

Figura 16- Gráficos de barras dos desvios médios e padrão da área integrada do pico $\nu_1\text{-PO}_4^{3-}$ pico vibracional ($\sim 958\text{ cm}^{-1}$) entre grupos. Osso, B; controle, C; membrana, M; LED, diodo emissor de luz FBM; e MLED, membrana + LED: (A) após 15 dias (B) após 30 dias.



Legenda: Osso(B), Controle(C), Membrana(M), LED e Membrana + LED (MLED).

Fonte: Autor

Quadro 4 - Análise estatística dos valores da área integrada dos espectros Raman relacionados ao componente fosfato $\nu_1\text{PO}_4$ 3 ($\sim 960 \text{ cm}^{-1}$) entre os grupos experimentais após o 15º e 30º dia de tratamento comparados com LED

Comparação entre grupos	15 dias	30dias
C versus LED	p<0,001	p<0.001
C versus M	ns p > 0.05	p<0.001
C versus M LED	ns p > 0.05	ns p > 0.05
C versus B	p<0,001	p<0,001
LED versus M	p<0,001	ns p > 0.05
LED versus MLED	p<0,001	p<0,001
LED versus B	p<0,001	ns p > 0.05
M versus MLED	ns p > 0.05	p<0,001
M versus B	p<0,001	p<0,001
MLED versus B	p<0,001	p<0,001

Legenda: Bone (Osso); Controle (C); Membrana(M); LED; e Membrana + LED (MLED). ns (não significativo).

Fonte: Autor

7 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou por meio da Espectroscopia Raman, análise histológica e MEV o processo de reparo ósseo de calvária de ratos com uso de MPSCN associada ou não à fotobiomodulação com LED.

O defeito crítico na calvária de ratos foi realizado com base nos estudos de Almeida *et al.*, (2014) e Alves *et al.*, (2018), por ser de fácil manejo, pouco custo e fácil disponibilidade do animal (SPICER *et al.*, 2012). Os defeitos na calvária de ratos são bastante empregados em experimentos com uso de membranas biológicas, pela pequena quantidade de osso medular e por apresentar osso remanescente somente nas extremidades do defeito (DONOS *et al.*, 2004). Neste estudo, a calvária apresentou como limitação a impossibilidade de realizar a imagem quantitativa por Espectrometria de Fluorescência de Raios- X por energia, pela pequena espessura das amostras.

A espectroscopia Raman tem sido usada para identificar modificações na constituição molecular do osso em processo de reparação e vários estudos têm mostrado a eficácia do uso do Raman como uma ferramenta para avaliar a qualidade óssea neoformada (LOPES *et al.*, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2013; SOARES *et al.*, 2014; SOARES *et al.*, 2015). A hidroxiapatita representa o principal componente do osso mineralizado, assim, o espectro ósseo basal não tratado apresenta pico de hidroxiapatita de fosfato a $\sim 960 \text{ cm}^{-1}$ (PINHEIRO *et al.*, 2017) e este foi usado como marcador de reparação óssea neste estudo.

Pinheiro *et al.*, (2018), em estudo com análise por espectroscopia Raman, com objetivo de avaliar o reparo de fraturas de tíbias de coelho tratadas com osteossíntese com fio e uso ou não de laser ou LED e MTA, evidenciaram que, a FBM laser e LED associados ao MTA, foram eficazes no reparo, aumentando a síntese de colágeno, criando um arcabouço de carbonato de cálcio e a subsequente deposição de hidroxiapatita.

No presente estudo, a associação de fotobiomodulação com LED com a MPSCN desacelerou o processo de reparo, demonstrando os menores picos de HA no grupo MLED, juntamente com o grupo controle. Ao passo que o grupo biomodulado por LED apresentou maiores picos de HA.

Os biomateriais utilizados devem permitir que os osteoblastos construam pontes entre seus grânulos e integre-se com outros osteoblastos para apoiar tanto a proliferação como a diferenciação nas fases iniciais do reparo, o que resultará em intrínseca estimulação da neoformação óssea (SOARES *et al.*, 2015).

Alves *et al.*, (2018), ao analisar os efeitos do uso de MPSC fotobiomoduladas com laser no reparo de defeitos ósseos em calvária de ratos, evidenciaram que o laser isoladamente, favoreceu o reparo ósseo, no entanto ao associá-lo com a MPSCN ocorreu aumento do processo inflamatório e retardo na remodelação óssea. No presente estudo não houve aumento do processo inflamatório.

A absorção da luz nas estruturas carotenóides são relacionadas às ligações conjugadas duplas da estrutura. A norbixina, derivada de carotenóides, é degradada pela exposição à luz, oxigênio e umidade. Ao absorver luz nos comprimentos de onda de 410 a 510 nm ocorre degradação (FONTANA *et al.*, 2000; TIWARI *et al.*, 2010). O poliestireno tem a função de revestir o composto com a matriz polimétrica e impedir sua degradação. Presume-se que a norbixina tenha sofrido oxidação ao ser biomodulada por laser, com comprimento de onda de 780 nm (ALVES *et al.*, 2018). Já neste estudo, apesar de ter ocorrido um retardo no processo de remodelação ao associar a membrana com o LED, não houve processo inflamatório. Supõe-se que a baixa potência utilizada no protótipo de LED do presente estudo, e as características da luz não coerente e não colimada, possam ter levado ao espalhamento da luz, disponibilizando menos energia e, possivelmente, ficando na barreira da membrana e minimizado a estimulação da remodelação óssea. Ao mesmo tempo, essas características do LED, provavelmente, tenham sido fator de proteção para não ocorrer a degradação da norbixina e, assim, evitar o aumento do processo inflamatório.

Evidenciou-se, em todos os grupos, no período de 15 dias, o processo de neoformação óssea, a partir da análise histológica, apresentando-se com extensão e espessuras variadas e sem a presença de infiltrado inflamatório. O uso da MPSCN neste estudo foi capaz de reduzir o infiltrado inflamatório, quando usada isoladamente ou associada à fotobiomodulação LED, o que demonstra a ação antioxidante e antiinflamatória dos carotenóides presentes no urucum (SOMACAL *et al.*, 2015; CAPELLA *et al.*, 2016).

Com 30 dias, nos grupos membrana, LED e membrana/LED ocorreu remodelação óssea, característica importante no processo de cicatrização óssea. As

membranas biocompatíveis devem ser constituídas de moléculas capazes de atrair células e andaimes para facilitar o processo de regeneração óssea e resturar a função, forma e estrutura, o mais próximo do fisiológico (RATNER; BRYANT, 2004; GUASTALDI; APARECIDA, 2010).

Oliveira *et al.*, (2012) observaram que a biomodulação com laser não melhorou as propriedades bioativas dos andaimes de biosilicato, mas ao ser usada isoladamente promoveu a neoformação óssea, achado semelhante encontrado neste estudo, no qual os grupos fobiomodulados por LED, sem uso da MPSCN, apresentaram maior remodelação óssea.

Os grupos do presente estudo que apresentavam a MPSCN e os grupos fotobiomodulados por LED não evoluíram com áreas de necrose. A MPSCN tem como característica, a não citotoxigenicidade, portanto, segura para uso (MONTE *et al.*, 2016).

O uso de luz LED isoladamente ou em associação com biomateriais no processo de reparo ósseo diminui o processo inflamatório e aumenta a deposição de colágeno (PINHEIRO *et al.*, 2013; PINHEIRO *et al.*, 2017). Estudos evidenciam que a irradiação com LED modula positivamente o processo de reparação óssea independente do uso de biomaterial (SOARES *et al.*, 2015; PINHEIRO *et al.*, 2017). No entanto, estudos utilizando a associação do LED com outros biomateriais (MTA – mineral agregado de trióxido) (PINHEIRO *et al.*, 2009); HA e fosfato β -tricalcico phosphate (β -TCP) (SOARES *et al.*, 2015) evidenciou aumento do processo inflamatório.

O uso da FBM associada ou não ao uso de diferentes composições de biomateriais, em experimentos com animais, evidenciaram efetividade na cicatrização óssea (LOPES *et al.*, 2005; LOPES *et al.*, 2006; WEBER *et al.*, 2006; MARTINEZ *et al.*, 2008; PINHEIRO *et al.*, 2009; LOPES *et al.*, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2012; PINHEIRO *et al.*, 2013; SOARES *et al.*, 2013; ALVES *et al.*, 2018; GERBER *et al.*, 2018), assim como a FBM LED (PINHEIRO *et al.*, 2014; SOARES *et al.*, 2014; SOARES *et al.*, 2015; PINHEIRO *et al.*, 2017).

No grupo LED foi verificada maior remodelação, com fechamento das bordas do defeito, achado que evidencia que a FBM acelera o processo de reparação óssea, aumentando a deposição e organização do osso neoformado (PINTO *et al.*, 2013; TIM *et al.*, 2013).

A fotobiomodulação com Laser e LED modula o metabolismo dos osteoblastos humanos, no qual, o LED aumenta a expressão de colágeno do tipo I, e incrementa a síntese de RNA, em diferentes doses, já o laser aumenta a mineralização dependendo da dose e do tempo (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Verificou-se no presente estudo, por meio da análise histológica e MEV, que a biomodulação com LED diminuiu o processo inflamatório e melhorou a resposta biológica do tecido ósseo estimulando a deposição de osso neoformado no local da lesão. As características dos espectros Raman e a intensidade de pico do novo osso formado após 30 dias, nos grupos irradiados por LED, foram semelhantes às do osso nativo, indicando uma mineralização óssea bem sucedida.

Os níveis de HA após 30 dias no grupo LED e a ausência de significância estatística entre os grupos osso e LED indicam o efeito positivo da biomodulação com LED nos defeitos ósseos. Esses resultados estão de acordo com estudos que demonstraram maior deposição de massa óssea com formação de tecido ósseo em animais fotobiomodulados com LED (PINHEIRO *et al.*, 2013; SOARES *et al.*, 2014; SOARES *et al.*, 2015; DIAMANTINO *et al.*, 2017; PINHEIRO *et al.*, 2018) e laser (PINHEIRO *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2013; GERBER *et al.*, 2018).

O efeito positivo obtido com o uso do LED está possivelmente associado à presença de osteoblastos mais maduros, com melhor capacidade de secreção de HA em grupos irradiados, quando comparados àqueles observados em animais de grupos não irradiados, onde a proliferação celular ainda estava ocorrendo (SOARES *et al.*, 2014; SOARES *et al.*, 2015; PINHEIRO *et al.*, 2017; DIAMANTINO *et al.*, 2017).

A fotobiomodulação com diodos emissores de luz demonstrou induzir um processo de reparo rápido em defeitos ósseos usando parâmetros semelhantes aos realizados com o laser (TORRES *et al.*, 2008; PINHEIRO *et al.*, 2011; SOARES *et al.*, 2013; SOARES *et al.*, 2013; PINHEIRO *et al.*, 2013; PINHEIRO *et al.*, 2018). No presente estudo observou-se remodelação óssea e diminuição do processo inflamatório nos grupos LED, tanto no intervalo de 15 dias como no de 30 dias.

O uso do LED está associado ao aumento na proliferação de fibroblastos, condroblastos, e osteoblastos e, portanto, maior deposição de colágeno, importante precursor de deposição da matriz mineral (PINHEIRO *et al.*, 2009; PINHEIRO *et al.*, 2013; SOARES *et al.*, 2015). Assim, o aumento da formação óssea está

provavelmente intimamente ligado com ambos os números aumentados de osteoblastos e sua atividade secretora.

8 CONCLUSÃO

O emprego da MPSCN no reparo ósseo de calvárias de rato reduziu o processo inflamatório, serviu de arcabouço e favoreceu a neoformação óssea. Ao associá-la com o LED ocorreu remodelação óssea, porém, de maneira desorganizada e irregular.

Os níveis de hidroxiapatita foram maiores nos grupos fotobiomodulados por LED e menores nos grupos controle e no grupo membrana associado com a fotobiomodulação.

A fotobiomodulação com LED em defeitos ósseos na calvária de ratos influenciou positivamente na formação óssea com aumento na deposição de hidroxiapatita, nos diferentes intervalos de tempo, sendo maior no final do experimento, resultando em osso mais compacto e linear. O uso simultâneo da MPSCN e fotobiomodulação apresentou pouca efetividade.

REFERÊNCIAS

- AGNES, J.E. **Eu sei Eletroterapia**. Santa Maria: Palotti, 2011.
- AKKUS, O.; ADAR, F.; SCHAFFLER, M. B. Age-related changes in physicochemical properties of mineral crystals are related to impaired mechanical function of cortical bone. **Bone**, v. 34, n. 3, p. 443–453. 2004.
- ALMEIDA, A. L. P. F. *et al.* The effect of low-level laser on bone healing in critical size defects treated with or without autogenous bone graft: an experimental study in rat calvária. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 25, p. 1131-1136, 2014.
- ALVES, A. M. M. *et al.* Evaluation of bone repair after application of a norbixin membrane scaffold with and without laser photobiomodulation (λ 780 nm). **Lasers in Medical Science**, v.33, n.77, p.1493–1504, 2018.
- AL-WATBAN, F. A.; ANDRES, B. L. Polychromatic LED in Oval Full-Thickness Wound Healing in Non-Diabetic and Diabetic Rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 24, n. 1, p.10-16, 2006.
- ANAND, V. *et al.* Evaluation of bone formation using recombinant human bone morphogenetic proteins-7 in small maxillofacial bony defects. **J Oral Maxillofac Pathol**, v. 23, n. 2, p. 208-212, 2019.
- AWONUSI, A.; MORRIS, M. D; TECKLENBURG, M. M. J. Carbonate Assignment and Calibration in the Raman Spectrum of Apatite. **Calcified Tissue International**, v. 81, p. 46-52, 2007.
- BARTH, A.; ZSCHERP, C. What vibrations tell us about proteind. **Rev. Biophys.**, v. 35, p. 369-430. 2002.
- BAKER, S.C. *et al.* Characterisation of electrospun polystyrene scaffolds for three-dimensional in vitro biological studies. **Biomaterials**, v. 27, n.16, p. 3136-3146, 2006.
- BETTI, L. V. **Análises microscópica e radiográfica do reparo de defeitos confeccionados em fêmures de coelhos preenchidos com matriz óssea bovina medular em bloco ou cortical em microgrânulos**. 2004. 152f. Tese (Doutorado)-Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Baurú, 2004.
- BHAKTA, G. The influence of collagen and hyaluronan matrices on the delivery and bioactivity of bone morphogenetic protein-2 and ectopic bone formation. **Acta Biomater**, v. 13, p. 347-354, 2013.
- BELANGER, A.Y. **Recursos Fisioterapêuticos: evidências que fundamentam a prática clínica**. 2 ed. São Paulo: Manole, 2012.
- BOLAGH, A.G.D; MITHIEUX, S.M; WEISS, A.S. Elastic proteins and elastomeric protein alloys. **Curr Opin Biotechnol.**, v. 39, p. 56–60, 2016.

BROWN, K.V. *et al.* Improving Bone formation in a rat fêmur segmental defect by controlling boné morphogenetic protein-2 release. **Tissue engineering part A.**, v. 17, n. 13-14, p. 1735-1746, 2011.

CALCIOLARI, E. *et al.* Degradation Pattern of a Porcine Collagen Membrane in an in Vivo Model of Guided Bone Regeneration. **J. Periodontal Res.** n.53, p. 430–439, 2018.

CAMARGOS, M.C.S. Estimativas de expectativa de vida livre de incapacidade funcional no Brasil e Grandes Regiões, 1998 e 2013. **Ciên Saude Colet.**, v. 24, n. 3, 2019.

CAMERON, M.H. *et al.* Electromagnetic radiation in physical agents. In: Cameron MH (ed) Rehabilitation, from research to practice. **WB Saunders**, v. 38, p. 303-344, 1999.

CAPELLA, S.O. *et al.* Potencial cicatricial da Bixa orellana L. em feridas cutâneas: estudo em modelo experimental. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 68; n. 1; p. 104-112; 2016.

CAPUTO, L. F. G.; GITIRANA, L. de B.; MANSO, P. P. de A. Técnicas histológicas. In: MOLINARO, E.; CAPUTO, L.; AMENDOEIRA, R. (Org.). **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde.** Rio de Janeiro: EPSJV, p. 8-188, 2010.

CARVALHO, P.S.P.; LUPPINO, F.; MENDES, V.C. Histofisiologia óssea e os biomateriais aplicados à implantodontia. In: BEZERRA, F.J.B.; LENHARO, A. **Terapia Clínica avançada em Implantodontia.** São Paulo. Artes. Artes Médicas, 2002.

CARVALHO, P.S.P. *et al.* Revisão e proposta de nomenclatura para os biomateriais. **Implantnews**, v. 3, n. 1, p. 255-260, 2004.

CHANG, Y.Y. *et al.* Comparison of collagen membrane and bone substitute as a carrier for rhBMP-2 in lateral onlaygraft. **Clin Oral Implants Res.**, v. 26, n. 11, p.13–19. 11, 2015.

CHEN, F.M.; JIN, Y. Periodontal tissue engineering and regeneration: current approaches and expanding opportunities. **Tissue Eng Part B Rev.**, v. 16, p. 219–255, 2010.

CHUANG, H. *et al.* The ruts and bolts of low level laser (light) therapy. **Anny. Biomed.Eng.** v. 40, p. 516-533, 2012.

COBEA. **Princípios éticos na experimentação animal.** Colégio Brasileiro de Experimentação animal, 1991.

COSTA, J.B.Z.C. *et al.* O uso de membranas biológicas para regeneração óssea guiada em implantodontia. Revisão de Literatura. **Revbahianaodonto**, v.7, n.1751, 2016.

CROCI, A.T. *et al.* Efeito do concentrado de plasma em falhas ósseas provocadas em fêmures de camundongos como estimulação de formação óssea. Estudo experimental. **Acta Ortop. Bras.**, v.11, n.4, 2003.

CRUZ, G. A. *et al.* Morphological and chemical analysis of bone substitutes by scanning electron microscopy and microanalysis by spectroscopy of dispersion energy. **Braz Dent J.**, v.18, n. 2, p.129-133, 2007.

CUNHA, M. J. S. *et al.* Effect of low level laser on bone defects treated with bovine or autogenous bone grafts: in vivo study of calvaria. **Biomed Res Int.**, v. 1, p. 1-9, 2014.

DEDAVI, B.A.; GOMES, C.I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras:** materiais poliméricos, metálicos e semicondutores. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.

DESMET, K. D. *et al.* Clinical and experimental applications of NIR-LED photobiomodulation. **Photomed Laser Surg.**, v, 24, p.121–128, 2006.

DIAMANTINO, A. G. *et al.* Effect of non-coherent infrared light (LED, $\lambda 945 \pm 20$ nm) on bone repair in diabetic rats—morphometric and spectral analyses. **Lasers in Medical Science**, v.32, n.5, p. 1041–1049, 2017.

DONOS, N. *et al.* Effect of GBR in combination with deproteinized bovine mineral and/or enamel matrix proteins on the healing of critical-size defects. **Clinical Implants Research.**, v. 15, p. 101-111, 2004.

DUTTON, M. **Fisioterapia ortopédica, exame, avaliação e intervenção.** 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

EINHORN, T. A.; GERSTENFELD, L. C. Fracture healing: mechanisms and interventions. **Nature Review Rheumatology**, v.11, n.164, p.45–54, 2014.

EMARA, K. M.; DIAB, R.A.; EMARA, A.K. Recent biological trends in management of fracture non-union. **World J Orthop.** v.6, n.8, p. 8-623, 2015.

ESCUADERO, J.S.B. *et al.* Photobiomodulation therapy (PBMT) in bone repair: A systematic review. **Injury**, v. 23. n. 1, 2020.

FABRI, Eliane Gomes; TERAMOTO, Juliana Rolim Salomé. Urucum: fonte de corantes naturais. **Hortic. Bras.**, v. 33, n. 1, p. 140, 2015.

FARLAY, D.; PANCZER, G.; REY, C. Mineral maturity and crystallinity index are distinct characteristics of bone mineral. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 28, n. 4, p. 433-45, 2010.

FONTANA, J.D. Carotenóides, cores atraentes e ação biológica. **Biotecnologia, ciência e desenvolvimento**, n. 13, p. 40-45, 2000.

- GERBI, M. E. M. de M. *et al.* Photobiomodulation Therapy in Bone Repair Associated with Bone Morphogenetic Proteins and Guided Bone Regeneration: A Histomorphometric Study. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 36, n.11, 2018.
- GUIMARÃES, K.B. *et al.* Histomorphometric evaluation of calcium phosphate bone grafts on bone repair. **Braz J Otorhinolaryngol.** v. 77, p. 447–454, 2011.
- GOSAIN, A.K. *et al.* Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF-(beta) isoforms. **Plastic Reconstr Surg.**, v. 106, n. 2, p. 360-371, 2000.
- GRANJEIRO. J.M; TAGA, R. Osteoclastos. *In*: CARVALHO, H.F.; BUZZATO, C.B.C. **Células: Uma abordagem multidisciplinar.** São Paulo: Manole, 2005. p. 50-67.
- GRIFFON, D. J. Cicatrização Óssea Primária. *In*: BOJRAB, M. J. **Mecanismos das Doenças em Cirurgia de Pequenos Animais.** 3. ed. São Paulo: Roca, 2014. 1014 p.
- GUASTALDI, C.; APARECIDA, A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Quim Nova**, v. 33, n.6, p.1352-1358, 2010.
- HASLERUD, S. *et al.* Low-level Laser Therapy and Cryotherapy as Mono-and Adjunctive Therapies for AchillesTendinopathy in Rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 35, n. 1, p. 32-42, 2017.
- HENDOW, E. K. *et al.* Biomaterials for hollow organ tissue engineering. **Fibrogenesis Tissue Repair.**, v. 9, n. 3, 2016.
- HIGUCHI, A. *et al.* Visible light regulates neurite outgrowth of nerve cells. **Cytotechnology**, v. 54, p.181–188, 2007.
- HUANG, YY; CHEN, A.C; CARROLL, J.D; HAMBLIN, M.R. Biphasic dose response in low-level light therapy. **Dose Response.** v. 7, p.358-383, 2009
- IROBI, O. N.; MOO-YOUNG, M. ANDERSON, W. A. Antimicrobial activity of Annatto (Bixa orellana) extract. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 34, n. 2, p.87–90, 1996.
- JAKUS, S.M.; SHAPIRO, A. HALL, C.D. Biologic and synthetic graft use in pelvic surgery: a review. **ObstetGynecolSurv.**, n. 4, v. 63, p. 66-253, 2008.
- KARU, T. I. Molecular mechanisms of the therapeutic effects low intensity Laser radiation. **Lasers Life Sci.**, v. 2, p. 53-74, 1989.
- KARU, T.I.; KOLIAKOV, S.F. Exact action spectra for cellular responses relevances to phototherapy. **Phothomedicine and laser surgery**, v, 23, n. 4, p,351-361, 2005.
- KARU, T. I. *et al.* Elementary Processes in Cells after Light Absorption Do Not Depend on the Degree of Polarization:Implications for the Mechanisms of Laser Phototherapy. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 26, n. 2, p. 77–82, 2008.

KASUYA, S. *et al.* New bone formation process using Bio-Oss and collagen membrane for rat calvarial bone defect: histological observation. **Implant Dent.**, v. 00. n. 00, 2018.

KHANSARY, M.A. *et al.* An enquiry on appropriate selection of polymers for preparation of polymeric nanosorbents and nanofiltration/ultrafiltration membranes for hormone micropollutants removal from water effluents. **Chemosphere.** v. 198, p. 91-99, 2017.

KIM, M. *et al.* Immediate reconstruction of mandibular defect after treatment of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) with rhBMP-2/ACS and miniplate: Review of 3 cases. **Int J Surg Case Rep**, v.66, p.25-29, 2020.

KONIGH, H.E; LIEBICH, H.G. **Anatomia dos animais domésticos: Texto e atlas colorido.** Porto Alegre: Artmed, 2004. v.2. p. 205-206.

LANE, N.E. *et al.* Glucocorticoid-treated mice have localized changes in trabecular bone material properties and osteocyte lacunar size that are not observed in placebo-treated or estrogen-deficient mice. **J Bone Miner Res.**, n. 21, p. 466–476, 2006.

LIMA, L. R. P. *et al.* Bixina, Norbixina e Quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 4, p.196-200, 2001.

LIMA, A.M.C.T; SÉRGIO, L.P.S; FONSECA, A.S. Photobiomodulation via multiple-wavelength radiations. **Lasers in Medical Science**, v. 35, n. 2, p. 207-316, 2019.

LI, R.Y. *et al.* Evaluation of biocompatibility and toxicity of biodegradable poly (DL-lactic acid) films. **Am J Transl Res.**, v. 7, n. 8, p.1357-1370, 2015.

LOPES, C.B. *et al.* Infrared laser light reduces loading time of dental implants: a Raman Spectroscopic study. **Photomed Laser Surg.**, v. 23, p. 27-31, 2005.

LOPES, C.B. *et al.* Infrared laser photobiomodulation (830 nm) on bone tissue around dental implants: a Raman spectroscopy and scanning electronic microscopy study in rabbits. **Photomed Laser Surg.** v. 25, n. 2, p.96-101, 2007.

LOPES, C.B. *et al.* The effect of the association of near infrared laser therapy, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration on tibial fractures treated with internal rigid fixation: A Raman spectroscopic study. **J Biomed Mater Res.**, v. 4, n. 4, p. 63-1257, 2010.

MAGESTE, M. A. *et al.* Thermodynamics and optimization of norbixin transfer processs in aqueous biphasics systems formed by polymers and organic salts. **Separation and purificatyon technology**, v. 98, p. 69-77, 2012.

MAIA FILHO, A. L. M. *et al.* Morphological and chemical evaluation of bone with apatite-coated Al₂O₃ implants as scaffolds for bone repair. **Cerâmica** (São Paulo. Impresso), v. 59, p. 533-538, 2013.

MAIA FILHO, A. L. M. *et al.* Evaluation of inorganic and organic bone components after application of an apatite-coated Al₂O₃ implants as scaffolds for bone repair. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, p. 334-339, 2014.

MAIORANE C. *et al.* Histomorphometric evaluation of an organic bovine bone coverage to reduce autogenous grafts resorption: preliminary results. **Open Dent J.** v. 5, p. 71–78, 2011.

MAMALIS, A.; GARCHA, M; JAGDE, J. Light Emitting Diode-Generated Blue Light Modulates Fibrosis Characteristics: Fibroblast Proliferation, Migration Speed, and Reactive Oxygen Species Generation. **Lasers in Surgery and Medicin.**, v. 47, p. 210–215, 2015.

MANDAIR, S.G.; MORRIS, D. M. Contributions of Raman spectroscopy to the understanding of bone strength. **BoneKEY Reports**, v. 4, n. 620, 2015.

MARTINEZ, M.; PINHEIRO, A.L.B.; RAMALHO, L.M.P. Effect of IR laser photobiomodulation on the repair of bone defects grafted with organic bovine bone. **Lasers Med Sci.**, v. 23, p. 313–317, 2008.

MATTOS, L.H.L *et al.* Effect of phototherapy with light-emitting diodes (890 nm) on tendon repair: an experiential model in sheep. **Lasers in Medicine Science**, v. 30, p. 193-201, 2015.

MENDES, S.C. *et al.* Biocompatibility testing of novel starch- based materials with potential application in orthopaedic surgery. A preliminary study. **Biomaterials**, v. 22, n. 14, p. 64-2057, 2001.

MESSORA, M.R. *et al.* Bone Healing in Critical- Size Defects Treated with Platelet-Rich Plasma Activated by two different methods. A histologic and histometric study in rat calvária. **Journal of periodontal research**, v. 43, n. 2, p. 23-217, 2008.

MONTE, S.M. *et al.* Genotoxicity Evaluation of Polystyrene Membrane with Collagen and Norbixin by Micronucleous Test and Comet Assay. **Int J Pharm Sci Invent.**, v. 5, n. 4. p. 2319-6718, 2016.

NASCIMENTO, L.D. *et al.* Effects of therapy with light emitting diod (led) in the calcaneal tendon lesions of rats: a literature review. **The Scientific World Journal**, 2019.

NAUTH, A.; SCHEMITSCH, E. H. Stem cells for the repair and regeneration of bone. **Indian J. Orthop.**, v.46, n.1, p.19-21, 2012.

NISHIED, Y. *et al.* Combined Effects of Soy Isoflavones and β -Carotene on Osteoblast Differentiation. **Int J Eviron Res Public Health.**, v. 12, n. 11, p. 13750-13761, 2015.

OLIVEIRA, P. et al. Comparative study of the effects of low-level laser and low-intensity ultrasound associate with biosilicate on the process of bone repair in the rat tibia. **Rev Bras Ortop.**, v. 47, n. 1, p. 102-107, 2012.

OLIVEIRA, F.A. et al. Low intensity lasers differently induce primary human osteoblast proliferation and differentiation. **jphotobiol.**, v.16, p.1011-1334 ,2016.

OLIVEIRA, G.J.P.L. Effect of low-level laser therapy on the healing of sites grafted with coagulum, deproteinized bovine bone, and biphasic ceramic made of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate. In vivo study in rats. **Laser Surg Med.**, v. 13, n.1002, 2018.

OHSUGI, Y. et al. Evaluation of bone healing following Er:YAG laser ablation in rat calvaria compared with bur drilling. **Journal of Biophotonics**, v. 12, n. 13, 2018.

PACHECO, P. S. et al. Laser phototherapy at high energy densities do not stimulate pré-osteoblast growth and differentiation. **Photomedicine and Laser Surgery**. v. 31, n. 5, p. 225-229, 2013.

PASSARELLA, S. et al. Quantitative analysis of lymphocyte–Salmonella interaction and effects of lymphocyte irradiation by He–Ne Laser. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.130, p. 546-552, 1985.

PICON, C.A. et al. Caracterização de superfícies de titânio irradiadas com laser Nd: YAG e depositadas com hidroxiapatita. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS, 17., 2006. **Anais...**, Foz do Iguaçu. 2006.

PINHEIRO, A.L.B.; GERBI, M.E.M.M.. Photoengineering of bone repair processes, **Photomed. Laser Surg.**, v. 24, p.169–178, 2006.

PINHEIRO, A.L.B. et al. Bone repair following bone grafting hydroxyapatite guided bone regeneration and infrared laser photobiomodulation: a histological study in a rodent model. **Lasers Med Sci**, v. 24, p.234-240, 2009.

PINHEIRO, A. L. B. et al. Effects of laser phototherapy on bone defects grafted with mineral trioxide aggregate, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration: A Raman spectroscopic study. **Journal of Biomedical Materials Research A**, v. 95, n. 4, p. 1041-1047, 2010.

PINHEIRO, A.L.B. et al. Light microscopic description of the effects of laser phototherapy on bone defects grafted with mineral trioxide aggregate, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration in a rodent model. **J Biomed Mater Res A.**, v. 98, p. 212–221, 2011.

PINHEIRO, A.L.B. et al. Does LED phototherapy influence the repair of bone defects grafted with MTA, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration? A description of the repair process on rodents. **Lasers Med Sci.**, v. 27, p. 1013–1024, p. 2012.

PINHEIRO A.L.B *et al.* The efficacy of the use of IR laser phototherapy associated to biphasic ceramic graft and guided bone regeneration on surgical fractures treated with miniplates: a Raman spectral study on rabbits. **Lasers Med Sci.**, v. 28, p. 513-518, 2013.

PINHEIRO, A.L.B. *et al.* Bone repair following bone grafting hydroxyapatite. **Journal of Photochemistry and Photobiology Biology**, v. 131, p.16–23, 2014.

PINHEIRO, A.L.B. Raman ratios on the repair of grafted surgical bone defects irradiated or not with laser (λ 780 nm) or LED (λ 850 nm). **Journal of Photochemistry and Photobiology Biology**. v, 14, p.1011-1344, 2014.

PINHEIRO, A.L.B. *et al.* Biochemical changes on the repair of surgical bone defects grafted with biphasic synthetic micro-granular HA + β -tricalcium phosphate induced by laser and LED phototherapies and assessed by Raman spectroscopy. **Lasers Med Sci.**, v. 32, p. 663-672, 2017.

PINHEIRO, A. L. B.; BRUGNERA JUNIOR, A.; ZANIN, F. A. A. **Aplicação do Laser na Odontologia**. São Paulo: Santos, 2010.

PINHEIRO, A. L. B. *et al.* Laser/LED phototherapy on the repair of tibial fracture treated with wire osteosynthesis evaluated by Raman spectroscopy. **Lasers in Medical Science**, v. 33, n. 8, p. 1657-1666, 2018.

PINTO, K.N. *et al.* Effects of biosilicate scaffolds and low-level laser therapy on the process of bone healing. **Photomed. Laser Surg.**, v. 31, 2013.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 377-384.

RATNER, B. D.; BRYANT, S. J. Biomaterials: where we have been and where we are going. **Annu Rev Biomed Eng.**, v. 6, p.4775, 2004.

ROBBINS, S.L. *et al.* **Fundamentos de Patologia Estrutural e Funcional**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001

ROCHA, L.B.; GOISSIS, G.; ROSSI, M.A. Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. **Biomaterials**, v. 23, p. 449-456, 2002.

SACONO, N.T. *et al.* Light emitted Diode Therapy in Chemotherapy Induced Mucositis. **Lasers in surgery Medicine**, v. 40, p. 625-633, 2008.

SALGADO, A. J.; COUTINHO, O. P.; REIS, R. L. Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends. **Macromolecular Bioscience**, v. 4, n. 8, p. 4, 743–765, 2004.

SANTOS, J.A.A. *et al.* Avaliação histomorfométrica do efeito do extrato aquoso de urucum (norbixina) no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, supl. 1, 2014.

SANTOS, A. D. *et al.* Effects of the combination of low-level laser therapy and anionic polymer membranes on bone repair. **Lasers in Medical Science**, v. 35, p. 813–821, 2019.

SANTOS, G. G; MARINHO, S.M.O.C; MIGUEL, F.B. Polímeros como biomaterias para o tecido cartilaginoso. **Rev. Ciênc. Med. Biol.**, v. 12, n. 3, p. 367-373, 2013.

SBRANA, M.C. **Avaliação de diferentes protocolos de laser de baixa intensidade associado ou não ao osso bovino biorgânico (Bio Oss) na cicatrização de defeitos ósseos criados cirurgicamente criados em calvária de ratos: Estudo histológico e histométrico.** 2015. 131f. Tese(Doutorado). Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Baurú, 2015.

SBRICOLI, L. *et al.* Selection of Collagen Membranes for Bone Regeneration: A Literature Review. **Materials**, v.13, n.3, 2020.

SCHMITZ, J.P.; HOLLINGER, J.O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clin Orthop.**, n. 205, 1986.

SERAFIM, A. *et al.* Osteoblastlike cell behavior on porous scaffolds based on poly (styrene) fibers. **BioMed research international**, 2014.

SHEIKH, Z. *et al.* Collagen based barrier membranes for periodontal guided bone regeneration applications. **The Society of The Nippon Dental University** , v. 1, n. 105, p. 1-12, 2016.

SHERMAN, S.E.; XIAO, Q.; PERCEC, V. Mimicking Complex Biological Membranes and Their Programmable Glycan Ligands with Dendrimersomes and Glycodendrimersomes. **Chem Rev.** v. 117, n. 9, p. 6538-6631, 2017.

SOARES, L.G.P. *et al.* New bone formation around implants inserted on autologous and xenografts irradiated or not with IR laser light: a histomorphometric study in rabbits. **Braz. Dent. J.**, v. 24, p. 218–223, 2013.

SOARES, L.G.P. *et al.* Raman study of the repair of surgical bone defects grafted with biphasic synthetic microgranular HA+ β -calcium triphosphate and irradiated or not with λ 780 nm laser. **Lasers Med Sci.** v. 29, n. 5, p. 1539-50, 2013.

SOARES, L.G.P. *et al.* Do laser/LED phototherapies influence the outcome of the repair of surgical bone defects grafted with biphasic synthetic microgranular HA + β -tricalcium phosphate? A Raman spectroscopy study. **Lasers Med Sci.**, v. 29, n. 5, p. 84-1575, 2014.

SOARES, L.G.P. *et al.* Repair of surgical bone defects grafted with hydroxylapatite + BTCP and irradiated with 850 nm LED light. **Brazilian Dental Journal**, v. 01, n. 26, 2015.

- SOMACAL, S. et al. The antiatherogenic effect of bixin in hypercholesterolemic rabbits is associated to the improvement of lipid profile and to its antioxidant and anti-inflammatory effects. **Mol Cell Biochem.**, v. 403, n. 1-2, p. 243-253, 2015.
- SPICER, P.P. *et al.* Evaluation of bone regeneration using the rat critical size defect. **Nature protocols.** v.7, n.10, p.29-1918, 2012.
- STANDRING S. Gray's Anatomy, 40th Edition. **The Anatomical Basis of Clinical Practice**, Expert Consult Churchill Livingstone 2009. p. 27-59.
- STEIN, R. S.; SILVA, J. S.; SILVA, V. D. Comparative Study Of Bone Neof ormation Using Autologous Grafting And Three Replacements: Bone defects In Rats. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 44, n. 4, p. 330-5, 2009.
- TAKHTFOOLADI, M.A. et al. Effects of light-emitting diode (LED) therapy on skeletal muscle ischemia reperfusion in rats. **Lasers Med. Sci.**, v.30, n. 1, p. 311-316, 2015.
- TERRANOVA, L. *et al.* Polystyrene scaffolds based on microfibers as a bone substitute; development and in vitro study. **Acta biomaterialia**, v. 29, p.380-388, 2016.
- TIM, C.R. *et al.* Low-level laser therapy enhances the expression of osteogenic factors during bone repair in rats. **Lasers Med. Sci.** v.13, n. 9, p. 1010-1302, 2013.
- TIWARI, P. et al. Phytochemical screening and extraction: a review. **Int Pharma Sci.** v. 1, n.1, p. 98-106, 2011.
- TOBITA, M.; MIZUNO, H. Periodontal disease and periodontal tissue regeneration. **Curr Stem Cell Res Ther.** v. 5, p. 168–174, 2010.
- TOKER, H. *et al.* Alendronate enhances osseous healing in a rat calvária defect model. **Archives of oral biology**, v.57, n.11, p. 50-1545, 2012.
- TORRES, C.S. Does the use of laser photomodulation bone morphogenetic protein, an guided bone regeneration improve the outcome of autologous bone grafts? An in vivo study in a rodent model. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 26, n. 4, p. 371-377, 2008.
- TORTORA, GRAWBOSKI. **Principios de Anatomia e Fisiologia**. Guanabara Koogan, v.9, 2008.
- TOSTA, M. *et al.* Histologic and histomorphometric evaluation of a synthetic bone substitute for maxillary sinus grafting in humans. **Clin Oral Implants Res.** v. 24, p. 866-870, 2013.
- VLEGGERT-LANKAMP, C. L. *et al.* Pores in synthetic nerve conduits are beneficial to regeneration. **J Biomed Mater Res.**, v. 80, p. 965-982, 2007.
- VINCK, E.M. *et al.* Green light emitting diode irradiation enhances fibroblast growth impaired by high glucose level. **Photomed Laser Surg.**, v. 23, p. 67–171, 2005.

WEBER, J. B. B. *et al.* Laser therapy improves healing of bone defects submitted to autologous bone graft. **Photomedicine and laser surgery**, v. 24, p. 38-44, 2006.

WEISS, R. A. *et al.* Clinical experience with light emitting diode (LED) photomodulation. **Dermatol Surg.**, v. 31, p.1199–1205, 2005.

WHELAN, H.T.; BUCHMANN, E.V.; DHOKALIA, A. Effect of NASA Light Emitting Diode Irradiation on Molecular Changes for Wound Healing in Diabetic Mice. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, v. 21, n. 2, p. 67-74, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Global status report on road safety: time for action** world health organization. Geneva: WHO, 2018.

YAMADA, K. Biological effects of low power laser irradiation on clonal osteoblastic cells (MC3T3-E1). **J Jpn Orthop Assoc.**, v65. p.101-114 , 1991.

YAIOTA, H. *et al.* Expression of bone morphogenetic proteins and rat distalless homolog genes following rat femoral fracture. **J. Bone Miner. Metab.**, v.18, p.63–70, 2000.

YOUNG, S. *et al.* Macrophage responsiveness to light therapy. **Lasers Surg Med.**, v. 9, n. 40, p.497-505, 1989.

ZHANG, D. *et al.* The development of collagen based composite scaffolds for bone regeneration. **Bioact Mater.**, v. 3, p.129–138, 2017.

ANEXO A- DECLARAÇÃO CEUA-UESPI



GOVERNO DO ESTADO DO PIAUÍ
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ - UESPI
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "ESTUDO COMPARATIVO IN VIVO DA REPARAÇÃO ÓSSEA GUIADA COM MEMBRANA BIOLÓGICA DE POLIESTIRENO COM COLÁGENO E NORBIXINA ESTIMULADA COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE, LED E ULTRASSOM". Protocolo número 08649/2016, sob responsabilidade de *Lilian Melo de Miranda Fortaleza*, para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei número 11.794 de 08 de outubro de 2008, Decreto número 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **DEFERIDO**, pela Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA/UESPI) da Universidade Estadual do Piauí.

ESPÉCIE	LINHAGEM	SEXO	IDADE	PESO	VIGÊNCIA DO PROJETO	Nº DE ANIMAIS
RATO HETEROGÊNICO	WISTAR	MACHO	2-3 MESES	250 G	02 ANOS	80

TERESINA, 17 DE OUTUBRO DE 2016

Antônio Luiz Martins Maia Filho

Dr. Antônio Luiz Martins Maia Filho
Coordenador CEUA-UESPI
port. 1347

ANEXO B- ARTIGO 1

Lasers in Medical Science
<https://doi.org/10.1007/s10103-018-2506-9>

ORIGINAL ARTICLE



Evaluation of bone repair after application of a norbixin membrane scaffold with and without laser photobiomodulation (λ 780 nm)

Adrielle Martins Monteiro Alves¹ · Lílian Melo de Miranda Fortaleza¹ · Antonio Luiz Martins Maia Filho² · Danniell Cabral Leão Ferreira² · Charlyton Luis Sena da Costa³ · Vicente Galber Freitas Viana⁴ · José Zilton Lima Verde Santos⁵ · Raurys Alencar de Oliveira⁶ · Gustavo Oliveira de Meira Gusmão⁷ · Luís Eduardo Silva Soares^{1,8}

Received: 1 November 2017 / Accepted: 5 April 2018
 © Springer-Verlag London Ltd., part of Springer Nature 2018

Abstract

Biocompatible membranes are widely used in medicine to stimulate bone repair. Several studies have demonstrated that laser photobiomodulation (PBM) also stimulates osteoblast proliferation and osteogenesis at the fracture site, leading to a greater deposition of bone mass and accelerating the process of bone consolidation. This work assessed the therapeutic effect of 780-nm laser PBM and a polystyrene membrane coated with norbixin and collagen (PSNC) on bone healing in rats with calvarial bone defect. Histological staining, Raman spectroscopy, and scanning electron microscopy (SEM) were used to evaluate the bone repair process. Four experimental treatment groups were compared: C, control; M, membrane only; L, laser PBM only; and ML, membrane + laser PBM. A bone defect was created in the calvaria of each animal, with each group subdivided into two subgroups that underwent euthanasia after 15 and 30 days treatment. The L and ML groups were irradiated ($\lambda = 780$ nm, ED = 6 J/cm², P = 60 mW, t = 4 s) postoperatively on alternate days until they were euthanized. The bone concentration of hydroxyapatite (CHA) showed a clear gradation with increasing phosphate area in the order B (normal cortical bone) > L > M > ML > C for both periods. The PSNC membrane was effective in reducing the inflammatory process and served as a scaffold for bone repair. The laser PBM also showed positive effects on the bone repair process with increased deposition and organization of the newly formed bone. However, laser PBM failed to improve the bioactive properties of the membrane scaffold.

Keywords Bone repair · Biocompatible membrane · Laser photobiomodulation · Raman spectroscopy · Scanning electron microscopy (SEM) · Bone histology

Introduction

Bone defects may occur due to many causes, such as traffic accident traumas, infection, tumor, and fractures in the geriatric population [1, 2]. Bone healing is a complex biological

process that requires specific steps for regeneration involving changes in an array of genes [3]. The reestablishment of bone architecture and functionality depends on correct cell proliferation and deposition of calcium salts to determine the successful regeneration of injured bone tissue [4]. When bone

✉ Luís Eduardo Silva Soares
 lesoares@univap.br

¹ Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, IP&D, Laboratório de Odontologia e Materiais Aplicados, LOMA, Universidade do Vale do Paraíba, UNIVAP, Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, São José dos Campos, SP 12244-000, Brazil

² Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia e Biodiversidade, Universidade Estadual do Piauí, Teresina, PI, Brazil

³ Curso de Farmácia da Faculdade Santo Agostinho, Teresina, PI, Brazil

⁴ Instituto Federal do Piauí, Teresina, PI, Brazil

⁵ Universidade Estadual do Piauí, Teresina, PI, Brazil

⁶ Curso de Fisioterapia, Centro Universitário UNINOVAFAP, Teresina, PI, Brazil

⁷ Departamento de Física, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brazil

⁸ Health Sciences College (FCS), Dentistry Course, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, São Paulo, Brazil

ANEXO C- ARTIGO 2



Raman spectroscopy analysis of bone regeneration in a rat model by implantation of a biocompatible membrane scaffold with and without LED photobiomodulation (λ 945 \pm 20 nm)

L.M. de M. Fortaleza^a, A.M.M. Alves^a, A.L.M. Maia Filho^b, D.C.L. Ferreira^c, C.L.S. Costa^d, V.G. F. Viana^e, J.Z.L.V. Santos^{c,f}, R.A. Oliveira^{c,g}, B.C. Viana^h, G.O.M. Gusmão^{h,i,*}, L.E.S. Soares^{h,i}

^a Laboratory of Dentistry and Applied Materials (LIDAM), Research and Development Institute (SPAD), Universidade do Vale do Paraíba, 13294-000, Brazil
^b Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual do Piauí, 64002-150, Brazil
^c Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal, Universidade Estadual do Ceará, 60714-903, Brazil
^d Coordenação de Física, Faculdade São Agostinho, 64019-625, Brazil
^e Pós-Graduação em Engenharia de Materiais, Instituto Federal do Piauí, 64000-000, Brazil
^f Coordenação de Física, Universidade Estadual do Piauí, 64002-150, Brazil
^g Coordenação de Física, Centro Universitário UNINOVAFAP, 64073-365, Brazil
^h Departamento de Física, Universidade Federal do Piauí (UFPI), 64049-900, Brazil
ⁱ Health Sciences College (FCS), Department of Dentistry, Universidade do Vale do Paraíba, 13294-000, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
 Bone regeneration
 Scaffold
 Raman spectroscopy

ABSTRACT

This study presents additional results of a new polystyrene membrane coated with collagen and norbixin (MPSNC) applied in bone associated or not with light emitting diode (LED) photobiomodulation (PBM) for bone repair. Raman Spectroscopy analysis, which help to detect the amount of hydroxyapatite in the lesion and infer about the mineralization of defect, Scanning Electron Microscopy (SEM) and histological analysis were used to evaluate the bone repair process the rat bone after 15th and 30th days of orthanastasia. The groups studied were divided in control; MPSNC; LED PBM; and MPSNC + LED PBM, respectively identified with the letters C, M, LED, MLED. After 30 days, the defects presented higher deposition of concentration of hydroxyapatite and a more compact and linear bone for LED group. The association between MPSNC and LED did not result in an improvement of the repair because a more exacerbated inflammatory process occurred, thus delaying the bone repair process.

1. Introduction

Tissue healing involve systemic and local responses representing a complex process. When bone tissue loss occurs, it is often, necessary to use supporting methods, including the use of biomaterials [1,2].

The autologous bone is the method more used the bone graft because it has characteristics such as biocompatibility, bone integration as well normal formation of bone tissue [3]. However, their use has disadvantages, such as risk of rejection and infection. Those limitations lead to the need to develop substitute grafts, such as biocompatible membranes from different sources [1].

In order to minimize the complications of two simultaneous surgical procedures, biomaterials have been used instead of autologous bone [3]. These materials to be inserted into the bone must be biocompatible,

bioresorbable, osteoconductive and osteoinductive [4,5].

Biomaterials can be used alone, associated with the use of biocompatible membranes, mixed with an autologous bone graft or photobiomodulated (PBM) with laser and / or light emitting diode (LED). These materials are applied to provide a base structure as a scaffold or stimulate new bone formation. In view of this application, some studies have shown that these grafts respond positively when PBM with an appropriate wavelength of light [5-8].

A polystyrene, collagen and norbixin membrane (MPSNC) was recently used as a scaffold for bone regeneration in calvarial defects of rats. The study revealed that the membrane causes a decrease in inflammation and worked like a scaffold for the bone regeneration process when used isolated. Contrary, when laser PBM was associated with PSNC membrane, there was a high level of inflammatory process

* Corresponding author at: Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual do Piauí, 64002-150, Brazil.
 E-mail addresses: gogusmao@ccn.unepi.br, gogusmao63@gmail.com (G.O.M. Gusmão).

<https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2020.102354>

Received 2 April 2020; Received in revised form 29 August 2020; Accepted 17 September 2020
 Available online 23 September 2020
 0924-6460/ Published by Elsevier B.V.