

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-graduação em Odontologia

Paulo César de Lacerda Dantas

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO ÓXIDO DE GRAFENO
FUNCIONALIZADO COM HIALURONATO DE SÓDIO E AVALIAÇÃO DOS
SEUS EFEITOS NA CICATRIZAÇÃO DE DEFEITOS ÓSSEO EM TÍBIAS DE
RATOS**

DIAMANTINA

2020

Paulo César de Lacerda Dantas

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO ÓXIDO DE GRAFENO
FUNCIONALIZADO COM HIALURONATO DE SÓDIO E AVALIAÇÃO DOS
SEUS EFEITOS NA CICATRIZAÇÃO DE DEFEITOS ÓSSEO EM TÍBIAS DE
RATOS

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte dos requisitos exigidos para o título de Doutor em Odontologia.

Área de concentração: Clínica Odontológica
Linha de Pesquisa: Propriedades físicas, químicas e biológicas dos materiais odontológicos

Orientador: Prof. Dr. Leandro Silva Marques

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Antônio Martins
Júnior

DIAMANTINA

2020

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

D192s

Dantas, Paulo Cesar de Lacerda

Síntese e caracterização do óxido de grafeno funcionalizado com hialuronato de sódio e avaliação dos seus efeitos na cicatrização de defeitos ósseo em tibias de ratos / Paulo Cesar de Lacerda Dantas, 2020.

92 p.: il.

Orientador: Leandro Silva Marques

Coorientador: Paulo Antônio Martins Júnior

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Odontologia) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2020.

1. Hialuronato de Sódio. 2. Engenharia Tecidual. 3. Grafeno. 4. Nanomaterial. 5. Reparo Ósseo. I. Marques, Leandro Silva. II. Martins Júnior, Paulo Antônio. III. Título. VI. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 617.6

Ficha Catalográfica – Sistema de Bibliotecas/UFVJM

Bibliotecária: Viviane Pedrosa – CRB6/2641

PAULO CÉSAR DE LACERDA DANTAS


**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO ÓXIDO DE GRAFENO
FUNCIONALIZADO COM HIALURONATO DE SÓDIO E AVALIAÇÃO DOS
SEUS EFEITOS NA CICATRIZAÇÃO DE DEFEITOS ÓSSEOS EM TÍBIAS DE
RATOS.**


Tese apresentada ao
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA,
nível de DOUTORADO como parte dos
requisitos para obtenção do título de
DOUTOR EM ODONTOLOGIA


Orientador (a): Prof. Dr. Leandro Silva
Marques

Data da aprovação : 02/03/2020

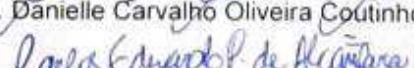

Prof. Dr. Leandro Silva Marques - UFVJM


Prof. Dr. Paulo Antônio Martins Júnior - UFMG


Profa. Dra. Simone Gomes Dias de Oliveira - UFVJM


Prof. Dr. Rodrigo Galo - UFVJM


Profa. Dra. Danielle Carvalho Oliveira Coutinho - UFMG


Prof. Dr. Carlos Eduardo Pinto de Alcântara - UFJF

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Juarez Silva Dantas (*in memorium*) e Maria Ivete de Lacerda Dantas que a mim se dedicaram, com muito empenho e amor. Sempre me incentivando, apoiando-me incondicionalmente e confiando em minhas ações ao longo da minha trajetória de vida! Expresso-lhes minha eterna gratidão e muito obrigado pelo carinho!

À minha esposa Eliane Gomes Botelho de Lacerda Dantas, pelo seu amor, carinho e lealdade! Fosse nos momentos críticos ou não, esteve sempre comigo, a me inspirar, incentivar e a me apoiar para a realização de muitos dos meus sonhos!

À minha irmã, Cláudia Christina de Lacerda Dantas, sempre carinhosa e entusiasta do meu crescimento pessoal e profissional!

Ao Dr. Marcelo Henrique Mascarenhas, pela grande amizade, confiança e valorização profissional!

A todos os meus Mestres e Colegas, os quais me proporcionaram oportunidades de crescimento intelectual e profissional!

AGRADECIMENTOS

A Deus, razão da nossa existência, a minha gratidão por sua presença constante na minha vida, proporcionando-me grandes oportunidades para a minha evolução espiritual!

Ao Professor Dr. Leandro Silva Marques, meu orientador, sempre se dedicando, com competência, a proporcionar uma formação acadêmica de excelência e possibilitando oportunidades para o nosso crescimento profissional. Muito obrigado pelo constante incentivo, apoio, confiança, lealdade e sincera amizade!

Ao Professor Dr. Paulo Antônio Martins-Júnior, meu co-orientador, que sempre se empenhou para que pudéssemos avançar, criteriosamente e com segurança, em cada etapa do nosso trabalho. Muito obrigado pelos valorosos ensinamentos e zelosa dedicação!

Aos professores convidados, membros titulares da "banca examinadora" (Dra. Simone Gomes Dias de Oliveira, Dr. Rodrigo Galo, Dra. Danielle Carvalho Oliveira Coutinho, Dr. Carlos Eduardo Pinto de Alcântara) e suplentes (Dr José Cristiano Ramos Glória e Dr. Marcos Augusto de Sá), que aceitaram e gentilmente, se dispuseram a compartilhar os seus conhecimentos científicos para o aprimoramento do nosso trabalho!

Aos Colegas das disciplinas de cirurgia, os Professores Dr. Cássio Roberto Rocha dos Santos, Dr. Saulo Gabriel Moreira Falci e Dr. Rafael Alvim Magesty que, durante o meu afastamento para cursar o doutorado, assumiram as minhas atividades acadêmicas e supriram a minha ausência!

Ao Professor Dr. João Luiz de Miranda, pela valorosa contribuição na interpretação dos resultados histoquímicos e imunohistoquímicos!

À Professora Dra. Flaviana Dornela Verli que, gentilmente, nos cedeu lâminas silanizadas para os nossos experimentos!

Ao Técnico de Laboratório Leonardo da Cunha Monteiro, pela constante disponibilidade, dedicação e grande auxílio na realização dos experimentos histológicos!

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia (PPGODONTO) da UFVJM, pela oportunidade de aprimoramento científico e obtenção do título de "Doutor", permitindo, assim, que eu possa melhor contribuir com os meus Colegas e com a formação acadêmica de futuros profissionais da odontologia!

Aos Colegas do PPGODONTO, pela amizade, colaboração e convívio harmonioso ao longo do curso!

À Secretária do PPGODONTO, Gislene Alessandra Santos, pela eficiência no desempenho das suas funções. Sempre gentil, disponível, dedicada e procurando amenizar as nossas dificuldades! Obrigado pelo carinho e amizade!

Aos Professores e demais Servidores Públicos integrantes do Departamento de Odontologia da FCBS/UFVJM, que nos proporcionam um ambiente de trabalho propício ao aprendizado acadêmico, desenvolvimento científico e prestação de serviços à população que recorre à esta renomada Instituição de Ensino!

Aos Colegas da UFMG: Dr. Anderson José Ferreira, Dr. Marcos Augusto de Sá, Dr. Celso Martins Queiroz-Junior, Dra. Vanessa Andrade Barbosa (Departamento de Morfologia/ ICB); Dra. Thalita Marcolan Valverde (Departamento de Bioquímica e Imunologia/ ICB); Dra. Tatiane Cristina Silva Almeida (Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear); Dr. Luiz Orlando Ladeira (Centro de Tecnologia e Nanomateriais e Grafeno); Dr. Alfredo Miranda de Góes e Erick de Souza Ávila (Departamento de Física/ ICEX); cada um, contribuindo de uma maneira singular para a concretização do nosso trabalho. Recebam, todos, os meus sinceros agradecimentos pela gentileza da sua disponibilidade e inestimável colaboração!

Aos colegas do Laboratório de Caracterização e Processamento de Nanomateriais (LCPNano) e do Laboratório de Cristalografia (LabCri), ambos do Departamento de Física da UFMG que, gentilmente, realizaram as caracterizações dos biomateriais.

A todos que, direta ou indiretamente, participaram e contribuíram com a minha trajetória acadêmica e profissional! Minha gratidão!

RESUMO

Este estudo teve como objetivo sintetizar e caracterizar um nanohíbrido composto pelo óxido de grafeno (OG) funcionalizado com hialuronato de sódio (HY) (OG-HY), avaliar sua viabilidade celular *in vitro* e seu potencial osteogênico *in vivo*. O HY, o OG e o OG-HY foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de Raman, termogravimetria, infra-vermelho e difração de raios-X. Estudo *in vitro* foi realizado com os biomateriais em diferentes concentrações, nos períodos de 48 e 72 horas, para avaliar a viabilidade celular de células MC3T3-E1 e a atividade da fosfatase alcalina, por meio dos ensaios usando 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) e do kit de bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP), sal de nitro-blue tetrazólio (NBT), respectivamente. No estudo *in vivo*, os grupos experimentais foram: Controle (coágulo), HY 1%, OG (50, 100 e 200 µg/mL) e OG-HY (50, 100 e 200 µg/mL) e a unidade amostral foi um "defeito ósseo" criado em cada tibia de ratos Wistar. Os "defeitos ósseos" criados foram preenchidos, aleatoriamente, por coágulo e pelos demais biomateriais. O cálculo amostral determinou um n=5 para cada grupo experimental e portanto, foram utilizados 40 animais. Após 7 e 14 dias dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram eutanasiados e análises histomorfométricas foram realizadas para avaliar a capacidade osteogênica dos biomateriais. A expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) foi avaliada por imunohistoquímica. As caracterizações dos biomateriais constataram a formação do nanohíbrido (OG-HY), representado pela funcionalização do OG com HY e concentração de 5 µg/mL do OG-HY não alterou a viabilidade das células MC3T3-E1 nem estimularam a atividade da fosfatase alcalina ($p > 0,05$). Após 7 dias de cirurgia, o OG-HY a 100 µg/mL foi capaz de acelerar significativamente o reparo ósseo em tibias de ratos, quando comparado ao grupo controle ($p < 0,001$) e foi possível observar uma expressão de VEGF significativamente menor, também, quando comparado ao controle ($p = 0,0223$). Esses achados mostraram que o nanohíbrido OG-HY foi capaz de acelerar a cicatrização óssea *in vivo* e sugerem este nanomaterial como candidato para aplicações em engenharia tecidual óssea.

Palavras-chave: Hialuronato de sódio. Engenharia tecidual. Grafeno. Nanomaterial. Reparo ósseo.

ABSTRACT

This study aimed to synthesize and characterize a nanohybrid composed of graphene oxide (OG) functionalized with sodium hyaluronate (HY) (OG-HY), to evaluate its cell viability *in vitro* and its osteogenic potential *in vivo*. HY, OG and OG-HY were characterized by scanning electron microscopy (SEM), Raman spectroscopy, thermogravimetry, infrared and X-ray diffraction. *In vitro* study was carried out with biomaterials in different concentrations, in the periods of 48 and 72 hours, to evaluate the cell viability of MC3T3-E1 cells and the activity of alkaline phosphatase, through the tests using 3-(4,5-dimethylthiazole -2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) and the bromine-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) kit, nitro-blue tetrazolium salt (NBT), respectively. In the *in vivo* study, the experimental groups were: Control (clot), HY 1%, OG (50, 100 and 200 $\mu\text{g} / \text{mL}$) and OG-HY (50, 100 and 200 $\mu\text{g} / \text{mL}$) and the sample unit was a "bone defect" created in each tibia of Wistar rats. The "bone defects" created were filled, randomly, by clot and other biomaterials. The sample calculation determined an $n = 5$ for each experimental group and therefore, 40 animals were used. After 7 and 14 days of the surgical procedures, the animals were euthanized and histomorphometric analyzes were performed to assess the osteogenic capacity of the biomaterials. The expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) was evaluated by immunohistochemistry. The characterizations of biomaterials confirmed the formation of the nanohybrid (OG-HY), represented by the functionalization of OG with HY and a concentration of 5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ of OG-HY, did not alter the viability of MC3T3-E1 cells nor did they stimulate the activity of alkaline phosphatase ($p > 0.05$). After 7 days of surgery, OG-HY at 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ was able to significantly accelerate bone repair in tibiae of rats, when compared to the control group ($p < 0.001$) and it was possible to observe a significantly lower VEGF expression, too, when compared to the control ($p = 0.0223$). These findings showed that the OG-HY nanohybrid was able to accelerate bone healing *in vivo* and suggest this nanomaterial as a candidate for applications in bone tissue engineering.

Keywords: Sodium hyaluronate. Tissue engineering. Graphene. Nanomaterial. Bone repair.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

DAS CONSIDERAÇÕES INICIAIS

- Figura 1 - Estrutura do hialuronato de sódio contendo repetidas unidades dissacarídicas de ácido *D*-glucurônico e de *N*-acetilglicosamina 18
- Figura 2 - Mãe de todas as formas de grafite. O grafeno é um material de construção 2D para materiais de carbono de todas as outras dimensionalidades. Ele pode ser apresentado em forma de “gaiolas” (fulereno), tubos (nanotubos) e folhas (grafeno) 20
- Figura 3 - Método para obtenção do Grafeno e seus derivados 21

DO ARTIGO CIENTÍFICO

- Figura 1 - Os biomateriais em suas apresentações: A- HY 1% (gel), B- OG e OG-HY (pós), C- Carbopol (gel inerte para veiculização dos biomateriais) e D- OG e OG-HY (géis nas concentrações de 50, 100 e 200 µg/mL, respectivamente) acondicionados em seringas para preenchimento dos defeitos ósseos 51
- Figura 2 - Sequencia dos procedimentos cirúrgicos: A- incisão longitudinal na região da crista da tíbia, após tricotomia da região a ser operada e aposição de campo cirúrgico; B- perfuração e transfixação da tíbia em sua face lateral, utilizando broca helicoidal acoplada em contra-ângulo cirúrgico e sob irrigação constante com soro fisiológico 0,9% resfriado; C- defeito ósseo confeccionado com 1,6 mm de diâmetro; D- inserção do biomaterial no defeito ósseo, com auxílio de seringa e agulha; E e F- tecidos reposicionados e suturados com fio de nylon (nº 4-0, agulhado) 52
- Figura 3 - Contra-ângulo cirúrgico (CONCEPT; redução 1:16) acoplado a motor cirúrgico (BLM 600), programado com 1200 rpm e torque de 30 N, para a confecção dos defeitos ósseos 53

Figura 4 - Sequencia dos procedimentos para remoção imediata das tíbias após eutanásia dos animais, nos periodos de 7 e 14 dias de pós-operatório: A- dissecação cuidadosa dos tecidos moles, B- retirada da tíbia e visualização do defeito ósseo, C- cabeça da tíbia mantida para referência no processo de inclusão em parafina D- recipiente (tubo Falcon) devidamente identificado e contendo formalina neutra tampada (FNT) 10% para fixação da tíbia, por 48 h, em temperatura ambiente 54

Figura 5 - Tíbia posicionada no molde para o processo de inclusão em parafina: a face plana (medial) da tíbia era sempre voltada para baixo e apoiada, paralelamente, no fundo do molde. A cabeça da tíbia era preservada e uma porção da parte distal (inferior) da tíbia era seccionada (mantendo margem de segurança de aproximadamente 2 a 3 mm do "defeito ósseo" 55

Figura 6 - Imagens real e binária de um "defeito ósseo" reconstruído no programa Microsoft PowerPoint®. A - imagem real da área total do defeito ósseo com sequencia (setas amarelas) para captura dos campos (trajetória em "S"); B - imagem binária da área real total do "defeito ósseo", delimitada; C - primeira imagem real focada no canto superior direito do "defeito ósseo". D - imagem binária do primeiro campo selecionado e delimitada, para análise pelo ImageJ® 56

Figura 7 - Valores representativos dos campos avaliados em uma determinada lâmina (amostra), exemplificando a obtenção do valor final (59,79442 %) de trabéculas formadas dentro da área total delimitada do "defeito ósseo" criado em tíbia de rato Wistar..... 57

Figura 8 - Fotomicrografias realizadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) (JEOL JSM 6360LV, com aceleração de 15Kv, aumento de 2000 vezes e distância de trabalho entre 11,8 e 12mm) para análise morfológica dos compostos OG, HY e OG-HY, caracterizando as suas superfícies 58

Figura 9 - Caracterização do OG, HY e nanohíbrido (OG-HY) por: (A) Espectroscopia Raman, apresentando os picos/bandas características dos compostos HY (796-1654 cm⁻¹ e 2700-3000 cm⁻¹), OG (1350 cm⁻¹ e 1590 cm⁻¹) e nanohíbrido (OG-HY) (pico

correspondente ao estiramento CH do HY; bandas D, G e 2D, característica de materiais grafíticos); (B) Análise termogravimétrica, apresentando as variações das massas dos compostos; (C) Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), revelando diferenças de espectros entre os compostos; (D) Medidas de difração de raios-X, evidenciando as características cristalográficas dos compostos 59

Figura 10 - Quantificação da viabilidade das células MC3T3-E1 cultivadas na presença dos biomateriais OG, HY e OG-HY, nos períodos de 48 e 72 horas, nas concentrações de 5 µg/mL (A), 10 µg/mL (B), 25 µg/mL (C), 50 µg/mL (D), 100 µg/mL (E) e 200 µg/mL (F). Os dados estão expressos com média ± EPM. * vs controle (p<0,05). One-way ANOVA seguido pelo teste post hoc de Tukey..... 60

Figura 11 - Avaliação da fosfatase alcalina nos períodos de 3 e 7 dias, comparando-se o grupo controle com os grupos OG, OG-HY e HY, em concentrações de 5 µg/mL (A) e 10 µg/mL (B). Os dados estão expressos com média ± EPM. * vs controle (p<0,05) 61

Figura 12 - Fotomicrografias (aumentos de 40 e 200x) representativas de defeitos ósseos (cortes de 5µm de espessura), 7 dias após os procedimentos cirúrgicos e coradas em Tricrômico de Masson. A e B (controle - coágulo sanguíneo: CTRL), C e D (HY 1%), E e F (OG 50 µg/mL) e G e H (OG-HY 50 µg/mL). Asteriscos: áreas centrais dos defeitos ósseos com tecido de granulação; Setas amarelas: trabéculas ósseas; Setas brancas: espaços intertrabeculares; Setas vermelhas: vasos sanguíneos. Barras A, C, E, G = 300 µm; B, D, F, H = 60µm 62

Figura 13 - Fotomicrografias (aumentos de 40 e 200x) representativas de defeitos ósseos (cortes de 5µm de espessura), 7 dias após os procedimentos cirúrgicos e coradas em Tricrômico de Masson. A e B (controle - coágulo sanguíneo: CTRL), C e D (HY 1%), E e F (OG 100 µg/mL) e G e H (OG-HY 100 µg/mL). Asteriscos: áreas centrais dos defeitos ósseos com tecido de granulação; Setas amarelas: trabéculas ósseas; Setas brancas: espaços intertrabeculares; Setas vermelhas: vasos sanguíneos. Barras A, C, E, G = 300 µm; B, D, F, H = 60 µm 63

Figura 14 - Fotomicrografias (aumentos de 40 e 200x) representativas de defeitos ósseos (cortes de 5µm de espessura), 7 dias após os procedimentos cirúrgicos e coradas em Tricrômico de Masson. A e B (controle - coágulo sanguíneo: CTRL), C e D (HY 1%), E e F (OG 200 µg/mL) e G e H (OG-HY 200 µg/mL). Asteriscos: áreas centrais dos defeitos ósseos com tecido de granulação; Setas amarelas: trabéculas ósseas; Setas brancas: espaços intertrabeculares; Setas vermelhas: vasos sanguíneos. Barras A, C, E, G = 300 µm; B, D, F, H = 60 µm 64

Figura 15 - Fotomicrografias (aumentos de 40 e 200x) representativas de defeitos ósseos (cortes de 5µm de espessura), 14 dias após os procedimentos cirúrgicos e coradas em Tricrômico de Masson. A e B (controle - coágulo sanguíneo: CTRL), C e D (HY 1%), E e F (OG 100 µg/mL) e G e H (OG-HY 100 µg/mL). Setas amarelas: trabéculas ósseas; Setas brancas: espaços intertrabeculares; Setas vermelhas: vasos sanguíneos. Barras A, C, E, G = 300 µm; B, D, F, H = 60 µm 65

Figura 16 - Análise morfométrica que avalia a neoformação óssea, 7 dias após procedimentos cirúrgicos. Os defeitos ósseos foram preenchidos com coágulo sanguíneo (controle), HY 1% e diferentes concentrações de OG (50, 100 e 200 µg/ mL) e de OG-HY (50, 100 e 200 µg/mL). Os dados estão expressos com média ± EPM. * vs controle (p<0,05) 66

Figura 17 - Fotomicrografias (aumentos de 40 e 100x) representativas da avaliação imunohistoquímica da expressão do VEGF em defeitos ósseos (cortes de 5µm de espessura), 7 dias após os procedimentos cirúrgicos. A e B (controle negativo: CTRL-N), C e D (controle - coágulo sanguíneo: CTRL), E e F (HY 1%), G e H (OG 100 µg/mL) e I e J (OG-HY 100 µg/mL). Asterisco: marcação de fundo; Setas amarelas: imunoexpressão do VEGF em trabéculas ósseas; Setas vermelhas: imunoexpressão do VEGF em tecido não mineralizado. Barras A, C, E, G, I = 300 µm; B, D, F, H, J = 50 µm..... 67

Figura 18 - Avaliação da expressão de VEGF nos defeitos ósseos, 7 dias após os procedimentos cirúrgicos, preenchidos com HY 1%, OG 100 µg/mL e OG-HY 100 µg/mL. Os dados estão expressos com média ± EPM. * vs controle (p<0,05) 68

LISTA DE SIGLAS

BCIP - Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato

BMP-2 - Proteína morfogenética do osso tipo 2

DAB - 3,3'- diaminobenzidina

DRX - Difração de raios-X

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EPC - Células progenitoras endoteliais

FA - Fosfatase alcalina

FBS - Soro bovino fetal

FNT - Formalina neutra tamponada

FTIR - Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

GAG - Glicosaminaglicana

HSC - Células-tronco hematopoiéticas

HY - Hialuronato de sódio

ICB - Instituto de Ciências Biológicas

ICEX - Instituto de Ciências Exatas

MEC - Matriz extracelular

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

MSC - Células-tronco mesenquimais

MTT - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheyl-2H-tetrazolium bromide

NBT - Nitro-blue tetrazólio

OG - Óxido de grafeno

OG-HY - Óxido de grafeno funcionalizado com Hialuronato de sódio

OGr - Óxido de grafeno reduzido

PBS - Solução tampão fosfato

PVPI - Iodo com polivilpirrolidona

SDS - Dodecil sulfato de sódio

TG - Termogravimetria

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

UFVJM - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

VEGF - Fator de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	16
1.1 Tecido ósseo	16
1.2 Defeitos ósseos	17
1.3 Hialuronato de sódio.....	18
1.4 Grafeno e Óxido de grafeno	19
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos	23
3 ARTIGO CIENTÍFICO	24
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
REFERÊNCIAS	70
ANEXO A - NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA LIFE SCIENSES	74
NEXO B - PARCER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS	91

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1.1 Tecido ósseo

O osso é um órgão complexo com numerosas funções, tais como: hematopoiese, regulação e armazenamento de minerais essenciais, proteção de órgãos vitais, facilitação da locomoção, entre outros (LOI *et al.*, 2016). É um tecido conjuntivo composto por 35% de parte orgânica, principalmente colágeno do tipo I e 65% de parte inorgânica, em sua maioria fosfato de cálcio sob a forma de cristais de hidroxiapatita, e possui uma matriz extracelular (MEC) mineralizada (KALFAS, 2001). A medula óssea contém uma mistura complexa de tipos de células, incluindo células-tronco hematopoiéticas (HSC), que formam o sistema sanguíneo; células-tronco mesenquimais (MSC), que formam tecidos conjuntivos; células progenitoras endoteliais (EPC), que formam o sistema vascular, plaquetas, glóbulos vermelhos e leucócitos (KING *et al.*, 2018).

Os principais componentes celulares do tecido ósseo são os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos. Os osteoblastos são células diferenciadas (HAYER *et al.*, 2005), responsáveis por sintetizar os componentes orgânicos da matriz óssea, tais como: colágeno do tipo I, proteoglicanos e glicoproteínas (SUDA *et al.*, 1999). À medida que sintetizam a matriz óssea, muitos acabam sendo aprisionados pela matriz, sofrendo apoptose ou diferenciando-se em osteócitos. Os osteócitos constituem mais de 90% das células do osso maduro (TATE *et al.*, 2004), possuem atividade sintética e secretora reduzida comparados aos osteoblastos, mas desempenham um papel central na determinação e manutenção de estrutura óssea (MIKUNITAKAGAKI, 1999; KAMIOKA *et al.*, 2001; HAN *et al.*, 2004; HOLMBECK *et al.*, 2005). Por fim, os osteoclastos são células derivadas dos monócitos circulantes, que se fundem na matriz óssea, formando uma célula gigante multinucleada, em um processo denominado osteoclastogênese (KHAN *et al.*, 2013). Os osteoclastos são células especializadas na reabsorção óssea e são encontrados nas zonas de reabsorção da matriz óssea, chamadas de lacunas de *Howship* (SÁNCHEZ-DUFFHUES *et al.*, 2015).

O tecido ósseo possui uma estrutura altamente dinâmica (BUENZLI e SIMS, 2015). A arquitetura tridimensional do tecido ósseo permite a interação de células e grandes quantidades de moléculas, em especial as proteínas, criando um microambiente complexo (MATTIOLI-BELMONTE *et al.*, 2012). O constante remodelamento ou *turnover* ósseo

permite que o tecido ósseo consiga se auto-reparar após pequenas fraturas, bem como adaptar-se às forças aplicadas sobre ele (DATTA *et al.*, 2008).

1.2 Defeitos ósseos

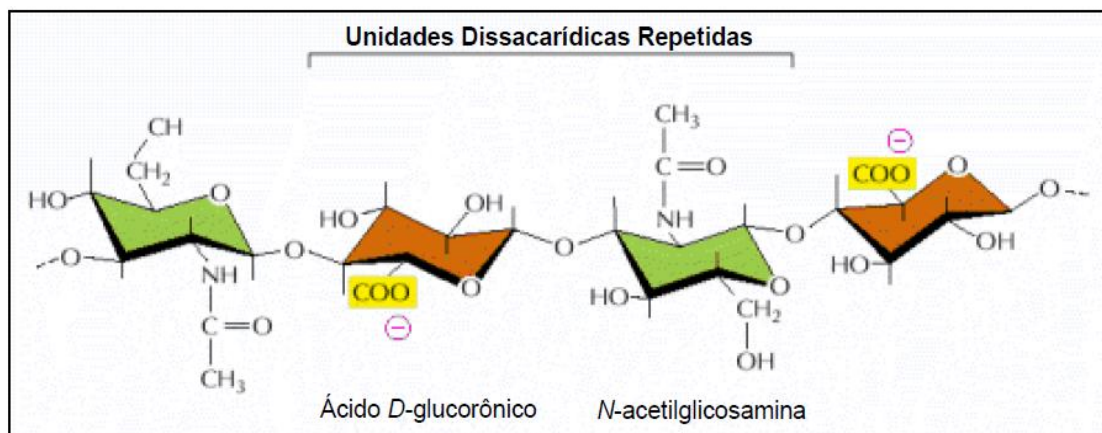
A cicatrização de um defeito ósseo é um mecanismo primário de sobrevivência, perfeitamente ajustada ao coágulo de fibrina formado inicialmente. O reparo de cavidades ósseas pode ser, morfologicamente, dividido em três fases: exsudativa (caracterizada pela formação do coágulo de fibrina), proliferativa (marcada pela proliferação fibroblástica e capilar) e reparadora (com síntese de colágeno e ossificação) (ALVES-REZENDE *et al.*, 2009). Na remodelação óssea ocorre um equilíbrio entre a atividade dos osteoclastos e osteoblastos. Os osteoblastos totalmente maturados são caracterizados por sua capacidade de sintetizar osteóide (fase orgânica da matriz óssea). Este osteóide torna-se mineralizado pela formação de cristais de hidroxiapatita. Como um osteoblasto torna-se cercado por sua própria matriz, ele se diferencia, terminalmente, em um osteócito e desempenha um papel central na comunicação celular e na regulação da remodelação óssea. Caso contrário, um osteoblasto maduro torna-se uma célula de revestimento ou sofre apoptose (MIRON e ZHANG, 2012).

Em casos de defeitos ósseos maiores, a utilização de enxertos é uma alternativa viável para permitir uma reconstrução óssea adequada, sendo que tecidos do próprio indivíduo (autógenos); de outro indivíduo da mesma espécie (alógenos); de indivíduos de outra espécie (xenógenos) ou compostos sintéticos (aloplásticos) podem ser utilizados, isoladamente ou em combinação e em diferentes proporções (GAPSKI *et al.*, 2006). O osso autógeno é atualmente considerado o "padrão ouro" para enxertia, pois é histocompatível e não imunogênico, combinando todas as propriedades necessárias em um material de enxerto ósseo: osteogênese (células osteoprogenitoras), osteoindução (proteínas morfogenéticas ósseas e outros fatores de crescimento) e osteocondução (arcabouço) (MACNEILL *et al.*, 1999). No entanto, além de representar um procedimento cirúrgico adicional para a remoção do enxerto, podendo apresentar desconforto e complicações para o paciente, o enxerto ósseo autógeno tem desvantagens de restrições quantitativas e custos substanciais (DIMITRIOU *et al.*, 2011). Dentre os substitutos ósseos, os materiais sintéticos ou aloplásticos destacam-se pela grande disponibilidade e por dispensarem o procedimento cirúrgico de um sítio doador (JARDIM *et al.*, 2009).

1.3 Hialuronato de sódio

O hialuronato de sódio (HY) foi isolado, inicialmente, em 1934 (MEYER e PALMER, 1934), mas teve sua estrutura primária descrita em 1955 (LINKER *et al.*, 1955). É uma glicosamingoliana (GAG) de alto peso molecular (10^4 - 10^7 Da) composta de repetidas unidades dissacarídicas não-sulfatadas de ácido *D*-glucorônico e *N*-acetilglicosamina (MOSELEY *et al.*, 2002; PRINCE, 2004) (FIG. 1), representando uma estrutura helicoidal, unida por ligações de pontes de hidrogênio, apresentando grupos carboxílicos na face externa da hélice (TOOLE, 2004). Comercialmente, o HY em sua fórmula solúvel $[(C_{14}H_{20}NNaO_{11})_n.Na]$ apresenta-se como gel (ASLAN *et al.*, 2006; ANDRADE, 2012). Em solução, os grupos carboxil aniônicos da sua estrutura se repelem, resultando em grande expansão volumétrica do polímero (TOOLE, 2004).

Figura 1 - Estrutura do hialuronato de sódio contendo repetidas unidades dissacarídicas de ácido *D*-glucorônico e de *N*-acetilglicosamina.



Fonte: Alberts *et al.* (2004).

Diversos estudos têm mostrado que HY atua como uma molécula sinalizadora, estimulando migração, adesão e proliferação de células mesenquimais indiferenciadas, bem como induzindo a diferenciação dessas células em osteoblastos (ASLAN *et al.*, 2006; DECHERT *et al.*, 2006; DAVID-RAOUDI *et al.*, 2008; PASQUINELLI *et al.*, 2008). Durante os processos de reparo ósseo, o HY pode atuar na retenção de fatores de crescimento osteoindutores dentro do microambiente local, em virtude de suas propriedades físico-químicas (SASAKI e WATANABE, 1995), além de mediar a adesão de osteoclastos à superfície óssea (PRINCE, 2004), acelerar a revascularização (GIAVARESI *et al.*, 2005) e a

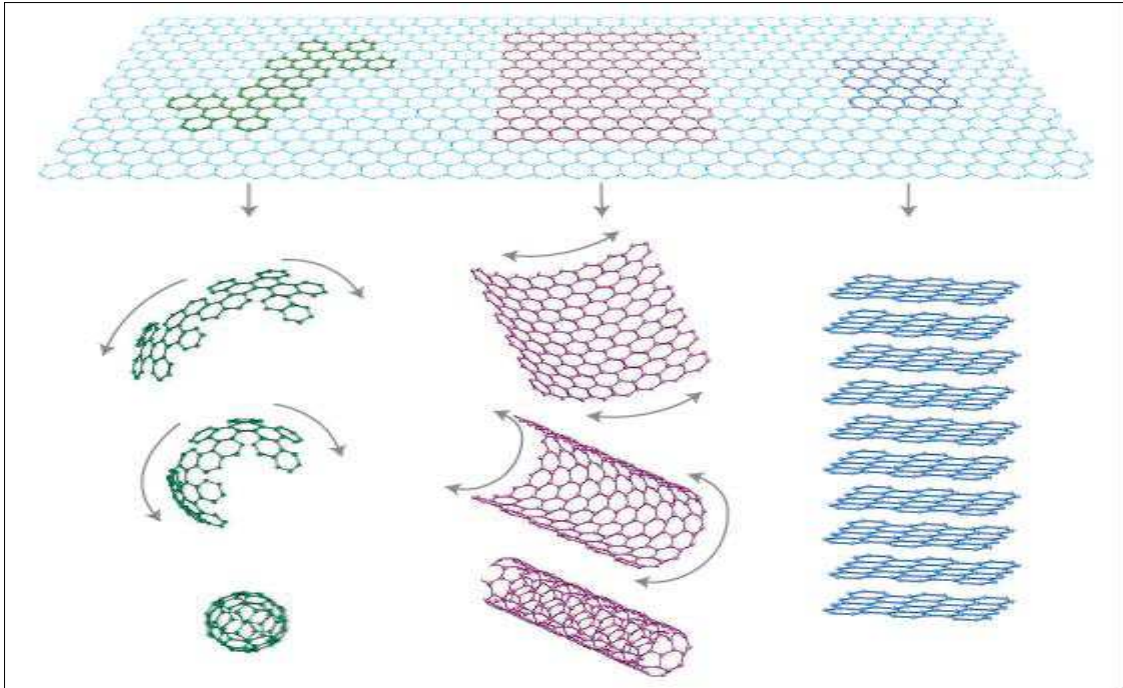
formação óssea *in vitro* (SASAKI e WATANABE, 1995; PILLONI e BERNARD, 1998). Um estudo mostrou que o HY acelerou o processo de reparo ósseo em alvéolos dentários de ratos por meio da estimulação da expressão de BMP-2 e osteopontina (MENDES *et al.*, 2008).

1.4 Grafeno e Óxido de Grafeno

Os nanomateriais podem ser definidos como partículas que apresentam, pelo menos, uma dimensão espacial, possuindo escala nanométrica de 1 a 100 nm, onde 1 nanômetro é um bilionésimo de metro (cerca de mil vezes menor que um glóbulo vermelho), podendo assumir estruturas diferentes, além de formar agregados ou aglomerados. Dentre os nanocompostos mais estudados estão os nanomateriais de carbono, que incluem os fulerenos (C₆₀, C₇₀ e C₈₄), os nanotubos e o grafeno (LOBATO, 2013).

O grafeno é uma monocamada plana de átomos de carbono hibridizados com ligações do tipo sp², formando uma nanoestrutura bidimensional (2D), em favo de mel de anéis de seis membros, semelhante a uma folha (*nanosheets*). Funciona como um bloco de construção, básico, para materiais de carbono, grafite, de todas as outras disposições geométricas. A espessura relatada de grafeno em monocamada é geralmente superior a 0,34 nm devido à existência de grupos funcionais em toda a superfície do grafeno (GEIM e NOVOSELOV, 2007; LOBATO, 2013; MEHRALI *et al.*, 2014; RAUCCI *et al.*, 2016; REN *et al.*, 2018) (FIG. 2).

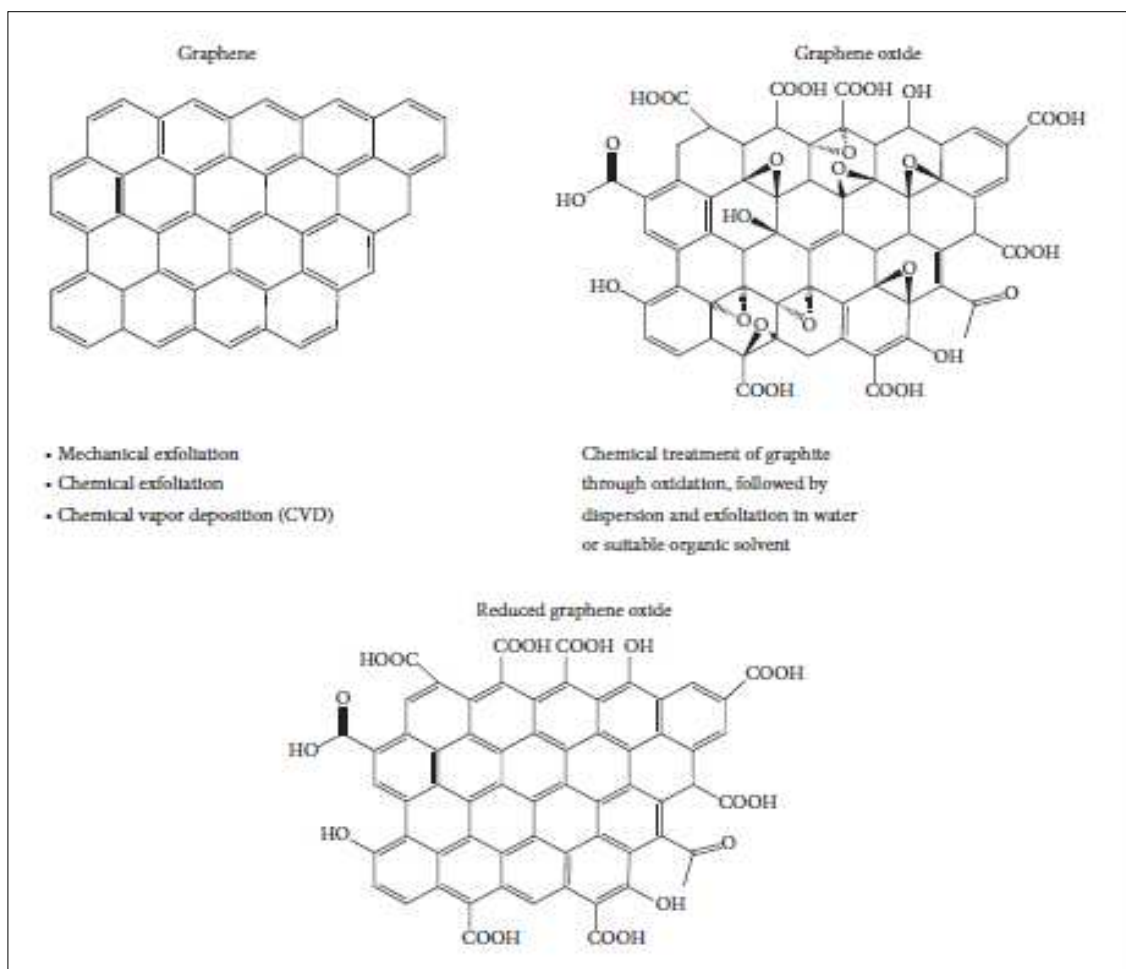
Figura 2 - Mãe de todas as formas de grafite. O grafeno é um material de construção 2D para materiais de carbono de todas as outras dimensionalidades. Ele pode ser apresentado em forma de “gaiolas” (fulereno), tubos (nanotubos) e folhas (grafeno).



Fonte: Geim e Novoselov (2007).

Materiais relacionados com grafeno podem ser classificados com base em número de camadas (por exemplo, o grafeno mono ou multi camadas) ou pela sua modificação química, tais como óxido de grafeno (OG) ou OG reduzido (OGr) (DUBEY *et al.*, 2015) (FIG. 3). O grafeno exibe hidrofobicidade e forma facilmente aglomerados de forma irreversível ou até mesmo restos para formar grafite via interações de van der Waals em soluções aquosas, sendo difícil a sua dispersão em água (REN *et al.*, 2018).

Figura 3 - Método para obtenção do Grafeno e seus derivados.



Fonte: Dubey *et al.* (2015).

O OG consiste em átomos de C, O e H, possuindo muitos grupos funcionais hidrofílicos, incluindo grupos hidroxila, carboxila e epóxi. É comumente sintetizado pelos métodos de Hummers modificados e pode ser considerado como um precursor para a síntese de grafeno/óxido de grafeno reduzido (OGr), por processos de redução química ou térmica. O OG apresenta-se como flocos de formato irregular, compostos por uma ou mais camadas de folhas de grafeno, com abundantes grupos funcionais contendo oxigênio (MOHAMMADREZAEI *et al.*, 2018; REN *et al.*, 2018). Os valores de pH afetam as propriedades físico-químicas do OG, especialmente o grau de ionização dos grupos funcionais contendo oxigênio nas superfícies do OG, de modo que a estabilidade do OG na água é dependente do pH. O OG precipita a $\text{pH} < 3$ e fica estável na faixa de pH 3 a 10. Isso foi atribuído à abertura / fechamento reversível do anel de epóxido no plano basal do OG, com acionamento por pH (REN *et al.*, 2018).

A presença abundante de grupos epóxido, hidroxilo e carbonilo no plano basal do OG desempenha um papel importante na ancoragem de íons cálcio e pode proporcionar sítios reativos para enormes interações químicas. As elevadas propriedades mecânicas obtidas em um estado reduzido (alta temperatura, envelhecimento ou tratamento químico), a alta hidrofiliabilidade e a boa biocompatibilidade de folhas de OG, sugerem que este nanomaterial poderia ser um material de reforço ideal e promissor nos biocompósitos, reforçando a ligação interfacial nos compósitos e a sua bioatividade (RAUCCI *et al.*, 2016).

O grafeno e seus derivados são materiais interessantes para aplicações biomédicas, uma vez que o carbono é a base da química orgânica (DUBEY *et al.*, 2015). Devido à sua área superficial extremamente grande, boa biocompatibilidade, bioestabilidade, facilidade de funcionalização química, excelente processabilidade aquosa, anfifilicidade e baixo custo, folhas de grafeno têm sido aplicadas em diferentes biotecnologias, tais como, biosensoriamento, sistema de *drug delivery*, imagiologia celular, tratamento de câncer, materiais antivirais, engenharia tecidual e inibidoras de bactérias (MEHRALI *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2015).

O grafeno e o OG podem aumentar a osteogênese das células-tronco para aplicações em tecido ósseo. Nesse sentido, foi demonstrado que o OG funcionalizado por amina exibiu o efeito mais significativo no aumento da proliferação e osteogênese de células mesenquimais, o que foi atribuído ao efeito sinergia de grupos funcionais contendo oxigênio e grupos amina, permitindo uma resposta de células-tronco (SHANG *et al.*, 2019).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

- Sintetizar e caracterizar um nanohíbrido composto pelo OG funcionalizado com HY (OG-HY) e avaliar sua citotoxicidade em cultura de osteoblastos, bem como a sua capacidade osteogênica, em "defeitos ósseos" criados em tíbia de ratos Wistar.

2.2 Objetivos específicos:

- Caracterizar o OG, o HY e o OG-HY e analisar as suas características e estruturas;
- Confirmar a funcionalização do OG pelo HY e avaliar a estabilidade da associação entre o OG e o HY;
- Determinar a concentração ideal de OG e de OG-HY a serem utilizadas;
- Analisar a viabilidade celular, bem como a atividade da fosfatase alcalina em cultura celular de osteoblastos cultivados na presença de OG, HY e OG-HY;
- Avaliar, histologicamente, o processo de reparo ósseo nos períodos de 7 e 14 dias, em "defeitos ósseos" tratados, previamente, com OG, HY e OG-HY;
- Avaliar, morfometricamente, o processo de reparo ósseo no período de 7 dias, em "defeitos ósseos" tratados, previamente, com OG, HY e OG-HY e constatar o percentual de trabéculas ósseas neoformadas;
- Avaliar, imunohistoquimicamente, a expressão de VEGF no período de 7 dias, em "defeitos ósseos" tratados, previamente, com OG, HY e OG-HY.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo a ser submetido à **Life Sciences**

Editor-chefe: L. E. Wold

Fator de impacto: 3.448

Normas de publicação (ANEXO A)

Óxido de grafeno funcionalizado com ácido hialurônico: caracterização, citotoxicidade e capacidade osteogênica

Paulo César de Lacerda Dantas¹, Paulo Antônio Martins-Júnior², Leandro Silva Marques¹

¹Faculdade de Odontologia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, MG, Brasil

²Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

Autor correspondente:

Leandro Silva Marques, PhD

Arraial dos Forros, 215, Centro Diamantina, MG, Brasil

CEP: 39.100-000

E-mail: lsmarques.prof@gmail.com

Justificativa para a participação de cada autor

Paulo César de Lacerda Dantas: Participou da aquisição, análise, interpretação dos dados, redigiu o manuscrito, aprovou a versão final do manuscrito e concordou em ser responsável por todos os aspectos do trabalho.

Paulo Antônio Martins-Júnior: Participou da concepção do trabalho, revisou criticamente o manuscrito, aprovou a versão final do manuscrito e concordou em ser responsável por todos os aspectos do trabalho.

Leandro Silva Marques: Participou da concepção do trabalho, revisou criticamente o manuscrito, aprovou a versão final do manuscrito e concordou em ser responsável por todos os aspectos do trabalho.

RESUMO

Este estudo teve como objetivo sintetizar e caracterizar um nanohíbrido composto pelo óxido de grafeno (OG) funcionalizado com hialuronato de sódio (HY) (OG-HY), avaliar sua viabilidade celular *in vitro* e seu potencial osteogênico *in vivo*. O HY, o OG e o OG-HY foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de Raman, termogravimetria, infra-vermelho e difração de raios-X. Estudo *in vitro* foi realizado com os biomateriais em diferentes concentrações, nos períodos de 48 e 72 horas, para avaliar a viabilidade celular de células MC3T3-E1 e a atividade da fosfatase alcalina, por meio dos ensaios usando 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) e do kit de bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP), sal de nitro-blue tetrazólio (NBT), respectivamente. No estudo *in vivo*, os grupos experimentais foram: Controle (coágulo), HY 1%, OG (50, 100 e 200 µg/mL) e OG-HY (50, 100 e 200 µg/mL) e a unidade amostral foi um "defeito ósseo" criado em cada tíbia de ratos Wistar. Os "defeitos ósseos" criados foram preenchidos, aleatoriamente, por coágulo e pelos demais biomateriais. O cálculo amostral determinou um n=5 para cada grupo experimental e portanto, foram utilizados 40 animais. Após 7 e 14 dias dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram eutanasiados e análises histomorfométricas foram realizadas para avaliar a capacidade osteogênica dos biomateriais. A expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) foi avaliada por imunohistoquímica. As caracterizações dos biomateriais constataram a formação do nanohíbrido (OG-HY), representado pela funcionalização do OG com HY e concentração de 5 µg/mL do OG-HY não alterou a viabilidade das células MC3T3-E1 nem estimularam a atividade da fosfatase alcalina ($p > 0,05$). Após 7 dias de cirurgia, o OG-HY a 100 µg/mL foi capaz de acelerar significativamente o reparo ósseo em tíbias de ratos, quando comparado ao grupo controle ($p < 0,001$) e foi possível observar uma expressão de VEGF significativamente menor, também, quando comparado ao controle ($p = 0,0223$). Esses achados mostraram que o nanohíbrido OG-HY foi capaz de acelerar a cicatrização óssea *in vivo* e sugerem este nanomaterial como candidato para aplicações em engenharia tecidual óssea.

Palavras-chave: Hialuronato de sódio. Engenharia tecidual. Grafeno. Nanomaterial. Reparo ósseo.

INTRODUÇÃO

O estabelecimento de estratégias para recuperação de defeitos ósseos sempre foi um desafio para pesquisadores e clínicos [1]. Pesquisas científicas tem sido realizadas com modelos de defeitos ósseos na tentativa de se encontrar substâncias naturais ou sintéticas capazes de reparar, substituir ou regenerar o tecido ósseo perdido [2,3], tais como o hialuronato de sódio (HY) [4] e os nanomateriais à base de carbono [5].

O HY é uma glicosaminoglicana endógena de alto peso molecular que possui um importante papel no reparo tecidual [6]. Estudos em animais e em humanos têm mostrado que o HY acelera a formação e deposição de matriz óssea [4,7], por estimular a migração, adesão e proliferação de células mesenquimais indiferenciadas, bem como por induzir sua diferenciação em células osteoblásticas e estimular a expressão de osteopontina, osteocalcina, proteína morfogenética óssea dos tipos 2 e 4 e colágeno dos tipos I e III [4,5,8-11].

O grafeno é uma monocamada plana de átomos de carbono hibridizados com ligações do tipo sp^2 , formando uma nanoestrutura bidimensional (2D) [12,13]. É considerado o material mais fino, forte e duro que se possa imaginar [14], além de possuir propriedades únicas, como biocompatibilidade, altacondutividade elétrica (até 6000 S/cm) e térmica (5000 W/m.K) [15], transparência, uma grande área superficial específica [16] e boas características tribológicas [17]. O óxido de grafeno (OG), obtido por meio da esfoliação química do grafite, é considerado um dos derivados mais importantes do grafeno e tem sido considerado um nanomaterial promissor para aplicações biomédicas [13,18]. Ao contrário de outros nanomateriais à base de carbono, o OG é metaestável e se autodegrada na água de forma semelhante a ácidos húmicos, produtos de degradação de toda a matéria orgânica [19]. Estudos recentes têm mostrado que o OG possui a habilidade de promover e aumentar a diferenciação osteogênica [20,21]. Dessa forma, a funcionalização do OG com o HY pode resultar em um nanohíbrido para ser utilizado como um biomaterial viável, biológica e economicamente, para a reconstrução de defeitos ósseos em Medicina e Odontologia.

Portanto, o objetivo deste estudo foi de sintetizar e caracterizar um nanohíbrido composto pelo OG funcionalizado com HY (OG-HY), avaliar seu efeito na viabilidade de células MC3T3-E1, avaliar a atividade da fosfatase alcalina e avaliar o potencial osteogênico deste nanohíbrido em defeitos ósseos produzidos em tíbias de ratos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Síntese do nanohíbrido

O OG foi sintetizado pelo método de Hummers modificado [22]. Um grama de grafite expandido foi disperso em 132 mL de uma mistura (9:1) de H₂SO₄ e H₃PO₄ com o auxílio de um banho ultrassônico. Esta mistura foi então colocada em banho de gelo sob agitação, sendo adicionado lentamente seis gramas de KMnO₄. A presença dos ácidos aumentam o potencial oxidativo do KMnO₄ e o banho de gelo minimiza a chance de ignição do material, evitando explosão. Este material é então mantido sob controle de temperatura e agitação por 2 h e posteriormente deixado em repouso overnight. No dia posterior, a solução foi aquecida a 50 °C e agitada vigorosamente por 20 min e então deixada em repouso por 13 dias, afim de garantir tempo suficiente para uma eficiência de conversão do grafite em óxido de grafeno. Foram adicionados 137 mL de uma solução 62,65 mmol/L de H₂O₂ afim de reagir com algum permanganato que ainda estivesse disponível. Esta solução foi agitada e deixada em repouso por uma semana, quando então foi neutralizada com uma solução de KOH e filtrada em membrana de 0,22 µm, seguida de secagem estufa a vácuo a 60 °C. O HY 1% foi adquirido junto à Nature Derme (Belo Horizonte, MG, Brasil). É apresentado em sua fórmula solúvel como um gel de hialuronato de sódio [(C₁₄H₂₀NNaO₁₁)_n.Na] apresentando-se com aspecto viscoso e incolor, contendo menos de 2 ppm de metais pesados e arsênico, 0% de proteína, 5,2 mg / mL de ácido glucurônico e 1% de ácido hialurônico (pH 6,1). De acordo com estudos prévios, a utilização do HY a 1% foi a concentração que melhor estimulou o reparo ósseo em alvéolos dentários e em tíbias de ratos [5,10]. Uma solução contendo OG (0,5 mg/mL) e HY (0,5 mg/mL) foi posta para reagir sob ultrassom por 2 h e deixada em repouso overnight. Esta solução foi filtrada sob vácuo em membrana de 0,45 µm e lavada com 200 mL de água ultrapura. Este processo eliminou o OG e HY que não formaram o nanohíbrido e ainda estavam livres na amostra. O material retido sobre o filtro foi secado e utilizado para os protocolos experimentais.

Caracterização do nanohíbrido

A análise da superfície do nanohíbrido por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada em um microscópio JEOL JSM 6360LV com aceleração de 15 Kv, aumento de 2.000 vezes e distância de trabalho entre 11,8 e 12 mm. A espectroscopia Raman foi realizada em um espectrômetro Raman Witec Alpha 300R com $\lambda = 532,1$ nm para determinação do número de camadas do nanohíbrido, bem como o grau de desordem da rede cristalina. A

análise termogravimétrica foi realizada em um equipamento DTG-60H (Shimadzu, Japão) sob atmosfera de ar sintético a uma taxa de aquecimento de 5 °C /min para quantificar as formas de carbono presentes no nanohíbrido, bem como as impurezas. Para confirmar a funcionalização entre o OG e o HY, a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi realizada em espectrofotômetro FTIR Nicolet 6700, (Thermo Scientific, USA) com faixa de medição entre 4000-650 cm⁻¹. As medidas de difração de raios-X foram realizadas em um difratômetro da PANalytical (modelo EMPYREAN), com geometria Bragg-Brentano, goniômetro $\theta - \theta$, equipado com detector de área (PIXcel3D) operando no modo Scanning Line e com um tubo de Cobre. Para as medidas, foi também utilizado um monocromador no feixe incidente (hybrid MPD - Cu W/Si) que permite a seleção apenas da radiação CuK α 1. As amostras foram analisadas na forma de pó à temperatura ambiente.

Estudo *in vitro*

Células

Foram utilizadas células da linhagem MC3T3-E1 subclone 14, pré-osteoblastos imortalizados da calvária de camundongos neonatos ATCC (Manassas, Virginia; www.atcc.org). As células foram cultivadas em meio *Alpha Minimum Essential Medium* (α -MEM) (Gibco™) suplementado com 10% de FBS (*Fetal Bovine Serum*) (Gibco™) e antibióticos estreptomicina (100 μ g/mL)/ penicilina (500 U/mL) (Invitrogen™). O meio de cultivo foi trocado a cada 48 h até as células atingirem confluência. Em seguida, as células foram coletadas utilizando solução de Tripsina (0,25%) *Ethylenediamine Tetraacetic Acid* (EDTA) (Gibco™). Posteriormente, as células foram ressuspensas em meio completo fresco e transferidas para novos frascos na razão desejada (1:5, por exemplo). Os experimentos foram realizados até a passagem 20, visto que osteoblastos em contínuas passagens apresentam diminuição na formação de matriz mineralizada [24].

Preparo da solução de biomateriais

Os ensaios *in vitro* foram realizados com os biomateriais OG, HY e OG-HY liofilizados e esterilizados por meio da radiação gama (12 Kgy). Em seguida, foi preparada uma solução estoque de cada biomaterial em PBS 1x estéril a 1 mg/mL e então, foi realizada a sonicação das soluções estoque, utilizando sonicador de banho, por 30 min. Em seguida, as soluções de tratamento foram preparadas nas doses de interesse para cada ensaio.

Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) (Invitrogen™) [25]. Foram plaqueadas 1×10^4 células MC3T3-E1 (por well) em placas de 48 wells por 24 h. Posteriormente, as células foram tratadas com 5, 10, 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de soluções dos biomateriais OG, HY e nanohíbrido, acrescido do controle negativo que recebeu apenas PBS 1x. Após o tratamento, os grupos de células foram avaliados ao final de dois tempos (48 e 72 h). O meio de tratamento foi, então, removido e adicionado uma solução contendo 130 μL de meio basal composto por α -MEM e 100 μL de MTT (5 mg/mL) / well. Após 2 h, os cristais de formazan foram visualizados em microscópio de luz e em seguida foram dissolvidos em 130 μL de SDS a 10% em HCl 0,01 M (Sigma-Aldrich®). Em todos os passos da descrição acima, as placas de cultura foram incubadas a 37 °C, em atmosfera umidificada de CO₂ 5%. Após 18 horas, todo conteúdo do well foi transferido para tubos de centrifuga cuidadosamente etiquetados e então, centrifugados a 2000 rpm por 2 min. Posteriormente, foram transferidos 100 μL da solução centrifugada para uma placa de 96 wells e realizada a leitura de densidade ótica a 595 nm. Como critério de normalização, a média obtida da viabilidade celular dos grupos experimentais (OG, HY e nanohíbrido) foi normalizada pela média da viabilidade do grupo controle. O ensaio foi realizado em triplicata biológica e experimental.

Atividade da fosfatase alcalina

A atividade de fosfatase alcalina (FA) foi avaliada por meio do kit de bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP), sal de nitro-blue tetrazólio (NBT), conforme descrição do fabricante (Life Technologies®). Foram semeadas 1×10^4 MC3T3-E1 (por well) em placas de 24 wells, por 24h. Posteriormente, as células foram tratadas com 5 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de soluções dos biomateriais OG, HY e OG-HY, preparadas em meio de cultura α -MEM suplementado e acrescido de solução osteogênica (2,165 mg/mL de β -glicerofosfato + ácido ascórbico) (Sigma-Aldrich®), além do controle negativo (apenas PBS 1x). Após o tratamento, os grupos de células foram avaliados ao final de dois tempos (3 e 7 dias). Para isso, o sobrenadante foi removido, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x e foi adicionado 200 μL de solução BCIP-NBT por well e incubadas a 37 °C, em atmosfera umidificada de CO₂ 5%, por 2 horas. Após a incubação, os precipitantes insolúveis de cor arroxeadas presentes no fundo dos poços foram solubilizados com 210 μL de dodecil sulfato de sódio (SDS) -10% HCl. Após 18h de incubação, todo conteúdo do poço foi transferido para tubos de centrifuga,

cuidadosamente etiquetados e então, centrifugados a 2000 rpm, por 2 min. Posteriormente, foram transferidos 100 µL da solução centrifugada para uma placa de 96 wells e realizada a leitura de densidade ótica a 595 nm. Como critério de normalização, a média obtida da fosfatase alcalina dos grupos experimentais (OG, HY e OG-HY) foi normalizada pela média da fosfatase alcalina do grupo controle. O ensaio foi realizado em triplicata biológica e experimental.

Estudo *in vivo*

Animais

Os experimentos foram realizados em conformidade com a Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (Protocolo #353/2017) (ANEXO B). Um total de 40 animais utilizados (ratos Wistar machos, com 3 meses de idade e pesando entre 250-300g) foram acomodados em ambiente com luminosidade e temperatura controladas, tendo acesso *ad libitum* à água e ração.

Grupos experimentais e biomateriais

O estudo foi realizado com 8 grupos experimentais, representados por: coágulo sanguíneo (Controle), HY 1% (veiculado em forma de gel) e diferentes concentrações de OG (50, 100 e 200 µg/mL) e OG-HY (50, 100 e 200 µg/mL). Os biomateriais OG e OG-HY (apresentações em pós), em suas diferentes concentrações, foram misturados em Carbopol (gel inerte) para serem veiculados em forma de gel (Figura 1).

Unidade amostral

O "defeito ósseo" (1,6 mm de diâmetro) foi considerado a unidade amostral, sendo que era realizado somente um "defeito ósseo" em cada tíbia. Ficou determinado que as duas tíbias, de um mesmo animal, seriam utilizadas para a confecção do "defeito ósseo" e as amostras seriam avaliadas nos períodos de 7 e 14 dias após os procedimentos cirúrgicos.

Cálculo amostral

Para o cálculo amostral, considerou-se a porcentagem de trabéculas ósseas formadas como a variável mais instável, sendo um desvio máximo de 3,6 e uma diferença esperada entre os grupos de 8,7% [5], um poder do teste de 90% e nível de significância de 5%, resultando em um número mínimo de 5 amostras (unidades amostrais) por grupo. Portanto, considerando-se 8 grupos experimentais, 5 amostras para cada grupo e 2 períodos para

avaliações (7 e 14 dias), foram utilizados 40 animais no total, perfazendo 80 "defeitos ósseos".

Procedimento cirúrgico

Os procedimentos de anestesia e cirurgia dos animais foram realizados por profissionais treinados (o pesquisador principal e um auxiliar) nas dependências do Laboratório de Biologia Cardíaca, do Departamento de Morfologia/ Instituto de Ciências Básicas - UFMG. Para a determinação das doses ideais dos medicamentos (anestésicos, antibióticos e analgésicos), cada animal era pesado e devidamente identificado (caneta hidrocor preta) com um número na sua cauda (1, 2, 3...). Os animais foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de Xilazina 2% (Vetbrands, Brasil) e cloridrato de Ketamina 10% (Syntec, Brasil) (1:1, 0,1 mL/100 g de peso corporal, i.m.). Convencionou-se que, sempre, os procedimentos cirúrgicos (Figura 2), seriam iniciados pela perna esquerda. Após tricotomia, a anti-sepsia era feita com Iodopovidona à 10% (solução de iodo com polivilpirrolidona - PVPI) e um campo cirúrgico era posicionado, deixando exposta somente a área a ser operada. Inicialmente, utilizando-se bisturi (cabo Bard Parker nº3 com lâmina nº 15), uma incisão longitudinal (1,5 cm, aproximadamente) era realizada na região da crista das tíbias. Após afastamento dos tecidos e exposição das tíbias, os defeitos ósseos foram criados com auxílio de uma broca helicoidal (SIN FH-1615; 1,6 mm de diâmetro) acoplada em um contra-ângulo cirúrgico (CONCEPT; redução 1:16) e motor cirúrgico (BLM 600; 1200 rpm e torque de 30 N) (Figura 3) sob irrigação constante com soro fisiológico 0,9% resfriado. Perfurava-se e transfixava-se a tíbia em sua porção média (sentido da sua face lateral para medial) e com o auxílio de seringa descartável Luer Lok (BD Plastipak, 10ml; com agulha hipodérmica 0,70 x 25 22G 1"), cada defeito ósseo criado foi preenchido por um dos tratamentos descritos, anteriormente. Em seguida, os tecidos eram reposicionados e suturados. Ao final dos procedimentos cirúrgicos, os animais receberam uma dose de antibiótico (Multibiótico Reforçado - benzilpenicilina/estreptomicina: 0,84 mg/100 g de peso corporal, i.m.) e analgésico/anti-inflamatório (Banamine[®] injetável - Flunixin Megumine, 0,5 mg em 0,1 mL; NLS Saúde Animal: 0,22 mg/100 g de peso corporal, i.m.). O reparo ósseo foi avaliado 7 e 14 dias após os procedimentos cirúrgicos.

Análises histológica e morfométrica

Os animais foram eutanasiados por sobredose de anestésico geral [cloridrato de Xilazina (45 mg/kg) e cloridrato Ketamina (240 mg/kg), i.m.], 7 e 14 dias após os procedimentos cirúrgicos. As tíbias foram imediatamente retiradas por dissecação, removendo-se cuidadosamente os tecidos moles (Figura 4) e mantendo-se a cabeça da tibia para servir como referência no processo de inclusão em parafina e na análise dos cortes histológicos. Em seguida, as tíbias eram fixadas em formalina neutra tampada (FNT) 10% por 48 h em temperatura ambiente. Após a fixação, as tíbias eram desmineralizadas em solução de Plank-Rychlo, por 72 h e uma porção da parte distal (inferior) da tibia era removida, mantendo-se uma margem de segurança de aproximadamente 2 a 3 mm do "defeito ósseo". Posteriormente, as tíbias eram desidratadas por meio da exposição gradual em alcoóis de concentrações crescentes, diafanizadas em xilol e impregnadas em parafina - Paraplast[®]. Durante o processo de inclusão, tomava-se o cuidado de posicionar as tíbias com a sua face plana (medial) voltada para baixo, de modo que elas ficassem apoiadas paralelamente ao fundo dos moldes (Figura 5). Isso era feito para facilitar que as amostras pudessem ser cortadas o mais perpendicular ao longo eixo do "defeito ósseo", melhorando, assim, a qualidade dos cortes. De cada amostra, foram obtidos cortes de 5µm de espessura, os quais foram montados em lâmina de vidro silanizada (silano 2%) e coradas com Tricrômico de Masson, para análise histológica.

A metodologia empregada para o imageamento microscópico, segmentação de imagens e definição das condições de morfometria foram, previamente, descrita na literatura [26]. Para a análise morfométrica, as imagens histológicas foram visualizadas e capturadas através de câmera (Q-Color5TM, Olympus) acoplada a um microscópio de luz (Olympus BX53). O programa Q-Capture Pro 7TM auxiliou na seleção e captura das imagens (objetiva com aumento de 20X). A maneira para se obter os campos, a serem focados e capturados, foi realizando movimentações do charriot do microscópio para deslocar a lâmina nos sentidos horizontal e vertical, seguindo uma sequencia que traçava uma trajetória semelhante ao formato da letra "S", de modo a percorrer toda a área do "defeito ósseo" na lâmina. Para melhor visualização e entendimento, uma reconstrução total real de cada "defeito ósseo", com a sua respectiva imagem binária, foi realizada no programa PowerPoint[®] (Microsoft Corporation) (Figura 6 - A e B). A primeira imagem era focada no canto superior direito do defeito ósseo e capturada (Figura 6 - C). Esse método permitiu uma varredura completa de cada defeito ósseo, capturando um número suficiente de imagens (variou de 6 a 17) para serem analisadas. Para cada imagem real de um campo, era gerada uma imagem binária [26]

(Figura 6 - D), na qual era delimitada uma área, cujos pixels das trabéculas ósseas eram analisados pelo programa ImageJ® (National Institute of Health, EUA), fornecendo um determinado valor em porcentagem, de neoformação de trabéculas ósseas.

De posse dos valores das "áreas delimitadas em cada campo" e das "porcentagens de trabéculas formadas nas áreas delimitadas em cada campo", dever-se-ia encontrar os valores das áreas de trabéculas formadas dentro das áreas delimitadas em cada campo (mm²). Para isso, realizava-se uma regra de três simples, onde o valor da "área delimitada em cada campo" (p.ex.: 0,225 mm²) estaria para 100% e o valor da porcentagem de trabéculas formadas na área delimitada em cada campo (p.ex.: 62,025%) estaria para "X" ("área de trabéculas formadas dentro da área delimitada em cada campo"). Portanto, o valor da área de trabéculas formadas dentro da "área delimitada em cada campo seria 0,139556 mm² ("X" = $0,225 \times 62,025 \div 100 = 0,139556$). Esse raciocínio deveria ser repetido para a obtenção dos valores dos demais campos restantes da lâmina (amostra). A seguir, deveria se obter o valor do somatório das "áreas delimitadas em cada campo" (p. ex: 2,434 mm²) e o valor do somatório das "áreas de trabéculas formadas dentro da área delimitada em cada campo" (p.ex: 1,455396 mm²). Para se encontrar o valor da "porcentagem de trabéculas formadas dentro da área total delimitada", deveria se fazer outra regra de três simples, onde valor do somatório das "áreas delimitadas em cada campo" (p.ex: 2,434 mm²) estaria para 100% e o valor do somatório das "áreas de trabéculas formadas dentro da área delimitada em cada campo" (p. ex: 1,455396 mm²) estaria para "X" (porcentagem de trabéculas formadas dentro da área total delimitada). Portanto, o valor da "porcentagem de trabéculas formadas dentro da área total delimitada" seria 59,79442% ("X" = $1,455396 \times 100 \div 2,434 = 59,79442$) (Figura 7).

Dessa forma, foi determinado valor da porcentagem (%) de trabéculas ósseas neoformadas em cada "defeito ósseo". Esses valores finais de cada lâmina (amostra) utilizada foram digitalizados em planilha no programa [Microsoft® Office Excel](#) e posteriormente, no programa [GraphPad Prism5 Software](#) (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), para análise dos dados.

Análise imunohistoquímica

As amostras de tíbias dos animais eutanasiados 7 dias após a cirurgia foram utilizadas para análise imunohistoquímica da expressão do fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF). Os cortes de tecido com 5 µm de espessura foram desparafinados e reidratados com alcoóis em concentrações decrescentes. A atividade da peroxidase endógena

foi bloqueada pela incubação das lâminas com uma solução de 10% de H₂O₂ e os cortes foram lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS) por 15 minutos. As ligações protéicas inespecíficas foram bloqueadas (Protein Block, Abcam, EUA) por 5 min, à temperatura ambiente. O excesso da solução foi removido e os cortes foram incubados a 4 °C, (*overnight*), com o anticorpo primário VEGF policlonal de coelho anti-rato (VEGF [A20]: SC-152; Santa Cruz Biotechnology, Inc., EUA) e diluído 1:50. No dia seguinte, o anticorpo primário foi removido com papel absorvente, os cortes foram lavados em PBS e o anticorpo secundário anti-coelho biotilado (K0690; LSAB/DAKO, Glostrup, Dinamarca), foi adicionado aos cortes e mantido por 30 min, à temperatura ambiente. Depois, os cortes foram incubados com o complexo de estreptavidina-peroxidase (Kit LSAB/DAKO), por 30 min, em temperatura ambiente e lavados com PBS. A reação foi revelada por imersão das lâminas em solução contendo 350 µM 3,3'- diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical Co., EUA) e 1% de H₂O₂ em PBS. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Mayer, desidratados com alcoóis em concentrações crescentes, diafanizados em xilol e as lâminas foram montadas com lamínulas em entellan. No controle negativo, o anticorpo primário foi substituído por incubação com PBS. As imagens foram avaliadas no programa ImageJ[®] (National Institute of Health, EUA), como descrito para análise morfométrica [26].

Análise estatística

Os dados foram digitalizados e organizados no GraphPad Prism 5 Software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Inicialmente, foram realizados testes de normalidade para verificar a distribuição dos dados. Testes paramétricos foram utilizados na análise de acordo aos resultados dos testes de normalidade. Os dados foram expressos como médias ± EPM e analisadas pelo teste One-way ANOVA, seguido pelo teste post hoc de Tukey (viabilidade celular) e de Dunn (morfometria e imunohistoquímica). Resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

Síntese e caracterização

Antes de se testar os biomateriais em estudos *in vitro* e *in vivo*, realizou-se a caracterização do OG, HY e OG-HY, utilizando-se as técnicas de MEV, espectroscopia de Raman, termogravimetria, FTIR e difração de raios-X.

As imagens em MEV (Figura 8) mostraram que o OG apresentou-se como um aglomerado de folhas de grafeno, em camadas homogêneas e compactadas, enquanto que o HY apresentou-se de forma mais porosa. Interessantemente, o nanohíbrido (OG-HY) manteve a estrutura lamelar, porém, foi possível detectar um recobrimento das folhas de OG pelo HY. A espectroscopia Raman (Figura 9-A) evidenciou dois principais picos característicos no OG analisado: a banda D, em 1350 cm^{-1} e a banda G em 1590 cm^{-1} . O HY apresentou as bandas características entre $796\text{-}1654\text{ cm}^{-1}$, correspondentes aos estiramentos C-C e C-O, dobramento e deformação C-H, além do estiramento C-N. Além disso, apresentou pico entre $2700\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$, correspondente ao estiramento CH. No nanohíbrido, pode-se perceber tanto a presença do pico correspondente ao estiramento CH do HY e as bandas D e G, bem como a presença da banda 2D, também conhecida como G' e característica de materiais grafiticos como o OG. Neste caso, isso evidencia a diminuição do número de camadas de grafeno no nanohíbrido devido ao recobrimento com o HY [27,28]. A diminuição da relação I_D/I_G de 1,08 no OG puro, para 0,82 no compósito OG-HY, pode demonstrar uma redução no número de lâminas de grafeno ou uma maior intercalação entre as camadas de grafeno e o HY. Por fim, o estreitamento das bandas D e G mostram alterações na estrutura do OG, o que pode evidenciar a formação do nanohíbrido OG-HY.

Pela termogravimetria (TG) (Figura 9-B), foi possível identificar três perdas de massa acentuadas nas amostras de OG. A perda inicial abaixo dos $150\text{ }^\circ\text{C}$ corresponde à perda de umidade, de aproximadamente 27%, em massa. A segunda e terceira perdas correspondem, respectivamente, à remoção de grupos contendo oxigênio e a oxidação do carbono. Para o HY, a primeira perda de massa, até os $200\text{ }^\circ\text{C}$, corresponde à perda de estruturas livres de água, ainda presentes no material e as demais perdas deve-se a degradação térmica do próprio material. Ao observar o termograma correspondente ao nano-híbrido OG-HY, pode-se perceber que seu aspecto se aproxima do termograma correspondente ao OG, porém a perda de massa correspondente à degradação dos compostos oxigenados está deslocada para a direita, correspondendo a uma estabilidade térmica no material e maior percentual de perda de

massa a partir de 200 °C devido à diminuição dos grupamentos oxigenados livres e a conjugação do OG-HY [28].

A espectroscopia FTIR (Figura 9-C) revelou a presença das bandas –OH (3380 cm⁻¹), OC= (1725 cm⁻¹), C=C (1622 cm⁻¹) e OC (1060 cm⁻¹), características do OG. O espectro obtido do produto da associação entre OG e HY diferiu em relação aos espectros do OG e HY isoladamente, apresentando a estreita banda correspondente ao alongamento C-O em 1045 cm⁻¹, confirmando a conjugação bem sucedida de HY no OG [28].

A análise por difração de raios-X (Figura 9-D) mostrou, no espectro correspondente ao OG, a presença do pico em $2\theta = 42,50$, com orientação 001 atribuída pela banda turbostrática de materiais de carbono desordenados, que pode apresentar as características de orientação das camadas do OG empilhadas e a presença do pequeno pico em $2\theta = 25,43$, que remete a estruturas π – conjugadas, revelam a característica gráfitica do material. O espaçamento reticular do OG foi de 0,91 nm com $2\theta = 9,72$, que corresponde ao pico de difração 002. O HY não apresentou picos característicos e no nanohíbrido OG-HY, pode-se verificar o desaparecimento do pico em $2\theta = 9,72$ e o surgimento do principal pico em $2\theta = 25,8$.

Ensaio de viabilidade celular

Para avaliar a sobrevivência das células cultivadas com os biomateriais, experimentos de viabilidade celular foram realizados após períodos de cultura de 48 e 72 horas, utilizando diferentes concentrações de OG, HY e OG-HY (Figura 10). Concentrações de 5 µg/mL dos biomateriais OG, HY e OG-HY não alteraram a viabilidade das células MC3T3-E1 ($p > 0,05$). O HY preservou a viabilidade celular independente do aumento das concentrações. Por outro lado, os resultados demonstram que existe uma citotoxicidade dose-dependente para o OG e OG-HY, independente do tempo de cultura, representada pela diminuição significativa ($p < 0,05$) da viabilidade celular.

Atividade da fosfatase alcalina

Na análise da atividade da fosfatase alcalina, utilizando-se OG, OG-HY e HY nas concentrações de 5 e 10 µg/mL (Figura 11), foi observado que, no período de 3 dias, houve uma diminuição significativa na atividade da fosfatase alcalina para a concentração de 10 µg/mL, ao se comparar todos os grupos tratados com o grupo controle ($p < 0,05$). Por outro lado, no período de 7 dias, um aumento da atividade da fosfatase alcalina para todos os grupos, quando comparado ao período de 3 dias. Ainda no período de 7 dias, houve uma

diferença significativa entre OG e OG-HY na concentração de 5 µg/mL e entre OG, OG-HY e HY na concentração de 10 µg/mL, quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$).

Análise histomorfológica

Na avaliação histológica dos defeitos ósseos 7 dias após os procedimentos cirúrgicos (Figuras 12, 13 e 14), o grupo controle (A e B), apresentou tecido de granulação rico em capilares recém formados e envolto por material osteóide, na região central do defeito. Na periferia do defeito, havia pouca regeneração tecidual óssea, formando trabéculas ósseas imaturas e desorganizadas, bem como escassos espaços inter-trabeculares. Os grupos tratados HY, OG e OG-HY (C a H) apresentaram regeneração tecidual óssea maior do que o grupo controle e quase toda área do defeito encontrava-se ocupada por tecido ósseo neoformado. Ainda nesses grupos, a região do defeito apresentou redução de núcleos celulares e aumento de trabéculas neoformadas, as quais estavam mais organizadas e espessas. Os espaços inter-trabeculares estavam em maior quantidade, assim como havia maior quantidade de vasos sanguíneos, os quais mostraram-se mais calibrosos e mais organizados. Os grupos OG 100 µg/mL (Figura 13- E e F) e OG-HY 100 µg/mL (Figura 13- G e H) apresentaram um melhor padrão de regeneração tecidual óssea.

Na avaliação histológica 14 dias após os procedimentos cirúrgicos (Figura 15), o grupo controle (A e B) apresentou defeito ósseo com grande quantidade de regeneração tecidual óssea, em toda sua extensão, com trabéculas ósseas imaturas e desorganizadas. Houve redução do número de núcleos celulares, restrição dos espaços inter-trabeculares e os vasos sanguíneos estavam presentes em grande quantidade, sendo mais calibrosos e mais organizados. Os grupos tratados HY 1% (C e D), OG 100 µg/mL (E e F) e OG-HY 100 µg/mL (G e H) apresentaram processo de regeneração tecidual óssea mais avançado do que o grupo controle, marcado por um processo progressivo de reabsorção do osso neoformado na região medular. As trabéculas ósseas eram maduras, espessas e bem organizadas. Houve diminuição do número de núcleos celulares, aumento dos espaços inter-trabeculares e os vasos sanguíneos eram mais calibrosos e mais organizados. O grupo OG 100 µg/mL (E e F) apresentou grau de regeneração tecidual óssea ligeiramente melhor do que os demais grupos tratados.

Análise histomorfométrica

A análise morfométrica realizada para avaliação da neoformação óssea 7 dias após os procedimentos cirúrgicos demonstrou que todos os grupos de tratamentos apresentaram um aumento na formação de trabéculas ósseas, em relação ao grupo controle e os grupos experimentais apresentaram as seguintes médias de neoformação trabecular óssea: Controle/coágulo (40,2%), OG 50 µg/mL (48%), OG 100 µg/mL (55,5%), OG 200 µg/mL (48,1%), HY 1% (50%), OG-HY 50 µg/mL (55,2%), OG-HY 100 µg/mL (63,2%) e OG-HY 200 µg/mL (51,6%). O percentual de trabéculas ósseas formadas, em relação à área total dos defeitos, foi estatisticamente maior nos defeitos ósseos presentes das tíbias tratadas com OG 100 µg/mL ($p=0,001$), OG-HY 50 µg/mL ($p=0,001$), OG-HY 100 µg/mL ($p<0,001$) e OG-HY 200 µg/mL ($p=0,016$), quando comparado ao grupo controle (Figura 16).

Análise imunohistoquímica

Na avaliação imunohistoquímica 7 dias após os procedimentos cirúrgicos (Figura 17), foi observado que a expressão do VEGF apresentou distribuição uniforme em toda a extensão dos defeitos ósseos do grupo controle (C e D) e dos grupos tratados (E a J), ocorrendo tanto no tecido conjuntivo não mineralizado quanto nas áreas de trabéculas. No grupo controle negativo (A e B), não houve imunoexpressão do VEGF. No grupo controle (C e D), houve uma expressão do VEGF mais intensa do que nos grupos tratados. Nos grupos tratados, a imunoexpressão do VEGF apresentava-se mais pronunciada nos espaços inter-trabeculares do que nas regiões trabeculares, sendo que os grupos OG 100 µg/mL (G e H) e OG-HY 100 µg/mL (I e J) apresentaram uma expressão do VEGF menos intensa do que no grupo HY 1% (E e F). Foi possível observar que o OG-HY 100 µg/mL apresentou uma expressão de VEGF significativamente menor quando comparado ao controle (Controle: $16,52\% \pm 1,40$ vs OG-HY 100 µg/mL: $12,59\% \pm 1,71$) ($p=0,022$). Em relação aos demais grupos, não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) (Figura 18).

DISCUSSÃO

Este estudo sintetizou, caracterizou um nanohíbrido composto pelo OG funcionalizado com HY (OG-HY) e avaliou sua viabilidade celular e seu potencial osteogênico. Os principais achados deste estudo foram a comprovação da criação de um nanohíbrido capaz de acelerar a cicatrização óssea *in vivo*.

A caracterização cuidadosa do OG, do HY e do OG-HY previamente à execução dos experimentos biológicos permitiu um conhecimento inicial destes biomateriais. No geral, as análises demonstraram que os biomateriais eram puros e de boa qualidade, além de constatar a ocorrência do processo de funcionalização do OG com o HY, por ligações covalentes, criando o nanohíbrido OG-HY. Através das análises por MEV, foi possível detectar um recobrimento das folhas de OG pelo HY. O OG manteve a estrutura lamelar, sugerindo que a incorporação do HY ocorreu somente na superfície do OG, assim como encontrado no estudo de Yang *et al.* [27], em que a conjugação de HY e de carboximetil quitosana com OG ocorre somente na superfície do OG, sem alterar a sua estrutura intrínseca. O recobrimento do HY na superfície do OG pode ser benéfica para que o HY possa atuar como uma molécula sinalizadora para migração, adesão, proliferação e diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas, principalmente para a linhagem osteoblástica [4,7].

Os diferentes métodos para produzir grafeno resultam em materiais com diferentes números de camadas e/ou grupos químicos. Análises por espectroscopia de Raman refletem alterações nas bandas de elétrons e permitem a inequívoca identificação e caracterização do grafeno, pela análise dos picos característicos de materiais grafiticos: G e D [20]. A diminuição da relação I_D/I_G de 1,08 no OG puro, para 0,82 no nanohíbrido OG-HY, pode demonstrar uma redução no número de lâminas de grafeno ou uma maior intercalação entre as camadas de grafeno e o HY. Por fim, o estreitamento das bandas D e G mostram alterações na estrutura do OG, o que pode evidenciar a formação do nanohíbrido OG-HY. Esses achados possuem semelhanças com as observações de Kotzianova *et al.* [28] e Guo *et al.* [29].

Segundo Jung *et al.* [30], o OG pode ser facilmente funcionalizado no domínio sp^2 com hidroxil, epóxi, grupos carboxila. Sendo assim, através de uma análise termogravimétrica, foi possível mostrar a imobilização do HY com o OG. A espectroscopia FTIR também confirmou o sucesso da funcionalização do OG com HY, pois revelou que o espectro obtido do produto da associação entre estes biomateriais (OG-HY) diferiu em relação

aos espectros do OG e do HY, isoladamente. Estes achados estão de acordo com resultados de estudos prévios de funcionalização de materiais à base de carbono com o HY [23,31].

Na análise por difração de raios-X, no espectro correspondente ao OG, a presença dos picos 2θ revelaram a característica gráfica do material. O espaçamento reticular do OG está congruente com o apresentado na literatura, com 2θ variando de 9,03 a 12,8 [32-35]. Sabe-se que, de acordo com a lei de Bragg, quanto maior a distância interplanar, menor o ângulo de difração. Assim, este espaçamento pode significar uma boa quantidade de estruturas oxigenadas, principalmente nas periferias do OG. O HY, como esperado, não apresentou picos característicos, devido a sua estrutura mais amorfa [36,37]. No nanohíbrido OG-HY, o desaparecimento do pico em $2\theta = 9,72$ e o surgimento do principal pico em $2\theta = 25,8$ é geralmente atribuído à forma reduzida do grafeno [38]. Isso demonstra a mudança das características cristalográficas que, juntamente com as outras caracterizações, evidencia a formação de uma nova estrutura, diferente do OG e do HY isolados, correspondendo ao nanohíbrido OG-HY.

Tem sido sugerido que o grafeno não induz efeitos tóxicos evidentes *in vivo* [39,40] e alguns estudos focados em dispersões de OG indicaram que ele não foi citotóxico, exceto em altas concentrações [17,21]. Os resultados do nosso estudo também demonstraram que existe uma citotoxicidade dose-dependente para o OG e OG-HY, independente do tempo de cultivo celular, sendo que apenas os materiais na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ mostraram não alterar a viabilidade das células MC3T3-E1, sugerindo que, em baixas concentrações, o material não é citotóxico. Para o HY, o aumento em sua concentração não levou à diminuição da viabilidade celular. Esse fato pode ser explicado pelo fato de o HY ocorrer naturalmente na matriz extracelular, além de ser um polímero totalmente biodegradável [36,41].

Dentre as várias proteínas envolvidas no metabolismo ósseo, a fosfatase alcalina é uma glicoproteína específica, que está relacionada aos estágios iniciais de diferenciação dos osteoblastos e parece ser responsável pelo crescimento de cristais de hidroxiapatita no início da formação óssea [42]. Sendo assim, para avaliar a influência do OG, OG-HY e HY na atividade da fosfatase alcalina, estes biomateriais foram utilizados nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ e analisados nos períodos de 3 e 7 dias. No entanto, os resultados demonstraram que os biomateriais não foram capazes de aumentar a atividade da fosfatase alcalina, indicando que o processo de aceleração do reparo ósseo deve estar relacionado a outros mecanismos.

Após os experimentos *in vitro*, os testes *in vivo* foram iniciados e os períodos escolhidos para análises histomorfométricas foram de 7 e 14 dias, pois estes períodos

permitem uma avaliação clara do processo de reparo ósseo através de análises qualitativas e quantitativas [5]. As análises histológicas evidenciaram que o padrão de regeneração tecidual óssea aconteceu da periferia para o centro do defeito ósseo, como o esperado. A análise histomorfométrica do período de 7 dias demonstrou uma aceleração no reparo ósseo e melhor organização tecidual nos grupos OG, HY e OG-HY, em relação ao controle. Apesar de todos os grupos tratados terem apresentado um aumento na formação de trabéculas ósseas, em relação ao grupo controle, o percentual de trabéculas ósseas formadas, em relação à área total dos defeitos, foi estatisticamente maior nos defeitos ósseos tratados com OG 100 µg/mL ($p=0,001$), OG-HY 50 µg/mL ($p=0,001$), OG-HY 100 µg/mL ($p<0,001$) e OG-HY 200 µg/mL ($p=0,016$), quando comparado ao grupo controle (Figura 12) e foi possível perceber que o grupo OG-HY 100 µg/mL apresentou a maior média de neoformação trabecular óssea (Média: 63,23%).

Esses achados foram proporcionados pelas propriedades específicas desses biomateriais. A literatura tem demonstrado que o HY acelera a regeneração óssea por meio de quimiotaxia, proliferação e diferenciação sucessiva de células mesenquimais, além de compartilhar características de indução óssea com substâncias osteogênicas [4,5,43]. A influência do OG pode ser explicada pela sua alta hidrofiliabilidade e boa biocompatibilidade. A presença abundante de grupos, como hidroxila e carbonila no plano basal do OG desempenham um papel importante na ancoragem de íons cálcio e podem proporcionar sítios reativos para muitas interações químicas [40]. Além disso, segundo Zhao *et al.* [17], o enrugamento presente nas folhas de OG aumenta a rugosidade da superfície e fornece mais pontos de contato para a nucleação Ca e P, contribuindo, também, para a deposição de hidroxiapatita, em substratos revestidos [44]. Esses dados estão de acordo com estudos anteriores que utilizaram nanotubos de carbono funcionalizados com HY para engenharia tecidual óssea em modelos de alvéolos dentários e tíbia de ratos [5,31,45]. Relacionando-se esses fatos, sugere-se, inicialmente, que esses nanomateriais à base de carbono possam exibir propriedades e comportamento biológico semelhantes, quanto aos seus efeitos de aceleração da regeneração óssea, sendo que o aspecto lamelar do OG possa ter funcionado como scaffold, propiciando uma boa regeneração óssea. Nesse sentido, o OG possui vantagens em relação aos nanotubos de carbono no que se refere à biocompatibilidade, devido às suas dimensões pré-estabelecidas e à metaestabilidade e capacidade de autodegradação na água [19]. Por outro lado, os nanotubos de carbono podem formar estruturas fibrilares com vários micrômetros de comprimento [46].

Para auxiliar no melhor entendimento de mecanismos envolvidos no processo de aceleração da regeneração óssea, avaliou-se também a expressão de VEGF no período de 7 dias após os procedimentos cirúrgicos, porque este tempo corresponde ao segundo pico de VEGF, que está relacionado ao processo de remodelação óssea [5]. A avaliação imunohistoquímica revelou uma distribuição uniforme da expressão do VEGF em toda a extensão dos defeitos ósseos. No grupo controle negativo, não houve imunoexpressão do VEGF, mas são visualizadas áreas de cor marrom, que podem ser caracterizadas como sendo uma coloração de fundo. No grupo controle, em estágio mais inicial de regeneração óssea, houve uma expressão do VEGF mais intensa do que nos grupos tratados. Estudos mostram que nos estágios iniciais da cicatrização óssea, o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) é liberado de plaquetas aprisionadas no hematoma e regula positivamente o VEGF [46]. O tecido em estágio inicial de regeneração óssea apresenta mais áreas de coágulo, tecido de granulação e vasos sanguíneos. Esses dados estão de acordo com Street *et al.* [47] e Andrade *et al.* [5] que relacionaram a maior presença do VEGF nos estágios iniciais do reparo, com o coágulo sanguíneo. A imunoexpressão do VEGF nos grupos tratados apresentou-se mais intensa no grupo HY do que nos grupos OG 100 µg/mL e OG-HY 100 µg/mL, sendo que o OG-HY 100 µg/mL apresentou uma expressão de VEGF significativamente menor quando comparado ao controle. Em conjunto, esses resultados sugerem que, nesse período avaliado, o OG, o HY e o OG-HY estão associados à reabsorção do osso neoformado e à formação de medula óssea, acelerando o processo de remodelação óssea, onde condrócitos hipertróficos secretam VEGF para restaurar a vascularização, trazendo à área os componentes hematopoiéticos que se diferenciam em osteoclastos, os quais degradam a cartilagem mineralizada para proporcionar formação de medula óssea [5,48,49].

Este estudo possui limitações que precisam ser reconhecidas. Uma análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET) pode auxiliar na melhor caracterização do nanohíbrido (OG-HY). Quanto aos testes de viabilidade celular e atividade de fosfatase alcalina, mais testes utilizando concentrações menores podem ser realizados para avaliar o efeitos dos biomateriais *in vitro*. Embora o defeito ósseo criado não seja considerado crítico, ele possui dimensões maiores do que o defeito criado em uma fratura típica de tíbia [5]. Sendo assim, estudos futuros devem investigar os efeitos do nanohíbrido não só em defeitos ósseos críticos, como também em outros tipos de ossos. Além disso, análises por microtomografia computadorizada serão importantes para avaliar a qualidade do tecido ósseo neoformado.

Em resumo, foi possível constatar que os tratamentos propostos foram capazes de induzir a aceleração da regeneração tecidual, em defeitos ósseos criados em tíbias de ratos, com destaque para o OG-HY 100 µg/mL. Este novo nanohíbrido apresenta boa relevância clínica e possui potencial para ampliar as perspectivas na área de engenharia tecidual óssea.

CONCLUSÕES

- Os métodos de caracterização dos biomateriais utilizados neste estudo demonstraram que o processo de funcionalização do OG com o HY, realmente resultou na sinterização do nanohíbrido OG-HY;
- Dentre as diferentes concentrações do OG-HY avaliadas, 100 µg/mL apresentou melhor padrão de aceleração da regeneração óssea.
- Os testes de viabilidade celular, em meio de cultura, demonstraram que o nanohíbrido OG-HY apresentou uma citotoxicidade dose-dependente, independente do tempo de cultura, mas que baixas concentrações do nanohíbrido não foram citotóxicas;
- Os biomateriais não aumentaram significativamente a atividade da fosfatase alcalina;
- Com base nos resultados histomorfométricos e imunohistoquímicos, é possível inferir que o OG-HY 100 µg/mL teve efeito esperado de intensificar o processo de regeneração tecidual óssea, comparado com os demais grupos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a todos os colegas que, gentilmente, se empenharam e contribuíram para a realização deste estudo e também, às seguintes agências de fomento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não possuir conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

1. Martins-Júnior, P. A., Alcântara, C. E., Resende, R. R., & Ferreira, A. J. (2013). Carbon nanotubes: directions and perspectives in oral regenerative medicine. *Journal of dental research*, *92*(7), 575-583.
2. Jiang, H., Cheng, P., Li, D., Li, J., Wang, J., Gao, Y., Zhang, S., Cao, T., Wang, C., Yang, L. & Pei, G. (2018). Novel standardized massive bone defect model in rats employing an internal eight-hole stainless steel plate for bone tissue engineering. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, *12*(4), e2162-e2171.
3. Yamamoto, N., Hayashi, K., & Tsuchiya, H. (2019). Progress in biological reconstruction and enhanced bone revitalization for bone defects. *Journal of Orthopaedic Science*, *24*(3), 387-392.
4. Mendes, R. M., Silva, G. A., Lima, M. F., Calliari, M. V., Almeida, A. P., Alves, J. B., & Ferreira, A. J. (2008). Sodium hyaluronate accelerates the healing process in tooth sockets of rats. *Archives of oral biology*, *53*(12), 1155-1162.
5. Andrade, V. B., Sá, M. A., Mendes, R. M., Martins-Júnior, P. A., Silva, G. A., Sousa, B. R., Caliari M. V., Ávila E. S.; Ladeira L. O., Resende R. R. & Ferreira, A. J. (2017). Enhancement of Bone Healing by Local Administration of Carbon Nanotubes Functionalized with Sodium Hyaluronate in Rat Tibiae. *Cells Tissues Organs*, *204*(3-4), 137-149.
6. David-Raoudi, M., Tranchepain, F., Deschrevel, B., Vincent, J. C., Bogdanowicz, P., Boumediene, K., & Pujol, J. P. (2008). Differential effects of hyaluronan and its fragments on fibroblasts: relation to wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, *16*(2), 274-287.
7. Alcântara, C. E. P., Castro, M. A. A., Noronha, M. S. D., Martins-Junior, P. A., Mendes, R. D. M., Caliari, M. V., Mesquita, R. A. & Ferreira, A. J. (2018). Hyaluronic acid accelerates bone repair in human dental sockets: a randomized triple-blind clinical trial. *Brazilian oral research*, *32*.
8. Aslan, M., Şimşek, G., & Dayi, E. (2006). The effect of hyaluronic acid-supplemented bone graft in bone healing: experimental study in rabbits. *Journal of biomaterials applications*, *20*(3), 209-220.

9. Pasquinelli, G., Orrico, C., Foroni, L., Bonafè, F., Carboni, M., Guarnieri, C., Raimondo, S., Penna C., Geuna, S., Pagliaro, P., Freyrie, A., Stella, A., Caldarera, C. M. & Muscari, C. (2008). Mesenchymal stem cell interaction with a non-woven hyaluronan-based scaffold suitable for tissue repair. *Journal of anatomy*, 213(5), 520-530.
10. Sá, M.A., H.J. Ribeiro, T.M. Valverde, B.R. Sousa, P.A. Martins-Junior, R.M. Mendes, L.O. Ladeira, R.R. Resende, G.T. Kitten, A.J. Ferreira (2016) Single-walled carbon nanotubes functionalized with sodium hyaluronate enhance bone mineralization. *Braz J Med Biol Res*49:e4888.
11. Akyildiz, S., Soluk-Tekkesin, M., Keskin-Yalcin, B., Unsal, G., Yildiz, S. O., Ozcan, I., & Cakarar, S. (2018). Acceleration of Fracture Healing in Experimental Model: Platelet-Rich Fibrin or Hyaluronic Acid? *Journal of Craniofacial Surgery*, 29(7), 1794-1798.
12. Huang, X., Yin, Z., Wu, S., Qi, X., He, Q., Zhang, Q., Yan Q., Boey F. & Zhang, H. (2011). Graphene-based materials: synthesis, characterization, properties, and applications. *small*, 7(14), 1876-1902.
13. Tahiri *et al.*, 2019Tahriri, M., Del Monico, M., Moghanian, A., Yarak, M. T., Torres, R., Yadegari, A., & Tayebi, L. (2019). Graphene and its derivatives: Opportunities and challenges in dentistry. *Materials Science and Engineering: C*. 102:171–185.
14. Bunch, J. S., Verbridge, S. S., Alden, J. S., Van Der Zande, A. M., Parpia, J. M., Craighead, H. G., & McEuen, P. L. (2008). Impermeable atomic membranes from graphene sheets. *Nano letters*, 8(8), 2458-2462.15.
15. De Barros, N. G.; Valera, T. S. Novo protocolo de obtenção de óxido de grafite. 2016.
16. Costa, S. F., Gascho, J. L. S., Hoepfner, J. C., & Pezzin, S. H. Estudo da obtenção do óxido de grafeno funcionalizado via silanização com glymo.
17. Zhao, C., Lu, X., Zanden, C., & Liu, J. (2015). The promising application of graphene oxide as coating materials in orthopedic implants: preparation, characterization and cell behavior. *Biomedical Materials*, 10(1), 015019.
18. Han, H., Lee, S. W., Moon, K. H., & Cho, S. (2019). Fabrication of Solid-State Asymmetric Supercapacitors Based on Aniline Oligomers and Graphene Electrodes with Enhanced Electrochemical Performances. *ACS omega*, 4(1), 1244-1253.

19. Holt, B. D., Wright, Z. M., Arnold, A. M., & Sydlik, S. A. (2017). Graphene oxide as a scaffold for bone regeneration. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 9(3), e1437.
20. Dubey, N., Bentini, R., Islam, I., Cao, T., Castro Neto, A. H., & Rosa, V. (2015). Graphene: a versatile carbon-based material for bone tissue engineering. *Stem cells international*, 2015.
21. Shang, L., Qi, Y., Lu, H., Pei, H., Li, Y., Qu, L., Wu Z. & Zhang, W. (2019). Graphene and Graphene Oxide for Tissue Engineering and Regeneration. In *Theranostic Bionanomaterials* (pp. 165-185). Elsevier.
22. Shen, H., Zhang, L., Liu, M., & Zhang, Z. (2012). Biomedical applications of graphene. *Theranostics*, 2(3), 283.
23. Sá, M. A., Andrade, V. B., Mendes, R. M., Caliari, M. V., Ladeira, L. O., Silva, E. E., Silva G. A., Corrêa-Júnior J. D. & Ferreira, A. J. (2013). Carbon nanotubes functionalized with sodium hyaluronate restore bone repair in diabetic rat sockets. *Oral diseases*, 19(5), 484-493.
24. Yan, X. Z., Yang, W., Yang, F., Kersten-Niessen, M., Jansen, J. A., & Both, S. K. (2014). Effects of continuous passaging on mineralization of MC3T3-E1 cells with improved osteogenic culture protocol. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 20(3), 198-204.
25. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*;16:55-63.
26. Caliari, M. V., Caliari, M. V., & Caliari, M. (1997). Princípios de morfometria digital: KS300 para iniciantes.
27. Yang, H., Bremner, D. H., Tao, L., Li, H., Hu, J., & Zhu, L. (2016). Carboxymethyl chitosan-mediated synthesis of hyaluronic acid-targeted graphene oxide for cancer drug delivery. *Carbohydrate polymers*, 135, 72-78.
28. Kotzianova, A., Rebicek, J., Zidek, O., Pokorny, M., Hrbac, J., & Velebny, V. (2015). Raman spectroscopy based method for the evaluation of compositional consistency of nanofibrous layers. *Analytical Methods*, 7(23), 9900-9905.

29. Guo, Y., Xu, H., Li, Y., Wu, F., Li, Y., Bao, Y., Yan X., Huang Z. & Xu, P. (2017). Hyaluronic acid and Arg-Gly-Asp peptide modified Graphene oxide with dual receptor-targeting function for cancer therapy. *Journal of biomaterials applications*, 32(1), 54-65.
30. Jung, H. S., Lee, M. Y., Kong, W. H., Do, I. H., & Hahn, S. K. (2014). Nano graphene oxide–hyaluronic acid conjugate for target specific cancer drug delivery. *RSC Advances*, 4(27), 14197-14200.
31. Mendes, R. M., Silva, G. A., Caliari, M. V., Silva, E. E., Ladeira, L. O., & Ferreira, A. J. (2010). Effects of single wall carbon nanotubes and its functionalization with sodium hyaluronate on bone repair. *Life Sciences*, 87(7-8), 215-222.
32. Zhang, X. Y., Li, H. P., Cui, X. L., & Lin, Y. (2010). Graphene/TiO₂ nanocomposites: synthesis, characterization and application in hydrogen evolution from water photocatalytic splitting. *Journal of Materials Chemistry*, 20(14), 2801-2806.
33. Feng, Z., Zhang, C., Chen, J., Wang, Y., Jin, X., Zhang, R., & Hu, J. (2013). An easy and eco-friendly method to prepare reduced graphene oxide with Fe (OH)₂ for use as a conductive additive for LiFePO₄ cathode materials. *RSC advances*, 3(13), 4408-4415.
34. Hidayah, N. M. S., Liu, W. W., Lai, C. W., Noriman, N. Z., Khe, C. S., Hashim, U., & Lee, H. C. (2017, October). Comparison on graphite, graphene oxide and reduced graphene oxide: Synthesis and characterization. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 1892, No. 1, p. 150002). AIP Publishing LLC.
35. Huang, H. H., De Silva, K. K. H., Kumara, G. R. A., & Yoshimura, M. (2018). Structural evolution of hydrothermally derived reduced graphene oxide. *Scientific reports*, 8(1), 1-9.
36. Sgorla, D., Almeida, A., Azevedo, C., Sarmiento, B., & Cavalcanti, O. A. (2016). Development and characterization of crosslinked hyaluronic acid polymeric films for use in coating processes. *International journal of pharmaceutics*, 511(1), 380-389.
37. Yousaf, A. M., Ramzan, M., Shahzad, Y., Mahmood, T., & Jamshaid, M. (2019). Fabrication and in vitro characterization of fenofibric acid-loaded hyaluronic acid–polyethylene glycol polymeric composites with enhanced drug solubility and dissolution rate. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 68(9), 510-515.

38. Barabás, R., de Souza Ávila, E., Ladeira, L. O., Antônio, L. M., Tötös, R., Simedru, D., Bizo, L. & Cadar, O. (2019). Graphene Oxides/Carbon Nanotubes–Hydroxyapatite Nanocomposites for Biomedical Applications. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 1-9.
39. Yang, X., Tu, Y., Li, L., Shang, S., & Tao, X. M. (2010). Well-dispersed chitosan/graphene oxide nanocomposites. *ACS applied materials & interfaces*, 2(6), 1707-1713.
40. Raucci, M. G., Giugliano, D., Longo, A., Zeppetelli, S., Carotenuto, G. & Ambrosio, L. Comparative facile methods for preparing graphene oxide–hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, v. 11, n. 8, p. 2204-2216, 2016.
41. Diker, N., Gulsever, S., Koroglu, T., Akcay, E. Y., & Oguz, Y. (2018). Effects of hyaluronic acid and hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate in combination on bone regeneration of a critical-size defect in an experimental model. *Journal of Craniofacial Surgery*, 29(4), 1087-1093.
42. Rodrigues, W. C., da Silva Fabris, A. L., Hassumi, J. S., Gonçalves, A., Sonoda, C. K., & Okamoto, R. (2016). Kinetics of gene expression of alkaline phosphatase during healing of alveolar bone in rats. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 54(5), 531-535.
43. Dahiya, P. & Kamal, R. (2013). Hyaluronic acid: a boon in periodontal therapy. *North American journal of medical sciences*, 5(5), 309.
44. Zhang, R., Lee, P., Lui, V. C., Chen, Y., Liu, X., Lok, C. N., To, M., Yeung K. W. & Wong, K. K. (2015). Silver nanoparticles promote osteogenesis of mesenchymal stem cells and improve bone fracture healing in osteogenesis mechanism mouse model. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 11(8), 1949-1959.
45. Martins-Júnior, P. A., Sá, M. A., Reis, A. C., Queiroz-Junior, C. M., Caliarí, M. V., Teixeira, M. M., Ladeira, L. O., Pinho, V. & Ferreira, A. J. (2016). Evaluation of carbon nanotubes functionalized with sodium hyaluronate in the inflammatory processes for oral regenerative medicine applications. *Clinical oral investigations*, 20(7), 1607-1616.

46. Kowalczewski, C. J. & Saul, J. M. (2018). Biomaterials for the delivery of growth factors and other therapeutic agents in tissue engineering approaches to bone regeneration. *Frontiers in pharmacology*, 9, 513.
47. Street, J., Bao, M., de Guzman, L., Bunting, S., Peale, F. V., Ferrara, N., Steinmetz H, Hoeffel, J., Cleland, J. L., Daugherty, A., van Bruggen, N., Redmond, H. P., Carano, R. A. & Filvaroff, E. H. (2002). Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(15), 9656-9661.
48. Filvaroff, E. H. (2003). VEGF and bone. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*, 3(4), 304-307.
49. Bahney, C. S., Zondervan, R. L., Allison, P., Theologis, A., Ashley, J. W., Ahn, J., Miclau. T., Marcucio, R. S. & Hankenson, K. D. (2019). Cellular biology of fracture healing. *Journal of Orthopaedic Research®*, 37(1), 35-50.

FIGURAS DO ARTIGO CIENTÍFICO

Figura 1 - Os biomateriais em suas apresentações: A- HY 1% (gel), B- OG e OG-HY (pós), C- Carbopol (gel inerte para veiculização dos biomateriais) e D- OG e OG-HY (géis nas concentrações de 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) acondicionados em seringas para preenchimento dos defeitos ósseos.



Figura 2 - Sequencia dos procedimentos cirúrgicos: A- incisão longitudinal na região da crista da tíbia, após tricotomia da região a ser operada e aposição de campo cirúrgico; B- perfuração e transfixação da tíbia em sua face lateral, utilizando broca helicoidal acoplada em contra-ângulo cirúrgico e sob irrigação constante com soro fisiológico 0,9% resfriado; C- defeito ósseo confeccionado com 1,6 mm de diâmetro; D- inserção do biomaterial no defeito ósseo, com auxílio de seringa e agulha; E e F- tecidos reposicionados e suturados com fio de nylon (nº 4-0, agulhado).

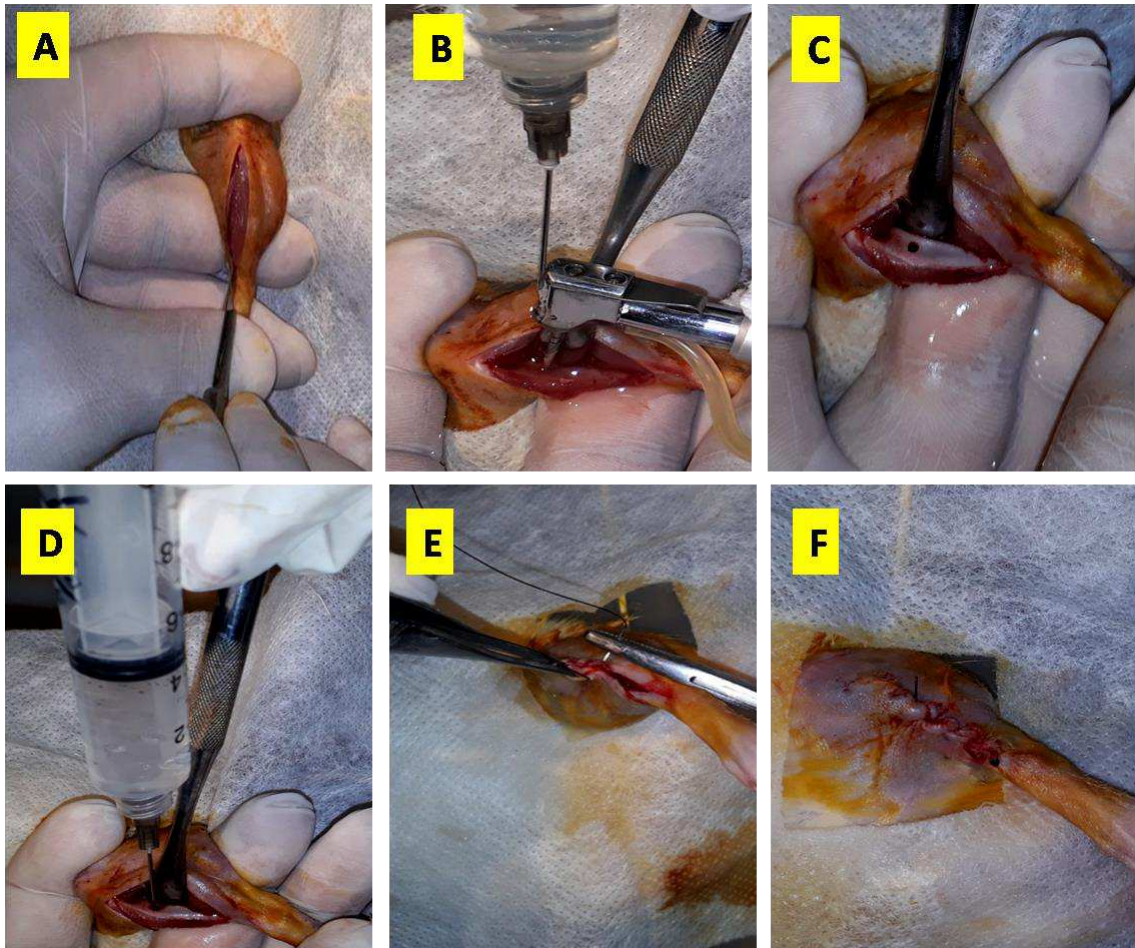


Figura 3 - Contra-ângulo cirúrgico (CONCEPT; redução 1:16) acolpado a motor cirúrgico (BLM 600), programado com 1200 rpm e torque de 30 N, para a confecção dos defeitos ósseos.



Figura 4 - Sequencia dos procedimentos para remoção imediata das tíbias após eutanásia dos animais, nos períodos de 7 e 14 dias de pós-operatório: A- dissecação cuidadosa dos tecidos moles, B- retirada da tíbia e visualização do defeito ósseo, C- cabeça da tíbia mantida para referência no processo de inclusão em parafina D- recipiente (tubo Falcon) devidamente identificado e contendo formalina neutra tampada (FNT) 10% para fixação da tíbia, por 48 h, em temperatura ambiente.

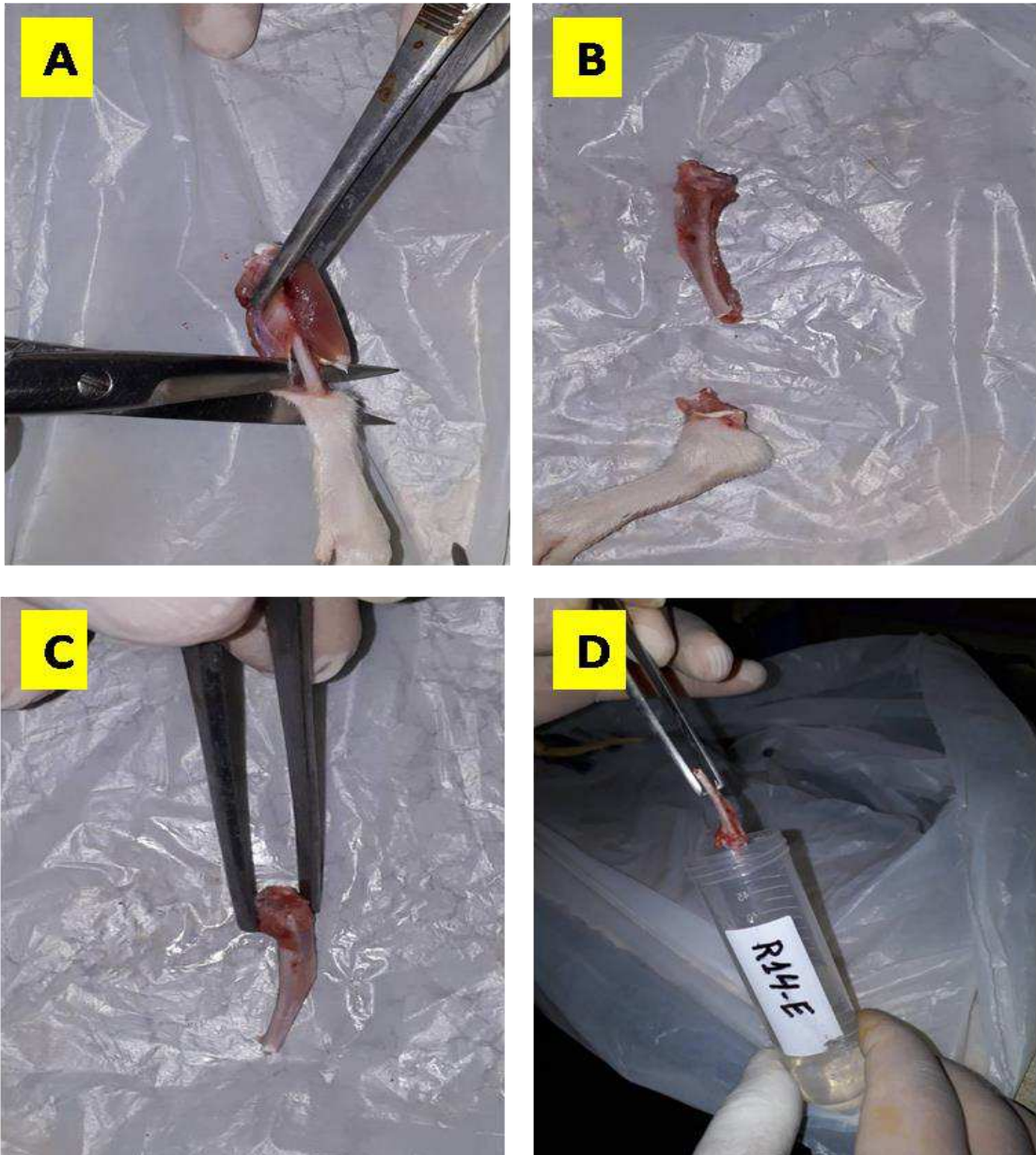


Figura 5 - Tíbia posicionada no molde para o processo de inclusão em parafina: a face plana (medial) da tíbia era sempre voltada para baixo e apoiada, paralelamente, no fundo do molde. A cabeça da tíbia era preservada e uma porção da parte distal (inferior) da tíbia era seccionada (mantendo margem de segurança de aproximadamente 2 a 3 mm do "defeito ósseo").



Figura 6 - Imagens real e binária de um "defeito ósseo" reconstruído no programa Microsoft PowerPoint®. A - imagem real da área total do defeito ósseo com sequência (setas amarelas) para captura dos campos (trajetória em "S"); B - imagem binária da área real total do "defeito ósseo", delimitada; C - primeira imagem real focada no canto superior direito do "defeito ósseo". D - imagem binária do primeiro campo selecionado e delimitada, para análise pelo ImageJ®.

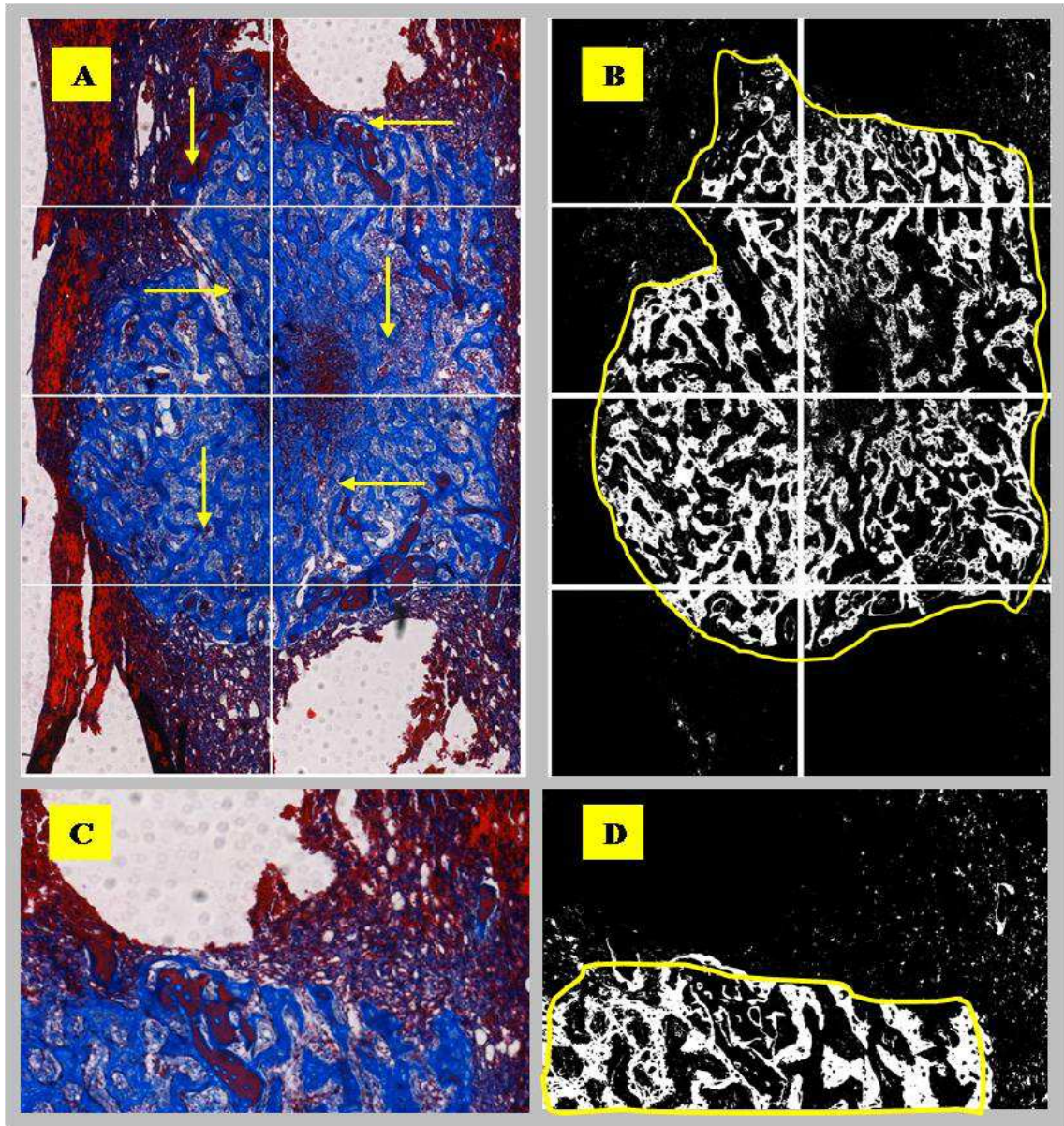


Figura 7 -Valores representativos dos campos avaliados em uma determinada lâmina (amostra), exemplificando a obtenção do valor final (59,79442 %) de trabéculas formadas dentro da área total delimitada do "defeito ósseo" criado em tibia de rato Wistar.

IDENTIFICAÇÃO DA LÂMINA				
R17-D				
Nº de campos avaliados	Área delimitada em cada campo (mm²)	Porcentagem de trabéculas formadas na área delimitada em cada campo (%)	Área de trabéculas formadas dentro da área delimitada em cada campo (mm²)	Trabéculas formadas dentro da área total delimitada (%)
1	0,225	62,025 %	0,139556	-----
2	0,156	69,059 %	0,107732	-----
3	0,359	57,952 %	0,208048	-----
4	0,544	49,011 %	0,26662	-----
5	0,544	57,312 %	0,311777	-----
6	0,467	67,735 %	0,316322	-----
7	0,068	75,279 %	0,05119	-----
8	0,071	76,269 %	0,054151	-----
TOTAL	2,434 mm²	-----	1,455396 mm²	59,79442 %

Figura 8 - Fotomicrografias realizadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) (JEOL JSM 6360LV, com aceleração de 15Kv, aumento de 2000 vezes e distância de trabalho entre 11,8 e 12mm) para análise morfológica dos compostos OG, HY e OG-HY, caracterizando as suas superfícies.

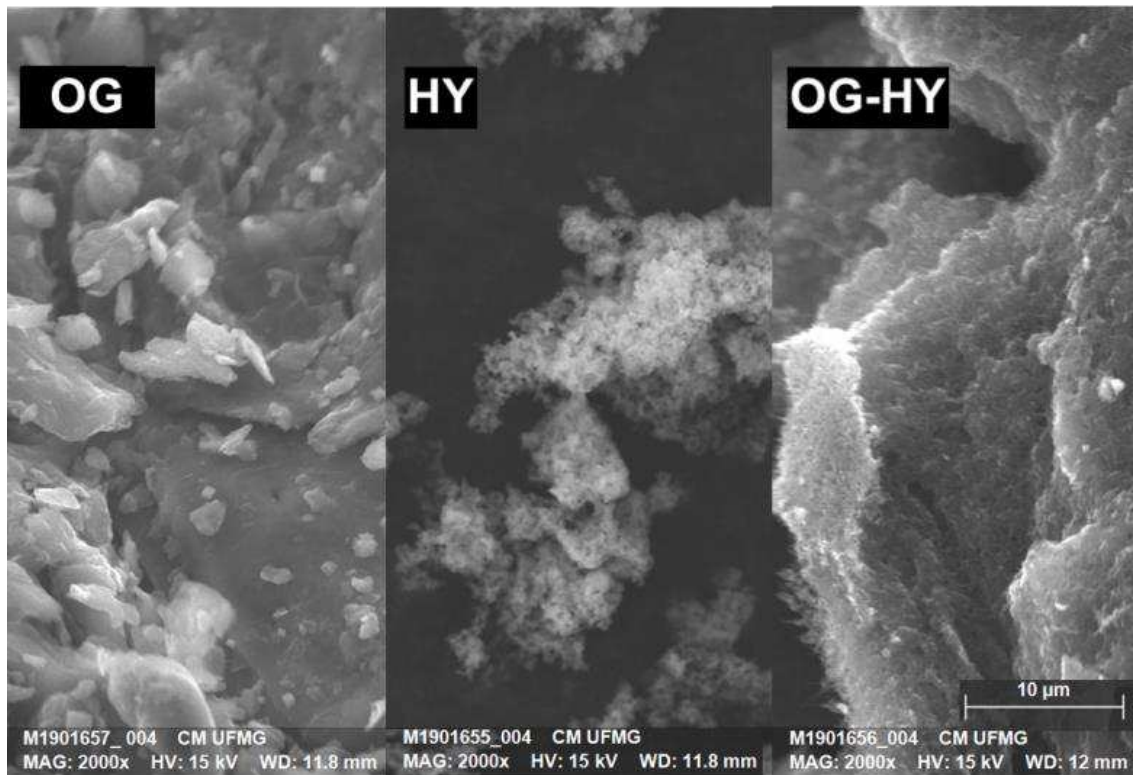


Figura 9 - Caracterização do OG, HY e nanohíbrido (OG-HY) por: (A) Espectroscopia Raman, apresentando os picos/bandas características dos compostos HY (796-1654 cm^{-1} e 2700-3000 cm^{-1}), OG (1350 cm^{-1} e 1590 cm^{-1}) e nanohíbrido (OG-HY) (pico correspondente ao estiramento CH do HY; bandas D, G e 2D, característica de materiais grafíticos); (B) Análise termogravimétrica, apresentando as variações das massas dos compostos; (C) Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), revelando diferenças de espectros entre os compostos; (D) Medidas de difração de raios-X, evidenciando as características cristalográficas dos compostos.

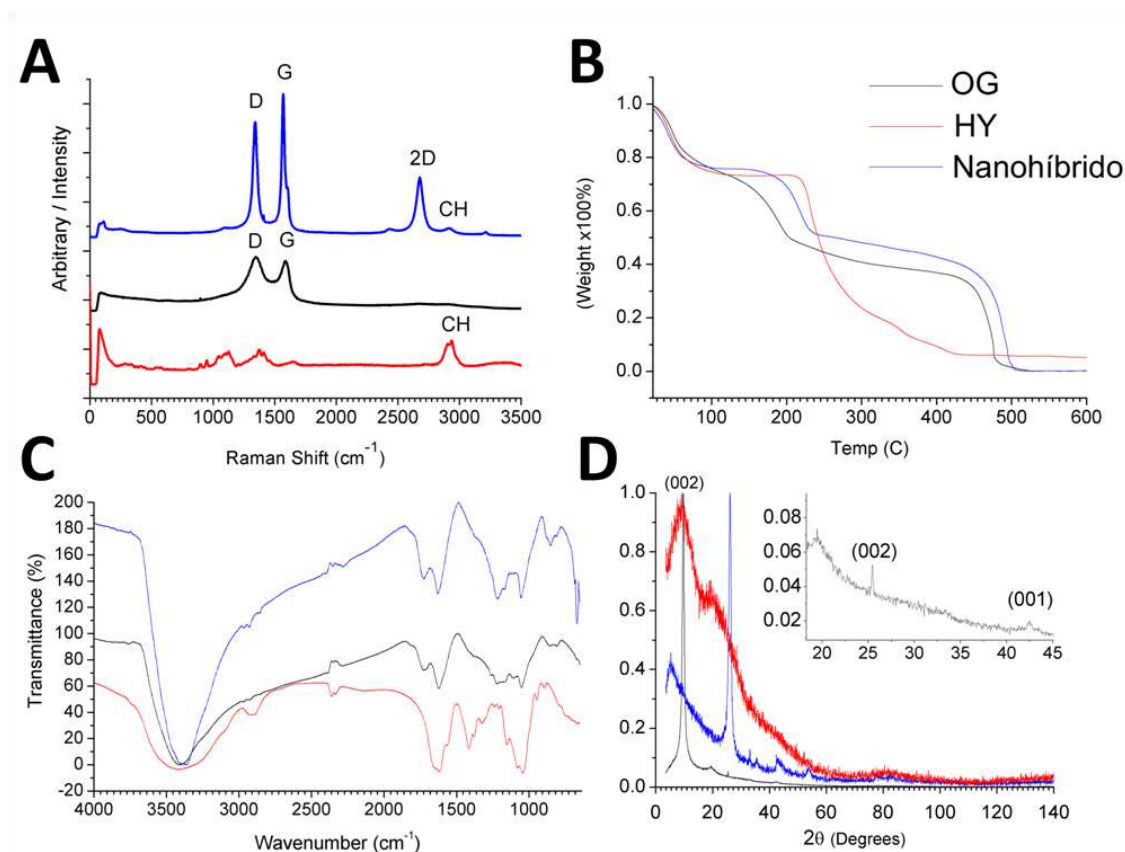


Figura 10 - Quantificação da viabilidade das células MC3T3-E1 cultivadas na presença dos biomateriais OG, HY e OG-HY, nos períodos 48 e 72 horas, nas concentrações de 5 $\mu\text{g/mL}$ (A), 10 $\mu\text{g/mL}$ (B), 25 $\mu\text{g/mL}$ (C), 50 $\mu\text{g/mL}$ (D), 100 $\mu\text{g/mL}$ (E) e 200 $\mu\text{g/mL}$ (F). Os dados estão expressos com média \pm EPM. * vs controle ($p < 0,05$). One-way ANOVA seguido pelo teste post hoc de Tukey.

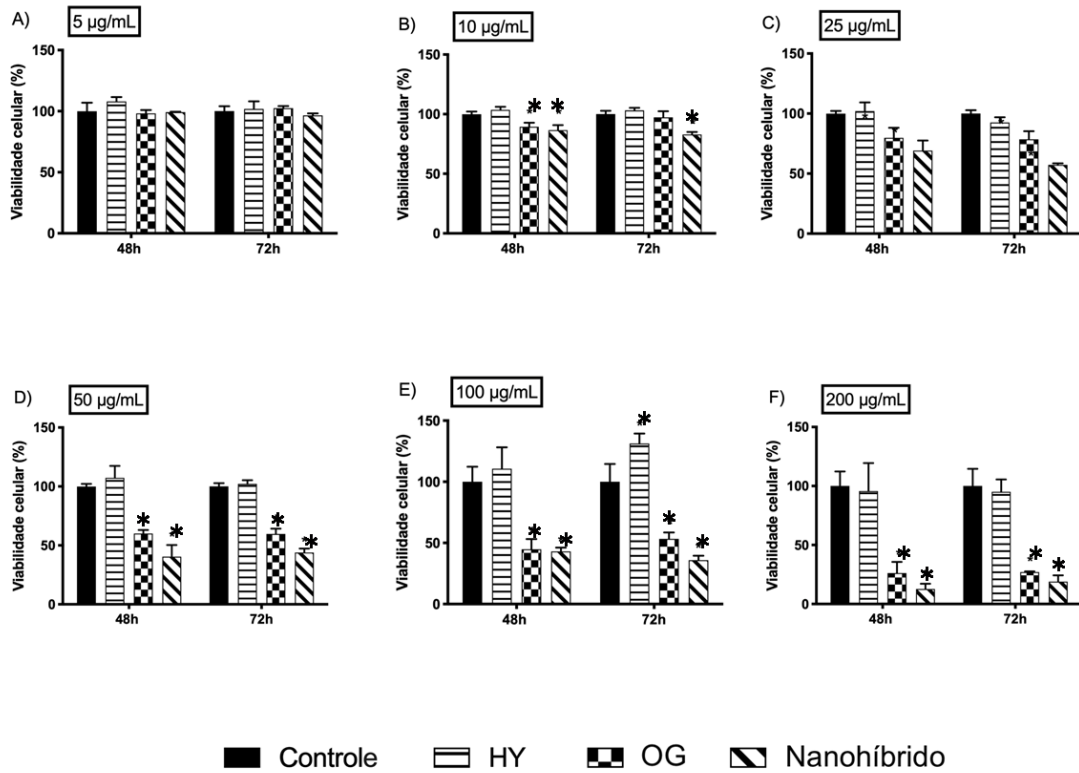


Figura 11 - Avaliação da fosfatase alcalina nos períodos de 3 e 7 dias, comparando-se o grupo controle com os grupos OG, OG-HY e HY, em concentrações de 5 µg/mL (A) e 10 µg/mL (B). Os dados estão expressos com média ± EPM. * vs controle (p<0,05).

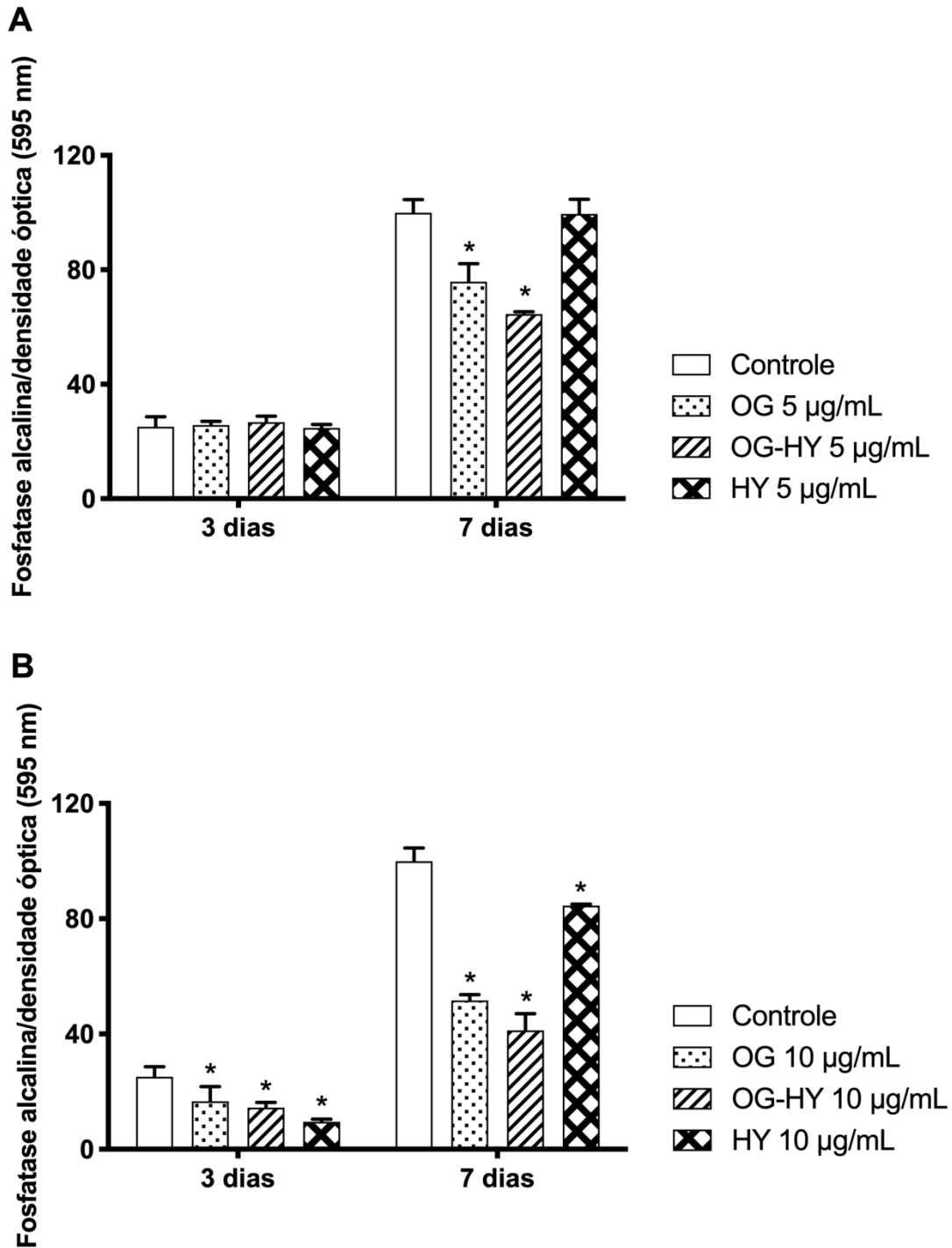


Figura 12 - Fotomicrografias (aumentos de 40 e 200x) representativas de defeitos ósseos (cortes de 5 μ m de espessura), 7 dias após os procedimentos cirúrgicos e coradas em Tricrômico de Masson. A e B (controle - coágulo sanguíneo: CTRL), C e D (HY 1%), E e F (OG 50 μ g/mL) e G e H (OG-HY 50 μ g/mL). Asteriscos: áreas centrais dos defeitos ósseos com tecido de granulação; Setas amarelas: trabéculas ósseas; Setas brancas: espaços intertrabeculares; Seta vermelha: vaso sanguíneo. Barras A, C, E, G = 300 μ m; B, D, F, H = 60 μ m.

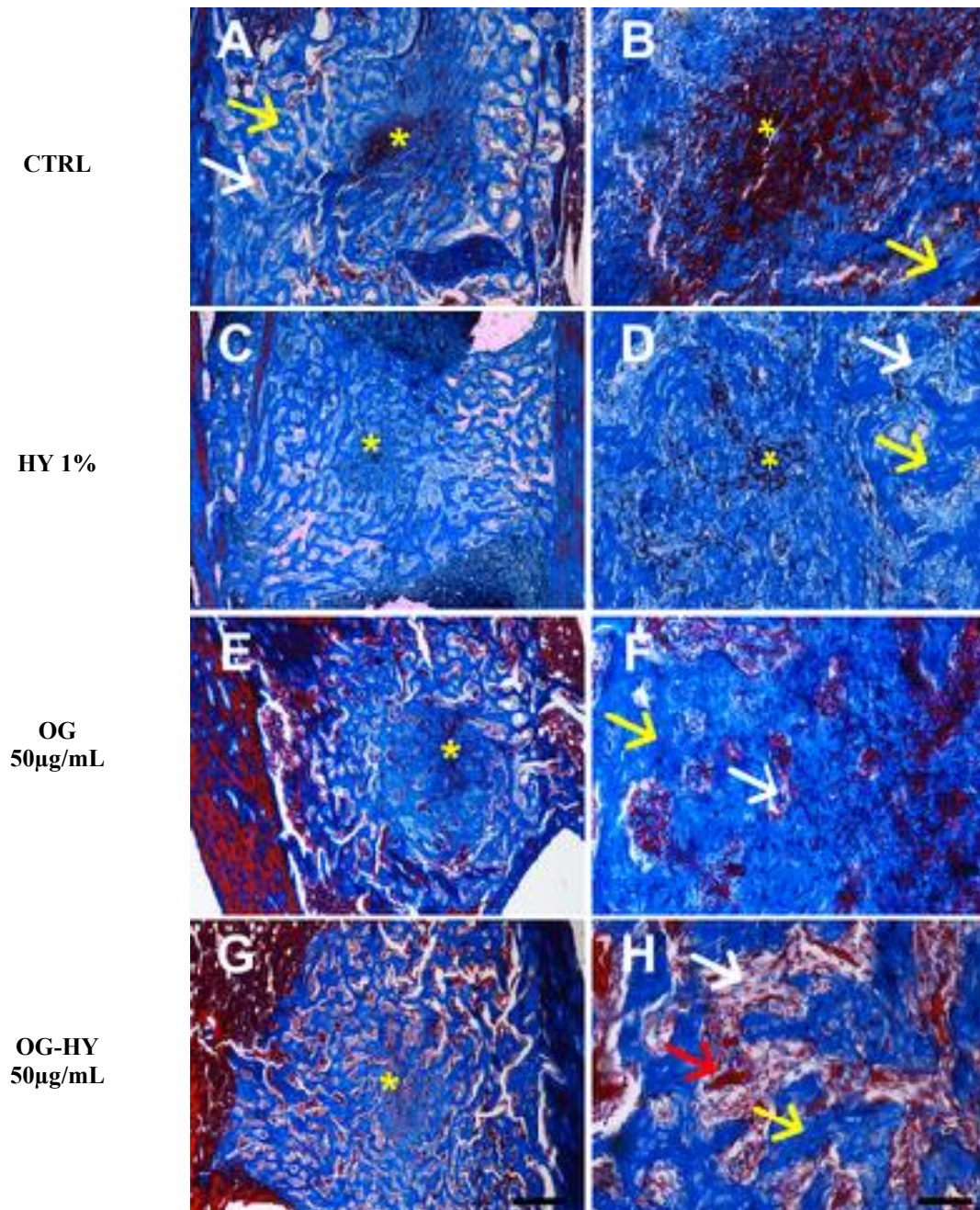


Figura 13 - Fotomicrografias (aumentos de 40 e 200x) representativas de defeitos ósseos (cortes de 5 μ m de espessura), 7 dias após os procedimentos cirúrgicos e coradas em Tricrômico de Masson. A e B (controle - coágulo sanguíneo: CTRL), C e D (HY 1%), E e F (OG 100 μ g/mL) e G e H (OG-HY 100 μ g/mL). Asteriscos: áreas centrais dos defeitos ósseos com tecido de granulação; Setas amarelas: trabéculas ósseas; Setas brancas: espaços intertrabeculares; Setas vermelhas: vasos sanguíneos. Barras A, C, E, G = 300 μ m; B, D, F, H = 60 μ m.

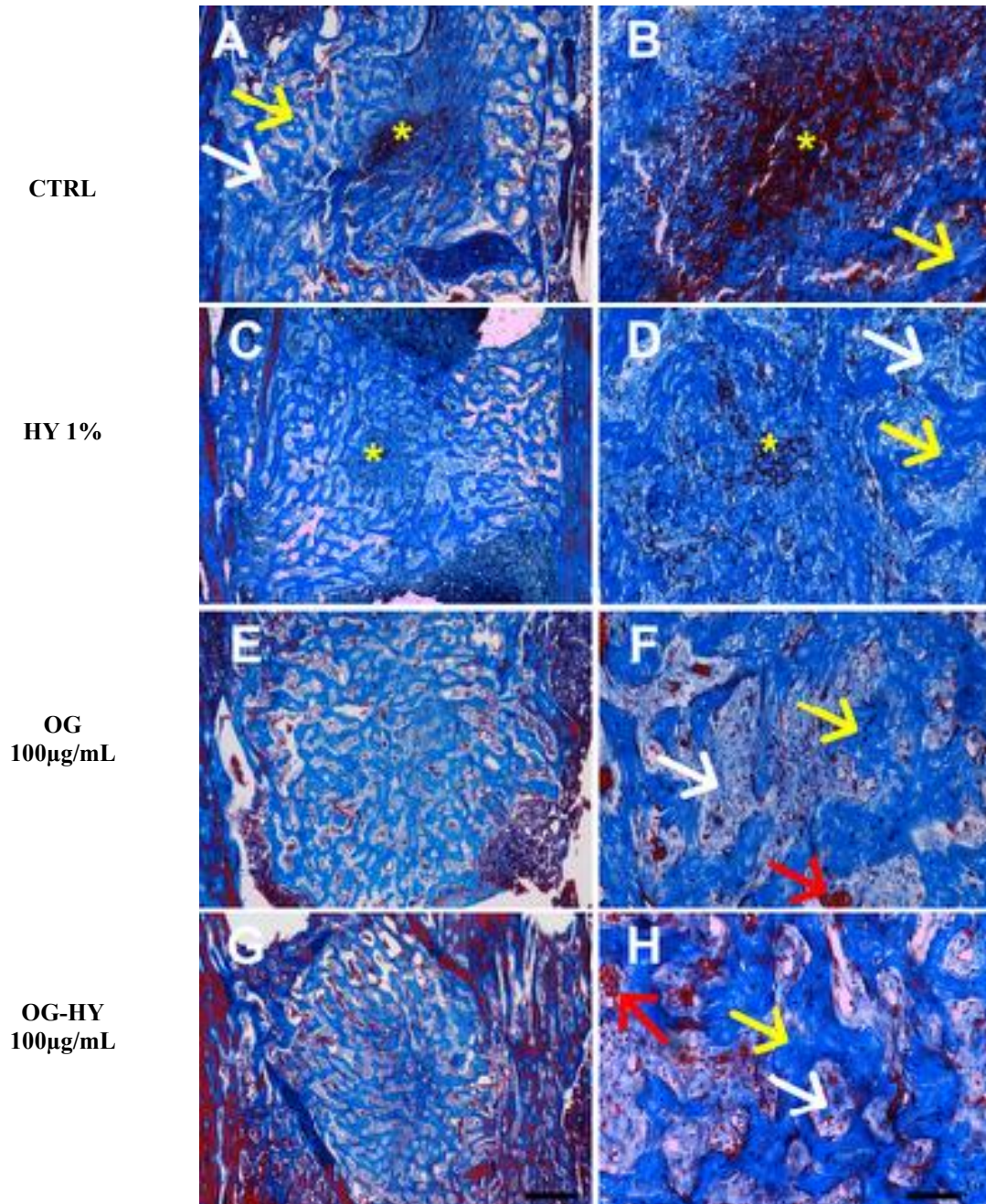


Figura 14 - Fotomicrografias (aumentos de 40 e 200x) representativas de defeitos ósseos (cortes de 5 μ m de espessura), 7 dias após os procedimentos cirúrgicos e coradas em Tricrômico de Masson. A e B (controle - coágulo sanguíneo: CTRL), C e D (HY 1%), E e F (OG 200 μ g/mL) e G e H (OG-HY 200 μ g/mL). Asteriscos: áreas centrais dos defeitos ósseos com tecido de granulação; Setas amarelas: trabéculas ósseas; Setas brancas: espaços intertrabeculares; Seta vermelha: vaso sanguíneo. Barras A, C, E, G = 300 μ m; B, D, F, H = 60 μ m.

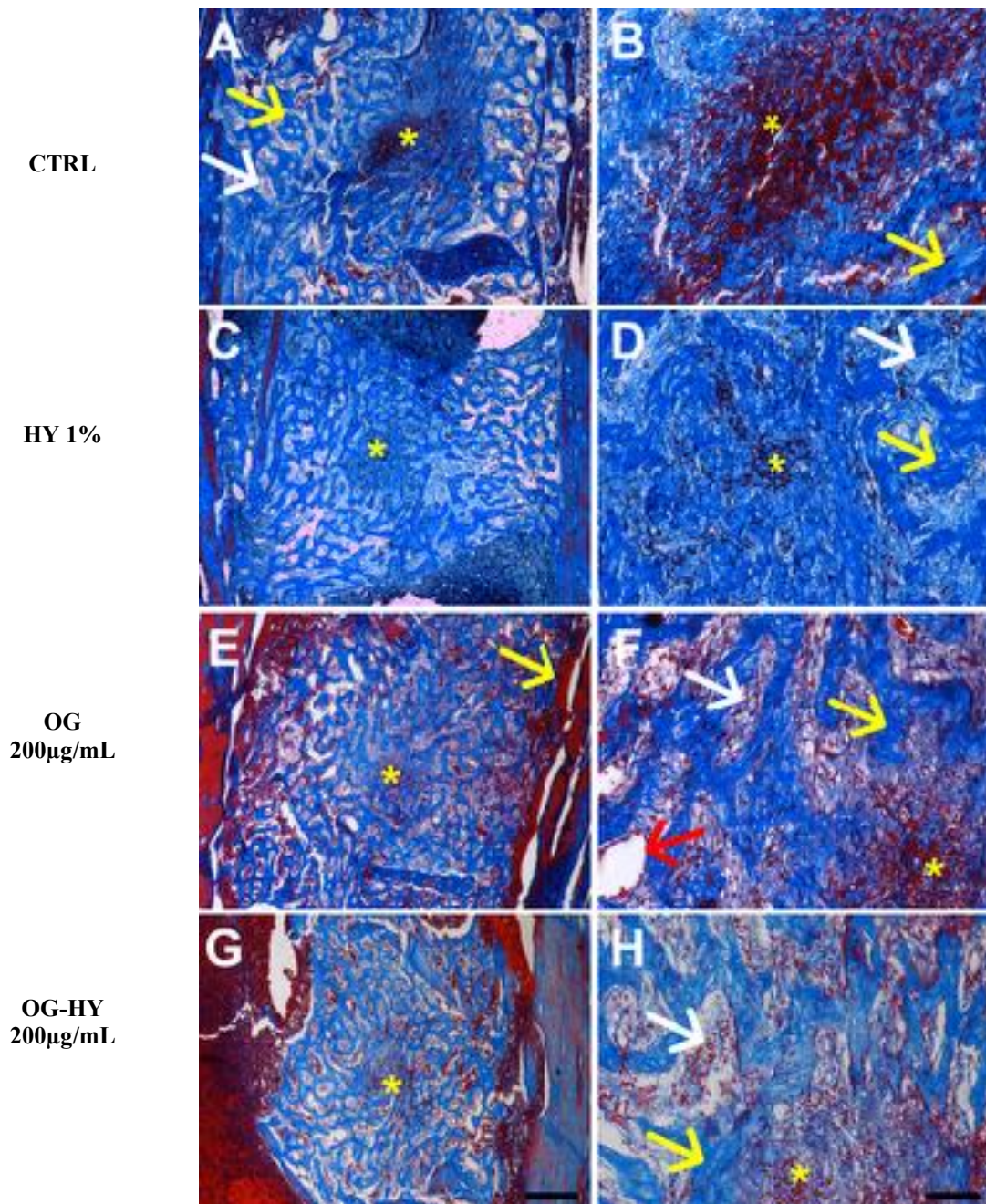


Figura 15 - Fotomicrografias (aumentos de 40 e 200x) representativas de defeitos ósseos (cortes de 5 μ m de espessura), 14 dias após os procedimentos cirúrgicos e coradas em Tricrômico de Masson. A e B (controle - coágulo sanguíneo: CTRL), C e D (HY 1%), E e F (OG 100 μ g/mL) e G e H (OG-HY 100 μ g/mL). Setas amarelas: trabéculas ósseas; Setas brancas: espaços intertrabeculares; Setas vermelhas: vasos sanguíneos. Barras A, C, E, G = 300 μ m; B, D, F, H = 60 μ m.

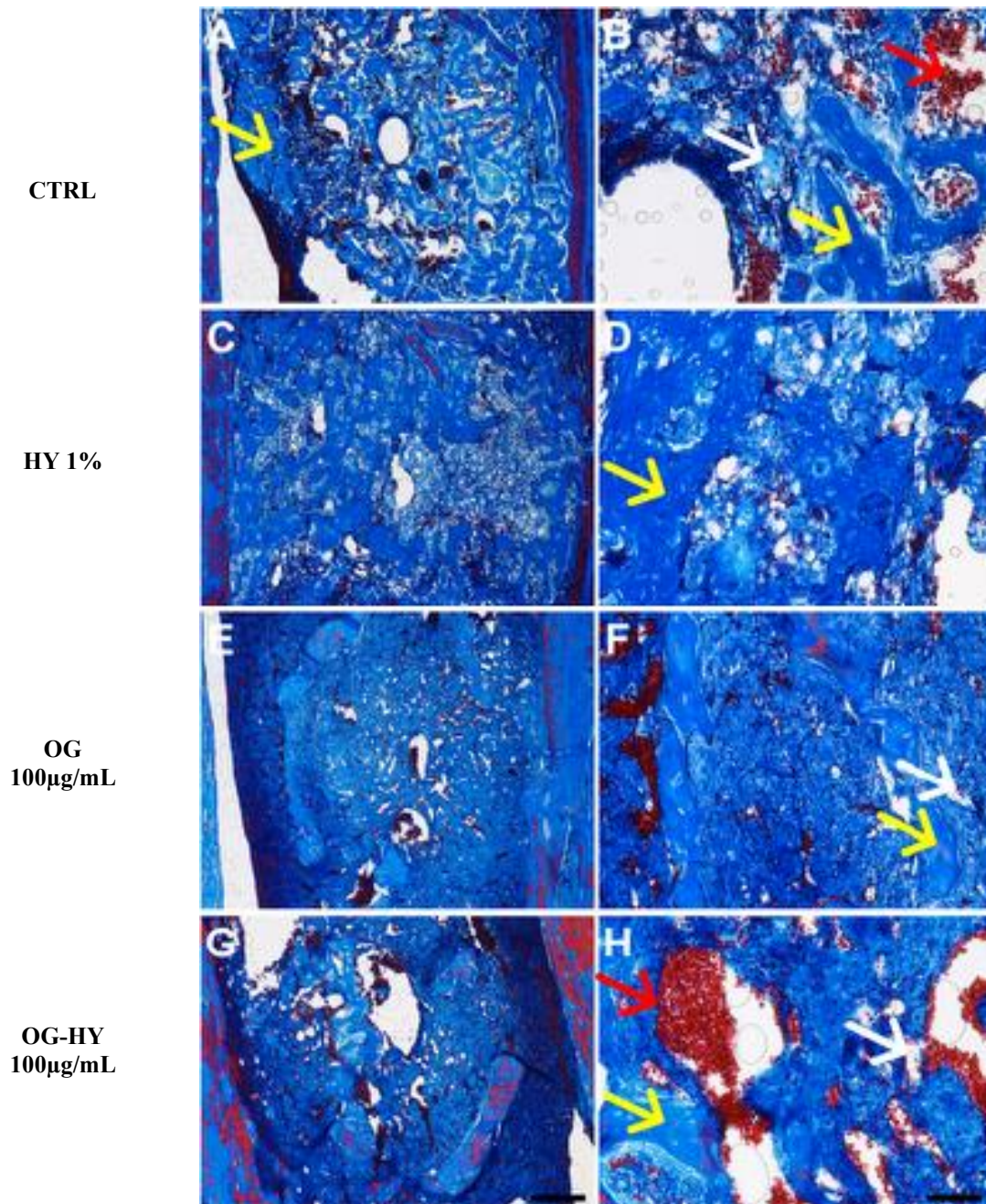


Figura 16 - Análise morfométrica que avalia a neoformação óssea, 7 dias após procedimentos cirúrgicos. Os defeitos ósseos foram preenchidos com coágulo sanguíneo (controle), HY 1% e diferentes concentrações de OG (50, 100 e 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e de OG-HY (50, 100 e 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Os dados estão expressos com média \pm EPM. * vs controle ($p < 0,05$).

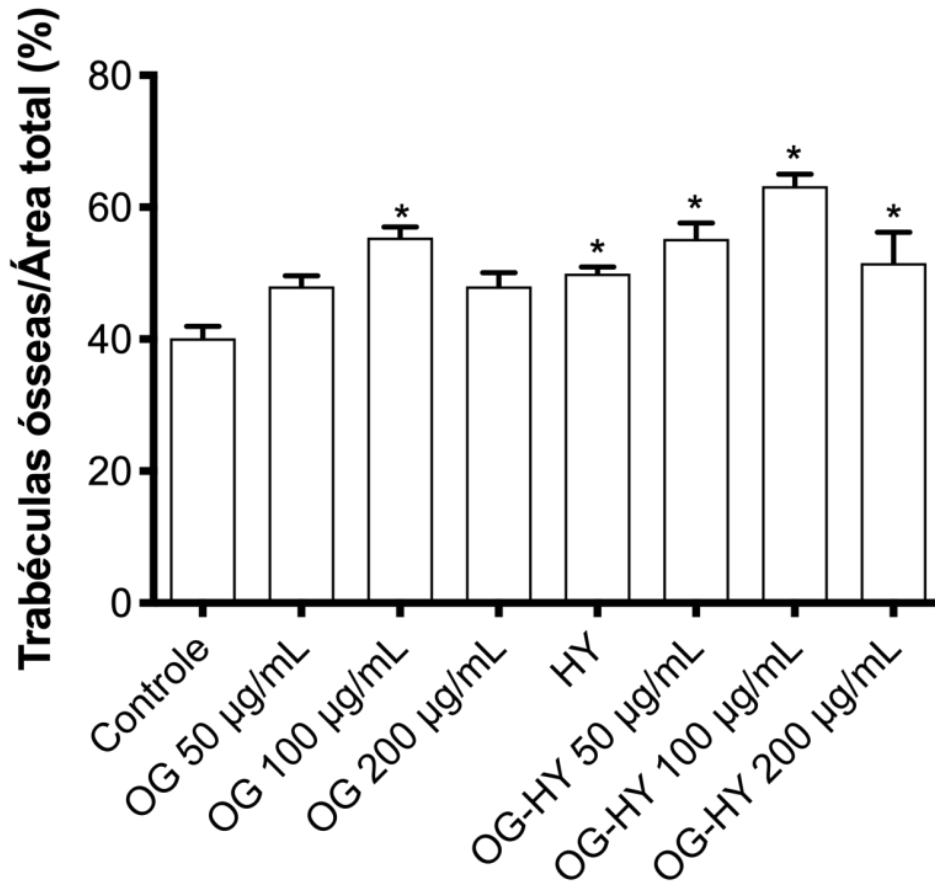


Figura 17 - Fotomicrografias (aumentos de 40 e 100x) representativas da avaliação imunohistoquímica da expressão do VEGF em defeitos ósseos (cortes de 5 μ m de espessura), 7 dias após os procedimentos cirúrgicos. A e B (controle negativo: CTRL-N), C e D (controle - coágulo sanguíneo: CTRL), E e F (HY 1%), G e H (OG 100 μ g/mL) e I e J (OG-HY 100 μ g/mL). Asterisco: marcação de fundo; Setas amarelas: imunoposição do VEGF em trabéculas ósseas; Setas vermelhas: imunoposição do VEGF em tecido não mineralizado. Barras A, C, E, G, I = 300 μ m; B, D, F, H, J = 50 μ m.

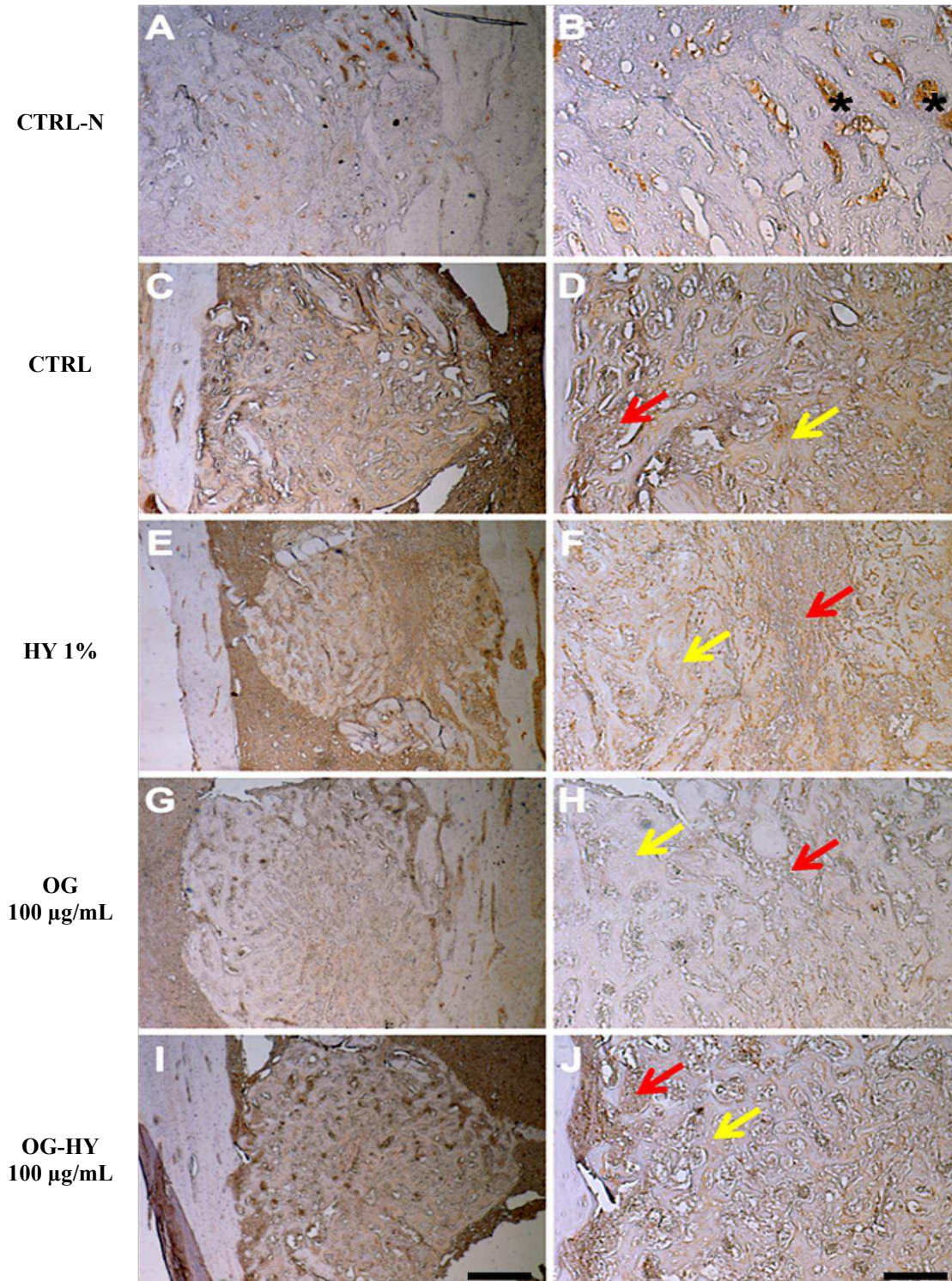
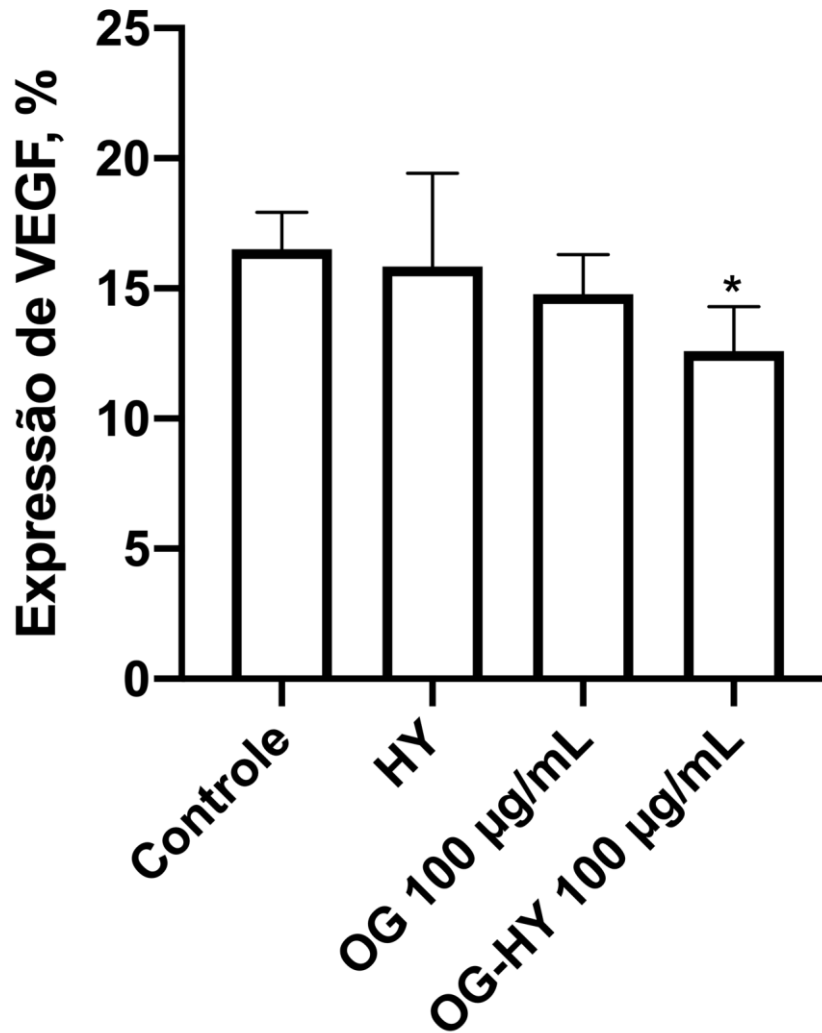


Figura 18 - Avaliação da expressão de VEGF nos defeitos ósseos, 7 dias após os procedimentos cirúrgicos, preenchidos com HY 1%, OG 100 $\mu\text{g/mL}$ e OG-HY 100 $\mu\text{g/mL}$. Os dados estão expressos com média \pm EPM. * vs controle ($p < 0,05$).



4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo forneceram boas evidências de que os biomateriais utilizados (OG, HY e OG-HY) influenciaram, positivamente, o reparo ósseo em tíbias de ratos, com adequada capacidade para acelerar a formação óssea *in vivo*. O nanohíbrido OG-HY 100 µg/mL apresentou uma maior eficiência em induzir, mais rapidamente, a regeneração óssea, podendo ser considerado um biomaterial com acentuado potencial para ser utilizado na engenharia tecidual óssea, em diversas áreas da Odontologia e da Medicina. Entretanto, é interessante a realização de estudos complementares, em períodos mais longos do reparo ósseo, para analisar os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo, bem como a distribuição sistêmica desse biomaterial e a qualidade do osso formado.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., MORGAN, D., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P., WILSON, J. e HUNT, T. *Biologia Molecular da Célula*. 4ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 1463p.
- ALVES-REZENDE, M. C. R., KUSUDA, R., ALVES, L. M. N., FELIPINI, R. C., OKAMOTO, R., OKAMOTO, T., L., ALVES-REZENDE, G. R., GARCIA-DA-SILVA, T. C. e ALVES-CLARO, A. P. R. Efeito do estresse crônico de contenção sobre o reparo de cavidades ósseas: estudo histológico em tíbias de ratos. **Rev. Odontol. Araçatuba (Online)**, v. 30, n. 2, p. 71-76, 2009.
- ANDRADE, V. B. Efeitos do hialuronato de sódio e dos nanotubos de carbono funcionalizados com hialuronato de sódio no reparo de tíbias de ratos. 2012.
- ASLAN, M., ŞİMŞEK, G. e DAYI, E. The effect of hyaluronic acid-supplemented bone graft in bone healing: experimental study in rabbits. **Journal of biomaterials applications**, v. 20, n. 3, p. 209-220, 2006.
- BUENZLI, P. R. e SIMS, N. A. Quantifying the osteocyte network in the human skeleton. **Bone**, v. 75, p. 144-150, 2015.
- CHEN, W. Y. J. e EMBERY, G. Comparison of the antioxidant properties of HYAFF®-11p75, AQUACEL® and hyaluronan towards reactive oxygen species in vitro. **Biomaterials**, v. 23, n. 10, p. 2255-2264, 2002.
- DATTA, H. K., NG, W. F., WALKER, J. A., TUCK, S. P. e VARANASI, S. S. The cell biology of bone metabolism. **Journal of clinical pathology**, v. 61, n. 5, p. 577-587, 2008.
- DAVID-RAOUDI, M., TRANCHEPAIN, F., DESCHREVEL, B., VINCENT, J. C., BOGDANOWICZ, P., BOUMEDIENE, K. e PUJOL, J. P. Differential effects of hyaluronan and its fragments on fibroblasts: relation to wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 16, n. 2, p. 274-287, 2008.
- DECHERT, T. A., DUCALE, A. E., WARD, S. I. e YAGER, D. R. Hyaluronan in human acute and chronic dermal wounds. **Wound Repair and Regeneration**, v. 14, n. 3, p. 252-258, 2006.
- DIMITRIOU, R., JONES, E., MCGONAGLE, D. e GIANNOUDIS, P. V. Bone regeneration: current concepts and future directions. **BMC medicine**, v. 9, n. 1, p. 66, 2011.
- DUBEY, N., BENTINI, R., ISLAM, I., CAO, T., CASTRO NETO, A. H. e ROSA, V. Graphene: a versatile carbon-based material for bone tissue engineering. **Stem cells international**, v. 2015, 2015.
- GAPSKI, R., NEIVA, R., OH, T. J. e WANG, H. L. Histologic analyses of human mineralized bone grafting material in sinus elevation procedures: a case series. **International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v. 26, n. 1, 2006.

GEIM, A. K. e NOVOSELOV, K. S. The rise of graphene. In: **Nanoscience and technology: a collection of reviews from nature journals**. 2010. p. 11-19.

GIAVARESI, G., TORRICELLI, P., FORNASARI, P. M., GIARDINO, R., BARBUCCI, R. e LEONE, G. Blood vessel formation after soft-tissue implantation of hyaluronan-based hydrogel supplemented with copper ions. **Biomaterials**, v. 26, n. 16, p. 3001-3008, 2005.

HAN, Y., COWIN, S. C., SCHAFFLER, M. B. e WEINBAUM, S. Mechanotransduction and strain amplification in osteocyte cell processes. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 101, n. 47, p. 16689-16694, 2004.

HAYER, S., STEINER, G., GÖRTZ, B., REITER, E., TOHIDAST-AKRAD, M., AMLING, M., HOFFMANN, O., REDLICH, K., ZWERINA, J., SKRINER, K., HILBERG, F., WAGNER, E. F., SMOLEN, J. S. e SCHETT, G. CD44 is a determinant of inflammatory bone loss. **The Journal of experimental medicine**, v. 201, n. 6, p. 903-914, 2005.

HOLMBECK, K., BIANCO, P., PIDOUX, I., INOUE, S., BILLINGHURST, R. C., WU, W., CHRYSOVERGIS K., YAMADA S., BIRKEDAL-HANSEN H. e POOLE, A. R. The metalloproteinase MT1-MMP is required for normal development and maintenance of osteocyte processes in bone. **Journal of cell science**, v. 118, n. 1, p. 147-156, 2005.

JARDIM, E. C. G., SANTOS, P. L. D., JUNIOR, S., FERREIRA, J., JARDIM JÚNIOR, E. G., ARANEGA, A. M. e GARCIA JÚNIOR, I. R. Enxerto ósseo em odontologia. **Rev. Odontol. Araçatuba (Online)**, p. 24-28, 2009.

KALFAS, IH. Principles of bone healing. *Neurosurg Focus*. 2001;10:E1.

KAMIOKA, H., HONJO, T. e TAKANO-YAMAMOTO, T. A three-dimensional distribution of osteocyte processes revealed by the combination of confocal laser scanning microscopy and differential interference contrast microscopy. **Bone**, v. 28, n. 2, p. 145-149, 2001.

KHAN, U. A., HASHIMI, S. M., BAKR, M. M., FORWOOD, M. R. e MORRISON, N. A. Foreign body giant cells and osteoclasts are TRAP positive, have podosome-belts and both require OC-STAMP for cell fusion. **Journal of cellular biochemistry**, v. 114, n. 8, p. 1772-1778, 2013.

KING, W., TOLER, K. e WOODDELL-MAY, J. Role of white blood cells in blood-and bone marrow-based autologous therapies. **BioMed research international**, v. 2018, 2018.

LINKER, A., MEYER, K. e WEISSMANN, B. Enzymatic formation of monosaccharides from hyaluronate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 213, n. 1, p. 237-248, 1955.

LOBATO, R. D. O. **Efeitos bioquímicos da exposição ao nanomaterial óxido de grafeno em diferentes tecidos do camarão branco (*Litopenaeus vannamei*; Crustacea, Decapoda), através da suplementação na ração**. 2013. Dissertação de Mestrado.

LOI, F., CÓRDOVA, L. A., PAJARINEN, J., LIN, T. H., YAO, Z. e GOODMAN, S. B. Inflammation, fracture and bone repair. **Bone**, v. 86, p. 119-130, 2016.

MACNEILL, S. R., COBB, C. M., RAPLEY, J. W., GLAROS, A. G., & SPENCER, P. In vivo comparison of synthetic osseous graft materials: a preliminary study. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 26, n. 4, p. 239-245, 1999.

MATTIOLI-BELMONTE, M., VOZZI, G., WHULANZA, Y., SEGGIANI, M., FANTAUZZI, V., ORSINI, G. e AHLUWALIA, A. Tuning polycaprolactone-carbon nanotube composites for bone tissue engineering scaffolds. **Materials Science and Engineering: C**, v. 32, n. 2, p. 152-159, 2012.

MEHRALI, M., MOGHADDAM, E., SHIRAZI, S. F. S., BARADARAN, S., MEHRALI, M., LATIBARI, S. T., METSELAAR, H. S., KADRI, N.A., ZANDI, K. e OSMAN, N. A. A. Synthesis, mechanical properties, and in vitro biocompatibility with osteoblasts of calcium silicate-reduced graphene oxide composites. **ACS applied materials & interfaces**, v. 6, n. 6, p. 3947-3962, 2014.

MENDES, R. M., SILVA, G. A., LIMA, M. F., CALLIARI, M. V., ALMEIDA, A. P., ALVES, J. B. e FERREIRA, A. J. Sodium hyaluronate accelerates the healing process in tooth sockets of rats. **Archives of oral biology**, v. 53, n. 12, p. 1155-1162, 2008.

MEYER, K., & PALMER, J. W. The polysaccharide of the vitreous humor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 107, n. 3, p. 629-634, 1934.

MIKUNI-TAKAGAKI, Y. Mechanical responses and signal transduction pathways in stretched osteocytes. **Journal of bone and mineral metabolism**, v. 17, n. 1, p. 57-60, 1999.

MIRON, R. J. e ZHANG, Y. F. Osteoinduction: a review of old concepts with new standards. **Journal of dental research**, v. 91, n. 8, p. 736-744, 2012.

MOHAMMADREZAEI, D., GOLZAR, H., REZAI RAD, M., OMIDI, M., RASHEDI, H., YAZDIAN, F., KHOJASTEH, A. e TAYEBI, L. In vitro effect of graphene structures as an osteoinductive factor in bone tissue engineering: a systematic review. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 106, n. 8, p. 2284-2343, 2018.

MOSELEY, R., LEAVER, M., WALKER, M., WADDINGTON, R. J., PARSONS, D., CHEN, W. Y. J., e EMBERY, G. Comparison of the antioxidant properties of HYAFF®-11p75, AQUACEL® and hyaluronan towards reactive oxygen species in vitro. **Biomaterials**, v. 23, n. 10, p. 2255-2264, 2002.

PASQUINELLI, G., ORRICO, C., FORONI, L., BONAFÈ, F., CARBONI, M., GUARNIERI, C., RAIMONDO, S., PENNA C., GEUNA, S., PAGLIARO, P., FREYRIE, A., STELLA, A., CALDARERA, C. M. e MUSCARI, C. Mesenchymal stem cell interaction with a non-woven hyaluronan-based scaffold suitable for tissue repair. **Journal of anatomy**, v. 213, n. 5, p. 520-530, 2008.

PILLONI, A. e BERNARD, G. W. The effect of hyaluronan on mouse intramembranous osteogenesis in vitro. **Cell and tissue research**, v. 294, n. 2, p. 323-333, 1998.

PRINCE, C. W. Roles of hyaluronan in bone resorption. **BMC musculoskeletal disorders**, v. 5, n. 1, p. 12, 2004.

RAUCCI, M. G., GIUGLIANO, D., LONGO, A., ZEPPESELLI, S., CAROTENUTO, G. e AMBROSIO, L. Comparative facile methods for preparing graphene oxide–hydroxyapatite for bone tissue engineering. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 11, n. 8, p. 2204-2216, 2017.

REN, X., LI, J., CHEN, C., GAO, Y., CHEN, D., SU, M., ALSAEDI, A. e HAYAT, T. Graphene analogues in aquatic environments and porous media: dispersion, aggregation, deposition and transformation. **Environmental Science: Nano**, v. 5, n. 6, p. 1298-1340, 2018.

SÁNCHEZ-DUFFHUES, G., HIEPEN, C., KNAUS, P. e TEN DIJKE, P. Bone morphogenetic protein signaling in bone homeostasis. **Bone**, v. 80, p. 43-59, 2015.

SASAKI, T. e WATANABE, C. Stimulation of osteoinduction in bone wound healing by high-molecular hyaluronic acid. **Bone**, v. 16, n. 1, p. 9-15, 1995.

SHANG, L., QI, Y., LU, H., PEI, H., LI, Y., QU, L., WU, Z. e ZHANG, W. Graphene and Graphene Oxide for Tissue Engineering and Regeneration. In: **Theranostic Bionanomaterials**. Elsevier, 2019. p. 165-185.

ANEXO A - NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA LIFE SCIENCE



LIFE SCIENCES

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

•	Description	p.1
•	Audience	p.1
•	Impact Factor	p.2
•	Abstracting and Indexing	p.2
•	Editorial Board	p.2
•	Guide for Authors	p.4



DESCRIPTION

Life Sciences is an international journal publishing articles that emphasize the **molecular, cellular, and functional basis of therapy**. The journal emphasizes the understanding of mechanism that is relevant to all aspects of human disease and translation to patients. All articles are rigorously reviewed.

The Journal favors publication of full-length papers where modern scientific technologies are used to explain **molecular, cellular and physiological mechanisms**. Articles that merely report observations are rarely accepted. Recommendations from the Declaration of Helsinki or NIH guidelines for care and use of laboratory animals must be adhered to. Articles should be written at a level accessible to readers who are non-specialists in the topic of the article themselves, but who are interested in the research. The Journal welcomes reviews on topics of wide interest to investigators in the **life sciences**. We particularly encourage submission of brief, focused reviews containing high-quality artwork and require the use of mechanistic summary diagrams.

Manuscripts should present novel preclinical findings addressing questions of **biological significance to human disease**. Studies that fail to do so may be rejected without review. Quantitative conclusions must be based on truly quantitative methods. *Life Sciences* does not publish work on the actions of biological extracts of unknown chemical composition. Compounds studied must be of known chemical structure and concentration. The study must be reproducible; materials used must be available to other researchers so they can repeat the experiment. Clinical studies may be considered if they expand understanding of mechanism, but the journal does not encourage clinical trial reports.

Four common reasons for rejection include: out of scope (the manuscript does not conform to the goal of identification of mechanisms related to therapy for human disease); too preliminary (manuscript is based on a limited amount of experimental data diminishing significance); lack of novelty (manuscript is well done but does not address a significant question); unidentified structure (actions of biological extracts of unknown chemical composition).

AUDIENCE

Pharmacologists, microbiologists, toxicologists, neurobiologists, immunologists.

MPACT FACTOR

2018: 3.448 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2019

ABSTRACTING AND INDEXING

Elsevier

BIOBASE BIOSIS

Citation Index

PubMed/Medline

PsycINFO

Nutrition Abstracts

Energy Research Abstracts

Energy Data Base Ophthalmic

Literature Embase

Pascal Francis

PsycLIT CD-ROM

Biological and Agricultural Index Reference Update

Current Contents

EMBiology

Scopus

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

L.E. Wold, The Ohio State University Department of Physiology and Cell Biology, 473 W. 12th Avenue, Columbus, Ohio, OH 43210, United States

Managing Editor

C. Kisthardt, Tucson, Arizona, United States

Associate Editors

B.J. Biesiadecki, Columbus, Ohio, United States

F. Gao, Xian, China

F. del Monte, Charleston, South Carolina, United States

K. Ouyang, Nanshan, China

L.H. Rogers, Columbus, Ohio, United States

T. Sanderson, Ann Arbor, Michigan, United States

F. Sheikh, La Jolla, California, United States

F. M. Souza-Smith, New Orleans, Louisiana, United States

K.I. Stanford, Columbus, Ohio, United States

M. Velten, Bonn, Germany

Editorial Advisory Board

E. Antunes, Campinas, São Paulo, Brazil

J.W. Calvert, Atlanta, Georgia, United States

K. Campbell, Lexington, Kentucky, United States

S. Campbell, New Haven, Connecticut, United States

M. Canis, Göttingen, Germany

C. Carnes, Columbus, Ohio, United States

J.C. Chatham, Birmingham, Alabama, United States

Z. Chen, Duarte, California, United States

J.T. Cheng, Tainan, Taiwan

B. Colson, Tucson, Arizona, United States

J.M. Daniel, New Orleans, Louisiana, United States

A.J. Davidoff, Biddeford, Maine, United States

G. De Nucci, São Paulo, Brazil

G. Ertl, Würzburg, Germany

F. Ferguson, Phoenix, Arizona, United States

A.V. Gomes, Davis, California, United States

G. Haddad, Washington, District of Columbia, United States

J. Heller Brown, La Jolla, California, United States

R.N. Kitsis, Bronx, New York, United States

R.A. Kloner, Los Angeles, California, United States

S. Lange, La Jolla, California, United States

M. Li, Orangeburg, New York, United States

R. Liao, Boston, Massachusetts, United States

G. Mattace Raso, Napoli, Italy

U. Mende, Providence, Rhode Island, United States

L. Nelin, Columbus, Ohio, United States

T.R. Nurkiewicz, Morgantown, West Virginia, United States

N. Paolucci, Baltimore, Maryland, United States

J. Privratsky, Durham, North Carolina, United States

N. Purcell, La Jolla, California, United States

J.R. Richardson, Rootstown, Ohio, United States

M. Robbins, Chicago, Illinois, United States

K. Singh, Johnson City, Tennessee, United States

S. Takasawa, Kashihara, Japan

B. Tanner, Pullman, Washington, United States

T. Tipple, Birmingham, Alabama, United States

N. Weisleder, Columbus, Ohio, United States

C. Wingard, Louisville, Kentucky, United States

Q. Zhang, Iowa City, Iowa, United States

M. Ziolo, Columbus, Ohio, United States

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may

choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, please visit the Preparation section below.

INTRODUCTION

Life Sciences is an international journal publishing articles that emphasize the molecular, cellular, and functional basis of therapy. All articles are rigorously reviewed. The Journal favors publication of full-length papers where modern scientific technologies are used to explain molecular, cellular and physiological mechanisms. Articles that merely report observations are rarely accepted. Articles should be written at a level accessible to readers who are non-specialists in the topic of the article themselves, but who are interested in the research.

The Journal welcomes reviews on topics of wide interest to investigators in the life sciences. We particularly encourage submission of focused reviews containing high-quality artwork and mechanistic diagrams.

IMPORTANT INFORMATION

- Submission of a paper will be held to imply that the manuscript contains original unpublished work and is not being submitted for publication elsewhere.
- Manuscripts should present novel findings addressing significant biological questions. Studies that fail to do so may be rejected without review.
- Quantitative conclusions must be based on truly quantitative methods.
 - *Life Sciences* does not publish work on the actions of biological extracts of unknown chemical composition. Compounds studied must be of known chemical structure and concentration.
 - The study must be reproducible; materials used must be available to other researchers so they can repeat the experiment.

For more details on how to write a world class paper, please visit our [Pharmacology Author Resources](#) page.

Please include word count and figure/table count on the cover page of your manuscript.

Authors are encouraged to submit video material or animation sequences to support and enhance your scientific research. For more information please see the paragraph on video data below.

Types of article

- Original research articles
- Reviews

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
 - Indicate clearly if color should be used for any figures in print *Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable) *Supplemental files* (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
 - Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
 - A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms **sex and gender** should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised

1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Conflict of Interest Policy

The Journal requires full disclosure of all potential conflicts of interest. At the end of the manuscript text, under a subheading "Conflict of Interest statement", all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. If there are no conflicts of interest, the authors should state: "The authors declare that there are no conflicts of interest." See also <https://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. A signed [Conflict of Interests Policy Form](#) is required upon submission. The corresponding author is responsible for completing the form, and signing it on behalf of all authors.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright- holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. [More details and an example](#)

Authorship

All authors listed on your paper must have made significant contributions to the study. To ensure clarity, you are required upon submission to enter the specific details of each author's contribution, which must substantiate the inclusion of each person on the manuscript. This information is required to be filled in on the [Conflict of Interests Policy and Author Statement Form](#).

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list

should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Open access

Please visit our Open Access page from the Journal Homepage for more information.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to

guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online. Use the following guidelines to prepare your article. Via the homepage of this journal (<https://www.elsevier.com/journals>) you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. The system automatically converts source files to a single Adobe Acrobat PDF version of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail and via the author's page in EES, removing the need for a hard-copy paper trail.

Specific queries can be directed to lifesci@elsevier.com.

Referees

To expedite the review process, authors must submit names of 4 - 6 individuals who are qualified to review their work. Include the email address of each potential referee, as much contact information as possible, and why you feel this person is competent to review your work. You should not have collaborated with the suggested reviewers at any time in the past five years. In our effort to enhance global perspective and communication of science, these individuals should be associated with institutions from as many different regions as possible (Europe, North America, Asia, etc.). Exception: Symposium submissions which have been previously reviewed and approved by their Organizing Committee.

PREPARATION

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/ book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book

chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

Peer review

This journal operates a double blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review.](#)

Double-blind review

This journal uses double-blind review, which means the identities of the authors are concealed from the reviewers, and vice versa. [More information](#) is available on our website. To facilitate this, please include the following separately:

Title page (with author details): This should include the title, authors' names, affiliations, acknowledgements and any Declaration of Interest statement, and a complete address for the corresponding author including an e-mail address.

Blinded manuscript (no author details): The main body of the paper (including the references, figures, tables and any acknowledgements) should not include any identifying information, such as the authors' names or affiliations.

Language

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). For language assistance, please see Language Services, above. Use decimal points (not decimal commas); use a space for thousands (10 000 and above).

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Organization of the manuscript

Beginning with the first page, present your manuscript in the order below:

1. Title: First letter capitalized, subsequent letters in lower case. Maximum length 150 characters including spaces. Avoid abbreviations.

2a. Names of all authors.

2b. Affiliations of all authors. If necessary, use superscripted lowercase letters after the author's name to distinguish affiliations.

3. Author to whom proofs and correspondence should be sent, including name, mailing address, telephone and fax numbers, and e-mail address.

4. A structured abstract has to be submitted for full length articles (not for reviews) of no more than 250 words. The following headings must be used:

Aims:

Main methods:

Key findings:

Significance:

5. Three or more key words for indexing purposes. In addition to key words from the title, please suggest other terms that help define the study. We encourage authors to test the relevance of their key words by using them for a database search and comparing the results with the topic of their own paper.

Word limits: In **full papers**, individual sections should be no longer than Abstract 250 words, Introduction 500 words, Discussion 1500 words, Conclusion 150 words. Materials and Methods and Results sections should be concise but there is no formal word limit.

Headings: Papers must include the major headings Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusion, Acknowledgments, and References. Include subheadings as appropriate. Review articles must contain Abstract and Introduction, with subsequent headings and subheadings as appropriate.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

Present the conclusions of the study in a short Conclusions section.

Highlights

Highlights are optional yet highly encouraged for this journal, as they increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

The Graphical Abstract is optional for research articles, but mandatory for reviews. GAs should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Refer to the following website for more information <https://www.elsevier.com/graphicalabstracts>.

Abbreviations

Abbreviations must be explained the first time they are used, both in the Abstract and again in the main text.

Abbreviations used as names of cell lines do not need to be explained, but the species and tissue of origin should be made clear in text the first time the cell line is mentioned. Examples: "the human colonic adenocarcinoma cell line Caco-2" or "the porcine renal endothelial cell line LLC-PK1".

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Please note that funding information must appear under the Acknowledgments heading.

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork Electronic art General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
 - For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these

references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software](#).

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/life-sciences>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/ book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the

proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '.... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result '

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, J. Sci. Commun. 163 (2010) 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, 2018. The art of writing a scientific article. Heliyon. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

[3] W. Strunk Jr., E.B. White, The Elements of Style, fourth ed., Longman, New York, 2000. Reference to a chapter in an edited book:

[4] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), Introduction to the Electronic Age, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304. Reference to a website:

[5] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK.

<http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] [6] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1, 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and

engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated

with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 600 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your Data in Brief.

MethodsX

You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple MethodsX articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or setting, but often without getting credit for this part of their work. MethodsX, an open access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible. Authors are encouraged to submit their MethodsX article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will automatically be transferred over to MethodsX where it will be editorially reviewed. Please note an open access fee is payable for publication in MethodsX. Full details can be found on the [MethodsX website](#). Please use [this template](#) to prepare your MethodsX article.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative

methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

**ANEXO B - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS (CEUA-UFGM)**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Caracterização do Óxido de Grafeno funcionalizado com Hialuronato de Sódio e avaliação dos seus efeitos na cicatrização de defeitos ósseo em tíbias de ratos", protocolo do CEUA: 353/2017 sob a responsabilidade de Paulo Antonio Martins Junior que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 27/02/2018.

Vigência da Autorização	26/02/2018 a 25/02/2023
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	3
Peso/Idade	250g / 3(meses)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFGM
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	3
Peso/Idade	250g / 3(meses)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFGM
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	3
Peso/Idade	250g / 3(meses)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFGM
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar

Nº de animais	3
Peso/Idade	250g / 3(meses)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	3
Peso/Idade	250g / 3(meses)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	3
Peso/Idade	250g / 3(meses)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	3
Peso/Idade	250g / 3(meses)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	3
Peso/Idade	250g / 3(meses)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG

Considerações posteriores:

27/02/2018	Aprovado na reunião do dia 26/02/2018. Validade: 26/02/2018 à 25/02/2023
------------	--------------------------------------------------------------------------

Belo Horizonte, 30/01/2020.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br