

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA – BIOFOTÔNICA**

**EFEITO DA TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO ASSOCIADA A MATERIAL  
COMPÓSITO DE CARBONO E ÓXIDO DE GRAFENO IMPREGNADO COM  
NANOPARTÍCULAS DE PRATA NO CONTROLE DO CRESCIMENTO  
BACTERIANO E NA VIABILIDADE DE OSTEÓBLASTOS**

**MATHEUS LOPES PÚBLIO**

São Paulo

2024

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOFOTÔNICA  
UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**

**MATHEUS LOPES PÚBLIO**

**EFEITO DA TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO ASSOCIADA A MATERIAL  
COMPÓSITO DE CARBONO E ÓXIDO DE GRAFENO IMPREGNADO COM  
NANOPARTÍCULAS DE PRATA NO CONTROLE DO CRESCIMENTO  
BACTERIANO E NA VIABILIDADE DE OSTEÓBLASTOS**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação como requisito para a  
obtenção do título de Mestre em Medicina –  
Biofotônica da Universidade Nove de Julho

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos

São Paulo

2024

Públio, Matheus Lopes.

Efeito da terapia por fotobiomodulação associada a material compósito de carbono e óxido de grafeno impregnado com nanopartículas de prata no controle do crescimento bacteriano e na viabilidade de osteoblastos. / Matheus Lopes Públio. 2024.

79 f.

Dissertação (Mestrado)- Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2024.

Orientador (a): Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos.

1. Fotobiomodulação. 2. Osteomielite. 3. Infecções ósseas. 4. Material de carbono. 5. Nanopartículas de prata.

I. Marcos, Rodrigo Labat. II. Título

CDU 615.831

São Paulo, 19 de dezembro de 2024.

**TERMO DE APROVAÇÃO**

Aluno (a): Matheus Lopes Públio

Título da Dissertação: "Efeito da terapia por fotobiomodulação associada a material compósito de carbono e óxido de grafeno impregnado com nanopartículas de prata no controle do crescimento bacteriano e na viabilidade de osteoblastos".

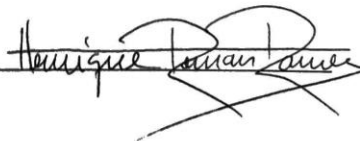
Presidente: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS



Membro: PROF. DR. RENATO ARAUJO PRATES



Membro: PROF. DR. HENRIQUE ROMAN RAMOS



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, sem ele nada seria possível.

Agradeço a Universidade Nove de Julho pelo seu corpo docente e infraestrutura que me permitiram adquirir e carregar até aqui todo conhecimento.

Ao meu orientador, Prof Dr. Rodrigo Labat por me proporcionar todo conhecimento e suporte até aqui, além de todo apoio e incentivo durante o curso.

Ao meu grande amigo Rodney, uma das minhas maiores inspirações, quem me incentivou chegar até aqui.

Aos meus pais Robnson e Heliety por toda dedicação, amor e carinho, que me sustentou durante toda vida. Além de abdicarem seus desejos para realizar os meus.

Ao meu irmão Vinícius pelo companheirismo e fortalecimento.

À minha noiva Daniele, por todo seu amor, dedicação e apoio para chegar até aqui.

*“Não chore, quem cuida de você não dorme  
Levanta, tem muita gente que te ama  
Deus mandou te dizer que vai acontecer  
Deus mandou te falar que tudo vai passar”*

**(Cesar Menotti e Fabiano)**

## RESUMO

A osteomielite é um processo inflamatório de origem infecciosa que afeta o tecido ósseo, impactando aspectos físicos, emocionais, sociais e econômicos da vida do paciente. A terapia por fotobiomodulação (PBM) representa uma abordagem de tratamento não invasiva aplicada em doenças osteoarticulares, proporcionando efeitos anti-inflamatórios, analgésicos e moduladores da atividade celular. Biomateriais de carbono possuem características importantes para crescimento celular, Já nanopartículas de prata são conhecidas pelo seu efeito antimicrobiano. Objetivo: Avaliar o efeito da PBM no crescimento celular de osteoblastos ou bacteriano de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) cultivados em material compósito carbono/grafeno impregnado com nanopartículas de prata (CAGONP). Metodologia: A capacidade de adsorção do material de carbono em solução de nanoprata (81 ppm) foi analisada. Posteriormente, o CAGONP foi utilizado em estudos microbiológicos com *S. aureus* e celulares com Osteoblastos. No estudo microbiológico, *S. aureus* foi cultivado no CAGONP e irradiado com LED azul (400 nm; 106 J/cm<sup>2</sup>; 353 mW/cm<sup>2</sup>), sendo avaliado o crescimento bacteriano em ágar e solução de meio BHI. No estudo celular, osteoblastos foram cultivados sobre o CAGONP e irradiados com LED azul, utilizando os mesmos parâmetros anteriores. Resultados: O material compósito de carbono e óxido de grafeno apresentou significativa capacidade de adsorção na solução de nanoprata. O CAGONP demonstrou redução no crescimento de *S. aureus* quando irradiado com LED azul. Os osteoblastos mantiveram sua viabilidade celular quando cultivados em meio contendo CAGONP irradiado. Conclusão: O material CAGONP irradiado com LED azul (400 nm; 106 J/cm<sup>2</sup>; 353 mW/cm<sup>2</sup>) exerce controle sobre o crescimento de *S. aureus*, sem comprometer a viabilidade das células ósseas.

Palavras-chave: Fotobiomodulação, Osteomielite, Material de carbono, Óxido de Grafeno Nanopartículas de prata, *Staphylococcus aureus*.

## ABSTRACT

Osteomyelitis is an inflammatory process of infectious origin that affects bone tissue, impacting the physical, emotional, social, and economic aspects of a patient's life. Photobiomodulation therapy (PBM) is a non-invasive treatment approach applied to osteoarticular diseases, providing anti-inflammatory, analgesic, and cellular activity-modulating effects. Carbon-based biomaterials possess important characteristics for cellular growth, while silver nanoparticles are known for their antimicrobial effect. **Objective:** To evaluate the effect of PBM on the cellular growth of osteoblasts or the bacterial growth of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) cultured on a carbon/graphene composite material impregnated with silver nanoparticles (CAGONP). **Methods:** The adsorption capacity of the carbon material in a silver nanoparticle solution (81 ppm) was analyzed. Subsequently, the CAGONP was used in microbiological studies with *S. aureus* and cellular studies with osteoblasts. In the microbiological study, *S. aureus* was cultured on the CAGONP and irradiated with blue LED (400 nm; 106 J/cm<sup>2</sup>; 353 mW/cm<sup>2</sup>), and bacterial growth was evaluated on agar plates and in BHI medium solution. In the cellular study, osteoblasts were cultured on the CAGONP and irradiated with blue LED under the same parameters as above. **Results:** The carbon and graphene oxide composite material exhibited significant adsorption capacity in the silver nanoparticle solution. The CAGONP demonstrated reduced *S. aureus* growth when irradiated with blue LED. Osteoblasts maintained their cellular viability when cultured on irradiated CAGONP. **Conclusion:** CAGONP irradiated with blue LED (400 nm; 106 J/cm<sup>2</sup>; 353 mW/cm<sup>2</sup>) controls *S. aureus* growth without compromising the viability of bone cells.

**Keywords:** Photobiomodulation, Osteomyelitis, Carbon material, Graphene oxide, Silver nanoparticles, *Staphylococcus aureus*.



## SUMÁRIO

Lista de Siglas e Abreviaturas.....	
Unidades de Medida.....	
Lista de Figuras.....	
Lista de Tabelas.....	
1. CONTEXTUALIZAÇÃO.....	17
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1 Infecções Osteoarticulares (Osteomielites).....	21
2.1.1 Histórico.....	21
2.1.2 Epidemiologia.....	22
2.1.3 Classificações.....	22
2.2 O <i>Staphylococcus aureus</i> .....	24
2.3 Avaliação do crescimento bacteriano.....	25
2.4 Métodos de avaliação do crescimento bacteriano.....	27
2.5 Células do tecido ósseo.....	28
2.6 Teste de viabilidade celular.....	29
2.6.1 Teste MTT.....	29
2.7 Tratamento das lesões ósseas.....	30
2.8 Biomateriais.....	31
2.9 Material carbonoso como substituto ósseo.....	32
2.10 Uso das nanopartículas de prata no controle das infecções ósseas.....	35
2.11 Terapia por Fotobiomodulação no Reparo ósseo.....	36
2.12 Terapia por Fotobiomodulação no controle de infecção.....	38
3. HIPÓTESES.....	40

4.	JUSTIFICATIVA.....	41
5.	OBJETIVO.....	43
5.1	Objetivos específicos.....	43
6.	MATERIAL E MÉTODOS.....	44
6.1	Etapa I - Preparação da nanoprata e do material carbonoso.....	44
6.1.1	Preparação da nanoprata.....	44
6.1.2	Preparação do material carbonoso com Oxido de Grafeno.....	45
6.1.3	Testes de Adsorção nanoprata.....	46
6.1.3.1	Adsorção da Nanoprata.....	46
6.2	ETAPA II - Análise Microbiológica.....	48
6.2.1	Critérios de controle.....	48
6.2.1.1	Quantificação relativa de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	48
6.2.1.2	Análise do crescimento do <i>Staphylococcus aureus</i> .....	48
6.2.2	Desenho do estudo / Tamanho da amostra.....	48
6.2.2.1	Protocolo experimental para cultura de <i>S. aureus</i> em placa de petri.....	48
6.2.2.2	Protocolo experimental para cultura de <i>S. aureus</i> em placa de 96 furos.....	49
6.3	ETAPA III: Análise Celular.....	52
6.3.1	Critérios de controle.....	52
6.3.1.1	Cultivo de osteoblastos de rato.....	52
6.3.2	Desenho do estudo.....	52
6.3.2.1	Grupos experimentais.....	52
6.3.3	Defechos do estudo.....	54
6.3.3.1	Ensaio de viabilidade celular por MTT.....	54

6.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
7.	RESULTADOS.....	56
7.1	Características da solução de nanop prata e do material carbonoso.....	56
7.1.1	Determinação da curva espectral da nanop prata.....	56
7.1.2	Irradiação com LED Azul pode alterar a concentração relativa da nanop prata.....	56
7.1.3	Porosidade do material de carbono por Microscopia de Eletronica de Varredura.....	58
7.1.4	Avaliação da Adsorção do material de carbono im- pregnado com nanopartícula de prata.....	59
7.2	Avaliação Microbiológica – Concentração de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	60
7.2.1	Concentração relativa de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	60
7.2.2	Crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> em placa de petri com meio de cultura.....	61
7.2.3	Crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> em meio de cultura – placa de 96 poços.....	62
7.3	Viabilidade de Osteoblastos.....	63
7.3.1	Viabilidade de osteoblastos – Técnica MTT.....	63
8.	DISCUSSÃO.....	64
9.	CONCLUSÃO.....	70
10.	REFERÊNCIAS.....	71

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AgNO<sup>3</sup> – Nitrato de prata

ALP- Fosfatase Alcalina

ANOVA - Análise de Variância

AsGaAl – Arsenieto de Gálio e Alumínio

ATP – Adenosina Trifosfato

BHI – Brain heart infusion

BMP – Proteína Morfogenética Óssea

C - Carbono

Ca<sup>++</sup> – Cálcio

Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub> – Hidroxiapatita

COX 2 – Ciclo oxigenas 2

CTL - Controle

DMO – Densidade Mineral Óssea

DMSO - Dimetilsulfuróxido

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ensaio de imunoabsorção enzimática)

Ion Ag<sup>+</sup> - Ion de prata

Il-6 – Interleucina 6

J – Joules

LAG - Latência

LASER – Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (amplificação de luz por emissão estimulada de radiação)

LED - Diodo Emissor de Luz

LSPR – Ressonância Plasmônica de superfície local

M-CSF – Fator Estimulador de Colônia de Macrófagos

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente a insulina

MTT – Teste usado para avaliar a viabilidade celular

NaBH<sup>4</sup> – Borohidreto de cloro

NP - Nanoprata

n – número de animais por amostra

OBs – Osteoblastos  
OCC - Osteocalcina  
OCs - Osteoclastos  
OCN – Osteocalcina  
OMS - Organização Mundial de Saúde  
OPG – Osteoprotegerina  
OTs – Osteócitos  
P – Nível de significância  
PBM – Terapia por Fotobiomodulação  
PBS - Solução salina tamponade  
PDGF – Fator de crescimento derivado das plaquetas  
PH -Potencial hidrogeniônico  
PMMA - Polimetilmetacrilato  
PTH - Paratormônio  
PPM – Partes por milhão  
RANK – Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa- $\beta$   
RANKL – Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa- $\beta$   
REF - Referência  
RNA – Ácido Ribonucleico  
RPMI - Roswell park memorial institute (meio usado para cultura celular)  
ROS / EROS – Espécies reativas de oxigênio  
*S. aureus* – *Staphylococcus aureus*  
SH – Grupo sulfidrila  
SUS - Sistema Único de Saúde  
TGF- $\beta$  – Fator de Crescimento Transformador beta  
TNF- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral alfa  
TRAP – Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato  
VS – Versus  
UFC – Unidade formadora de colônias  
UNINOVE – Universidade Nove de Julho

## **UNIDADE DE MEDIDAS:**

°C – graus Celsius

cm<sup>2</sup> - centímetro quadrado

J/cm<sup>2</sup> - Joules por centímetro quadrado

kg – quilograma

min - minutos

mg – miligrama

ml – mililitro

mm<sup>2</sup> - milímetro quadrado

nm – nanometro

µg - micrograma

µl – microlitro

µm – micrometro

W – Watt

mW - miliwattt

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Classificação de Cierny e Mader, com destaque para o tipo III.....	29
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática da quantificação relativa da nanoprata.....	45
<b>Figura 3.</b> Imagem do material de carbono e suas porosidades (MEV).....	47
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática do teste de adsorção da nanoprata.....	48
<b>Figura 5.</b> Esquema do teste de desorção da solução de nanoprata pelo material de carbono.....	49
<b>Figura 6.</b> Esquema da placa de petri com os grupos experimentais.....	53
<b>Figura 7.</b> Esquema da placa com a distribuição dos grupos experimentais.....	55
<b>Figura 8.</b> Curva espectral das nanopartículas de prata. Em (A) com 27ppm (partes por milhão), Em (B) com 54ppm e em (C) com 81ppm. Seta preta para pico da nanoprata.....	57
<b>Figura 9.</b> Curva espectral da solução de nanoprata na concentração de 81ppm. Em (A) imediatamente após a irradiação; Em (B) leitura após 7 dias da irradiação e em (C) com leitura após 30 dias da irradiação com LED azul.....	58
<b>Figura 10.</b> Caracterização tomográfica do material de carbono. Seta amarela indicando o diâmetro dos poros e seta branca indicando as conectividades.....	59
<b>Figura 11.</b> Gráfico da Adsorção e Dessorção da solução de nanoprata em material de carbono ativado. Concentração inicial da nanoprata de 81ppm. Em vermelho, taxa de adsorção e em azul, taxa de desorção.....	60
<b>Figura 12.</b> Concentração relativa de <i>Staphylococcus aureus</i> em diferentes diluições. Leitura em 600nm.....	61
<b>Figura 13.</b> Crescimento bacteriano ( <i>Staphylococcus aureus</i> ) em placa de petri. Grupos experimentais: CTL ( <i>S aureus</i> ); NP ( <i>S aureus</i> +Nanoprata 81ppm); C ( <i>S aureus</i> + Material de carbono) e C+NP ( <i>S aureus</i> + material de carbono impregnado com Prata). Grupos não irradiados ou Irradiados com LED azul (400nm; 10J; 50mW; 5 minuto)Em 600nm.....	61
<b>Figura 14.</b> Crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> em meio de cultura. Grupos Não irradiados ou Irradiados (i) com LED (400nm; 10J; 50mW; 5 minutos). CTL: <i>S aureus</i> ; NP ( <i>S aureus</i> + Solução de nanoprata 81ppm); CA ( <i>S aureus</i> + material de carbono) e CA+NP ( <i>S aureus</i> + material de carbono + Solução de nanoprata 81ppm * p<0,05*** p<0,001 VS CTL.....	64

**Figura 15.** Gráfico da viabilidade celular na cultura de osteoblastos em placa de 96 poços, 24 horas após a irradiação com LED azul. Grupos experimentais: CTL (osteoblastos em meio RPMI); NP (osteoblastos em solução de Nanoprata); C (Osteoblastos em material de carbono com PRMI) e C+NP: (Osteoblastos em material de carbono impregnado com Prata e com RPMI). \*  $p < 0,05$  VS CTL.....65

**Figura 16.** Gráfico da viabilidade de osteoblastos pela técnica “Live – Dead”. Grupos Experimentais: Grupo Controle não irradiado (CTL) e irradiado (CTLi); Osteoblastos cultivados com nanoprata sem irradiação (NP) ou irradiado (NPi) Osteoblastos com material de carbono não irradiado (C) ou irradiado (Ci) e osteoblastos com material de carbono impregnado com nanoprata não irradiado (C+NP) ou irradiado (C+NPI). \*\*  $p < 0,01$  e #  $p < 0,01$  VS CTL e CTLi.....66

**Figura 17-** Imagem representativa da viabilidade celular de osteoblastos no material de carbono. Seta amarela indica o Material de carbono. Seta vermelha indica Osteoblastos aderidos ao material. Em (A1) e (A2) células aderidas ao material de carbono sem irradiação. Em (B1) e (B2) células aderidas ao material de carbono sem irradiação. A2 e B2 com aumento de 6 vezes A1 e B1 respectivamente.....71

**Figura 18-** Imagem representativa da viabilidade celular de osteoblastos no material de carbono impregnado com nanoprata. Seta amarela indica o Material de carbono. Seta vermelha indica Osteoblastos aderidos ao material de carbono impregnado com nanoprata. Em (A1) e (A2) células aderidas ao material de carbono impregnado com prata e sem irradiação. Em (B1) e (B2) células aderidas ao material de carbono sem irradiação. A2 e B2 com aumento de 6 vezes A1 e B1 respectivamente.....72



## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Parâmetros de Irradiação utilizado no experimento (*S. aureus*).....52

**Tabela 2.** Parâmetros de Irradiação utilizado no experimento (Osteoblastos).....54

## 1. CONTEXTUALIZAÇÃO

A fotobiomodulação é uma forma de terapia acessível e não invasiva, sendo extensivamente empregada para gerenciar diversas condições, incluindo aquelas relacionadas ao sistema osteoarticular. Entre os benefícios terapêuticos estão suas propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e sua capacidade de modular a atividade celular. Adicionalmente, observa-se a promoção de neoangiogênese na área estimulada.<sup>1</sup>

Graças às suas propriedades reparadoras, a fotobiomodulação está sob investigação em diversas condições, como feridas na pele, lesões musculares, osteoartrite, entre outras. No contexto de osteomielites, seu principal valor reside em auxiliar na modulação da resposta inflamatória, diminuindo a liberação de mediadores inflamatórios e favorecendo um ambiente propício para o processo de cicatrização.<sup>(2)</sup>

A osteomielite é delineada como uma inflamação infecciosa que afeta o tecido ósseo. Essa situação séria pode exercer uma influência considerável na qualidade de vida dos indivíduos, acarretando dor intensa, restrições funcionais, incapacidade para realizar tarefas cotidianas e, em casos extremos, até mesmo ameaçar a vida. O impacto da osteomielite abrange diversas esferas da vida do paciente, englobando aspectos físicos, emocionais, sociais e econômicos.

Os efeitos da osteomielite se manifestam em diversas dimensões da vida do paciente, abrangendo aspectos físicos, emocionais, sociais e econômicos.

Em termos físicos, a osteomielite pode desencadear uma dor crônica persistente, com potencial incapacitante que impacta diretamente na qualidade de vida. A mobilidade e a função dos membros afetados podem ser comprometidas, resultando em limitações nas atividades cotidianas e dependência de cuidadores. Adicionalmente, a persistência da infecção óssea pode acarretar complicações sérias, incluindo a formação de abscessos, fraturas patológicas e, em casos extremos, a disseminação da infecção para outros órgãos.

Sob uma perspectiva emocional, os indivíduos com osteomielite frequentemente confrontam-se com elevados níveis de estresse, ansiedade e depressão, resultantes da dor crônica e das limitações físicas associadas à condição. A extensão prolongada do tratamento, a exigência de procedimentos cirúrgicos repetidos e a incerteza em relação à recuperação completa podem exercer um

impacto adverso no estado emocional dos pacientes, propiciando o surgimento de problemas psicológicos adicionais.

No âmbito social, a osteomielite pode ocasionar um distanciamento e limitação nas interações sociais. Os pacientes podem experimentar sentimentos de vergonha ou constrangimento devido às deformidades físicas decorrentes da infecção óssea ou ao uso de dispositivos de apoio, como muletas ou cadeiras de rodas. Essa situação pode resultar em uma redução na participação em eventos sociais, impactando negativamente a qualidade de vida e o bem-estar global.

No aspecto econômico, o impacto da osteomielite pode ser considerável. O tratamento prolongado, frequentemente composto por antibióticos intravenosos, intervenções cirúrgicas e consultas médicas frequentes, pode acarretar despesas elevadas relacionadas à área médica e hospitalar. Adicionalmente, a incapacidade de desempenhar atividades laborais devido à dor e às limitações físicas pode resultar na perda de renda e no enfrentamento de desafios financeiros.

O tratamento da osteomielite comumente adota uma abordagem multimodal que incorpora terapia antimicrobiana, intervenção cirúrgica e cuidados de suporte. As opções terapêuticas podem variar conforme a gravidade da infecção, a localização afetada e a presença de fatores de risco subjacentes. Dentre os principais métodos utilizados, destaca-se a importância do uso de antibióticos. A seleção dos antibióticos é baseada nos resultados de culturas e testes de sensibilidade aos agentes infecciosos identificados. Em situações graves ou crônicas, a terapia antimicrobiana pode ser administrada via intravenosa por um período estendido, frequentemente abrangendo várias semanas a meses.

A intervenção cirúrgica é comumente requerida no tratamento da osteomielite. Os procedimentos cirúrgicos podem abranger o debridamento, que consiste na remoção de tecido infectado ou necrótico, a descompressão de abscessos, a drenagem de coleções purulentas e a extração de corpos estranhos. Em situações de osteomielite crônica ou recorrente, pode ser necessário realizar uma cirurgia reconstrutiva para restaurar a integridade da estrutura óssea comprometida.

A terapia de pressão negativa, conhecida também como terapia de vácuo, pode ser empregada para facilitar a cicatrização de feridas e favorecer a eliminação do tecido infectado. Neste método, um curativo especial é aplicado sobre a ferida e conectado a um sistema de sucção que facilita a remoção de fluidos, ao mesmo tempo em que estimula a formação de tecido saudável.

No decorrer do tratamento da osteomielite, é fundamental fornecer cuidados de suporte apropriados, o que engloba a administração de analgésicos.

É crucial enfatizar que o tratamento da osteomielite deve ser personalizado, considerando variáveis como a extensão da infecção, a condição geral de saúde do paciente e a presença de comorbidades. A realização de consultas médicas regulares e a adesão rigorosa ao plano de tratamento são elementos essenciais para alcançar uma recuperação eficaz e prevenir complicações.<sup>3</sup>

O carvão ativado é um material carbonáceo altamente poroso, com a capacidade de seletivamente coletar e reter gases, líquidos e outras impurezas em seus poros. Apresenta uma extensa área de superfície e uma porosidade significativa. Observa-se que células vivas aderem à superfície do carvão ativado por meio de adsorção, o que levanta a possibilidade de que esse material possa desempenhar um papel benéfico no suporte ao crescimento de células-tronco.<sup>4</sup>

A prata é reconhecida por suas propriedades antimicrobianas e tem a capacidade de eliminar cerca de 650 organismos patogênicos. Desde a antiguidade, gregos e romanos utilizavam a prata como bactericida e antibiótico. Os íons de prata demonstram atividade antimicrobiana, apresentando efeitos bactericidas e bacteriostáticos. Acredita-se que as partículas de prata possuam a habilidade de se ligar às bactérias, interferindo em suas funções, inibindo o crescimento bacteriano, afetando as membranas celulares bacterianas e o transporte intracelular de moléculas essenciais, além de integrarem-se aos grupos tiol das enzimas e proteínas cruciais para a sobrevivência bacteriana.<sup>5</sup>

Adicionalmente, observa-se que a prata possui propriedades anti-inflamatórias, o que pode contribuir para a redução da resposta inflamatória associada à osteomielite.<sup>6</sup>

A combinação de luz (fotobiomodulação), material carbonoso e prata pode representar uma abordagem terapêutica promissora no tratamento de condições específicas, como feridas crônicas ou infectadas. Essa fusão visa tirar proveito dos benefícios da fotobiomodulação, das propriedades do material carbonoso e das propriedades antimicrobianas da prata, visando promover a cicatrização e o reparo tecidual.<sup>7</sup>

Conforme mencionado anteriormente, a fotobiomodulação emprega luz de baixa intensidade para estimular processos biológicos e facilitar a cicatrização. Essa abordagem pode auxiliar no aumento da atividade metabólica celular, aprimorar a microcirculação sanguínea, diminuir a inflamação e estimular a produção de fatores de crescimento cruciais para a regeneração tecidual.

O material carbonoso, por sua vez, pode ser empregado como um tipo de curativo ou revestimento para a ferida. Esse material possui propriedades adsorventes, sendo capaz de absorver exsudatos da ferida, remover detritos e criar um ambiente mais propício para a cicatrização. Além disso, o material carbonoso também pode desempenhar o papel de suporte para a prata, facilitando a liberação controlada dos íons de prata na ferida.

Dentro da categoria de nanomateriais de carbono, que se situa na escala nanométrica de 1 a 100 nm, as formas mais amplamente estudadas incluem os fullerenos (também conhecidos como gaiolas), os nanotubos e o grafeno (em forma de folhas) (Tahriri et al., 2019). O grafeno é um alótropo do carbono com uma estrutura de folha plana, composta por átomos de carbono densamente ligados, organizados em um padrão bidimensional hexagonal e cristalino. Sua obtenção pode ocorrer através da extração de camadas superficiais de grafite, sendo passível de modificação química por meio de processos como oxidação e redução térmica (Schniepp et al., 2006; Pastrana-Martínez et al., 2013;).

A prata é reconhecida por suas propriedades antimicrobianas, sendo capaz de combater infecções bacterianas, fúngicas e outros microrganismos que possam estar presentes na ferida. A liberação controlada dos íons de prata a partir do material carbonoso pode desempenhar um papel crucial ao manter um ambiente livre de microrganismos, contribuindo assim para a promoção da cicatrização.<sup>7</sup>

## **2- REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1- Infecções Osteoarticulares (Osteomielites)**

#### **2.1.1- Histórico**

Infecções osteoarticulares são condições clínicas que abrangem a infecção dos ossos, articulações e tecidos circunvizinhos. A resolução clínica e a eficácia do tratamento nessas situações continuam a ser desafios tanto para médicos quanto para pacientes.

Desde a antiguidade, especificamente em 1600 a.C., registros médicos da antiga civilização egípcia fazem menção à presença de infecções ósseas em múmias sumérias, indicando um conhecimento inicial das osteomielites(8). Por volta de 460 a.C., Hipócrates descreveu casos de infecções ósseas, contribuindo com algumas das primeiras observações clínicas sobre essa condição. <sup>8</sup>

Em 1844, Nelaton foi o pioneiro ao introduzir o termo médico "osteomielite", definindo-o como um processo inflamatório de origem infecciosa que afeta o osso. Naquela época, o tratamento preconizado por Nelaton consistia em manter a ferida aberta para permitir a saída do exsudato purulento.<sup>9</sup>

Na década de 1940, a introdução dos antibióticos, como a penicilina, promoveu uma revolução no tratamento das osteomielites, possibilitando uma resolução mais rápida e eficaz das infecções ósseas <sup>10</sup>. Na década de 1970, o progresso continuou com o desenvolvimento de técnicas de imagem, como a tomografia computadorizada, trazendo avanços significativos no diagnóstico das osteomielites, permitindo a visualização direta das lesões ósseas. <sup>11</sup>

Nos anos 90, a popularização da ressonância magnética nuclear contribuiu significativamente para uma maior precisão no diagnóstico e no acompanhamento das osteomielites. Essa técnica possibilitou uma avaliação detalhada das estruturas ósseas e dos tecidos adjacentes, representando um avanço importante nesse campo.

No século XXI, observamos uma significativa evolução no desenvolvimento de biomateriais e técnicas de regeneração óssea. Esses avanços têm como objetivo promover a cicatrização óssea e reduzir a morbidade associada à perda óssea decorrente da osteomielite. A utilização de enxertos ósseos, substitutos ósseos sintéticos, fatores de crescimento e técnicas de engenharia de tecidos tem apresentado resultados promissores na regeneração óssea e na restauração da função do aparelho locomotor. <sup>6</sup>

### **2.1.2- Epidemiologia**

Entre 2012 e 2016, o Brasil registrou 78.967 pacientes internados por osteomielite. Dentre esses, 21,19% pertenciam à faixa etária acima de 60 anos. Conforme o padrão nacional, a Região Sudeste apresentou o maior número de casos, totalizando 7.163 internações, o que representa 42,79% do total. Em segundo lugar, a Região Nordeste contabilizou 5.165 casos (30,86%), seguida pela Região Sul, com 2.462 casos (14,71%). A Região Centro-Oeste ficou em quarto lugar, com 1.162 casos (6,9%), e a Região Norte registrou 784 casos, correspondendo a 4,6% do total.

13

### **2.1.3- Classificações**

Em relação às classificações das osteomielites, a mais comum refere-se ao tempo de duração da doença, dividindo-as em Aguda, caracterizada por uma infecção recente e de curta duração, geralmente tratada com antibióticos, podendo necessitar de drenagem cirúrgica do local afetado em alguns casos. E Crônica, que ocorre quando a infecção persiste por um longo período, frequentemente meses ou anos. Esse tipo pode ser mais desafiador de tratar devido à formação de abscessos, áreas de necrose óssea e a presença de bactérias resistentes. O tratamento pode requerer terapia antibiótica prolongada e, em algumas situações, a remoção cirúrgica do tecido infectado pode ser necessária. <sup>11</sup>

Com base no local da infecção, temos a Osteomielite hematogênica, que ocorre quando a infecção se espalha para o osso através da corrente sanguínea, geralmente originária de outra fonte de infecção no corpo. É frequentemente observada em crianças e pode afetar diversos ossos. A Osteomielite contígua, por outro lado, ocorre quando a infecção se propaga para o osso a partir de uma área adjacente, como uma ferida aberta, uma articulação infectada ou uma fratura exposta.

11

Quanto à causa da infecção, temos a Osteomielite bacteriana, que é a forma mais comum e ocorre quando as bactérias invadem o osso, causando a infecção. A Osteomielite fúngica, por sua vez, acontece quando fungos, como *Candida* ou *Aspergillus*, infectam o osso, sendo mais comum em indivíduos imunocomprometidos. Por fim, a Osteomielite tuberculosa é causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, representando uma forma rara de osteomielite.<sup>11</sup>

A classificação de Cierny-Mader, amplamente adotada por cirurgiões ortopedistas na atualidade, baseia-se em três critérios principais: o estado do osso afetado, o estado do tecido mole circundante e o estado sistêmico do paciente. Essa classificação divide a osteomielite em quatro tipos:

- Tipo I: osteomielite medular sem comprometimento significativo dos tecidos moles ou sistema vascular.
- Tipo II: osteomielite superficial com comprometimento moderado dos tecidos moles.
- Tipo III: osteomielite localmente avançada com extenso envolvimento dos tecidos moles, abrangendo músculos, pele e/ou sistema vascular; também conhecida como osteomielite cavitária.
- Tipo IV: osteomielite difusa com infecção disseminada além dos limites do osso, associada a instabilidade óssea.<sup>9,14</sup>



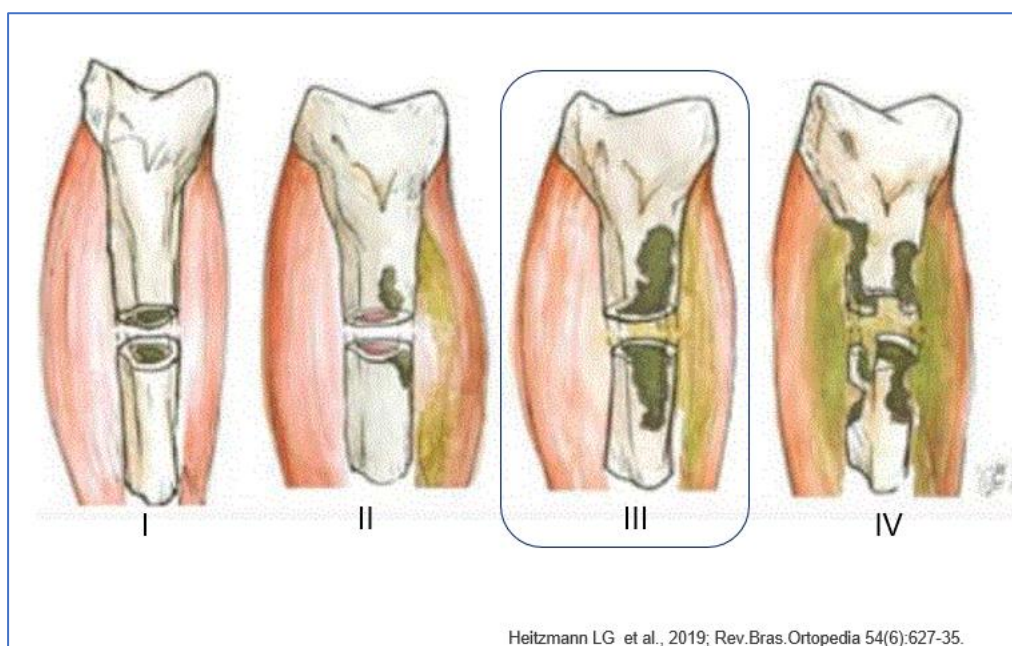


Figura 1 - Classificação de Cierny e Mader, com destaque para o tipo III

## 2.2- O *Staphylococcus aureus* na infecção óssea

O patógeno mais comumente associado à osteomielite é o *Staphylococcus aureus*, um micro-organismo gram-positivo que apresenta uma ampla variedade de mecanismos de patogenicidade.<sup>11</sup>

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria gram-positiva que faz parte da microbiota normal da pele e das mucosas em seres humanos. No entanto, em certas condições, essa bactéria pode se tornar patogênica e causar uma variedade de infecções, que vão desde infecções cutâneas até infecções mais graves, como pneumonia, endocardite, osteomielite e sepse.<sup>15</sup>

Estudos epidemiológicos têm consistentemente demonstrado que o *Staphylococcus aureus* é o patógeno mais frequentemente isolado em casos de osteomielite.<sup>16</sup>

Essa bactéria apresenta características microbiológicas únicas que contribuem para sua virulência e habilidade em causar doenças graves. Ela produz toxinas e enzimas que desempenham um papel crucial em sua patogenicidade. Exemplos notáveis incluem as toxinas hemolisinas, leucocidinas, enterotoxinas e a toxina da síndrome do choque tóxico. Essas substâncias têm a capacidade de destruir células hospedeiras, promover a invasão tecidual e modular a resposta imune do hospedeiro. Além disso, enzimas como a coagulase e a catalase auxiliam na evasão da resposta imunológica do hospedeiro e facilitam a disseminação bacteriana.<sup>15,17</sup>

O *Staphylococcus aureus* é um excelente formador de biofilme, contribuindo para sua persistência e resistência a tratamentos antimicrobianos. Os biofilmes bacterianos são comunidades microbianas estruturadas, envolvidas por uma matriz polimérica, que aderem a superfícies bióticas ou abióticas. Essa capacidade permite ao *S. aureus* colonizar e persistir em implantes médicos, próteses articulares e tecidos ósseos, tornando mais desafiadora a erradicação completa da infecção.<sup>17</sup> O *Staphylococcus aureus* também é conhecido por sua capacidade de desenvolver resistência a múltiplas classes de antibióticos. Essa resistência é mediada por genes codificadores de resistência, bem como pela habilidade da bactéria de se adaptar rapidamente a diferentes ambientes e de empregar mecanismos para evadir o sistema imunológico do hospedeiro. A disseminação de cepas resistentes de *S. aureus*, como a meticilina-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), representa um desafio significativo no tratamento das infecções osteoarticulares.<sup>17,18</sup>

Todos esses aspectos destacam a importância do *Staphylococcus aureus* nas osteomielites. Compreender esses elementos é fundamental para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes e para o controle adequado das infecções ósseas causadas por esse patógeno bacteriano significativo.<sup>19</sup>

### **2.3- Avaliação de crescimento bacteriano**

O crescimento bacteriano é um processo fundamental para a sobrevivência e proliferação das bactérias. Envolve o aumento do número de células bacterianas ao longo do tempo, resultando em uma população maior. As bactérias possuem uma capacidade intrínseca de se multiplicar e se reproduzir. Elas podem se reproduzir assexuadamente por meio de um processo chamado de divisão celular, no qual uma célula bacteriana se divide em duas células filhas geneticamente idênticas.

O crescimento bacteriano é influenciado por diversos fatores, incluindo condições ambientais, disponibilidade de nutrientes, temperatura, pH e presença de oxigênio. Cada espécie bacteriana possui requisitos específicos para seu crescimento ideal.<sup>20</sup>

O ciclo de crescimento bacteriano é composto por diferentes fases. A fase "lag" é o período inicial de adaptação das bactérias ao ambiente, durante o qual aumentam sua atividade metabólica, sintetizam enzimas e se preparam para a divisão celular. Em seguida, ocorre a fase exponencial de crescimento ou fase logarítmica, na qual as bactérias se dividem ativamente, e o número de células aumenta de maneira exponencial, representando o período de maior crescimento populacional.

À medida que os nutrientes se esgotam e os subprodutos do metabolismo bacteriano se acumulam, as bactérias entram na fase estacionária. Nesse estágio, o crescimento bacteriano se estabiliza, e a taxa de reprodução se iguala à taxa de morte celular. As bactérias podem se adaptar a condições adversas para sobreviver nessa fase por um período prolongado.

Finalmente, se as condições continuarem a piorar, as bactérias entrarão na fase de declínio ou morte. Nessa fase, a taxa de morte celular excede a taxa de reprodução, resultando em um declínio na população bacteriana.

O estudo do crescimento bacteriano é de grande importância em áreas como microbiologia, medicina, biotecnologia e controle de infecções. Compreender os mecanismos subjacentes ao crescimento bacteriano possibilita o desenvolvimento de estratégias para controlar o crescimento excessivo de bactérias patogênicas, aprimorar a produção de bactérias benéficas em aplicações industriais e criar tratamentos antimicrobianos mais eficazes.<sup>20</sup>

É crucial destacar que o crescimento bacteriano pode variar entre diferentes espécies bacterianas e está sujeito a influências ambientais específicas. Portanto, os métodos de cultivo e estudo do crescimento bacteriano devem ser adaptados para cada contexto de pesquisa.

No controle da osteomielite, a terapia antimicrobiana desempenha um papel fundamental. A escolha dos antibióticos deve ser fundamentada na susceptibilidade bacteriana, a qual é determinada pelos resultados da cultura bacteriana. É essencial selecionar agentes antimicrobianos eficazes contra as bactérias identificadas, considerando fatores como a penetração óssea e a biodisponibilidade.

A duração da terapia antimicrobiana é um ponto crucial a ser considerado. Geralmente, o tratamento com antibióticos é administrado por um período prolongado para assegurar a erradicação completa da infecção. Em certos casos, a terapia intravenosa pode ser necessária inicialmente, sendo seguida pela transição para a terapia oral, dependendo da gravidade da osteomielite e da resposta ao tratamento.

21

As bactérias podem adquirir ou desenvolver mecanismos de resistência aos antibióticos, seja por meio de mutações genéticas espontâneas ou pela transferência de genes de resistência entre bactérias. A resistência aos antibióticos compromete a eficácia dos medicamentos, tornando o tratamento mais desafiador e acarretando implicações clínicas significativas, como falhas no tratamento, cronificação da infecção e dificuldades no manejo clínico.

A persistência bacteriana pode resultar em falhas no tratamento, com a recorrência da infecção após o término do curso de antibióticos. Isso pode levar a complicações adicionais, como a formação de abscessos ou a necessidade de intervenções cirúrgicas mais invasivas.

A cronificação da infecção, associada à resistência bacteriana, pode contribuir para episódios recorrentes ou persistentes de osteomielite. Isso está relacionado a uma maior morbidade, tempo de recuperação prolongado e aumento dos custos de tratamento.

A presença de bactérias resistentes nas osteomielites apresenta um desafio significativo no tratamento. Tornam-se necessárias estratégias terapêuticas combinadas, como a utilização de diferentes classes de antibióticos em combinação, a implementação de terapias prolongadas e, em alguns casos, a remoção cirúrgica do tecido infectado. <sup>21</sup>

#### **2.4- Métodos de avaliação do crescimento bacteriano**

Dentre esses métodos, destaca-se a "Contagem de células viáveis", uma técnica clássica que envolve a diluição seriada de uma cultura bacteriana, seguida pela semeadura em meio de cultura apropriado. As colônias resultantes são contadas e utilizadas para determinar a densidade celular. Esse método é fundamental para a avaliação da concentração e viabilidade das células em uma amostra, fornecendo informações importantes sobre o crescimento e a saúde celular. <sup>22</sup>

Existem várias abordagens para a contagem de células viáveis, e a escolha depende da precisão desejada, do tipo de células e da disponibilidade de equipamentos. Algumas técnicas comuns incluem:

1. Contagem manual em câmara de Neubauer: As células são diluídas em um corante que permite a diferenciação entre células vivas e mortas. A contagem é realizada em uma grade na câmara de Neubauer usando um microscópio.

2. Citometria de fluxo: Permite a contagem e a análise de células individuais com base em suas características físicas e marcadores de superfície. A viabilidade celular pode ser avaliada usando corantes fluorescentes específicos para células vivas e mortas.

3. Reações enzimáticas ou metabólicas: Esses ensaios medem a atividade de enzimas ou processos metabólicos nas células vivas, como a atividade mitocondrial, a síntese de DNA ou a produção de ATP. A quantidade de sinal gerado é proporcional ao número de células viáveis presentes.<sup>23</sup>

Existem instrumentos disponíveis que realizam a contagem automatizada de células viáveis utilizando tecnologia de imagem e análise computacional. Esses sistemas proporcionam maior precisão e eficiência em comparação com a contagem manual. Um exemplo é a Turbidimetria e Nefelometria, que se baseiam na medição da turbidez ou dispersão da luz causada pela presença de células bacterianas em suspensão. A absorbância ou intensidade da dispersão da luz é medida e correlacionada com a densidade celular.<sup>24</sup>

## **2.5- Células do Tecido Ósseo**

Os osteoblastos são células de tamanho considerável e formato cúbico, possuindo um núcleo único e bem definido. Desempenham um papel crucial na formação e manutenção do osso. Essas células são responsáveis por sintetizar e secretar a matriz óssea, composta principalmente por colágeno tipo I, o principal componente fibrilar que confere resistência e flexibilidade ao tecido ósseo. Além do colágeno, a matriz óssea inclui outros componentes orgânicos e inorgânicos, como glicoproteínas adesivas, por exemplo, a osteopontina e a osteonectina, que desempenham papel na adesão e interação das células osteoblásticas com a matriz extracelular. À medida que os osteoblastos realizam a secreção da matriz, eles se incorporam a ela e, nesse estágio, são chamados de osteócitos, representando as células maduras do osso.<sup>25</sup>

Além disso, essas células respondem a uma variedade de sinais e fatores de crescimento, tais como o hormônio paratireoideano (PTH), fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) e fatores de crescimento transformadores (TGF- $\beta$ ). Esses elementos regulam a proliferação, diferenciação e atividade dos osteoblastos, exercendo influência direta na formação óssea.<sup>25,26</sup>

Desempenham um papel crucial na regulação do equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea, conhecido como turnover ósseo. Isso ocorre por meio de interações com os osteoclastos, células responsáveis pela reabsorção óssea, utilizando moléculas sinalizadoras como o ligante RANK (receptor ativador do fator nuclear kappa-B) e seu ligante RANKL. Essa comunicação entre os osteoblastos e os osteoclastos é essencial para manter a homeostase óssea e garantir um turnover ósseo adequado, preservando a estrutura e a integridade do osso ao longo do tempo.<sup>26</sup>

## **2.6- Testes de viabilidade celular**

Essenciais na pesquisa em biologia celular e molecular, os ensaios de viabilidade celular desempenham um papel crucial. Eles são fundamentais para a investigação de processos biológicos e para o desenvolvimento de novos tratamentos e terapias. A viabilidade celular refere-se à capacidade das células de manterem funções vitais, como replicação do DNA, síntese proteica e metabolismo, além de sua habilidade de sobreviverem e proliferarem em condições apropriadas.<sup>27</sup>

Diversos métodos e testes estão disponíveis para avaliar a viabilidade celular, sendo exemplos o ensaio MTT.

### **2.6.1- Teste MTT**

O ensaio com MTT é empregado para avaliar a atividade metabólica das células. Neste teste, o MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) é um composto inicialmente amarelo que, ao ser metabolizado por células metabolicamente ativas, passa por uma conversão, tornando-se formazan, que é insolúvel e apresenta uma coloração roxa. Essa transformação ocorre principalmente nas mitocôndrias das células viáveis, mediada por enzimas oxidoredutases. A presença de um precipitado colorido indica a viabilidade celular, e a densidade óptica medida oferece uma avaliação quantitativa da viabilidade. Células não viáveis ou danificadas demonstram uma redução na capacidade de converter o MTT, resultando

em uma formação menor de formazan.<sup>28</sup> A determinação da viabilidade celular é efetuada pela medição da absorbância do formazan a um comprimento de onda específico. Maior absorbância está diretamente relacionada a uma maior viabilidade celular. Os resultados são apresentados como a porcentagem de viabilidade em comparação com o controle não tratado.<sup>29</sup>

Na execução do teste MTT com osteoblastos, as células geralmente são cultivadas em placas de cultura e tratadas conforme o protocolo experimental. Após um período definido de incubação, o reagente MTT é introduzido nas células e incubado. Posteriormente, o formazan é solubilizado utilizando um agente lítico, como o DMSO (dimetilsulfóxido), e a absorbância é quantificada através de um espectrofotômetro.<sup>30</sup>

## **2.7- Tratamento das lesões ósseas**

O processo de reparo ósseo recapitula elementos do desenvolvimento e crescimento do esqueleto, envolvendo uma interação complexa de componentes extracelulares, celulares e fatores de crescimento. Esse reparo pode ser subdividido em quatro fases distintas: inflamação, condrogênese, ossificação e remodelamento. Cada fase é caracterizada por eventos celulares e moleculares específicos, ocorrendo de maneira coordenada. As fraturas ósseas podem ser causadas por diversos fatores, como traumas diretos (resultantes de acidentes, quedas, torções ou ferimentos por arma de fogo). Já os defeitos ósseos podem ser decorrentes de malformações congênitas, traumas não tratados, lesões extensas ou intervenções cirúrgicas, como a remoção de tumores. Para corrigir esses defeitos, são empregadas técnicas como enxertia óssea, colocação de próteses biocompatíveis e o uso de substâncias indutoras de formação óssea.<sup>32</sup>

A fase inflamatória do reparo ósseo é caracterizada pelo aumento de citocinas, incluindo TNF- $\alpha$  e IL-6, juntamente com a presença de células inflamatórias e células de origem mesenquimal. É importante notar que a presença dessas citocinas não está restrita apenas à fase inflamatória, podendo ocorrer também em outras fases do processo de reparo, como no período de remodelação. Isso destaca a complexidade e a sobreposição de eventos moleculares ao longo das diferentes etapas do reparo ósseo.<sup>33</sup>

A presença de células inflamatórias recruta osteoprogenitoras para a área afetada, iniciando o processo de ossificação endocondral. Isso resulta na formação de uma matriz cartilaginosa composta por osteoblastos e fibroblastos, os quais proliferam e sintetizam tecido fibrocartilaginoso para unir a lacuna óssea. Posteriormente, ocorre a formação do calo ósseo semirrígido, promovendo maior atividade osteogênica através de aposição e reabsorção óssea. Para a formação da matriz celular óssea, é essencial a combinação de componentes proteínicos e matriz extracelular mineralizada. No estágio final do reparo, caracterizado pelo remodelamento, osteoclastos e interleucinas atuam para restabelecer a forma original do osso, proporcionando uma intensa formação óssea regular.<sup>5</sup>

Terapias auxiliares, como laser de baixa intensidade, ultrassom e biomateriais, têm sido empregadas para aprimorar o processo de reparo ósseo. Essas abordagens incluem o uso de materiais como hidroxiapatita, polímeros biodegradáveis, cerâmicas, biovidros e, mais recentemente, materiais carbonosos. *Bossini et al, (2011)*<sup>34</sup> Realizaram um estudo utilizando ratas osteopênicas para investigar os efeitos da combinação de uma vitrocerâmica com o laser de baixa intensidade. Os resultados indicaram um aumento na quantidade de osso neoformado. Outras pesquisas também destacam que a associação do laser com biomateriais pode induzir a osteogênese e mineralização, resultando no aumento da deposição de massa óssea e na melhoria das propriedades mecânicas do tecido ósseo.<sup>35,36</sup>

É amplamente reconhecido que os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo podem ser categorizados em dois grupos principais: aqueles relacionados à formação óssea, como ALP (fosfatase alcalina), OCC (colágeno tipo I) e COL1 (proteína do colágeno tipo I); e aqueles relacionados à reabsorção óssea, como ALP. A relação e o equilíbrio desses marcadores desempenham um papel crucial na determinação da qualidade do osso formado.<sup>37</sup>

## **2.8- Biomateriais**

Os compostos bioativos podem ser definidos como materiais sintéticos, orgânicos ou uma combinação destes que têm a capacidade de desencadear uma resposta biológica específica, estabelecer conexões e interagir com o tecido, promovendo benefícios ambientais sem causar toxicidade ou resposta imunológica. Os padrões-ouro da engenharia de tecidos indicam que um substituto ósseo ideal deve ter uma estrutura osteoindutiva tridimensional muito porosa que permita a



circulação de nutrientes e fatores de crescimento. Além disso, deve ter características de superfície que promovam a migração, proliferação e diferenciação de vários tipos celulares de interesse local; ser biocompatível e de biodegradação controlada; conter células ou moléculas biologicamente ativas que induzem osteogênese e osteocondutividade; e ter propriedades mecânicas condizentes com a região do implante, cada uma dessas características com o objetivo de promover a reparação e/ou restauração tecidual <sup>38,39</sup>

Diversas linhas de pesquisa foram criadas e os benefícios foram acumulados ao longo do processo de consolidação. <sup>40</sup>, o aumento da angiogênese e estímulo da neoformação óssea <sup>41</sup> até o desenvolvimento de uma matriz óssea e uma melhoria da diferenciação celular <sup>42</sup>. Nos últimos anos, a Engenharia de Tecidos tem testemunhado significativos avanços no desenvolvimento de materiais bioativos. Esses avanços envolvem a combinação estratégica de células, arcabouços e fatores bioativos para criar biomateriais de diversas composições, como vidros, vitrocerâmicas, polímeros de variadas composições e nacre (madrepérola). Esses materiais são destinados ao uso em enxertos ósseos, proporcionando uma variedade de opções para aprimorar os procedimentos relacionados à regeneração óssea. <sup>39,42,43</sup>

## **2.9- Material Carbonoso como substituto ósseo.**

O carvão ativado é um material carbonoso sólido e poroso que apresenta sítios acessíveis para a ocorrência do fenômeno de adsorção, bem como para reações químicas. A denominação "ativado" refere-se a materiais de carbono que são produzidos por meio de pirólise em temperaturas superiores a 1000°C, seguida de um processo de ativação que visa criar a estrutura porosa final desejada. <sup>44</sup>

Essencialmente, qualquer material de baixo custo que contenha um alto teor de carbono, juntamente com uma quantidade moderada de substâncias inorgânicas, pode ser utilizado como matéria-prima para a produção de carvão ativado. Em termos gerais, os processos industriais empregam precursores como derivados de biomassa degradada ou fóssil (como turfa, lignito, antracito e hulha), biomassa fresca (aparas de madeira, cascas de coco, cascas de várias nozes, casca e palha de arroz, etc.) ou ainda resíduos de biomassa após seu processamento (como lignina, bagaço de cana, etc.). Estas matérias-primas apresentam baixo custo de aquisição e alto teor de carbono, ou combinam ambas essas propriedades. <sup>44</sup>

No contexto de aplicações médicas, o carvão ativado exibe muitas das condições ideais necessárias para esse tipo de utilização. Sua principal característica está associada à elevada porosidade do material. A presença de uma abundância de poros com diferentes diâmetros e uma ampla superfície interna sugere que esse biomaterial seja altamente propenso a interagir eficientemente com compostos externos, como na adsorção de poluentes e fármacos. Além disso, há a possibilidade de que atue como um catalisador físico para a proliferação celular.<sup>39,44</sup>

Considerando as características do carvão ativado e a diversidade de suas aplicações, surge a hipótese de que esse material pode desempenhar um papel significativo nos processos de estímulo e reparo quando empregado como substituto ósseo.

Vários autores destacaram as vantagens do uso de grafeno e seus derivados, incluindo baixos níveis de impurezas e propriedades eletroquímicas (*Dumitrescu et al., 2008*), maior resistência à degradação (*Bourke et al., 2007*), resistência mecânica superior à tração e ruptura (*Perkins & Naderi, 2016; Matos et al., 2017*), melhor biocondutividade favorecendo a adsorção de moléculas do fluido circundante na superfície do biomaterial (*Lee et al., 2016*), e função catalisadora para os indutores osteogênicos, contribuindo para a proliferação e diferenciação celular (*Tonelli et al., 2012; Menaa & Menaa, 2015; Gao et al., 2017; Shang et al., 2019*).

O interesse no biomaterial de carbono (C) e no biomaterial compósito de carbono/óxido de grafeno (CG) empregados no presente estudo reside no baixo custo de produção e na facilidade de obtenção da matéria-prima. Qualquer material contendo um elevado teor de carbono e um moderado teor de substância inorgânica pode ser utilizado, como biomassa fresca (aparas de madeira, cascas de coco, cascas de diversos tipos de nozes, casca e palha de arroz) e resíduos da biomassa (lignina, bagaço de cana) (*Couto et al., 2004*).

As indústrias de papel e celulose utilizam o eucalipto como matéria-prima, constituído principalmente de celulose (fibras) e lignina, conferindo rigidez, impermeabilidade e resistência aos tecidos vegetais (*Laurichesse & Avérous, 2014*). Durante o processo de polpação kraft, a madeira passa por cozimento, e reagentes químicos à base de sulfetos são adicionados para dissolver a lignina (rica em ligações de carbono) e liberar as fibras celulósicas (polpa) (*Singh et al., 2005*).

A capacidade do óxido de grafeno de interagir com células e de promover a regeneração de tecidos ósseos tem sido amplamente estudada, mostrando

resultados promissores para o tratamento de fraturas ósseas e defeitos ósseos causados por doenças ou trauma.

O óxido de grafeno é uma forma modificada do grafeno, na qual grupos funcionais contendo oxigênio, como epóxidos, hidroxilas e carboxilas, estão presentes na superfície das folhas de grafeno. Essas modificações conferem ao GO características hidrofílicas e melhoram a biocompatibilidade, além de permitir a funcionalização com diferentes moléculas bioativas, como proteínas e fatores de crescimento, que podem estimular o processo de regeneração óssea. Essas funcionalidades tornam o óxido de grafeno uma plataforma ideal para o desenvolvimento de materiais de engenharia óssea.

Uma das principais vantagens do óxido de grafeno no reparo ósseo é sua capacidade de promover a adesão celular e a diferenciação de osteoblastos — células responsáveis pela formação do osso. Estudos mostram que o GO tem a capacidade de se integrar aos osteoblastos e, por meio de suas interações físicas e químicas, estimula a formação de uma matriz extracelular que favorece o crescimento ósseo. Além disso, o GO pode servir como um "scaffold" (estrutural de suporte) para células-tronco mesenquimatosas, promovendo a regeneração óssea em defeitos ósseos críticos, onde a cicatrização natural pode ser insuficiente.

Além de suas propriedades estruturais, o óxido de grafeno também pode ser modificado para incluir fatores de crescimento específicos, como o fator de crescimento ósseo derivado de plaquetas (PDGF) ou o fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ). Essas modificações podem intensificar o processo de cicatrização óssea e promover a osteogênese, o processo no qual as células formam tecido ósseo novo. Ao ser incorporado em hidrogéis ou compósitos com outros biomateriais, como cerâmicas e polímeros, o GO também tem o potencial de melhorar as propriedades mecânicas do material de reparo ósseo, conferindo-lhe maior resistência e estabilidade.

Além da promoção da regeneração óssea, o óxido de grafeno pode oferecer propriedades adicionais que são vantajosas para a medicina regenerativa. A sua capacidade para a liberação controlada de medicamentos ou agentes terapêuticos também tem sido explorada. Isso poderia permitir a entrega localizada de fármacos anti-inflamatórios ou antibióticos diretamente no local da fratura ou defeito ósseo, acelerando o processo de cicatrização e prevenindo infecções.

Entretanto, apesar das promessas, ainda existem desafios a serem superados para garantir a aplicação clínica segura e eficaz do óxido de grafeno no reparo ósseo. A toxicidade a longo prazo, a biocompatibilidade e a estabilidade do GO no ambiente biológico são áreas de investigação contínua. É crucial desenvolver estratégias para minimizar possíveis efeitos adversos e garantir que os materiais à base de óxido de grafeno sejam totalmente compatíveis com os tecidos humanos.

## **2.10- Uso de nanopartículas de prata no controle de infecções ósseas**

Devido às suas propriedades, as nanopartículas metálicas têm recebido considerável atenção da comunidade acadêmica. As propostas para sua utilização abrangem diversas aplicações, incluindo sensores ópticos, agentes bactericidas e fungicidas. Ao longo da história, as propriedades antimicrobianas da prata têm sido reconhecidas.<sup>45</sup>

Com a descoberta dos antibióticos, o uso da prata foi em grande parte descartado. No entanto, o crescente aumento da resistência bacteriana e o surgimento de novas cepas resistentes aos antibióticos mais potentes constituem fatores que reavivaram o interesse da comunidade científica na prata como agente contra microrganismos.

As partículas de prata em escala nanométrica apresentam propriedades antimicrobianas excepcionais devido à sua morfologia com faces altamente ativas. Destaca-se o fato de que a reatividade é favorecida por facetas de alta densidade atômica.<sup>46</sup> O efeito antimicrobiano da prata é amplamente reconhecido; no entanto, o mecanismo de ação ainda é apenas parcialmente compreendido.

Estudos *in vitro* demonstraram que a prata emite íons biologicamente ativos em sua superfície. Esses íons liberados têm a capacidade de se ligar a várias estruturas celulares bacterianas, incluindo a parede celular de peptidoglicano, a membrana plasmática, o DNA bacteriano e as proteínas bacterianas. Segundo *Li et al. (2008)*<sup>47</sup> a interação dos íons de prata com grupos tiol em proteínas e enzimas bacterianas leva à inativação das enzimas respiratórias.<sup>45,47,48</sup> Causando prejuízo a funções celulares vitais, tais como a respiração celular.

Simultaneamente, observa-se um incremento na permeabilidade celular, uma vez que a interação dos íons com a parede celular compromete sua camada externa. Esse processo resulta na perda de conteúdo celular e na formação de anomalias estruturais.<sup>2</sup> Devido à maior espessura das paredes celulares em bactérias Gram-

positivas, é requerida uma concentração mais elevada de prata para inibir o crescimento bacteriano, em comparação com as bactérias Gram-negativas.<sup>7</sup>

Um adicional mecanismo de toxicidade implica na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos íons de prata, podendo agir sinergicamente com o mecanismo de interação do grupo SH. Isso é respaldado pela evidência de um aumento na atividade antimicrobiana em condições aeróbicas quando comparadas às condições anaeróbicas.<sup>19</sup> O íon  $\text{Ag}^+$  inibe a replicação do DNA ao se ligar aos ácidos nucleicos, impedindo assim a multiplicação celular.<sup>13</sup>

Alguns estudos empregam partículas de nanop prata em materiais porosos com o intuito de regular sua liberação. Entretanto, essas pesquisas são consideradas preliminares, indicando a necessidade de investigações mais abrangentes para compreender a ação da prata no controle de infecções bacterianas em lesões ósseas.

7

## **2.11- Terapia por Fotobiomodulação no Reparo ósseo**

Ao irradiar tecidos vivos com luz laser de baixa intensidade, esta é absorvida por cromóforos fotoreceptores localizados nas células, desencadeando modulações bioquímicas significativas, estimulando a respiração mitocondrial por meio da produção de oxigênio molecular e a síntese de ATP. A palavra "laser" origina-se do acrônimo "Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation", ou Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação. A coerência é uma das propriedades da luz laser, na qual as ondas sucessivas de radiação estão em fase e tempo coerentes, e os trens de onda estão todos na mesma direção e com o mesmo comprimento de onda<sup>49,50</sup>, contudo, ao penetrar nos tecidos, essa propriedade se dispersa nos primeiros extratos de osso, devido à diversidade de estruturas celulares que compõem o osso<sup>51</sup>. Segundo esses autores, apesar da perda da coerência da radiação do laser de baixa intensidade no interior dos tecidos, esta ainda é absorvida pelas células, promovendo alterações em seu metabolismo, tanto em tecidos superficiais quanto profundos.<sup>52,53</sup>

Os resultados apontam para a influência do laser em estágios iniciais da neoformação óssea, agindo no estímulo e indução do processo de reparo. Isso cria uma série de condições ambientais propícias para a melhora do reparo ósseo. Estudos sugerem a modulação de vários fatores de crescimento, incluindo IGF, PDGF e TGF- $\beta$ , assim como fatores osteogênicos como RANKL e OPG, juntamente com

diversas citocinas, como IL-1 $\beta$ , COX2 e TNF- $\alpha$ , durante as fases iniciais da reparação óssea. Além disso, foi observado um aumento significativo na deposição de colágeno tipo I e II nos tecidos.<sup>54-55</sup>

*Rennó e cols. (2007)* <sup>56</sup> observou-se que a irradiação de culturas de células com laser de baixa intensidade promoveu um aumento na proliferação de osteoblastos e acelerou o processo de reparo. Um estudo recente do mesmo grupo aponta para efeitos regulatórios no ciclo celular, indicando que o laser atua modulando a resposta bioquímica da célula em relação às atividades mitocondrial e gênica, assim como na síntese de proteínas regulatórias. Essa regulação melhora a proliferação celular e o processo de consolidação da fratura. Pesquisas anteriores já evidenciavam as diversas capacidades modulatórias do laser, com resultados que vão desde uma maior formação de tecido osteoide trabecular até a promoção da rápida formação de matriz óssea, aumento na deposição óssea e favorecimento da diferenciação de osteoblastos.<sup>57,58</sup>

Apesar dos resultados positivos obtidos com o uso isolado da laserterapia e de biomateriais no reparo ósseo, é notável a escassez de publicações que exploram os benefícios da combinação de biomateriais com a irradiação laser nesse contexto <sup>59,60</sup>, este é um objeto de estudo relevante, uma vez que podem ocorrer modulações distintas no processo de reparo ósseo quando ambas as condições de tratamento, laserterapia e biomateriais, são combinadas.

Considerando as características apresentadas pelo Carvão Ativado, torna-se crucial investigar seu papel nos processos de reparo ósseo, considerando a relação custo-benefício, a facilidade de obtenção e manufatura, bem como o baixo custo associado à sua origem a partir da queima de outros compostos. Todas essas considerações destacam o carvão ativado, e sua associação ao laser de baixa intensidade, como um objeto de estudo promissor no âmbito de compostos auxiliares no reparo ósseo.

## 2.12- Terapia por Fotobiomodulação no controle de infecção

A luz tem se mostrado uma ferramenta poderosa no controle de infecções, principalmente quando associada a moléculas fotosensibilizadoras. Essas substâncias, que têm a capacidade de absorver luz em determinadas faixas de comprimento de onda e transferir essa energia para moléculas de oxigênio, gerando espécies reativas de oxigênio (ROS), têm sido amplamente exploradas em terapias fotodinâmicas (TFD) para o tratamento de diversas infecções bacterianas e fúngicas.

Quando uma molécula fotosensibilizadora é exposta à luz, ela é excitada para um estado energético elevado. Esse processo permite que ela interaja com o oxigênio presente no ambiente, gerando radicais livres e outros tipos de ROS, como o peróxido de hidrogênio. Essas espécies reativas têm a capacidade de danificar estruturas celulares, como lipídios, proteínas e material genético dos patógenos, resultando em sua morte ou inativação. A vantagem dessa abordagem é que a produção de ROS é altamente seletiva, atingindo preferencialmente as células infectadas ou áreas específicas, sem afetar gravemente os tecidos saudáveis.

A terapia fotodinâmica tem se mostrado eficaz contra uma ampla gama de patógenos, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e outros microrganismos resistentes a antibióticos convencionais. A luz, ao ser utilizada como um "catalisador", promove uma ativação controlada das moléculas fotosensibilizadoras, permitindo o controle preciso da quantidade de ROS gerada e, consequentemente, a eficácia do tratamento.

Além disso, uma das grandes vantagens desse tipo de terapia é sua baixa toxicidade para os tecidos humanos normais, uma vez que as moléculas fotosensibilizadoras se acumulam preferencialmente nas células patológicas e são ativadas apenas na presença de luz. Isso torna o tratamento menos invasivo e com menos efeitos colaterais, em comparação com terapias tradicionais baseadas em antibióticos ou antifúngicos.

Estudos recentes também têm explorado o uso de diferentes fontes de luz, como lasers de baixa intensidade, LEDs e até luz solar filtrada, para otimizar a eficácia da terapia fotodinâmica. Além disso, o desenvolvimento de novas moléculas fotosensibilizadoras, mais eficientes e com maior seletividade por patógenos específicos, tem sido um foco de pesquisa, visando superar limitações como a baixa

penetração da luz em tecidos mais profundos e a resistência de certos microrganismos à ação das ROS.

O uso da luz como catalisador de moléculas fotosensibilizadoras representa uma abordagem inovadora e promissora no combate a infecções, especialmente em um cenário de crescente resistência a antibióticos. A combinação de precisão, eficácia e segurança dessa terapia coloca a fototerapia como uma alternativa importante no arsenal terapêutico contra infecções bacterianas e fúngicas, com potencial para transformar a forma como tratamos doenças infecciosas no futuro.



### **3- HIPÓTESE**

- O material de carbono com oxido de grafeno impregnado com nanopartículas de prata (CGONP) controla o crescimento bacteriano sem interferir na viabilidade de osteoblastos.
- A irradiação com LED azul no CGONP pode interferir no crescimento bacteriano e na viabilidade de osteoblastos.

#### 4- JUSTIFICATIVA:

A osteomielite cavitária, uma condição inflamatória e infecciosa que resulta na formação de cavidades e destruição tecidual, é convencionalmente tratada com antibióticos e remoção cirúrgica do tecido infectado. No entanto, estas abordagens frequentemente apresentam limitações, levando a complicações persistentes. Assim, surge a necessidade urgente de estratégias terapêuticas inovadoras capazes de controlar eficazmente a infecção e promover a regeneração do tecido ósseo afetado.

A relevância acadêmica e científica deste trabalho reside na exploração da associação de compostos carbonosos, reconhecidos por sua propriedade osteocondutora, com nanoprata, conhecida por suas propriedades bactericidas e bacteriostáticas, em conjunto com a fotobiomodulação. A sinergia potencial dessas abordagens é evidente. Os compostos carbonosos demonstram propriedades osteocondutoras, estimulando o crescimento e a diferenciação das células ósseas para promover a regeneração do tecido danificado. Por sua vez, a nanoprata apresenta atividade antimicrobiana comprovada, capaz de eliminar e inibir o crescimento bacteriano, reduzindo a carga infecciosa.

Além disso, a combinação desses compostos com a fotobiomodulação, técnica que utiliza luz de baixa intensidade para modular processos celulares, pode potencializar os efeitos terapêuticos. A fotobiomodulação demonstra propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e regenerativas, estimulando a proliferação celular e a produção de fatores de crescimento. Ao integrar essa técnica com os compostos carbonosos e a nanoprata, é possível criar um ambiente propício à regeneração óssea, ao mesmo tempo em que controla a infecção bacteriana.

A originalidade e contribuição deste trabalho residem na abordagem combinada desses três componentes, ainda pouco explorada na literatura científica. A integração de compostos carbonosos, nanoprata e fotobiomodulação busca obter um efeito sinérgico que maximize a eficácia do tratamento, favorecendo tanto a regeneração óssea quanto o controle da infecção.

Os benefícios futuros desta pesquisa são notáveis. A estratégia terapêutica proposta pode oferecer uma abordagem inovadora para o tratamento da osteomielite cavitária, potencialmente melhorando os resultados clínicos e a qualidade de vida dos pacientes. Além disso, os resultados obtidos podem proporcionar insights valiosos para o desenvolvimento de terapias combinadas destinadas a outras condições ósseas infecciosas ou inflamatórias.

O carbono é um subproduto gerado pelas indústrias de papel e celulose durante seus processos produtivos. Esse subproduto é frequentemente obtido a partir da queima de biomassa, como madeira e resíduos vegetais, utilizados no processo de fabricação do papel. Devido a ser um resíduo da produção, o carbono possui um custo muito baixo em comparação a outros materiais ou insumos. A disponibilidade abundante do carbono nas fábricas de papel e celulose, juntamente com sua natureza de subproduto, torna-o uma opção economicamente viável para diversas aplicações, tornando-o atrativo tanto do ponto de vista ambiental quanto financeiro.

## 5- OBJETIVO

Estudar o impacto da terapia por fotobiomodulação com laser em baixa intensidade de potência sobre o material de carbono com oxido de grafeno impregnado com nanopartículas de prata (CAGONP), avaliando o crescimento de *Staphylococcus aureus* e a viabilidade de osteoblastos.

### 5.1- Objetivos Específicos

- Avaliar a adsorção da nanoprata no material de carbono;
- Avaliar o efeito do material CAGONP (81ppm), irradiado ou não com LED azul (400nm; 106J/cm<sup>2</sup>; 353mW/cm<sup>2</sup>) no crescimento bacteriano e viabilidade de osteoblastos.

## 6- MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1- ETAPA I: PREPARAÇÃO DA NANOPRATA E DO MATERIAL DE CARBONO

#### 6.1.1- Preparação da Nanoprata

As soluções de nanoprata nas concentrações de 27, 54 e 81 ppm foram preparadas e generosamente cedidas pelo Professor Dr. Guilherme Lenz, do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.

As nanopartículas de prata foram sintetizadas utilizando uma solução de 1,0 mmol/L de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ), adicionada gota a gota a 30 mL de boro-hidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), em uma solução com concentração de 2,0 mmol/L. Posteriormente, o  $\text{AgNO}_3$  foi adicionado lentamente, a uma frequência de 1 gota por segundo, sob agitação magnética e em um banho de gelo. Após a mudança de coloração, a agitação foi interrompida e a solução contendo as nanopartículas de prata foi armazenada sob refrigeração em um recipiente de vidro âmbar com tampa escura, protegida da luz.<sup>61</sup>

Para a quantificação relativa da nanoprata, adotou-se uma placa de 96 poços, onde 100  $\mu\text{L}$  da solução de nanoprata foram transferidos para três poços distintos. Este procedimento foi repetido para as três soluções de nanoprata (27, 54 e 81 ppm), seguindo o esquema ilustrado na Figura 2.

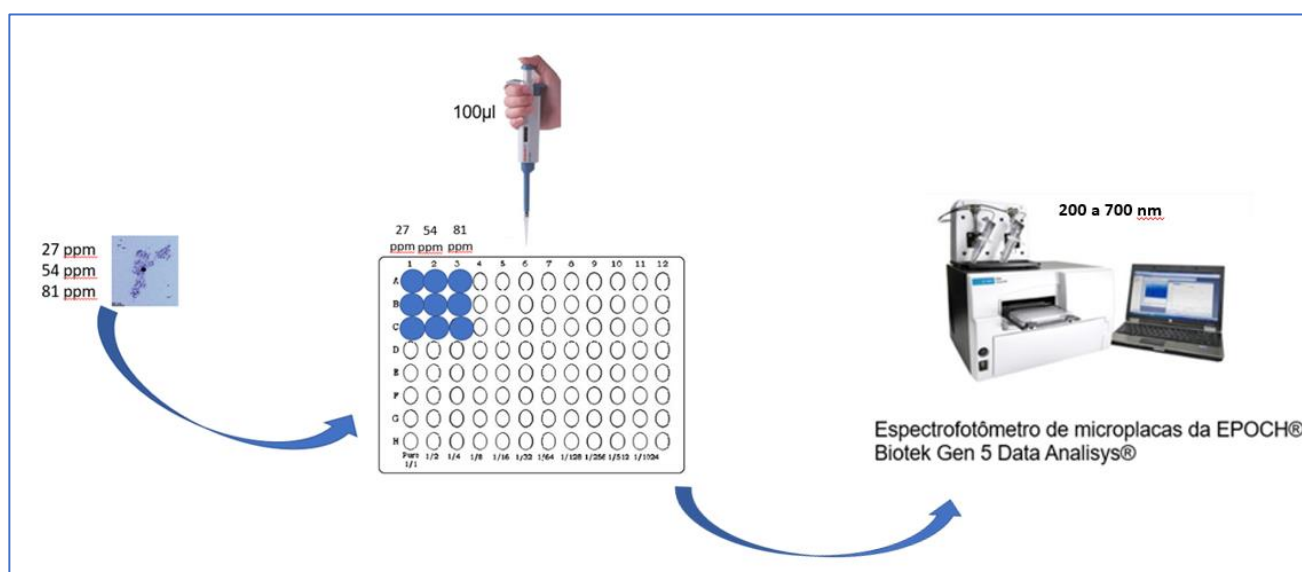


Figura 2 – Representação esquemática da quantificação relativa da solução de nanoprata em 3 concentrações (27; 54 e 81ppm).

As soluções de nanoprata foram submetidas à leitura espectral na faixa de 200 a 700 nm utilizando um leitor de ELISA EPOCH, Bio-TEK. Os dados resultantes foram recuperados e utilizados para gerar um gráfico comparativo quantitativo da nanoprata nas três concentrações. Este gráfico oferecerá uma representação visual das diferenças espectrais entre as concentrações de 27, 54 e 81 ppm.

### **6.1.2- Preparação do Material de Carbono com óxido de grafeno**

O material foi produzido e generosamente cedido pelo Professor Dr. Guilherme Lenz, do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.

Para a elaboração da amostra, o licor negro, um subproduto líquido escuro do processo de produção de celulose, foi utilizado sem qualquer tratamento prévio. Com o objetivo de obter um tamanho de poro controlado, o PMMA (Polimetilmetacrilato) foi peneirado para manter a maioria das partículas na faixa de granulometria de  $420\mu\text{m} < \Phi < 500\mu\text{m}$ . Na formulação dos materiais carbonosos, foram adicionados 100g de licor negro bruto, 15g de resorcinol e 45g de PMMA para a formação de poros de tamanho micro. Por último, 44g de formaldeído foram inseridos como agente reticulante durante a polimerização do material. Todo esse processo ocorreu sob agitação, utilizando uma placa de agitação e uma barra magnética.

Em um forno tubular horizontal, com uma taxa de aquecimento de  $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até atingir a temperatura de  $900^{\circ}\text{C}$  amostra foi submetida até à carbonização. O tempo de permanência foi de 2 horas sob atmosfera inerte de argônio. Logo após, as amostras foram esfriaram em uma atmosfera inerte até atingir a temperatura ambiente para evitar a queima do material. Por fim, foi lavada a amostra a fim de remover o excesso de sais de sódio, potássio e enxofre provenientes do processo de deslignificação.<sup>62</sup>

Utilizando vidros estéreis com tampa, em temperatura ambiente o material de carbono foi armazenado até a utilização nos experimentos seguintes.

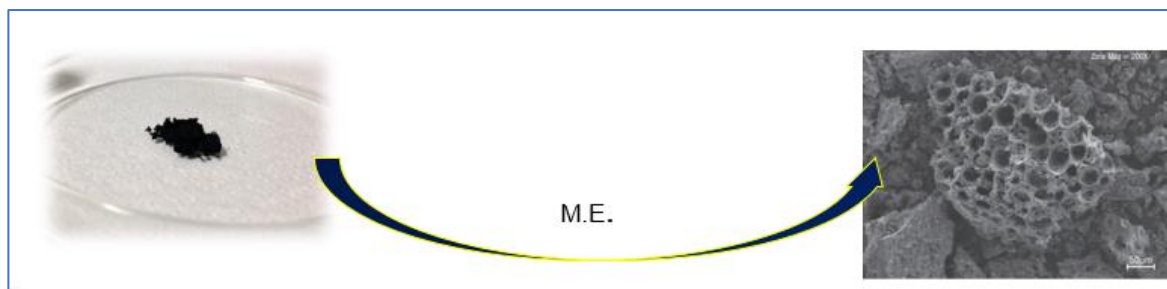


Figura 3 - Imagem do material de carbono e suas porosidades (MEV)

### 6.1.3- Testes de Adsorção da Nanoprata

#### 6.1.3.1- Adsorção da nanoprata

Este teste foi conduzido com o propósito de confirmar se o carvão ativado realiza a adsorção da nanoprata em uma concentração de 81 ppm. Inicialmente, 5 ml da solução de nanoprata a 81 ppm foram adicionados a um tubo Falcon, e imediatamente 100  $\mu$ l foram retirados e transferidos para um tubo Eppendorf de 1,5 ml. Em seguida, 5 mg de material de carbono foram adicionados ao tubo Falcon contendo a solução de nanoprata, e novamente 100  $\mu$ l da solução foram retirados e armazenados em outro tubo Eppendorf. Este procedimento foi repetido à sombra, nos seguintes intervalos de tempo: 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas e 48 horas.

Ao final do experimento, os volumes de nanoprata nos tubos Eppendorf foram transferidos separadamente para uma placa de 96 poços, e a absorbância foi analisada em um leitor de ELISA utilizando um comprimento de onda de 400 nm. Os resultados foram registrados e um gráfico foi elaborado para avaliar a concentração de nanoprata em cada solução, visando verificar a adsorção das nanopartículas de prata pelo material de carbono.

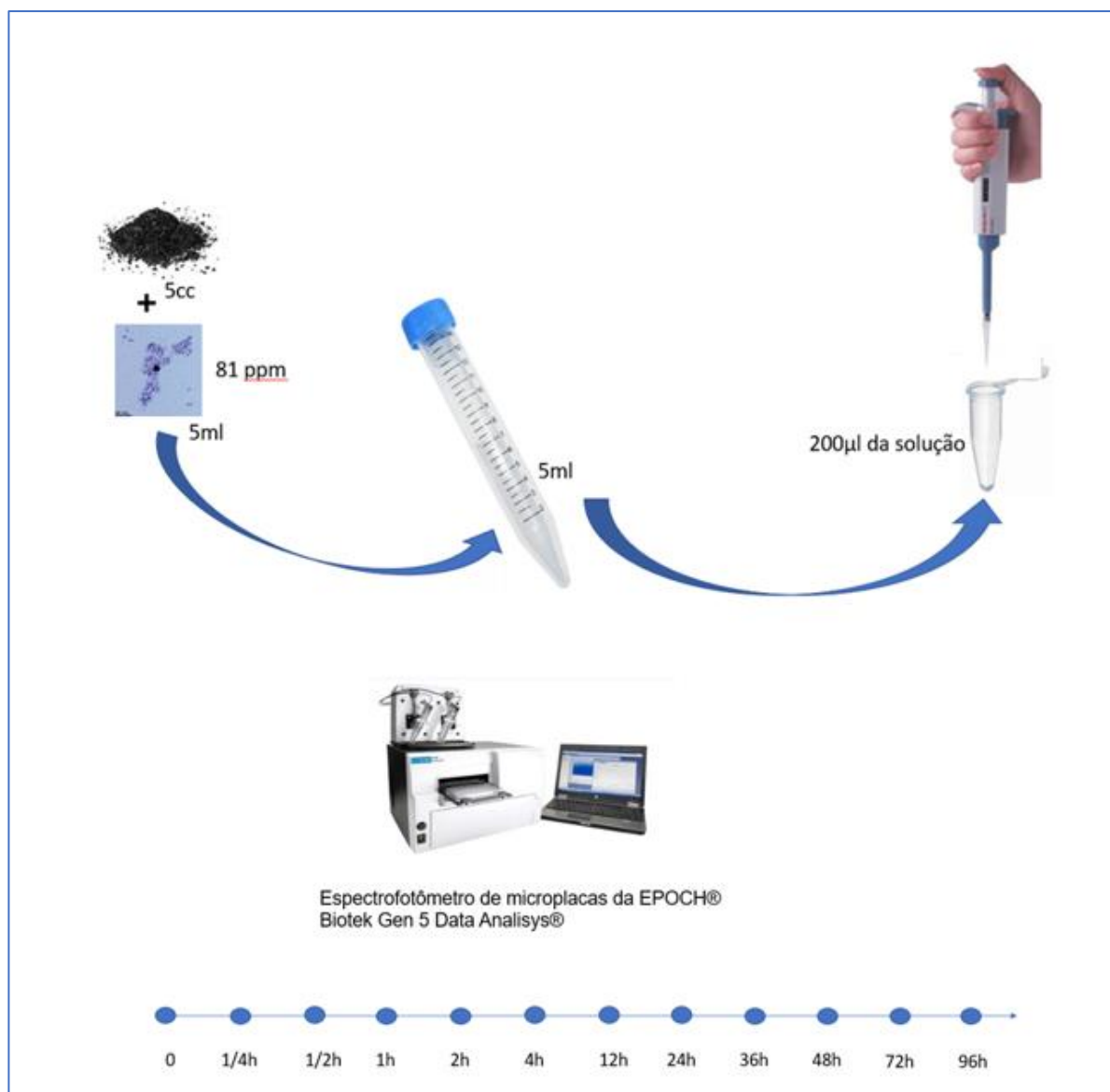


Figura 4 – Representação esquemática do teste de adsorção da solução de nanoprata no material de carbono em diferentes tempos.



## 6.2- ETAPA II – ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

### 6.2.1- Critérios de Controle

#### 6.2.1.1- Quantificação relativa de *Staphylococcus aureus*

Foi empregada uma placa de 96 poços para o experimento. Após a preparação da placa com 100 µl de PBS em cada poço, um inóculo foi preparado com uma concentração de aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  (equivalente a 0,5 na escala de MacFarland) de *S. aureus*. Foram realizadas diluições sucessivas até atingir a razão de 1:11.

Utilizando uma pipeta multicanal de 100 µl, foi realizada uma diluição seriada até a 11ª coluna da placa. A 12ª coluna foi designada como "controle", contendo apenas meio de cultura. A determinação do pico de absorbância da solução foi realizada no comprimento de onda de 600 nm utilizando o espectrofotômetro de microplacas EPOCH® juntamente com o software Biotek Gen 5 Data Analysis®.

#### 6.2.1.2- Análise do Crescimento do *S. aureus*

Foram realizadas 2 formas de crescimento de *S. aureus* para a avaliação.

1 Experimento: O cultivo bacteriano foi realizado em placa de Petri com meio de cultura, e o controle de crescimento foi observado pela formação de "unidades formadoras de colônia" (UFC).

2 Experimento: O cultivo foi realizado com diferentes grupos em solução aquosa em uma placa de 96 poços.

### 6.2.2- Desenho do Estudo / Tamanho da Amostra

#### 6.2.2.1- Protocolo Experimental para cultura de *S. aureus* em placa de petri:

Para efetuar a avaliação quantitativa, foi preparada uma amostra com a concentração equivalente à do teste anterior.

Ao conduzir a medição de turbidez pela Escala de McFarland em um tubo Falcon contendo 7 a 9 ml de PBS, utilizando uma alça bacteriológica, foi obtida pelo menos uma colônia. Após 30 segundos de agitação no vórtex, procedeu-se à categorização da amostra, considerando o intervalo ideal de 0,5 (equivalente a  $1,5 \times 10^8$  bactérias) a 1 (equivalente a  $3 \times 10^8$  bactérias).

Com o propósito de conduzir a comparação do crescimento bacteriano com e sem irradiação a laser, foi preparada uma amostra inicial com a concentração de  $3 \times 10^8$  (escala 1 de McFarland).

Cada conjunto experimental foi preparado em tubos Eppendorf, sem a realização inicial da irradiação. Posteriormente, foram semeados em duplicata em placas contendo meio Agar BHI (Infusão de Cérebro e Coração) utilizando uma pipeta simples de 10µl, empregando a técnica de gotejamento. Os grupos experimentais foram gotejados três vezes em cada placa. Por fim, cada um dos conjuntos foi submetido à irradiação com laser azul (400nm; 106J/cm<sup>2</sup>; 353mW/cm<sup>2</sup>) por 5 minutos, seguido pelo plaqueteamento utilizando a técnica de gotejamento conforme descrito na Tabela 1.

As placas foram devidamente envolvidas com filme plástico e colocadas para incubação em estufa. Após um período de 24 horas, procedeu-se à contagem qualitativa de bactérias, expressa em Unidades Formadoras de Colônia (UFC).

#### **6.2.2.2- Protocolo Experimental para cultura de *S. aureus* em placa com 96 poços:**

Com o objetivo de mensurar a quantidade de bactérias nos grupos experimentais, *S. aureus* foi cultivado no meio de Caldo BHI (Infusão de Cérebro e Coração).

Ambos os conjuntos foram acondicionados em tubos Eppendorf, sendo o primeiro grupo experimental submetido à irradiação com luz azul (400nm; 106J/cm<sup>2</sup>; 353mW/cm<sup>2</sup>) por 5 minutos, enquanto o segundo grupo permaneceu não irradiado (Figura 6).

Posteriormente, as soluções foram transferidas para duas placas de 96 poços, cada uma contendo duas concentrações diferentes dos grupos experimentais (A-D: 1/2 e E-H: 1/1) (Figura 6).

As placas de 96 poços foram subsequentemente colocadas na estufa e mantidas por 24 horas para permitir o crescimento bacteriano. Após esse intervalo, as placas foram submetidas à leitura utilizando um espectrofotômetro EPOCH®.

Não foi implementado o cegamento do experimento em ambas as etapas de plaquetamento e irradiação. Todas as manipulações microbiológicas foram conduzidas simultaneamente por dois pesquisadores.

Para ambos os ensaios, foram contemplados os seguintes conjuntos:

A) Não Irrradiados – Neste grupo não foi realizada irradiação

- Grupo CTL: Cultura de *Staphylococcus aureus*;
- Grupo NP: Cultura de *S aureus* + Solução de nanoprata (81 ppm);
- Grupo CA + GO: Cultura de *S aureus* e adição de material de Carbono
- Grupo CA+ GO +NP: Cultura de *S aureus* e adição de material de Carbono com oxido de grafeno impregnado com nanopartículas de prata.

B) Irradiados – Neste experimento, todos os grupos foram irradiados com LED

– (400nm; 106J/cm<sup>2</sup>; 353mW/cm<sup>2</sup>)

- Grupo CTL: Cultura de *Staphylococcus aureus*;
- Grupo NP: Cultura de *S aureus* + Solução de nanoprata (81 ppm);
- Grupo CA + GO: Cultura de *S aureus* e adição de material de Carbono
- Grupo CA+ GO +NP: Cultura de *S aureus* e adição de material de Carbono com oxido de grafeno impregnado com nanopartículas de prata.

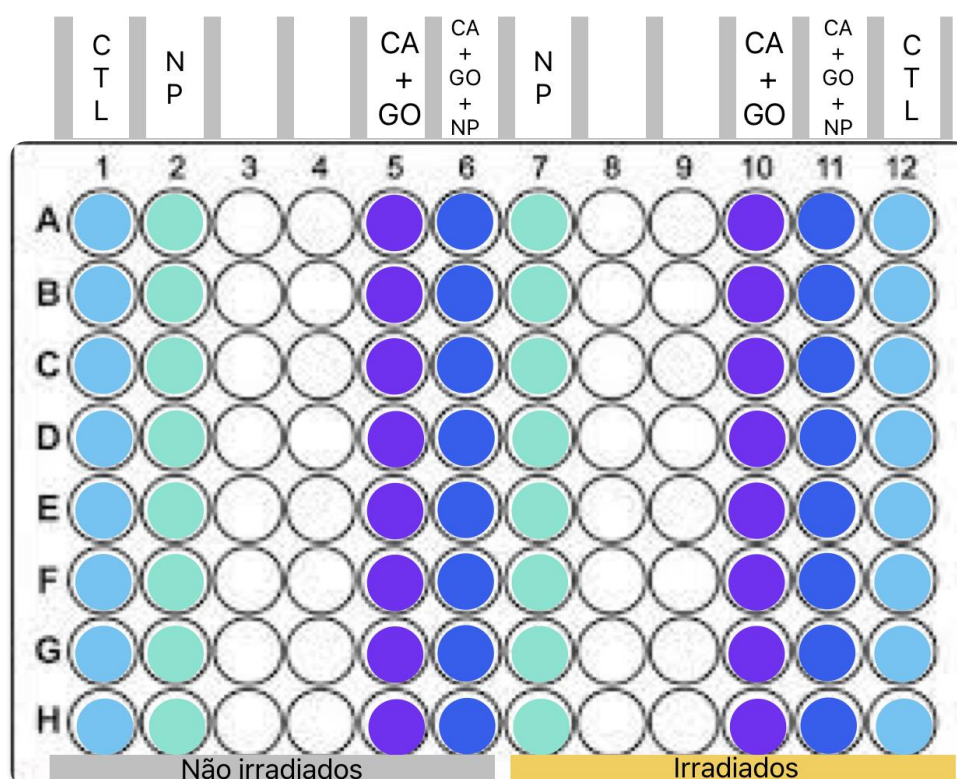


Figura 6: Esquema da placa de petri com os grupos experimentais.

### 6.2.2.3- Parâmetros Dosimétricos para Irradiação Bacteriana:

Parâmetro	Valor
Comprimento de onda central (nm)	400
Largura espectral (FWHM) (nm)	20
Modo de operação	Contínuo
Potência radiante média (mW)	600
Polarização	Aleatória
Área na saída (cm <sup>2</sup> )	1,7000
Irradiância na abertura (mW/cm <sup>2</sup> )	353
Perfil do feixe	Multimodo
Tamanho do feixe no alvo (cm <sup>2</sup> )	1,7000
Irradiância no alvo (mW/cm <sup>2</sup> )	353
Tempo de exposição (s)	300
Exposição radiante no alvo (J/cm <sup>2</sup> )	106
Energia radiante por ponto (J)	180
Número de pontos irradiados	1
Área irradiada por sessão (cm <sup>2</sup> )	1,70
Energia radiante por sessão (J)	108,0
Técnica de aplicação	Em contato
Frequência das sessões	1
Número de sessões	1
Energia radiante total (J)	108,0

Tabela 1: Parâmetros de Irradiação utilizado na cultura de *S. aureus*.

## **6.3- ETAPA III – ANÁLISE CELULAR**

### **6.3.1- Critérios de Controle**

#### **6.3.1.1- Cultivo dos Osteoblastos de Ratos**

Osteoblastos obtidos a partir de calota craniana de Ratos Wistar (Osteo1) foram descongelados e cultivados em frascos contendo meio de cultura RPMI. O cultivo no frasco foi interrompido quando a monocamada de células estava prestes a atingir a fase de subconfluência. Nesse ponto, o sobrenadante foi retirado, e as células foram lavadas com solução tampão PBS (NaCl 140mM; KCl 2,5mM; NaHPO<sub>4</sub> 8mM; KH<sub>2</sub>PO 1,4mM; pH 7,4) e tratadas com solução de tripsina 0,25% por 3 minutos a 37°C para a descolagem dos osteoblastos. O fundo dos frascos foi lavado com meio de cultura RPMI. Em seguida, toda a solução foi coletada em tubos Falcon e centrifugada a 1200 rpm a 20°C por 5 minutos (Centrífuga Excelsa 4-280R, Fanem, São Paulo, SP, Brasil).

A contagem das células foi conduzida em uma câmara de Neubauer, utilizando coloração com azul de Trypan (0,4%). Os ensaios de cultura que apresentaram uma viabilidade superior a 95% foram selecionados para o experimento.

As células viáveis foram diluídas em placas de 96 poços, com uma densidade de  $1 \times 10^4$  células por poço. As placas foram incubadas em estufa por 24 horas, em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, para permitir a adesão ao meio. Marcadores foram aplicados nas placas para distinguir os diferentes grupos. Após essa fase, as células foram submetidas à irradiação com Laser de Baixa Intensidade, conforme especificado na Tabela 2.

### **6.3.2- Desenho do Estudo**

#### **6.3.2.1- Grupos Experimentais**

As células ( $1 \times 10^3$ ) foram inseridas em placas de 96 poços. Foram considerados os seguintes grupos experimentais (Fig 7).

- Grupo I: Osteoblastos saudáveis
- Grupo II: Osteoblastos + Nanoprata
- Grupo III: Osteoblastos + PBM
- Grupo IV: Osteoblastos + Nanoprata + PBM

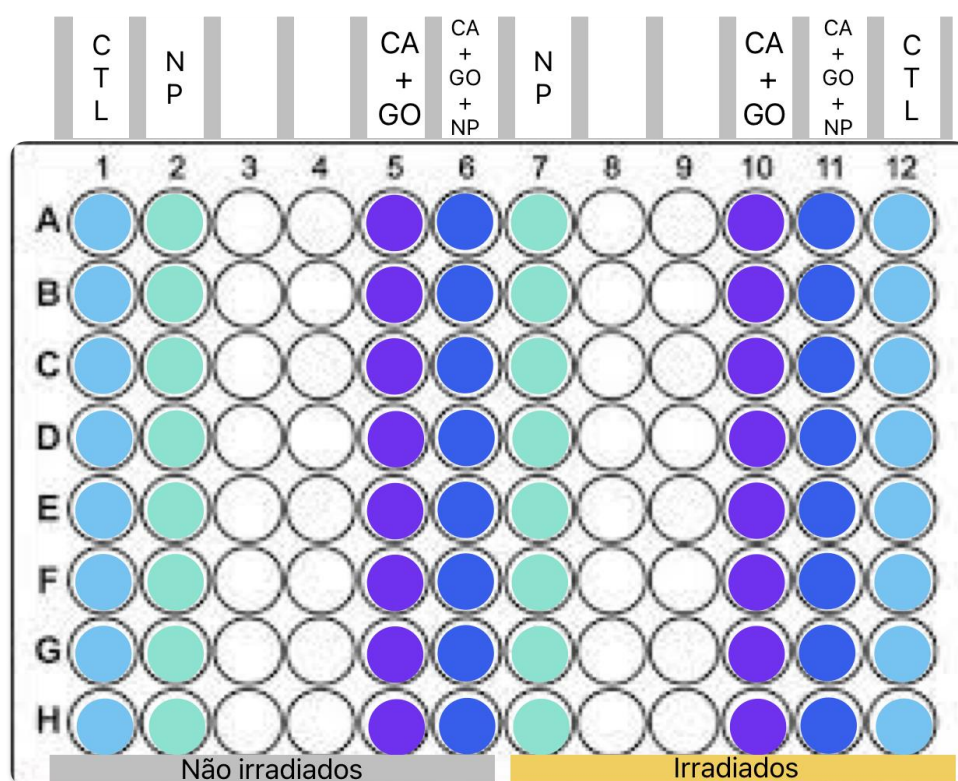


Figura 7: Esquema da placa com a distribuição dos grupos experimentais.

### 6.3.2.2- Parâmetros Dosimétricos para Irradiação dos Osteoblastos:

Parâmetro	Valor
Comprimento de onda central (nm)	400
Largura espectral (FWHM) (nm)	20
Modo de operação	Contínuo
Potência radiante média (mW)	600
Polarização	Aleatória
Área na saída (cm <sup>2</sup> )	1,7000
Irradiância na abertura (mW/cm <sup>2</sup> )	353
Perfil do feixe	Multimodo
Tamanho do feixe no alvo (cm <sup>2</sup> )	1,7000
Irradiância no alvo (mW/cm <sup>2</sup> )	353
Tempo de exposição (s)	300
Exposição radiante no alvo (J/cm <sup>2</sup> )	106
Energia radiante por ponto (J)	180
Número de pontos irradiados	1
Área irradiada por sessão (cm <sup>2</sup> )	1,70
Energia radiante por sessão (J)	108,0
Técnica de aplicação	Em contato
Frequência das sessões	1
Número de sessões	1
Energia radiante total (J)	108,0

Tabela 2: Parâmetros de Irradiação utilizado na cultura de Osteoblastos.

### 6.3.3 - Desfechos do Estudo

#### 6.3.3.1- Ensaio de Viabilidade Celular por MTT

Para a avaliação de viabilidade, as células cultivadas em bandejas de 96 poços foram submetidas a procedimentos específicos. O líquido dos poços foi retirado e as células foram lavadas com PBS para eliminar as células que não estavam mais viáveis.

Posteriormente, a cada poço foi adicionado 100µl de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5,-difeniltetrazólio brometo) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As placas foram imediatamente colocadas para incubação em um ambiente úmido com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 3 horas. Após esse período, 100 µl de isopropanol foram introduzidos

em cada poço para dissolver os cristais formazan. A absorbância foi então registrada a 620 nm usando um leitor de microplacas de absorvância Epoch – BIOTEK.

As informações de densidade óptica (DO), expressas como absorbância e correlacionadas à viabilidade celular, foram adquiridas através da leitura de absorbância em oito poços. Esses valores foram apresentados na forma de médias e desvios padrão (DV).

#### **6.4- ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados das análises de crescimento bacteriano e da viabilidade de osteoblastos foram apresentados por meio da média e do desvio padrão. Subsequentemente, esses resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Bonferroni. Os gráficos foram elaborados utilizando o software GraphPad Prism 5. O nível de significância estatística adotado foi de  $p < 0,05$ .



## 7- RESULTADOS

### 7.1- Características da solução de Nanoprata e do Material de Carbono.

#### 7.1.1- Determinação da curva espectral da nanoprta.

A figura 9 apresenta a curva espectral das nanopartículas de prata na concentração de 81ppm. A escolha pela utilização da nanoprta de 81 ppm foi motivada pela sua característica de apresentar a maior concentração com a menor precipitação. Esse fator é crucial para otimizar o desempenho do processo, garantindo maior eficiência, ao mesmo tempo que minimiza os efeitos adversos associados ao acúmulo de partículas indesejadas. Nesta figura, é possível observar a curva formada em 400nm referente ao pico da indicada pela seta preta

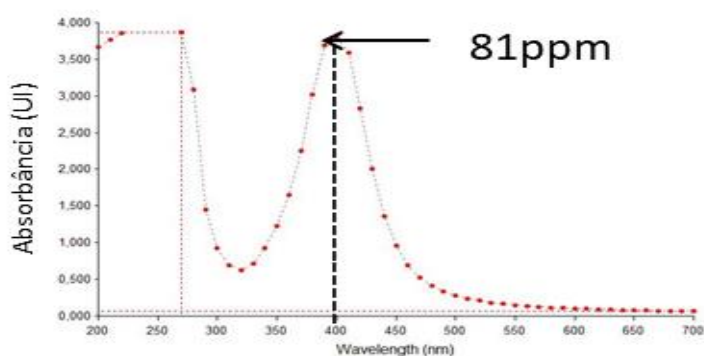


Figura 9 - Curva espectral das nanopartículas de prata. Em (A) com 27ppm (partes por milhão), Em (B) com 54ppm e em (C) com 81ppm. Seta preta para pico da nanoprta.

#### 7.1.2- Irradiação com LED Azul pode alterar a concentração relativa de nanoprta.

O gráfico da Figura 10 exibe a absorbância da solução de nanoprta em uma concentração de 81ppm em três momentos distintos. Na condição (A), imediatamente após a irradiação com LED azul; na condição (B), após 7 dias de irradiação; e na condição (C), após 30 dias da irradiação. Observa-se que não há uma alteração significativa na absorbância da nanoprta ao comparar a primeira e a segunda leitura.

Entretanto, a absorbância da solução de nanoprata irradiada diminui de maneira significativa após 30 dias da irradiação, indicando a instabilidade do composto ao longo do tempo.

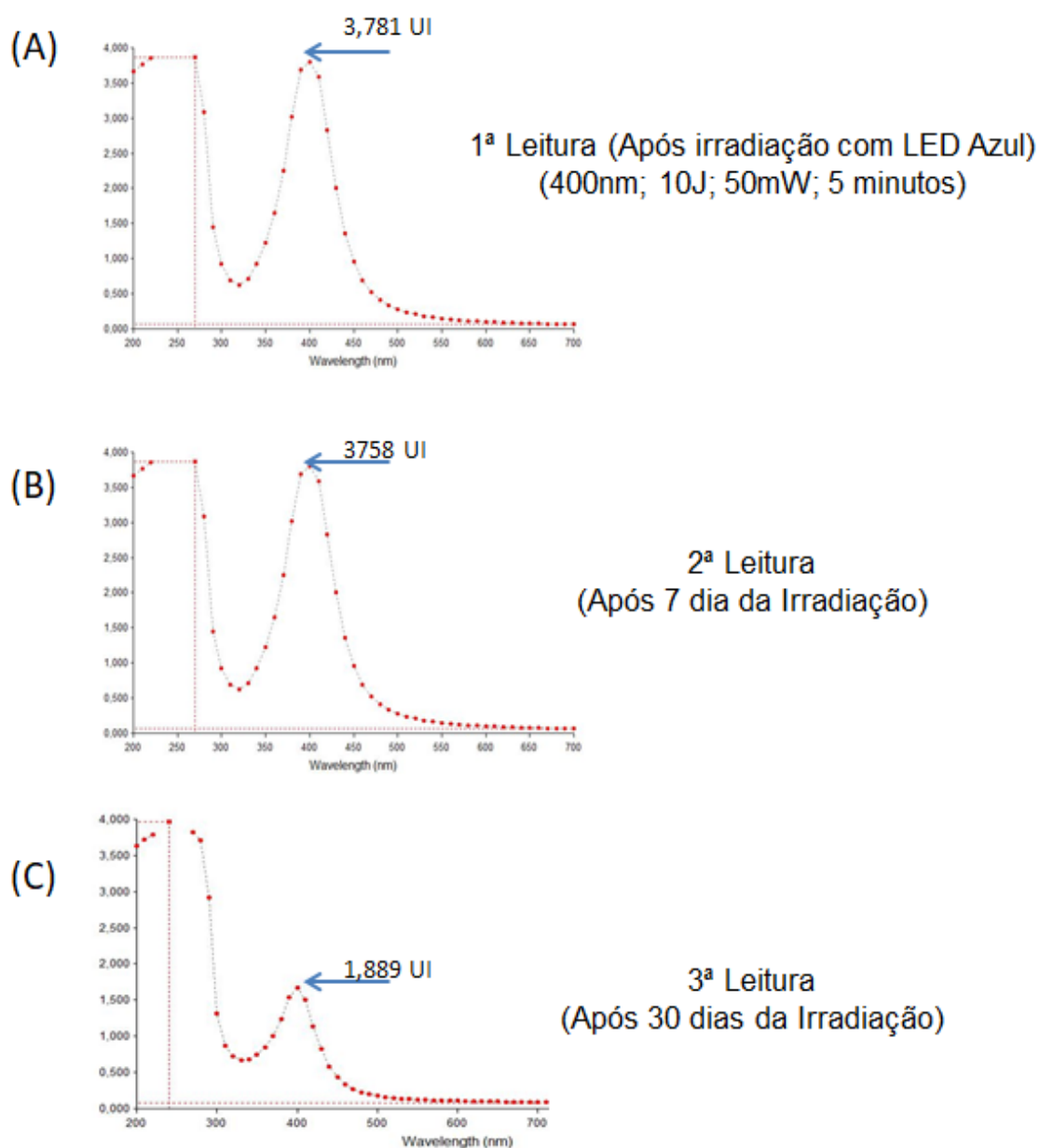


Figura 10 - Curva espectral da solução de nanoprata na concentração de 81ppm. Em (A) imediatamente após a irradiação; Em (B) leitura após 7 dias da irradiação e em (C) com leitura após 30 dias da irradiação com LED azul.

### 7.1.3- Porosidade do material de carbono por Microscopia Eletrônica de Varredura

A análise tomográfica representada na Figura 10 foi conduzida nas amostras após a fabricação do material de carbono. É evidente a presença de uma considerável quantidade de poros, destacando-se também a conectividade desses poros na superfície do material. A análise revela que o tamanho final dos poros está compreendido entre 250 $\mu$ m e 420 $\mu$ m.

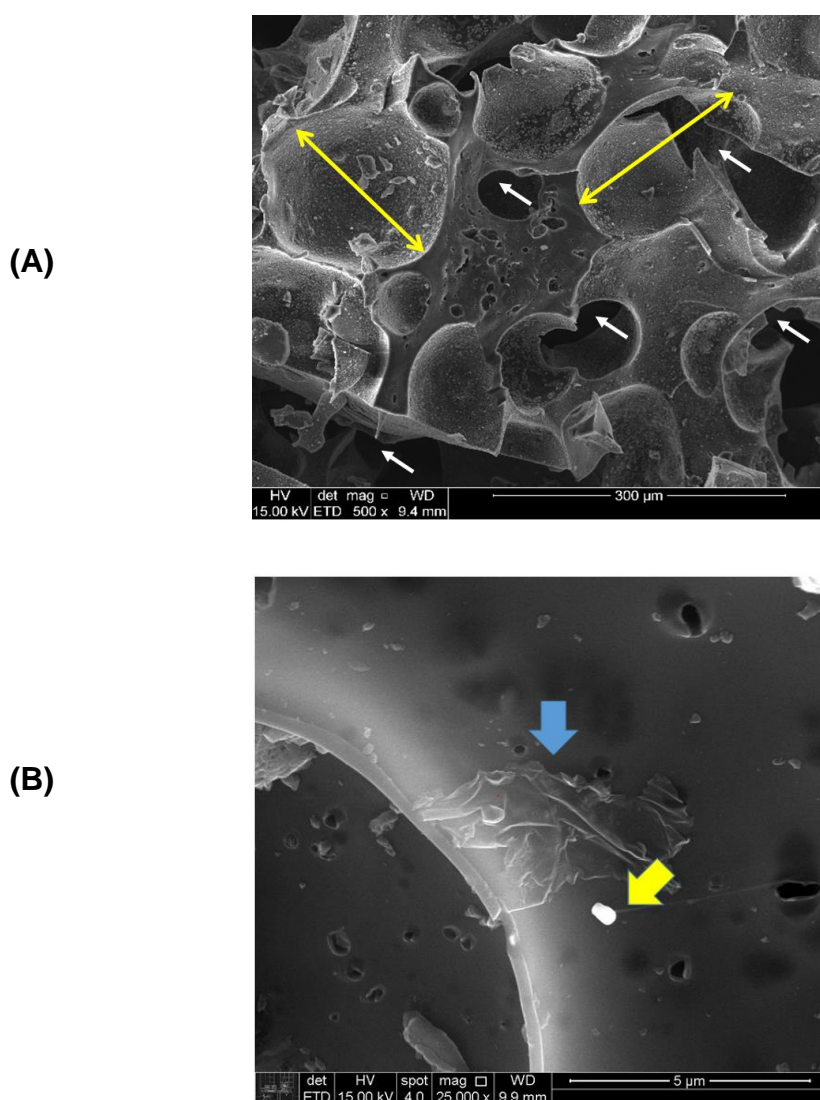


Figura 10- Caracterização tomográfica do material de carbono. Em (A), a Seta amarela indicando o diâmetro dos poros e a seta branca indicando as conectividades. Em (B) Seta azul: grafeno fundo cinza: base do carbono seta amarela: nano prata outros pedacinhos: partículas de carbono que quebram na maceração

#### 7.1.4- Avaliação da Adsorção do material de carbono impregnado com nanopartícula de prata.

No gráfico da figura 11, a linha em vermelho representa a redução de nanoprata, observada principalmente nos primeiros 15 minutos. Da concentração de 1.889, no tempo 0 (imediatamente), para a concentração de 0.336, após 15 minutos.

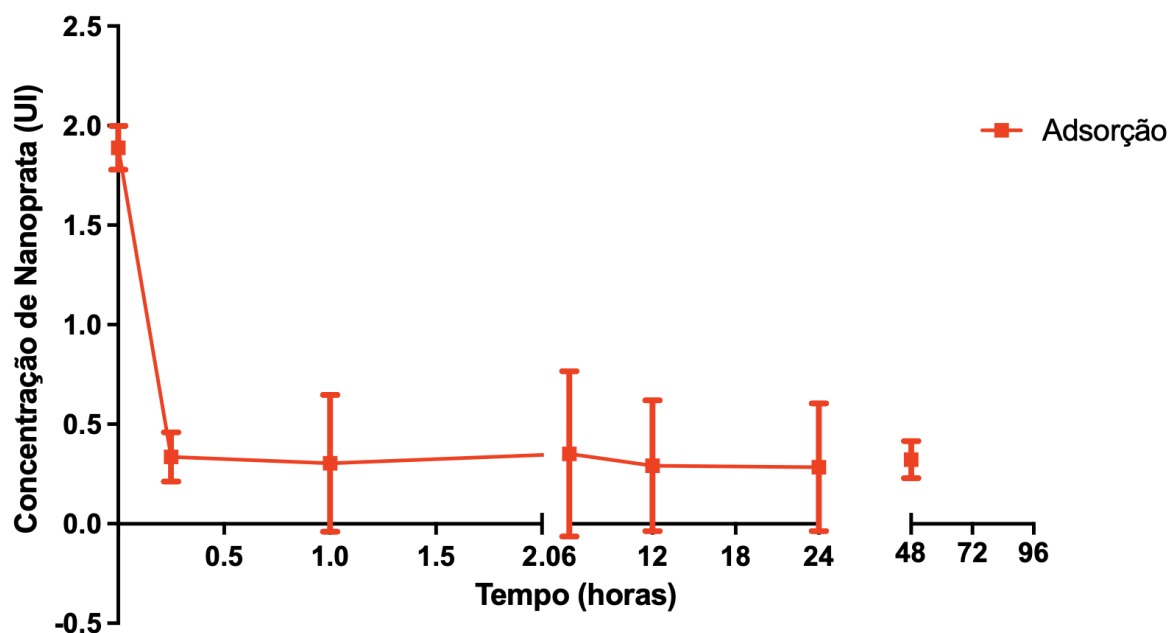


Figura 11 - Gráfico da Adsorção da solução de nanoprata em material de carbono ativado. Concentração inicial da nanoprata de 81ppm.

## 7.2- Avaliação Microbiológica – Concentração de *Staphylococcus aureus*.

### 7.2.1- Concentração relativa de *Staphylococcus aureus*.

A Figura 12 ilustra a concentração relativa de *S. aureus* com base na absorbância da solução contendo a bactéria, medida em 600 nm, em diversas diluições. É perceptível uma diminuição proporcional na absorbância de *Staphylococcus aureus*, especialmente até a diluição de 1:16. A partir das diluições de 1:32, o aparelho não é capaz de registrar variações na absorbância na solução contendo a bactéria.

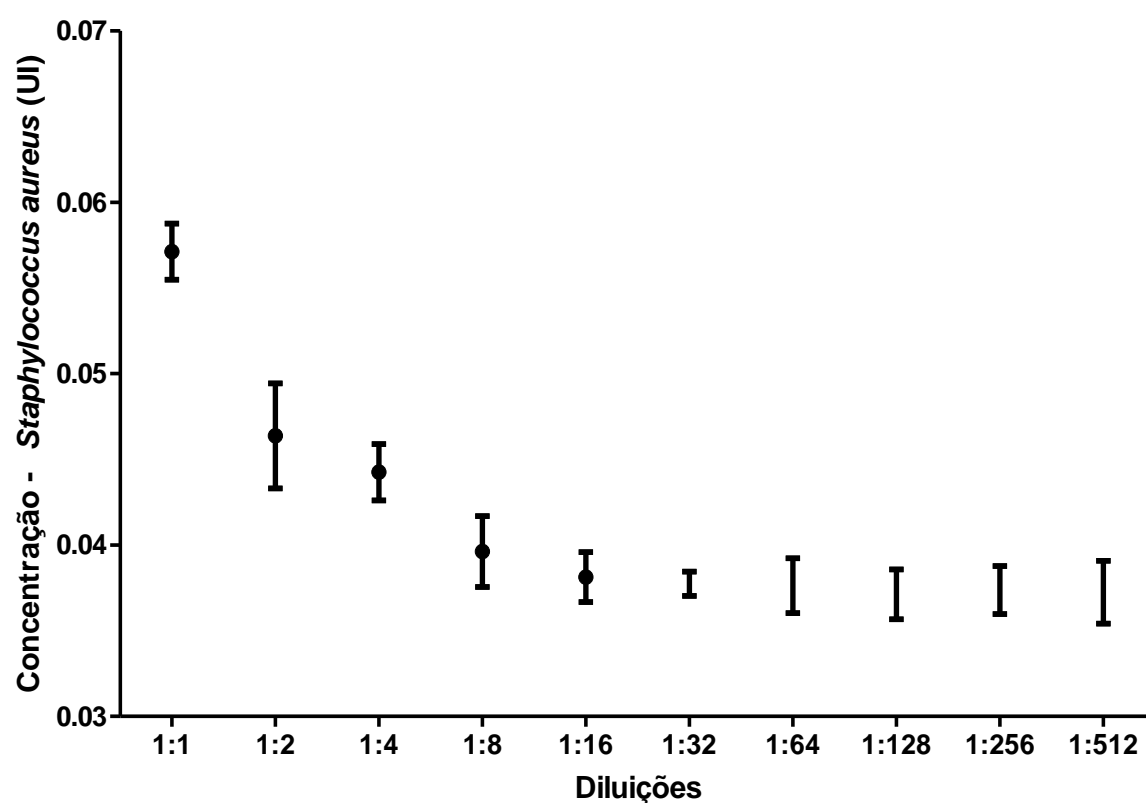


Figura 12 - Concentração relativa de *Staphylococcus aureus* em diferentes diluições. Leitura em 600nm.

### 7.2.2- Crescimento de *Staphylococcus aureus* em placa de petri com meio de cultura.

A Figura 13 exibe o crescimento de *S. aureus* em uma placa de Petri, 24 horas após o cultivo em duas condições: sem irradiação (grupo não irradiado) e com irradiação utilizando LED azul (400 nm; 106 J/cm<sup>2</sup>; 353 mW/cm<sup>2</sup>) por 5 minutos. Na imagem, é evidente que o grupo CTL, cultivado apenas com *S. aureus*, apresentou crescimento bacteriano em todos os círculos. Nos grupos NP (*S. aureus* + solução de Nanoprata) e C (*S. aureus* + material de carbono com óxido de grafeno), observou-se crescimento bacteriano semelhante ao grupo CTL. Os grupos CTL, CAGO, NP e CAGO+NP não mostraram alterações quando foram irradiados, sendo também observado crescimento bacteriano.

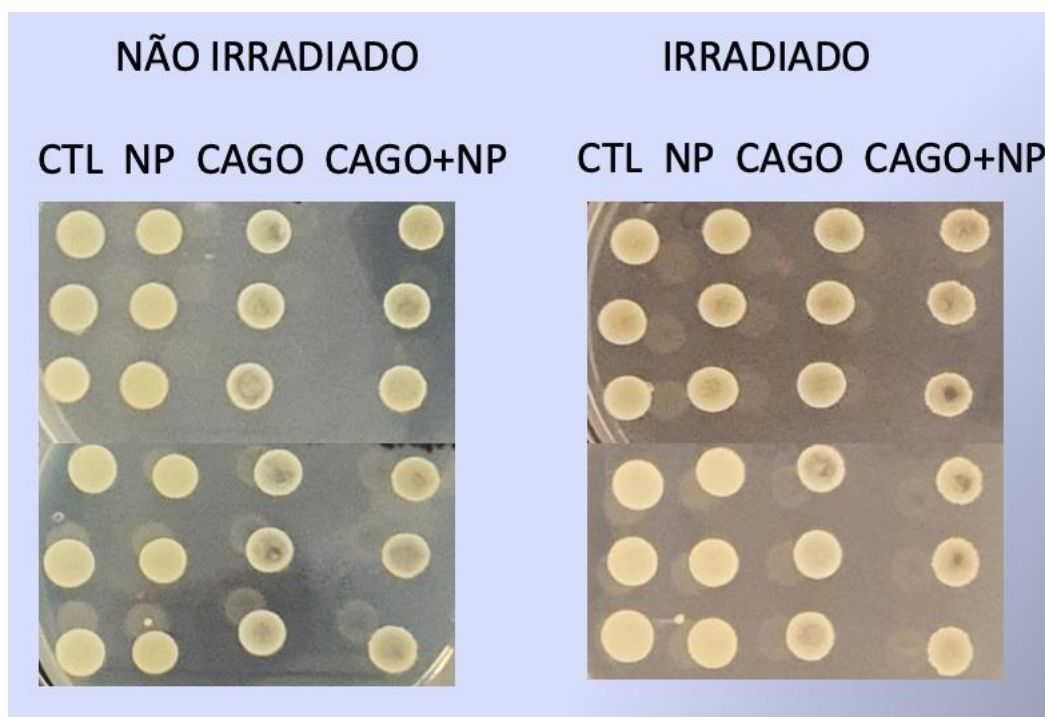


Figura 13 - Crescimento bacteriano (*Staphylococcus aureus*) em placa de petri. Grupos experimentais: CTL (*S aureus*); NP (*S aureus* +Nanoprata 81ppm); C (*S aureus* + Material de carbono) e C+NP (*S aureus* + material de carbono impregnado com Prata). Grupos não irradiados ou Irradiados com LED azul (400nm; 106J/cm<sup>2</sup>; 353mW/cm<sup>2</sup>) por 5 minutos.

### 7.2.3- Crescimento de *Staphylococcus aureus* em meio de cultura – placa de 96 poços

O gráfico da figura 14 apresenta o crescimento de *Staphylococcus aureus* em solução de meio de cultura, distribuído em placa com 96 poços e incubada por 24 horas em diferentes situações. Não houve diferenças no crescimento bacteriano nos grupos CTL e NP, quando comparamos antes e após a irradiação.

Quando comparamos os diferentes tratamentos, o grupo com material de carbono apresentou expressivo aumento no crescimento bacteriano, comparado à todos os demais grupos, porém quando irradiado o crescimento de bactérias é reduzido.

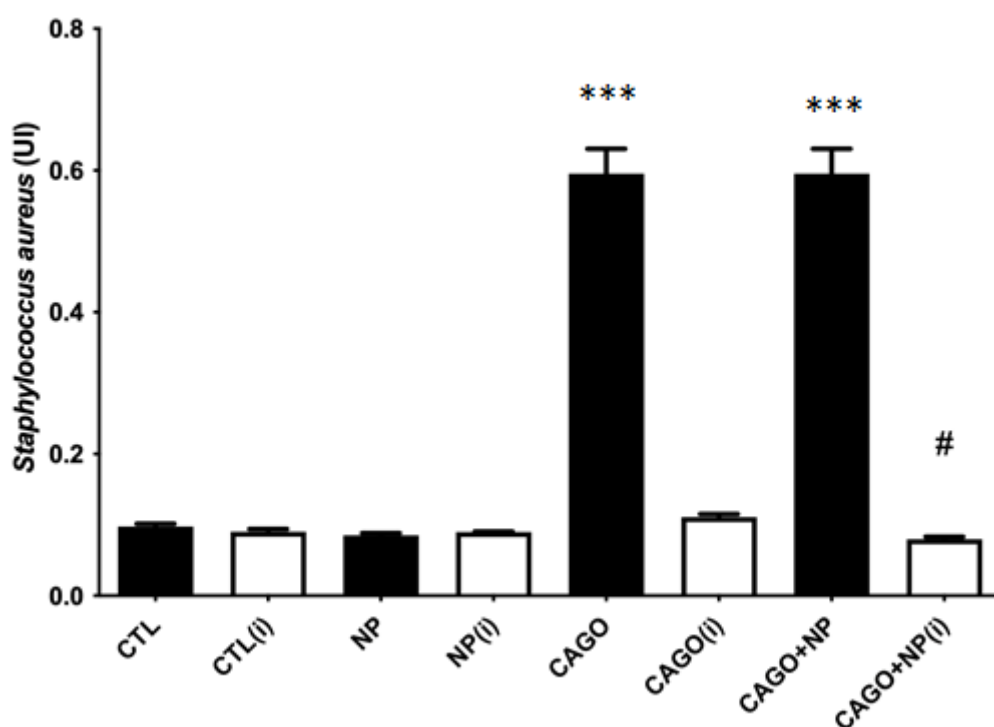


Figura 14 - Crescimento de *Staphylococcus aureus* em meio de cultura. Grupos Não irradiados ou Irradiados (i) com LED (400nm; 10J; 50mW; 5 minutos). CTL: *S aureus*; NP (*S aureus* + Solução de nanop prata 81ppm); CAGO (*S aureus* + material de carbono com oxido de grafeno) e CA+GO + NP (*S aureus* + material de carbono com oxido de grafeno+ Solução de nanop prata 81ppm). \*\*\*  $p < 0,001$  VS CTL. #  $p < 0,05$  Vs CAGO(i).

### 7.3- Viabilidade de Osteoblastos

#### 7.3.1- Viabilidade de osteoblastos – Técnica MTT.

O gráfico da Figura 15 apresenta os resultados de viabilidade celular, obtidos por meio da técnica de MTT, que correlaciona a formação de cristais de formazan com a atividade celular. As leituras de absorbância realizadas na cultura de osteoblastos em uma placa de 96 poços indicam que não houve diferenças na viabilidade dos osteoblastos ao comparar os períodos "antes" e "após" a irradiação nos grupos CTL, NP e CAGO+NP. Somente no grupo CAGO (osteoblastos cultivados com material de carbono), tanto não irradiados quanto irradiados, foi observado um aumento na viabilidade celular.

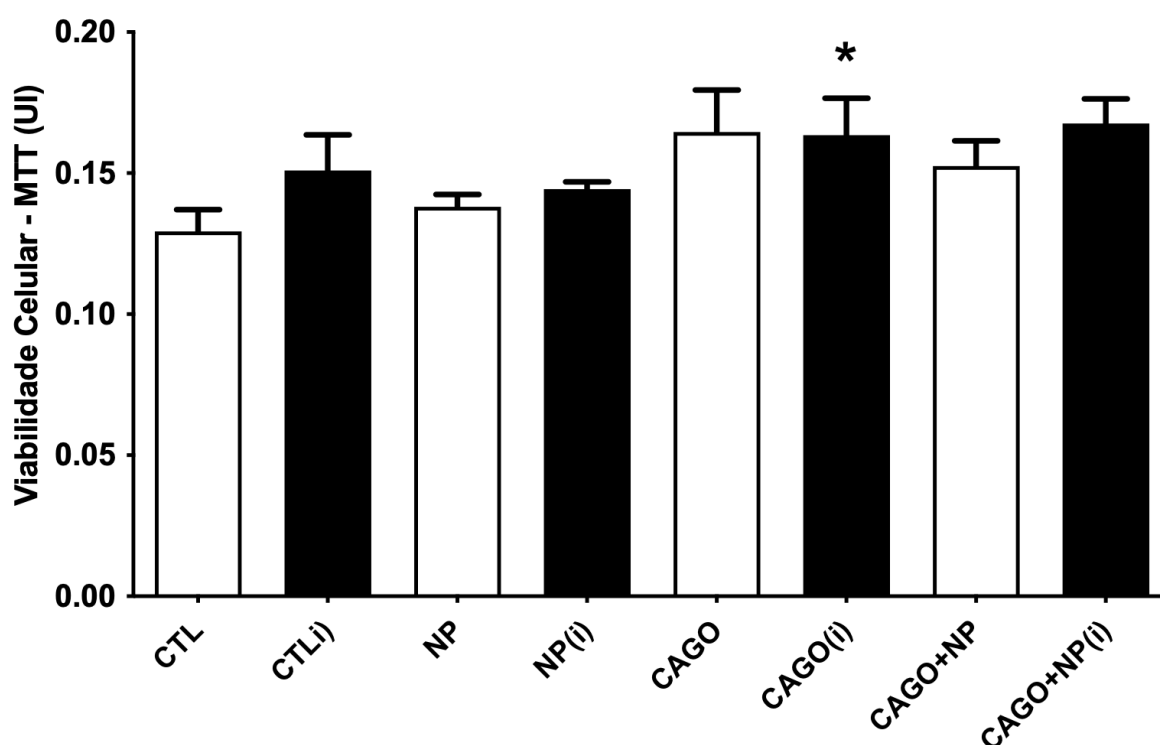


Figura 15 - Gráfico da viabilidade celular na cultura de osteoblastos em placa de 96 poços, 24 horas após a irradiação com LED azul. Grupos experimentais: CTL (osteoblastos em meio RPMI); NP (osteoblastos em solução de Nanoprata); CAGO (Osteoblastos em material de carbono e oxido de grafeno com PRMI) e CAGO+NP: (Osteoblastos em material de carbono e oxido de grafeno impregnado com Prata e com RPMI). \*  $p < 0,05$  VS CTL.



## 8- DISCUSSÃO

Infecções ósseas, como a osteomielite, apresentam desafios significativos no tratamento, especialmente quando a terapia, predominantemente baseada em agentes farmacológicos como antimicrobianos, não é eficaz, resultando em quadros infecciosos recorrentes.<sup>3;63</sup>. O propósito deste estudo foi explorar a eficácia do material de carbono impregnado com nanopartículas de prata, irradiado com luz LED azul, para controlar o crescimento bacteriano sem prejudicar as células ósseas. Nossos resultados indicam que o material de carbono impregnado com nanopartículas de prata reduziu o crescimento de *Staphylococcus aureus* quando exposto à irradiação de LED (400nm; 106J/cm<sup>2</sup>; 353mW/cm<sup>2</sup>) por 5 minutos. Além disso, o material demonstrou preservar a viabilidade celular em culturas de osteoblastos, enquanto facilitava a adesão celular ao substrato de carbono.

A solução de nanoprata empregada neste estudo foi produzida e generosamente fornecida pelo Prof. Dr. Guilherme Frederico Lenz e Silva, do Laboratório de Materiais de Carbono e Compósitos da Escola Politécnica da USP. O método de síntese química adotado para a produção da nanoprata permitiu a preparação de soluções em três concentrações distintas (27 ppm, 54 ppm e 81 ppm). Essas concentrações foram posteriormente analisadas por meio de leitura espectral, sendo registrado um pico de concentração em 400 nm.

A quantificação da nanoprata na solução foi também realizada utilizando o método de absorvância em um leitor de ELISA, sendo esta análise empregada em uma fase subsequente do trabalho, especificamente na avaliação dos processos de adsorção e dessorção de nanoprata pelo material de carbono.

Também foi avaliado o impacto da irradiação na solução de nanoprata, utilizando um LED azul (400nm; 106J/cm<sup>2</sup>; 353mW/cm<sup>2</sup>) em três momentos distintos: I) Imediatamente após a irradiação, II) Sete dias após a irradiação e III) Trinta dias após a irradiação. Nos dois primeiros períodos (imediatamente após a irradiação e sete dias após a irradiação), não foi observada nenhuma redução na concentração de nanoprata. No entanto, uma diminuição significativa na concentração de nanoprata foi registrada após 30 dias.

A redução na concentração de nanopartículas de prata na solução, 30 dias após a irradiação com LED, pode implicar em uma alteração no efeito antimicrobiano dessa solução a longo prazo. Nesse contexto, seria crucial realizar estudos de estabilidade da solução de nanoprata, bem como determinar a concentração mínima

necessária para reduzir o crescimento bacteriano sem comprometer a viabilidade dos osteoblastos. Essas investigações são essenciais para aprimorar a aplicação dessa abordagem em modelos experimentais *in vitro*.

É conhecida a sensibilidade da prata à luz, e alguns estudos indicaram que soluções contendo prata, como o Citrato de Prata, podem reagir com luz LED (470 nm, 5 mW por 5 minutos), resultando na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).<sup>64</sup> Certamente, o efeito da nanop prata irradiada e a possibilidade de formação de radicais livres representam fatores importantes para o controle microbiano. A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) pode desempenhar um papel significativo na capacidade antimicrobiana, contribuindo para a eficácia no controle de microrganismos. Essa ação oxidativa pode afetar a integridade da membrana celular bacteriana e influenciar processos metabólicos essenciais, contribuindo para a redução do crescimento bacteriano. No entanto, é importante considerar tanto os efeitos antimicrobianos quanto os potenciais impactos em sistemas celulares e tecidos, especialmente em aplicações médicas ou terapêuticas.

O material de carbono utilizado como substituto ósseo neste estudo foi produzido e gentilmente cedido pelos professores Profa Dra Gisele Amaral Labat, do Instituto de Pesquisas Espaciais – INPE, e pelo Prof Dr Guilherme Frederico Lenz e Silva, da Escola Politécnica da USP. Este material de carbono exibe características notáveis, como alta porosidade e conectividade entre os poros, propriedades essas que são de extrema importância para seu emprego como biomaterial e que são cuidadosamente controladas durante sua fabricação (65). Trabalhos pré-clínicos utilizando esse material de carbono como substituto ósseo já foram conduzidos, evidenciando importantes características osteoproliferativas. A elevada porosidade desse material de carbono também favorece os processos de adsorção e dessorção de substâncias.<sup>66</sup>

Neste estudo, realizou-se a impregnação de prata no material por meio da técnica de adsorção em uma solução de nanop prata, permitindo a penetração das nanopartículas no interior do material de carbono. Durante a avaliação das propriedades de adsorção do material de carbono, observou-se uma redução significativa na concentração de nanop prata nos primeiros 15 minutos após o contato do material com a solução, estabilizando-se a partir desse ponto. Conforme mencionado anteriormente, a capacidade de adsorção do material de carbono é

reconhecida e decorre da alta porosidade, aliada à conectividade entre os poros.<sup>62;</sup>

65

Outra fase realizada neste estudo foi a microbiológica, utilizando culturas de *S. aureus* tanto em meio sólido (Ágar de BHI) em placas de Petri quanto em meio aquoso (Solução de BHI) em placas de 96 poços. O primeiro modelo experimental, com crescimento bacteriano em Ágar de BHI, é comumente empregado para avaliar as unidades formadoras de colônias, enquanto que no segundo modelo, com bactérias suspensas em meio aquoso de BHI, é possível observar o crescimento bacteriano pelo nível de turbidez da solução em cada poço da placa.

Neste estudo, não foram observados efeitos antimicrobianos significativos da solução de nanop prata (NP) quando utilizada como tratamento isolado. Da mesma forma, a irradiação com LED azul sobre a solução de nanop prata não interferiu na quantidade de unidades formadoras de colônia. Apenas no grupo em que as *S. aureus* foram tratadas com o material de carbono impregnado com a solução de nanop prata e posteriormente irradiadas, foi observada uma redução expressiva nas unidades formadoras de colônia.

No segundo modelo experimental, utilizando solução de BHI na cultura de *S. aureus* em placa de 96 poços, os resultados foram semelhantes. Houve aumento do crescimento bacteriano em todos os grupos, exceto no grupo com material de carbono impregnado com prata e irradiado com LED azul. Observou-se também um aumento expressivo na proliferação bacteriana no grupo com material de carbono sem a nanop prata. O crescimento de *S. aureus* no material de carbono é esperado, uma vez que este apresenta grande porosidade<sup>65;66</sup>. Contudo, a redução expressiva de bactérias nos grupos com material de carbono impregnado por prata é um resultado significativo e demonstra seu potencial no controle do crescimento de *S. aureus*. Além disso, a diminuição bacteriana observada no grupo com material impregnado com prata e irradiado com LED azul traz uma nova perspectiva no controle bacteriano, utilizando a irradiação combinada com o uso de nanopartículas de prata.

O uso isolado da prata para efeito antimicrobiano é bem conhecido, e recentemente o mecanismo de ação foi descrito. Além do aumento da toxicidade pela formação de EROs, a prata também pode agir liberando íons que desestabilizam as ligações das moléculas de peptideoglicana na parede da bactéria. Observou-se ainda que as bactérias Gram-positivas, por possuírem uma parede celular mais espessa,

podem necessitar de concentrações maiores de nanoprata para causar essa desestabilização.<sup>69; 70; 71; 72</sup>

A irradiação da nanoprata com LED azul possui outro mecanismo proposto. Neste caso, há uma interação entre as nanopartículas de prata com a luz, resultando no fenômeno conhecido como "ressonância plasmônica de superfície local" ou (LSPR), conferindo a essas moléculas propriedades físicas únicas com um consequente aumento da temperatura local. Esse fenômeno é também conhecido como fototermólise, estimulando novamente a formação de EROs. Esse processo danifica não apenas a parede e a membrana celular, mas também intensifica os processos metabólicos da bactéria, levando à sua morte.<sup>73; 74; 75</sup>

Neste trabalho, não foi especificamente demonstrado quais dos mecanismos foram ativados para a redução do crescimento bacteriano no grupo de *S. aureus* em material de carbono impregnado com nanoprata e irradiado com LED azul. No entanto, é possível que seja uma combinação desses mecanismos que tenha contribuído para o comprometimento do crescimento bacteriano nesse grupo.

Na última etapa deste trabalho, foi realizada a avaliação da viabilidade celular em cultura de osteoblastos, a avaliação da viabilidade pela técnica MTT. Não foi observada mudança na viabilidade celular nos osteoblastos tratados apenas com a nanoprata em 81 ppm. Como explicado anteriormente, concentrações mais elevadas de prata podem prejudicar a homeostasia celular. No entanto, em concentrações baixas, como as utilizadas neste trabalho, a viabilidade celular foi mantida em ambos os grupos (NP ou CAGO+NP), independentemente de terem sido irradiados ou não com LED azul..

Os reagentes empregados nesse procedimento marcam as células vivas em verde e as células com baixa viabilidade em vermelho. A comparação é realizada com base em imagens obtidas por fluorescência através de dois filtros, conforme descrito previamente no método. Os resultados deste estudo indicaram um aumento na proporção de osteoblastos não viáveis quando expostos à luz do LED azul. Alguns estudos anteriores já evidenciaram o impacto da luz azul (470 nm – 480 nm) na redução da viabilidade celular em células da pele, embora tenham utilizado períodos de exposição mais longos, como 15 e 30 minutos. Contudo, o mecanismo exato pelo qual a viabilidade celular é afetada ainda não foi esclarecido, como também indicado pelo mesmo estudo.<sup>64</sup>

Ao examinar os resultados celulares, notou-se um aumento na viabilidade dos osteoblastos cultivados em material de carbono após a irradiação. É crucial salientar mais uma vez que, apesar de o material de carbono ser inerte, ele apresenta uma considerável quantidade de poros interconectados, facilitando assim o crescimento celular. Além disso, a capacidade de adsorção desse material pode possibilitar uma maior absorção de nutrientes do próprio meio de cultura, o que, por sua vez, promoveria ainda mais o crescimento e a viabilidade celular nesse ambiente.<sup>65; 67</sup> Neste estudo, também foi evidenciada a adesão de osteoblastos saudáveis ao material de carbono, tanto de forma isolada quanto quando impregnado com nanopartículas de prata. Esse achado fortalece a perspectiva de empregar esse material como substituto ósseo.

Para ampliar a compreensão sobre o crescimento e a viabilidade celular em relação ao uso de nanomateriais, sugere-se a realização de novas análises que considerem diferentes métodos de avaliação celular. Embora as abordagens convencionais tenham fornecido informações de qualidade, a implementação de técnicas adicionais, pode oferecer uma visão mais detalhada sobre a interação das células com os nanomateriais, permitindo a obtenção de mais dados.

Ainda, um foco promissor para futuros estudos seria a utilização de culturas celulares em 3D. Esse modelo tem o potencial de simular de maneira mais fiel o comportamento celular *in vivo*, permitindo a análise de aspectos como a interação celular em um microambiente tridimensional, a formação de estruturas mais complexas e a resposta celular a estímulos externos, o que poderia trazer uma nova perspectiva sobre a viabilidade e o crescimento celular em presença de nanomateriais.

Outro ponto relevante é a investigação dos processos de dessorção, ou seja, a liberação de íons de prata da superfície das nanopartículas. Estudos sobre a dinâmica de dessorção podem esclarecer melhor os mecanismos de liberação e o impacto disso sobre a toxicidade e a eficácia das nanopartículas, além de contribuir para o desenvolvimento de nanomateriais mais controlados e eficazes.

Por fim, destaca-se a importância de investigar maneiras de melhorar a estabilidade da nanop prata. Esse aspecto é crucial para garantir que as nanopartículas mantenham suas propriedades ao longo do tempo, minimizando degradações que possam comprometer sua performance e segurança em aplicações biológicas e biomédicas. O desenvolvimento de estratégias para aumentar a resistência à

aglomeração e a dissolução prematura das nanopartículas pode ser um ponto chave para otimizar seus benefícios.

São necessários estudos adicionais para consolidar a eficácia do material de carbono associado a nanopartículas de prata na regulação do crescimento bacteriano sem comprometer o desenvolvimento e a viabilidade das células ósseas. Seria crucial avaliar se esses efeitos antimicrobianos são replicáveis em bactérias Gram-negativas, além de determinar se o mecanismo de ação para esse efeito é singular ou se envolve uma combinação de mecanismos para o controle bacteriano ou resistência ao uso contínuo. Outra abordagem relevante seria avaliar a concentração segura que potencializa o efeito negativo sobre as bactérias sem prejudicar a viabilidade dos osteoblastos. Além disso, seria importante testar se diferentes comprimentos de onda, como o vermelho e o infravermelho, amplamente utilizados nas terapias por fotobiomodulação, exercem algum efeito sobre as nanopartículas de prata em solução ou aderidas ao material de carbono.

A realização de testes com culturas em 3D seria crucial, especialmente considerando que o material de carbono empregado possui uma estrutura tridimensional. Isso poderia aprimorar a observação das células aderidas a esse material. Alguns estudos com biomateriais optam por utilizar culturas de macrófagos para avaliar a compatibilidade celular ou verificar se o material permanece verdadeiramente inerte, representando outra abordagem valiosa para compreender melhor a interação do material de carbono com a atividade celular. No que diz respeito à porosidade, seria pertinente investigar a possibilidade de certa seletividade no material de carbono quanto ao potencial de adsorção e dessorção de outras moléculas relacionadas ao crescimento ósseo, como nutrientes e fatores de crescimento.

Seria importante a utilização de outros métodos de avaliação de crescimento bacteriano, a fim de obter uma análise mais abrangente e precisa do efeito do material em estudo. Além disso, uma comparação com o uso de antibióticos, como a tetraciclina, pode proporcionar uma melhor compreensão da eficácia antimicrobiana do material, considerando seu desempenho em relação aos tratamentos convencionais. Com relação às características do material, a avaliação da dessorção seria um fator importante para ser avaliado, a fim de compreender o comportamento do material em diferentes condições e como ele interage com o ambiente. Por fim, a avaliação do acondicionamento do material é fundamental para garantir sua

estabilidade e viabilidade durante o uso, assegurando que suas propriedades não sejam comprometidas ao longo do tempo.

Por último, vale ressaltar que o material de carbono empregado neste estudo possui uma vertente sustentável, uma vez que é derivado de materiais reciclados. Além de apresentar baixo custo, essa característica confere valor ao material e contribui para a redução do volume de resíduos industriais no ambiente, reforçando, assim, seu apelo sustentável.<sup>66</sup> Adicionalmente, os resultados preliminares indicaram que os materiais de carbono impregnados com nanopartículas de prata também exercem controle sobre o crescimento de *S. aureus*, sem provocar alterações na viabilidade das células ósseas.

## 9- CONCLUSÃO

Neste estudo, podemos concluir que o material compósito de carbono / grafeno impregnado com nanopartículas de prata, quando exposto à irradiação de LED azul (400nm; 106J/cm<sup>2</sup>; 353mW/cm<sup>2</sup>) por 5 minutos, demonstrou a capacidade de reduzir o crescimento bacteriano em culturas de *S. aureus*, sem afetar a viabilidade celular em culturas de osteoblastos.

Além disso, observou-se que:

- A nanoprata é eficiente na adsorção de grande parte das nanopartículas de prata nos primeiros 30 minutos, em uma solução com concentração de 81ppm;
- A concentração de nanoprata pode ser modificada após 30 dias da irradiação com LED azul, mantendo os parâmetros (400nm; 106J/cm<sup>2</sup>; 353mW/cm<sup>2</sup>);
- A nanoprata, na concentração de 81ppm, não demonstrou capacidade de reduzir o crescimento bacteriano ou afetar o desenvolvimento de osteoblastos, mesmo quando submetida à irradiação com LED azul;



## 11- REFERÊNCIAS

1. Fávaro-Pipi, E.; Bossini, P.; De Oliveira, P.; Ribeiro, J.U.; TIM, C.; Parizotto, N.; Alvez, J.M.; Ribeiro, D.A.; Selistre De Araújo, H.S.; Renno, A.C. Low-intensity pulsed ultrasound produced an increase of osteogenic genes expression during the process of bone healing in rats. *Ultrasound Med. Biol.*, v.36, n.12, p.2057-2064, 2010.
2. Zivic Y. Photobiomodulation in cells' repair. *Dermatol Open J.* 2020; 5(1): 12-25. doi: 10.17140/DRMTOJ-5-141
3. Momodu II, Savaliya V. Osteomyelitis. [Updated 2023 May 31]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532250/>
4. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury.* 2005 Dec;36(12):1392-404. Epub 2005 Aug 15.
5. Hadjiargyrou, M.; Lombardo, F.; Zhao, S.; Ahrens, W.; Joo, J.; Ahn, H.; Jurman, M.; White, D.W.; Rubin, C.T. Transcriptional profiling of bone regeneration. Insight into the molecular complexity of wound repair. *J. Biol. Chem.*, v.277, n.33, p.30177-30182, 2002.
6. Kemah B, Uzer G, Turhan Y, Özturan B, Kılıç B, Gültepe BS, Ceyran AB, Ertürk S, Aksoylu B, Şenaydın Ö, Özkan K. Effects of Local Application of Nano-silver on Osteomyelitis and Soft Tissue Infections: An Experimental Study in Rats. *J Bone Jt Infect.* 2018 Apr 12;3(1):43-49. doi: 10.7150/jbji.22121. PMID: 29774178; PMCID: PMC5955729.
7. Shalaby, M.A., Anwar, M.M. & Saeed, H. Nanomaterials for application in wound Healing: current state-of-the-art and future perspectives. *J Polym Res* 29, 91 (2022). <https://doi.org/10.1007/s10965-021-02870-x>
8. Porter R, ed. *The Cambridge History of Medicine*. Cambridge: Cambridge University Press; 2006
9. Heitzmann LG, Battisti R, Rodrigues AF, Lestingi JV, Cavazzana C, Queiroz RD. Postoperative Chronic Osteomyelitis in the Long Bones – Current Knowledge and Management of the Problem. *Rev Bras Ortop.* 2019;54(6):627-35

10. Zhou X. Antibiotic Culture: A History of Antibiotic Use in the Second Half of the 20th and Early 21st Century in the People's Republic of China. *Antibiotics*. 2023;12(3):510
11. Lew DP, Waldvogel FA. Osteomyelitis. *Lancet*. 2004 Apr 24;364(9431):369-79.
12. Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med*. 2011;9:66.
13. Santos de Souza C, Bandeira LLB, Aguiar MC, Cruz CF, Borges de Aragão IP, Souza Neto JD. Analysis of the profile of osteomyelitis care in patients over 60 years of age in Brazilian regions. *Rev Bras Clin Med*. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1026502>
14. Mader JT, Shirliff M, Calhoun JH. Staging and Staging Application in Osteomyelitis. *Clinical Infectious Diseases*. 1997 Dec;25(6):1303-1309
15. Otto M. Staphylococcus aureus toxins. *Curr Opin Microbiol*. 2014; 17:32-37
16. Kremers HM, Nwojo ME, Ransom JE, Wood-Wentz CM, Melton LJ 3rd, Huddleston PM 3rd. Trends in the epidemiology of osteomyelitis: a population-based study, 1969 to 2009. *J Bone Joint Surg Am*. 2015 Apr 15;97(8):624-32
17. Arciola CR, et al. Biofilm formation in Staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials*. 2018; 33:5967-5982
18. Chambers HF, DeLeo FR. Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol*. 2009 Sep;7(9):629-41
19. Kavanagh N, Ryan EJ, Widaa A, Sexton G, Fennell J, O'Rourke S, Cahill KC, Kearney CJ, O'Brien FJ, Kerrigan SW. Staphylococcal Osteomyelitis: Disease Progression, Treatment Challenges, and Future Directions. *Clin Microbiol Rev*. 2018 Apr; 31(2): e00084-17. doi: 10.1128/CMR.00084-17. PMID: 29444953; PMCID: PMC5967688
20. Maier RM. Bacterial Growth. In: Maier RM, Pepper IL, Gerba CP, editors. *Environmental Microbiology (Second Edition)*. 2009. p. 37-54.
21. Conterno LO, da Silva Filho CR. Antibiotics for treating chronic osteomyelitis in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009;(3):CD004439.
22. Fagète S, Steimer C, Girod PA. Comparing two automated high throughput viable-cell counting systems for cell culture applications. *J Biotechnol*. 2019 Nov 10;305:23-26

23. Freshney RI. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. 6th ed. Wiley-Blackwell, 2010.
24. Hatiboruah D, Devi DY, Namsa ND, Nath P. Turbidimetric analysis of growth kinetics of bacteria in the laboratory environment using smartphone. First published: 07 January 2020
25. Karsenty G, Wagner EF. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell*. 2002 Feb;2(4):389-406
26. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res*. 2011 Mar;26(2):229-38
27. Stoddart MJ. Cell viability assays: introduction. *Methods Mol Biol*. 2011;740:1-6
28. Freshney, R. Ian. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications. John Wiley & Sons, 2015
29. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec;65(1-2):55-63
30. Bodhak S, Bose S, Kinsel WC, Bandyopadhyay A. Investigation of In Vitro Bone Cell Adhesion and Proliferation on Ti Using Direct Current Stimulation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2012 Dec 1;32(8):2163-2168
31. Spaepen P, De Boodt S, Aerts JM, Vander Sloten J. Digital Image Processing of Live/Dead Staining. *Methods Mol Biol*. 2011;740:209-30. doi:10.1007/978-1-61779-108-6\_21
32. Schindeler, A.; McDonald, M.M.; Bokko, P.; Little, D.G. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, v.19, n.5, p.459-466, 2008.
33. Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Developmental aspects of fracture healing and the use of pharmacological agents to alter healing. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2003 Dec;3(4):297-303; discussion 320-1.
34. Bossini, P.S.; Renno, A.C.M.; Ribeiro, D.A.; Fangel, R.; Peitz, O.; Zanotto, E.D.; Parizotto, N.A. Biosilicate® and low-level laser therapy improve bone repair in osteoporotic rats. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, v.5, p.229-337, 2011.
35. Abo-ElSaad, N.S.; Soory, M.; Gadalla, L.M.A.; Ragab, L.I.; Dunne, S.; Zalata, K.R.; Louca, C. Effect of soft laser and bioactive glass on bone regeneration in

- the treatment of infra-bony defects (a clinical study). *Lasers Med. Sci.*, v.24, p.387-395, 2009.
36. Oonishi, H.; Hench, L.L.; Wilson, J.; Sugihara, F.; Tsuji, E.; Matsuura, M.; Kin, S.; Yamamoto, T.; Mizokawa, S. Quantitative comparison of bone growth behavior in granules of Bioglasst, A-W glass-ceramic, and hydroxyapatite. *J. Biomed. Mater. Res.*, v.51, n.1, p.37-46, 2000.
  37. Vieira, J.G.H. Considerações Sobre os Marcadores Bioquímicos do Metabolismo Ósseo e sua Utilidade Prática. *Arq Bras Endocrinol Metab* vol.43 no.6, 1999
  38. Moura, J.; Teixeira, L.N.; Ravagnani, C.; Peitl-Filho, O.; Zanotto, E.D.; Beloti, M.M.; Panzeri, H.; Rosa, A.L.; Oliveira, P.T. In vitro osteogenesis on a highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate®). *J. Biomed. Mater. Res. A.*, v.82, p.545-557, 2007.
  39. Henkel, J.; Woodruff, M.A.; Epari, D.R.; Steck, R.; Glatt, V.; Dickinson, I.C.; Choong, P.F.M.; Schuetz, M.A.; Hutmacher, D.W. Bone regeneration based on tissue engineering conceptions – a 21st century perspective. *Bone Research.*, v.3, p.216-248, 2013.
  40. Miranda, E.S.; Cardoso, F.T.S.; Medeiros-Filho, J.F.; Barreto, A.D.R.; Teixeira, R.M.M.; Wanderley, A.L.; Fernandes, K.E. Organic and Inorganic Bone Graft use in Rabbits' radius surgical fractures repair: an experimental and comparative stud. *Acta Ortop. Bras.*, v.13, n.5, p.245-248, 2005.
  41. Oliveira, P.; Fernandes, K.R.; Sperandois, E.F.; Pastor, F.A.; Nonakas, K.O.; Parizotto, N.A.; Renno, A.C.M. Comparative study of the effects of low-level laser and low-intensity ultrasound associated with biosilicate® on the process of bone repair in the rat tibia. *Rev. Bras. Ortop.*, v.47, n.1, p.102-107, 2012.
  42. Flausse, A.; Henrionnet, C.; Dossot, M.; Dumas, D.; Hupont, S.; Pinzano, A.; Mainard, D.; Galois, L.; Magdalou, J.; Lopez, E.; Gillet, P.; Rousseau, M. Osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in hydrogel containing nacre powder. *J. Biom. Mat. Res.*, v.101A, n.11, p.3211-3218, 2013.
  43. Reswan, K.; Chen, Q.Z.; Blaker, J.J.; Boccaccini, A.R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.*, n. 27, p. 3413–3431, 2006.

44. Kollef M. H, Sherman G, Ward S, Fraser VJ. Inadequate antimicrobial treatment of infections: A risk factor for hospital mortality among critically ill patients. *Chest*. 1999;115:462–74.
45. Berni, E. A., Ribeiro, C., Zucolotto, V. Síntese de nanopartículas de prata para aplicação na sanitização de embalagens. São Carlos, Comunicado Técnico, n. 99, Embrapa, 2008.
46. Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramirez, J. T., Yacaman, M. J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, Institute of Physics Publishing, v. 16, p. 2346– 2353, 2005.
47. LI, Qilin et al. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. *Water Research*, v. 42, p. 4591-4602, 2008.
48. Koga, H. e Kitaoka, T. On-paper Synthesis of Silver Nanoparticles for Antibacterial Applications. In: PEREZ, David Pozo (Org.). *Silver Nanoparticles*. Vukovar: In- tech, 2010. Cap. 14.
49. Lee SJ. Cytokine delivery and tissue engineering. *Yonsei Med J*. 41(6):704–19, 2000.
50. De Castro e Silva Júnior O.; Zucoloto S, Menegazzo L.A.; Granato R.G.; Marcassa L.G.;, Bagnato V.S. Laser enhancement in hepatic regeneration for partially hepatectomized rats. *Lasers Surg Med*. 2001;29(1):73–7.
51. Karu T.I. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser irradiation. *Dokl Akad Nauk SSSR*. 1986;291(5):1245–9.
52. Schaffer M.; Bonel H.; Sroka R.; Schaffer P.M.; Busch M.; Reiser M. et al. Effects of 780 nm diode laser irradiation on blood microcirculation: preliminary findings on time-dependent T1-weighted contrast-enhanced magnetic resonance imaging (MRI). *J Photochem Photobiol B*. janeiro de 2000;54(1):55–60.
53. Kiyozumi T. Low level diode laser treatment for hematomas under grafted skin and its photobiological mechanisms. *Keio J Med*. dezembro de 1988;37(4):415–28.
54. Khadra, M.; Ronold, H.J.; Lyngstadaas, S.P.; Ellingsen, J.E.; Haanaes, H.R. Low-level laser therapy stimulates bone-implant interaction: an experimental study in rabbits. *Clin. Oral Impl. Res.*, v.15, n.3, p.325-332, 2004.

55. Kazem, S.S.; Soleimanpour, J.; Salekzamani, Y.; Oskuie, M.R. Effect of low-level laser therapy on the fracture healing process. *Lasers Med. Sci.*, 2009.
56. Renno, A.C.M.; McDonnell, P.A.; Parizotto, N.A.; Laakso, E-L. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro. *Photomed. Laser Surg.*, v.25, n.4, p.275-280, 2007.
57. TimIM, C.R.; ZambroniAMBONI-PintoINTO, K.N.; RossiOSSI, B.R.O.; Fernandes, K.; Matsumoto, M.A.; Parizotto, N.A.; Rennó, A.C.M.; Low-level laser therapy enhances the expression of osteogenic factors during bone repair in rats. *Lasers Med Sci.*, v.29, p.147-156, 2014.
58. Ebrahimi, T.; Moslemi, N.; Rokn, A.R.; Heidari, M.; Nokhbatolfoghahaie, H.; Fekrazad, R. The influence of low-level laser therapy on bone healing. *J. Dent.*; v.9, n.4, p.238-248, 2012.
59. Bossini, P.S.; Renno, A.C.M.; Ribeiro, D.A.; Fangel, R.; Peitl, O.; Zanotto, E.D.; Parizotto, N.A. Biosilicate® and low-level laser therapy improve bone repair in osteoporotic rats. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, v.5, p.229-337, 2011.
60. Granito, R.N., Ribeiro, D.A., Renno, A.C.M., Ravagnani, C., Bossini, P.S., Peitl-Filho, O., Zanotto, E.D., Parizotto, N.A., Oishi, J. Effects of biosilicate and bioglass 45S5 on tibial bone consolidation on rats: a biomechanical and a histological study. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, v.20, p.2521-2526, 2009.
61. Duran, N., Rolim, W.R., Duram, M., Favaro, W.J., Seabra, A.B, NANOTOXICOLOGY OF SILVER NANOPARTICLES: TOXICITY IN ANIMALS AND HUMANS, *Quím. Nova* 42 (2) • Fev 2019 <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170318>.
62. Vergara DEF, Lopes BHK, Quirino SF, Silva GFBL e, Boss AFN, Amaral-Labat GA, et al.. Frequency Selective Surface Properties of Microwave New Absorbing Porous Carbon Materials Embedded in Epoxy Resin. *Mat Res [Internet]*. 2019;22:e20180834.
63. Ranghar S, Sirohi P, Verma P, Agarwal V. Nanoparticle-based drug delivery systems: promising approaches against infections. *Braz arch biol technol [Internet]*. 2014 Mar; 57(2): 209–22. Available from: <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013005000011>.
64. Ju Ah. Yoo, Eunbi Yu, See-Hyoung Park, Sae Woong Oh, Kitae Kwon, Se Jung Park, Hyeyoun Kim, Seyoung Yang, Jung Yoen Park, Jae Youl Cho, Youn-Jung Kim, Jongsung Lee, "Blue Light Irradiation Induces Human Keratinocyte Cell

- Damage via Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) Regulation", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2020, Article ID 8871745, 14 pages, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8871745>
65. A. Celzard, V. Fierro, G. Amaral-Labat, Adsorption by Carbon Gels, in: J.M.D. Tascon, Novel Carbon Adsorbents, Elsevier Ltd, 2012, pp. 207–244. ISBN: 9780080977447. <http://www.elsevier.com/locate/permissionusematerial>
  66. Amaral-Labat, G., da Silva, E.L., Cuña, A. *et al.* A Sustainable Carbon Material from Kraft Black Liquor as Nickel-Based Electrocatalyst Support for Ethanol Electro-Oxidation. *Waste Biomass Valor* **12**, 2507–2519 (2021). <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01201-3>
  67. Fonseca BC da S, Araújo LS, Pinheiro B da S, Santos AS dos, Amaral-Labat G, Matsushima JT, et al.. Bio-based Carbon Electrochemically Decorated with Cu Nanoparticles: Green Synthesis and Electrochemical Performance. *Mat Res [Internet]*. 2022;25:e20220143. Available from: <https://doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2022-0143>
  68. Agnihotria S, Mukherjia S, Mukherji S. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5-100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. Electronic Supplementary Information. *RSC Adv.*, 2014, **4**, 3974-3983. DOI: 10.1039/C3RA44507K. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2014/ra/c3ra44507k>.
  69. Chaloupka K , MalamY, SeifalianAM. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends Biotechnol* 2010;28:580–588.
  70. Yamanaka M , HaraK, KudoJ. Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:7589–7593.
  71. Alt V , BechertT, SteinrückeP, et al. An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. *Biomaterials* 2004;25:4383–4391.
  72. Chaloupka K , MalamY, SeifalianAM. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends Biotechnol* 2010;28:580–588.
  73. Baffou G, Quidant R. 2014. Nanoplasmonics for chemistry. *Chem Soc Rev* 43:3898. CrossRefPubMed.

- 74.** Zhang D, Wang J. 2017. In Situ Photoactivated Plasmonic Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>@silver as a Stable Catalyst With Enhanced Photocatalytic Activity Under Visible Light. *Mater Res* 20:702–711.
- 75.** da Silva AGM, Rodrigues TS, Correia VG, Alves T V., Alves RS, Ando RA, Ornellas FR, Wang J, Andrade LH, Camargo PHC. 2016. Plasmonic Nanorattles as Next-Generation Catalysts for Surface Plasmon Resonance-Mediated Oxidations Promoted by Activated Oxygen. *Angew Chemie* 128:7227–7231.