



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

Drielli Viana Souza

**O EFEITO DA TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO, ASSOCIADA
AO MATERIAL DE CARBONO IMPREGNADO COM NANOPARTÍCULAS DE
PRATA, NO CONTROLE DA RESISTÊNCIA ÓSSEA**

São Paulo/SP

2025



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

**O EFEITO DA TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO, ASSOCIADA
AO MATERIAL DE CARBONO IMPREGNADO COM NANOPARTÍCULAS DE
PRATA, NO CONTROLE DA RESISTÊNCIA ÓSSEA**

Dissertação apresentada à Universidade Nove de Julho, para obtenção do título de Mestre (a) em Medicina Biofotônica.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos

SÃO PAULO

2025

Souza, Drielli Viana.

O efeito da terapia por fotobiomodulação, associada ao material de carbono impregnado com nanopartículas de prata, no controle da resistência óssea. / Drielli Viana Souza. 2025.

78 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2025.

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

1. Carbono ativado. 2. Fotobiomodulação. 3. Nanoprata. 4. Propriedades mecânicas. 5. Colágeno.

I. Marcos, Rodrigo Labat.

II. Título.

CDU 615.831

São Paulo, 13 de novembro de 2025.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): Drielli Viana Souza

Título da Dissertação: “O efeito da terapia por fotobiomodulação associada ao material de carbono impregnado com nanopartículas de prata no controle da resistência óssea”.

Presidente: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS



Membro: PROF. DR. RENATO ARAUJO PRATES



Membro: PROF. DR. HUMBERTO DELLE



AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela oportunidade de me aprimorar ainda mais e alcançar mais um objetivo que a princípio parecia um sonho distante.

Agradecer à minha mãe e ao meu pai, que sempre me incentivaram e me mostraram que nenhum sonho é tão distante que não possa se tornar realidade com muito esforço e muita fé.

Ao meu irmão, que é meu parceiro de vida e ao meu namorado que aguentou tantos dias de ansiedade e nervosismo até a realização dessa apresentação.

FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (capes) – Processo: 88887.853491/2023-00.

RESUMO

Infecção óssea é uma condição grave e de difícil tratamento, com impacto significativo na vida dos pacientes, incluindo aspectos físicos, emocionais, sociais e econômicos. O tratamento depende da gravidade e envolve uma abordagem multimodal que combina terapia antimicrobiana, intervenção cirúrgica, e cuidados de suporte. Contudo, o tratamento farmacológico nem sempre se mostra eficaz. Nesse contexto, o uso de materiais compósitos de carbono com nanoprata, usados como substitutos ósseos surge como alternativa na promoção do reparo ósseo. De forma complementar, a terapia por fotobiomodulação (PBM) tem sido amplamente utilizada para otimizar a qualidade do reparo tecidual, modulando o processo inflamatório e reduzindo a dor. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de um compósito de carbono impregnado com nanopartículas de prata (ACNS), isoladamente ou em combinação com PBM, na organização tecidual e resistência óssea, considerando parâmetros biomecânicos e morfológicos. **Metodologia:** Ratos *Wistar* foram anestesiados e foi realizada a confecção do defeito ósseo em ambas as tíbias. Os animais foram distribuídos em grupos: controle sem lesão (CTL) ou com lesão, sem tratamento (NT); ou tratados com fotobiomodulação (PBM); com material compósito (ACNS) ou tratados com as terapias associadas (PBM+ACNS). Após 30 dias, os animais foram eutanasiados e as tíbias coletadas para análises morfológicas e funcionais. **Resultados:** A lesão óssea induzida promoveu alterações tanto nas propriedades mecânicas quanto na organização tecidual e na proporção de colágeno. Os tratamentos isolados com PBM ou ACNS não modificaram significativamente as propriedades mecânicas, mas favoreceram a organização tecidual. Já a associação PBM+ACNS promoveu melhora nas propriedades biomecânicas e morfológicas, direcionando para um tecido mais organizado com proporção de colágeno semelhante à do grupo controle. **Conclusão:** A fotobiomodulação associada ao uso de material compósito de carbono impregnado com nanopartículas de prata promoveu o reparo ósseo com manutenção tanto da organização tecidual como das propriedades mecânicas, em modelo experimental de lesão óssea.

Palavras-chave: Carbono ativado; Fotobiomodulação; Nanoprata; propriedades mecânicas; colágeno.

ABSTRACT

Bone infection is a serious and difficult-to-treat condition, significantly impacting patients' lives, including physical, emotional, social, and economic aspects. Treatment depends on the severity of the condition and involves a multimodal approach that combines antimicrobial therapy, surgical intervention, and supportive care. However, pharmacological treatment is not always effective. In this context, the use of carbon-based composite materials as bone substitutes emerges as a promising alternative that promotes recovery and accelerates healing. Additionally, photobiomodulation therapy (PBM) has been widely used to optimize the quality of tissue repair by modulating the inflammatory process and reducing pain. The objective of this study was to evaluate the efficacy of a carbon composite associated with silver nanoparticles (ACNS), either alone or in combination with PBM, in the bone repair of an experimental injury model, considering biomechanical and morphological parameters. **Methodology:** Wistar rats were anesthetized and subjected to induction of bone injury in both tibias. The animals were distributed into groups: control without injury (CTL); with injury without treatment (NT); treated only with PBM (PBM); treated with composite material (ACNS); or treated with the combined therapies (PBM+ACNS). After 30 days, the animals were euthanized, and the tibias were collected for morphological and functional analyses. **Results:** The induced bone injury promoted changes in, both mechanical properties and tissue organization, as well as collagen proportion. Isolated treatments with PBM or ACNS did not significantly modify mechanical properties but favored tissue organization. In contrast, the PBM+ACNS combination showed significant improvement in biomechanical and morphological properties, leading to more organized tissue with a collagen proportion similar to that of the control group (CTL). **Conclusion:** Photobiomodulation associated with the use of a carbon composite material impregnated with silver nanoparticles promoted bone repair while maintaining tissue organization and mechanical properties in an experimental model of bone injury.

Keywords: Activated carbon; Photobiomodulation; Silver nanoparticles; Mechanical properties; Collagen.

DESTAQUES

- Relevância clínica: O estudo aborda um problema grave e de difícil tratamento, relacionado às infecções ósseas e ao seu processo de reparo, como foco na resistência mecânica.
- Inovação: Propõe a utilização de um novo biomaterial compósito de carbono associado à nanopartículas de prata, irradiadas com laser em baixa intensidade, representando uma estratégia promissora e de baixo custo para o reparo ósseo.
- Potencial futuro: Os resultados abrem perspectivas para aplicações clínicas em humanos, com potencial para reduzir complicações, acelerar a cicatrização e melhorar a qualidade de vida dos pacientes.
- Alternativas terapêuticas: Compósitos de carbono com nanoprata despontam como substitutos ósseos promissores, enquanto a fotobiomodulação (PBM) mostra eficácia na otimização do reparo tecidual, configurando alternativas viáveis aos tratamentos convencionais.

HIGHLIGHTS

- Clinical Relevance: Addresses a serious and challenging problem (bone infection and repair).
- Innovation: Employs a novel carbon-based composite biomaterial combined with silver nanoparticles, representing a promising and cost-effective strategy for bone regeneration.
- Reduction of Side Effects: Unlike drugs that may cause long-term adverse effects, the application of laser therapy combined with biomaterials in bone lesions showed no evidence of side effects.
- Future Potential: The findings pave the way for future applications in humans, with the potential to reduce complications, accelerate healing, and improve patients' quality of life.
- Therapeutic Alternatives: The use of carbon composites with silver nanoparticles emerges as a promising bone substitute, while photobiomodulation (PBM) has been applied to optimize tissue repair, representing an alternative to current treatments.

RESUMO PARA LEIGOS

A infecção óssea é uma condição grave e de difícil tratamento, que pode afetar de forma significativa a qualidade de vida das pessoas. O tratamento tradicional geralmente envolve o uso de medicamentos, cirurgias e outros cuidados, mas nem sempre apresenta os resultados esperados. Por esse motivo, novas alternativas vêm sendo estudadas. Entre elas, destaca-se o uso de um material de carbono combinado a nanopartículas de prata, que pode auxiliar na recuperação do osso. Outra possibilidade é a fotobiomodulação (PBM), uma terapia a laser que ajuda a controlar a inflamação, acelerar a cicatrização e reduzir a dor. Neste estudo, utilizamos um modelo de lesão óssea em animais para avaliar o reparo do osso com a associação entre laser e o material de carbono com prata. Após um mês, os grupos tratados apresentaram ossos mais resistentes, semelhantes aos de animais saudáveis. Esses resultados indicam que o uso do laser, na dose adequada, associado ao material de carbono com prata, pode representar uma alternativa promissora para melhorar a qualidade óssea.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura tridimensional de um osso	20
Figura 2	Tabela de grupos.	42
Figura 3	Delineamento experimental e linha temporal.....	43
Figura 4	Defeito ósseo monocortical em tíbias, realizado com uma broca cirúrgica helicoidal de implante com 1.3 mm de diâmetro.....	44
Figura 5	Ilustração da região do defeito ósseo e inserção do material de carbono e aplicação da PBM.....	47
Figura 6	Dispositivo para ensaio de flexão em 3 pontos.	48
Figura 7	Gráfico do ensaio de flexão	49
Figura 8	Posicionamento do osso tibial para ensaio mecânico	49
Figura 9	Cortes histológicos transversais das tíbias de ratos.....	52
Figura 10	Gráfico da Força máxima durante ensaio de flexão cíclica no momento da ruptura óssea (Fmax).....	53
Figura 11	Gráfico da deformação máxima durante ensaio de flexão cíclica no momento da ruptura óssea (Dmax).....	54
Figura 12	Propriedades mecânicas da tíbia após indução da lesão óssea.	55
Figura 13	Gráfico da proporção de colágeno total	56
Figura 14	Imagens histológicas do tecido ósseo de tíbias de ratos coradas com <i>Picrosirius</i>	57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Parâmetros dosimétricos	45
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP	Fosfatase Ácida Tartarato Resistente
ALP	Fosfatase Alcalina
AsGaAl	Arseneto de Gálio e Alumínio
ATP	Trifosfato de Adenosina
BMPs	Proteínas Morfogenética Óssea
Ca	Cálcio
CALC	Calcitonina
CTL	Controle
CV	Canais Vasculares
DMAX	Deformação Máxima no Momento da Ruptura (mm)
DMO	Densidade Mineral Óssea
DNA	Ácido Desoxirribonucleíco
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
FMAX	Força Máxima no Momento da Ruptura (N)
G	Grupo
H	Tratamento Hormonal (Estrógeno+Progesterona)
H.E.	Hematoxilina-Eosina
I	Lesão (Injury)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL	Interleucina
J	Joule
J/cm ²	Joule por centímetro quadrado kg – quilograma
Laser	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
LED	Diodos Emissores de Luz
LBI	Laser de Baixa Intensidade
LLLT	Low Level Laser Therapy
LM2C2	Laboratório de Moagem de Alta Energia, Materiais de Carbono e Compósitos para Altas Temperaturas
M-CSF	Fator Estimulador de Colônia de Macrófagos
MP	Propriedade Mecânica

ME Módulo de Elasticidade
MEF Módulo de Elasticidade por Flexão
MC Módulo de Cisalhamento
n número de animais por amostra
NT Sem Tratamento
OB Osteoblasto OC - Osteoclasto
OCC Osteocalcina
OMS Organização Mundial de Saúde
OPG Osteoprotegerina
OT Osteócito
OVX Ovariectomia PBM - Fotobiomodulação
PGE2 Prostaglandina E2 PTH – Paratohormônio
RANK Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa- β
RANKL Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa- β
RNA Ácido Ribonucleíco
SERMs Moduladores Seletivos do Receptor de Estrógeno SUS – Sistema Único de Saúde
TGF- β Fator de Crescimento Transformador - Beta TNF- α – Fator de Necrose Tumoral– alfa
TT Tecido de Transição
UNINOVE Universidade Nove de Julho
UVB Radiação Ultravioleta B

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
cm ²	Centímetro quadrado GPa – Giga Pascal
mg	Miligrama ml – Mililitro mm – Milímetro
nm	Nanômetro
s	Segundos
t	Tempo
μl	Microlitro μm – Micrômetro W - Watt
W/cm ²	Watt por centímetro quadrado

SUMÁRIO

1	CONTEXTUALIZAÇÃO	17
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	Morfologia do Tecido Ósseo	19
2.2	Propriedades Mecânicas do Tecido Ósseo	21
2.3	Mecanismo do reparo e remodelamento ósseo.....	23
2.4	Colágeno no reparo tecidual.....	27
2.5	Uso de Biomateriais no Tratamento de Lesões Ósseas.	29
2.6	Uso de Materiais de Carbono em Lesões Ósseas.....	31
2.7	Uso de Nanoprata no Controle de Infecções ósseas.	33
2.8	Características da Terapia por Fotobiomodulação	35
2.9	Uso da Fotobiomodulação no Reparo Ósseo	38
3.0	OBJETIVO	41
3.1	Objetivos Específicos.....	41
4	MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1	Animais e fatores éticos.	42
4.2	Grupos experimentais.....	42
4.3	Método de Anestesia dos animais.	43
4.4	Protocolo Experimental.....	43
4.5	Técnica de indução da lesão óssea	44
4.6	Tratamentos.	45
4.6.1	<i>Tratamento por fotobiomodulação</i>	45
4.6.2	<i>Tratamento com biomaterial de carbono</i>	46
4.7	Eutanásia e coleta de amostras.....	47
4.8	Análises.....	47
4.8.1	<i>Análise das propriedades mecânicas ósseas</i>	47
4.8.2	<i>Análise Histológica – Microscopia de luz (óptica)</i>	50
4.8.3	<i>Análise estatística</i>	50
5	RESULTADOS	51
5.1	Avaliação Histológica – Organização Tecidual	51
5.2	Avaliação da Força Máxima de Ruptura – Fmax.	53
5.3	Avaliação da Deformação Óssea – Dmax.....	53
5.4	Relação entre Fmax e Dmax.	54
5.5	Quantificação do Colágeno Total.....	55
5.6	Imagens Histológicas da tíbia de ratos – Proporção de Colágeno.....	56
6	DISCUSSÃO	58
7	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS	63
	ANEXO	79

1 CONTEXTUALIZAÇÃO

As lesões ósseas provocam modificações estruturais que comprometem a organização tecidual e sua resistência mecânica. O processo de reparo ocorre de forma gradual, com o objetivo de formar um novo tecido. Entretanto, alterações em suas fases de reparo podem impactar a qualidade óssea, resultando em características morfológicas e funcionais distintas do tecido original (OVSIANIKOV *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2022).

Quando não tratadas, essas lesões podem evoluir para quadros infecciosos, como a osteomielite, geralmente originados por fraturas ou por comprometimento de tecidos adjacentes, representando um risco significativo ao paciente (LEW, WALDVOGEL, 2004). O principal patógeno associado à osteomielite é o *Staphylococcus aureus*, um micro-organismo gram-positivo dotado de múltiplos mecanismos de patogenicidade (KREMERS *et al.*, 2015). Essa bactéria é reconhecida pela elevada capacidade de formação de biofilme, o que contribui para sua persistência e resistência a antimicrobianos. Nessas condições, formam-se comunidades microbianas organizadas, envoltas por uma matriz polimérica, aderindo a superfícies bióticas e abióticas, como implantes médicos, próteses articulares e tecidos ósseos após o trauma, dificultando consideravelmente o tratamento da infecção (LEW, WALDVOGEL, 2004).

As lesões ósseas também alteram a morfologia do tecido, promovendo interrupções na função vascular e modificações estruturais. O processo de reparo ocorre em fases distintas. A fase inflamatória é caracterizada pela ativação de células de defesa responsáveis pela remoção de fragmentos celulares. Na sequência, estabelece-se a fase proliferativa, marcada pela formação de tecido de granulação (LIN *et al.*, 2011; MARSELL, EINHORN, 2011; ABDEL-MAGGED *et al.*, 2024). A etapa final, o remodelamento ósseo, tem como objetivo restaurar a morfologia original por meio da formação do calo ósseo secundário. Nessa fase, a matriz irregular é gradualmente convertida em osso maduro, em um processo no qual osteoclastos participam da reabsorção e remodelação da matriz extracelular (HADJIARGYROU *et al.*, 2002).

O colágeno, componente essencial da matriz extracelular, desempenha papel determinante na organização e resistência óssea. A proporção entre colágeno tipo I e tipo III influencia diretamente a qualidade do reparo, sendo o

equilíbrio dessas fibras um fator crítico para o desempenho mecânico do osso (MURATA, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Essas propriedades são fundamentais para sua função de suporte, conferindo resistência, rigidez e tenacidade. Além disso, a remodelação contínua do tecido ósseo garante o equilíbrio entre resistência e flexibilidade, permitindo a sustentação de cargas variadas sem ocorrência de fraturas (ANTIPOV *et al.*, 2022).

Diversas terapias vêm sendo investigadas para favorecer o reparo ósseo ou controlar processos infecciosos. Entre elas, destacam-se os biomateriais, como hidroxiapatita, polímeros biodegradáveis, cerâmicas e biovidros, empregados como substitutos ósseos com resultados positivos no reparo tecidual (BOSSINI *et al.*, 2011). Mais recentemente, materiais de carbono têm sido utilizados como substitutos ósseos em estudos experimentais, apresentando resultados promissores na organização tecidual e resistência mecânica (PUBLIO *et al.*, 2025). Esses materiais estimulam a atividade de osteoblastos e modulam enzimas relacionadas à formação óssea (QIAO *et al.*, 2022; MAHER *et al.*, 2025).

Uma característica relevante dos materiais de carbono é sua elevada porosidade, que favorece tanto a adesão celular quanto a incorporação de moléculas, como fármacos, possibilitando ainda a adsorção de nanopartículas de prata (39 e 44 do Ayres). As nanopartículas de prata exibem reconhecidas propriedades antimicrobianas (46 do Ayres). Embora o efeito antimicrobiano da prata seja bem documentado, seu mecanismo de ação ainda não está totalmente esclarecido. Estudos *in vitro* demonstraram que íons liberados da superfície das partículas de prata ligam-se a estruturas bacterianas, como a parede de peptidoglicano e a membrana celular, promovendo inativação e morte celular (BERNI *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2008; KOGA, KITAOKA, 2010).

No contexto terapêutico, a PBM tem se mostrado uma abordagem promissora para o reparo ósseo. Evidências experimentais e clínicas demonstram que a PBM pode modular mediadores inflamatórios, estimular a atividade osteoblástica, aumentar a produção de colágeno e favorecer a neoformação óssea (BOSSINI *et al.*, 2011; RODRIGUES, 2015; OLIVEIRA, 2017; MAGRI *et al.*, 2019; ROSSI *et al.*, 2024).

Diante disso, considerando que a lesão óssea promove alterações estruturais e morfológicas que representam fator de risco para infecção, e

levando em conta estudos anteriores que evidenciam o potencial dos biomateriais de carbono, da fotobiomodulação e da ação antimicrobiana da prata, este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da fotobiomodulação (808 nm; 6 J; 100 mW), sobre defeitos ósseos preenchidos com biomaterial de carbono impregnado com nanopartículas de prata, avaliando a organização tecidual a partir da proporção de colágeno e sua relação com a resistência mecânica óssea, em modelo experimental de lesão em tibia de ratos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Morfologia do Tecido Ósseo

O tecido ósseo é um tipo especial de tecido conjuntivo que se destaca por sua mineralização, conferindo-lhe uma consistência dura e a capacidade de oferecer suporte e proteção. Sua matriz extracelular, composta por células especializadas, responde a uma variedade de estímulos metabólicos, físicos e endócrinos. Tanto as composições orgânicas quanto inorgânicas da matriz influenciam nas propriedades físicas do osso, como rigidez, elasticidade e flexibilidade. Funcionalmente, os ossos desempenham diversas funções vitais nos vertebrados, incluindo sustentar a movimentação corporal, proteger órgãos importantes, promover a formação de células sanguíneas e manter a homeostase mineral (Figura 1) (GUERREIRO, 2019).

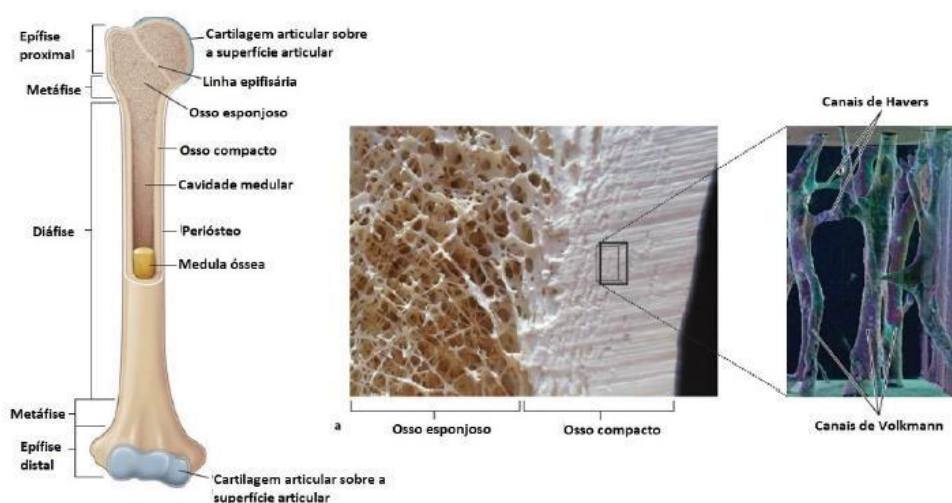


Figura 1: Estrutura tridimensional de um osso. *Fonte: Adaptado de Ross e Pawlina (2016)*

A morfologia do tecido ósseo caracteriza-se por uma estrutura especializada composta por células e matriz extracelular mineralizada. Esse tecido é altamente dinâmico, responsável por fornecer sustentação mecânica, proteção a órgãos vitais e atuar como reservatório de minerais, especialmente cálcio e fósforo. A matriz extracelular óssea divide-se em fase orgânica, composta principalmente por colágeno tipo I, e fase inorgânica, formada por cristais de hidroxiapatita, que conferem dureza ao osso (JUNQUEIRA,

CARNEIRO, 2013; GUERREIRO, 2019).

Do ponto de vista celular, o tecido ósseo possui quatro principais tipos de células: osteoblastos, osteócitos, osteoclastos e células osteoprogenitoras. Os osteoblastos são responsáveis pela síntese da matriz orgânica, enquanto os osteócitos, localizados em lacunas dentro da matriz mineralizada, mantêm a homeostase óssea. Já os osteoclastos são células multinucleadas especializadas na reabsorção óssea, fundamentais para o remodelamento, enquanto as células osteoprogenitoras atuam como precursoras dos osteoblastos (GUERREIRO, 2019; ROSS, PAWILNA, 2020; CRUZ *et al.*, 2022).

A organização estrutural do tecido ósseo pode se apresentar sob duas formas principais: osso compacto e osso esponjoso. O osso compacto é caracterizado por sistemas de *Havers* ou *osteons*, que consistem em lamelas concêntricas ao redor de canais centrais contendo vasos sanguíneos e nervos. Já o osso esponjoso apresenta trabéculas ósseas interconectadas, adaptadas para suportar pressões multidirecionais e geralmente associadas à medula óssea (MESCHER, 2018).

As forças aplicadas no tecido ósseo em vários ângulos produzem padrões de tensão complexos. O osso tem características anisotrópicas e viscoelásticas e mais adaptabilidade a esforços funcionais, tornando difícil estabelecer constantes que caracterizam suas propriedades físicas (EINHORN *et al.*, 1996).

2.2 Propriedades Mecânicas do Tecido Ósseo

As propriedades mecânicas são informações importantes no desenvolvimento de produtos, artigos, construções, pesquisa, inovações e estão em crescimento em áreas de estudos da saúde. Em se tratando no campo de tecido ósseo a importância do estudo de propriedades mecânicas se encontra em saber características próprias do tecido ósseo. É de conhecimento que o corpo humano assim como de qualquer ser vivo possui ossos de diferentes formas, cada qual com diferentes características, alguns mais rígidos outros mais flexíveis, outros com mais poros e outros sem poros algum. Os ossos possuem características mecânicas como resistência e rigidez, respectivamente, capacidade de suportar uma carga sem falhar e suportar uma carga com certa deformação. Essas características variam de acordo com a localização e

geometria (espessura cortical e diâmetro da secção transversal), também deve se levar em consideração a idade do indivíduo e o tipo histológico predominante (lamelar ou reticular) (GAGLIARDI, 2020).

O osso é uma estrutura rígida e forte que compõe o esqueleto dos vertebrados. Os ossos são formados por um tecido conjuntivo especializado, o tecido ósseo, que é composto por proteínas e minerais, como o cálcio. O esqueleto humano adulto é formado por 206 ossos, que podem ser divididos em duas partes funcionais: o esqueleto axial e o esqueleto apendicular. O esqueleto axial é formado pelos ossos da cabeça, vértebras, costelas, osso hioide e osso esterno. O esqueleto apendicular é formado pelos ossos dos membros superiores e inferiores. Os ossos têm diversas funções, entre as quais: dar forma ao corpo; proteger órgãos internos, como o cérebro, que é protegido pelo crânio; abrigar a medula óssea, onde são produzidas as células sanguíneas; manter o reservatório de cálcio do corpo; permitir a locomoção; permitir a respiração (VILLA-FORTE, 2022).

Como já mencionado, o tecido ósseo possui as seguintes células: osteócitos, células que se situam em cavidades ou lacunas no interior da matriz; osteoblastos, que sintetizam a parte orgânica da matriz e localizam-se na periferia; e osteoclastos. Além das células, o tecido ósseo também possui uma matriz óssea que é dividida em orgânica e inorgânica. A parte orgânica contém 95% de fibras colágenas e aproximadamente 5% de substância fundamental amorfa contendo agregados de proteoglicanas e glicoproteínas, determinando a resistência do tecido e fatores sinalizadores solúveis (fatores de crescimento). A parte inorgânica é responsável pela dureza do osso, sendo composta principalmente por fosfato de cálcio (58% do peso do osso), carbonato de cálcio (7% do peso), fluoreto de cálcio e fosfato de magnésio (1 a 2%) e cloreto de sódio (menos de 1% do peso) (ROSS, 1989; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2008; BITTNER-FRANK *et al.*, 2024), sendo responsável pelas propriedades de rigidez e resistência à compressão (FIELD, 2000).

Quanto às propriedades mecânicas do tecido ósseo, estão diretamente relacionadas à sua composição e organização estrutural. O osso apresenta uma matriz extracelular formada por fase orgânica, composta principalmente por fibras de colágeno tipo I, responsável pela resistência à tração, e por fase inorgânica, constituída predominantemente por cristais de hidroxiapatita, que

conferem rigidez e resistência à compressão. Essa combinação única de componentes orgânicos e minerais garante ao osso a capacidade de suportar diferentes tipos de cargas e pressões fisiológicas (CURREY, 2002; MA *et al.*, 2022).

Outro aspecto importante é a capacidade de remodelamento do osso, que permite ajustar continuamente suas propriedades mecânicas em resposta a estímulos externos, como o exercício físico ou a sobrecarga. Esse processo, mediado pela ação coordenada de osteoblastos e osteoclastos, garante a manutenção da integridade estrutural e previne fraturas. Assim, o tecido ósseo não é apenas um material rígido, mas um tecido dinâmico que combina resistência, elasticidade e capacidade adaptativa (COWIN, 2001).

2.3 Mecanismo do reparo e remodelamento ósseo

O reparo ósseo inicia-se após uma lesão ou fratura e envolve três fases principais: inflamatória, reparativa e de remodelamento. Na fase inflamatória, ocorre formação do hematoma, recrutamento de células inflamatórias e liberação de citocinas e fatores de crescimento, preparando o local para a regeneração. Em seguida, na fase reparativa, há a formação de um calo cartilaginoso ou matriz osteoide que posteriormente mineraliza, com atuação de osteoblastos e condroblastos, além da neoangiogênese. Por fim, na fase de remodelamento, osteoclastos reabsorvem o osso imaturo, enquanto osteoblastos depositam novo osso, refinando a estrutura e restabelecendo a resistência mecânica (EINHORN, GERSTENFELD, 2015; BOLAMPERTI *et al.*, 2022). Um tecido pode se diferenciar e quando isso ocorre sob a influência de outro, é então denominado de autoindução. A osteoindução tem sido usada para descrever o processo de diferenciação das células osteoprogenitoras em condrócitos e OB, dando assim a regeneração óssea. Estudos recentes sugerem que o reparo ósseo é diretamente dependente de uma resposta celular local ao estímulo dos Fatores de Crescimento e Diferenciação Ósseo–FCDO, são polipeptídeos de baixo peso molecular, produzidos fisiologicamente por osteoblastos em pequenas concentrações e armazenados na matriz óssea em forma de pró-peptídeos ou simplificando FDCO.

Células osteoprogenitoras em contato com substâncias osteoindutoras

promovem a proliferação e diferenciação celular que pode ser ortotrópica ou heterotópica formando respectivamente um tecido ósseo ou cartilaginoso. As células osteoprogenitoras diferenciadas em osteoblastos são fundamentais para a regeneração óssea, no entanto não se sabe a origem destas células, a teoria mais aceita é de que os OB se originem de células primitivas mesenquimais indiferenciadas. O esqueleto é derivado do mesênquima, devido a muitos estudos acredita-se que o reparo ósseo recapitule parcialmente ou totalmente o processo de formação do osso fetal (VINCENZO *et al.*, 2000). Quando o reparo ósseo é realizado, forma-se um calo ósseo primário com uma matriz óssea muito irregular, no entanto essa irregularidade pode ser benéfica em questão de resistência ao osso.

A última etapa é o remodelamento ósseo, quando o osso volta ao seu formato original. Isso acontece com o suprimento sanguíneo adequado e gradual estabilidade mecânica, que segundo a Lei de Wolf, depende do estímulo mecânico (carga axial) proporcionado pelo próprio peso corporal do indivíduo, também com atividade de andar, fazer atividades físicas, ocasionando uma mudança dinâmica da estrutura óssea, assim onde tem mais tensão ocorre formação óssea e onde diminui a tensão tem-se reabsorção (VINCENZO *et al.*, 2000). As células responsáveis pelo reparo ósseo são os OC, OB (MORRISON *et al.*, 2006).

Os ossos são materiais viscoelásticos, ou seja, eles se distendem, porém voltam ao seu formato. No entanto não podem ultrapassar certo limite de carga, pois acabam fraturando. O osso é um material de estrutura e sendo assim tem suas características estruturais, portanto ele também vai ter deformação elástica e deformação plástica, também vai ter sua ruptura quando aplicado uma carga superior ao que pode suportar (DINIZ *et al.*, 2014).

Como visto anteriormente, quando nos ocorre um acidente e temos lesões como fraturas, esmagamento e outros tipos de acometimentos, o tecido ósseo vai se recuperar através de etapas e uma delas é o remodelamento ósseo. Este processo de reparo ósseo envolve uma série de mecanismos e hormônios para que ocorra. Um dos hormônios envolvido na remodelação óssea e no controle do nível de cálcio plasmático é a Calcitonina – CALC, ele é secretado na Glândula Tireoide e sua secreção é controlada pelo nível de cálcio no sangue. Caso falte cálcio no sangue a atividade dos OC diminui, sem reduzir a morte

delas, o número de apoptose permanece resultando no fim uma deficiência destas células no organismo (KUO *et al.*, 2012). Por suas propriedades anti-osteoclásticas a CALC é utilizada no tratamento de doenças caracterizadas por excessiva remodelação óssea como a osteoporose, favorecendo a formação óssea (ARISAWA *et al.*, 2010). O PTH é secretado nas Glândulas Paratireoides a sua ação é oposta à da CALC, quando no sangue tem pouco cálcio sua secreção é aumentada. Age ativando os OC e por consequência ocorre a reabsorção óssea, liberando Cálcio no sangue (ROBBINS, COTRAN, 1994).

O remodelamento ósseo ocorre na nossa vida de forma contínua, garantindo a renovação do tecido ósseo, acontece também na fase final do reparo ósseo após uma lesão, que pode ser uma fratura ou uma cirurgia, permitindo que este osso fique o mais próximo possível de sua forma inicial e recuperando sua resistência mecânica. As células envolvidas no processo de remodelamento são os OB que se originam a partir de células osteoprogenitoras presentes no perióstio e endóstio e quando são solicitadas se diferenciam em condroblastos e OB (VIEIRA, 1999). Durante a fase de remodelamento, ocorre uma etapa de reversão em que o microambiente é preparado para a deposição de matriz pelos osteoblastos. Essa nova matriz passa por mineralização, e parte dos osteoblastos sofre apoptose ou se transforma em células de revestimento. O equilíbrio entre reabsorção e formação define o ganho, manutenção ou perda de massa óssea. Alterações nesse processo, como excesso de reabsorção ou falhas na formação, estão associadas a doenças como osteoporose e outras patologias do tecido ósseo (ATRIA *et al.*, 2023; SIMS *et al.*, 2024; Yu *et al.*, 2025).

Esse processo não se limita ao reparo de fraturas. O remodelamento também atua no microdano contínuo do esqueleto, garantindo a homeostase mineral e a adaptação às cargas mecânicas do dia a dia. As unidades multicelulares básicas (BMUs) coordenam a reabsorção seguida pela formação óssea de forma organizada no tempo e no espaço, assegurando a manutenção da função estrutural do osso (WANG *et al.*, 2022; ROWE, 2023). Os osteócitos exercem papel central nesse processo, funcionando como sensores mecânicos capazes de detectar sobrecargas e microdanos. Através da liberação de sinais como RANKL e esclerostina, modulam a atividade de osteoclastos e osteoblastos, regulando a intensidade e a duração do remodelamento ósseo

(ATRIA *et al.*, 2023; SIMS *et al.*, 2024). Além do controle local, fatores sistêmicos desempenham funções determinantes na remodelação.

O equilíbrio desse ciclo determina se haverá ganho, manutenção ou perda de massa óssea. Alterações nesse mecanismo, como o excesso de reabsorção ou falhas na formação, resultam em patologias como a osteoporose. Dessa forma, o reparo e o remodelamento ósseo são processos indispensáveis não apenas para a recuperação estrutural após lesões, mas também para a manutenção da saúde esquelética ao longo da vida (ATRIA *et al.*, 2023; YU *et al.*, 2025).

2.4 Colágeno no reparo tecidual

O colágeno é uma proteína estrutural fundamental da matriz extracelular, desempenhando papel chave no reparo de tecidos ao prover um “andaime” para migração celular, proliferação e deposição de matriz durante a cicatrização. Nos tecidos moles, tipos como I e III são predominantes, e o equilíbrio entre deposição e degradação colagenosa influencia diretamente a qualidade do reparo e da cicatriz (WANG *et al.*, 2024). Além disso, a orientação, densidade e *cross-linking* (ligações cruzadas enzimáticas ou não enzimáticas) do colágeno determinam propriedades mecânicas como resistência à tração e resiliência dos tecidos já reparados. O colágeno é a proteína mais abundante no corpo humano e também é o principal componente da matriz extracelular dos tecidos (LIMA *et al.*, 2022). Já foram identificados diversos tipos de colágeno, sendo que todos apresentam uma estrutura terciária tripla-helicoidal, e na maioria dos tecidos conjuntivos, se constituem parte integrante da rede de fibrilas organizadas espacialmente no interior da matriz extracelular (MEC), que resulta em uma estrutura tridimensional altamente especializada (CHATTOPADHYAY, RAINES, 2014).

O colágeno é um biopolímero natural, presente em diversos tecidos conjuntivos, como por exemplo, em peles, ossos, tendões e cartilagem de diversos animais, e corresponde a cerca de 30% do total de proteínas presentes nesses tecidos, sua principal função é promover força e resistência mecânica ao tecido conjuntivo (ARAÚJO, 2022). Além disto, possui um papel fundamental na regulação do reparo tecidual e na adesão celular, apresenta características

como biodegradabilidade, biocompatibilidade, elasticidade, além de possuir alto valor comercial (CHENG *et al.*, 2009). É formado por cadeias polipeptídicas dos aminoácidos glicina, prolina, lisina, hidroxilisina, hidroxiprolina e alanina, organizadas paralelamente em alfa-hélice, estabilizadas por pontes de hidrogênio e por ligações intermoleculares. A proteína apresenta em média 280nm de comprimento e massa molecular de 300.000 Daltons (WANG, 2021).

No contexto ósseo, o colágeno tipo I constitui cerca de 90% da fração orgânica da matriz óssea, sendo essencial para a mineralização e para a formação de osso lamelar durante o reparo de fraturas. Estudos recentes demonstram que, nas fases iniciais de reparo de fraturas, há predomínio do colágeno tipo II na formação do calo cartilaginoso, que depois é substituído por colágeno tipo I conforme o processo progrida. Essa transição é crítica para garantir que o osso recém-formado adquira propriedades mecânicas comparáveis ao osso original, em termos de rigidez, dureza e resistência (NAIR *et al.*, 2022). Além disso, modificações estruturais do colágeno ósseo, como ligações cruzadas avançadas de produtos da glicação (AGEs) ou danos mecânicos ao colágeno fibrilar, têm sido associadas ao comprometimento da resistência óssea pós-yield, ou seja, da capacidade de suportar deformações sem fraturar. A integridade molecular do colágeno também está relacionada à capacidade de dissipação de energia durante a fratura e à tenacidade do osso. Estudos mostram que quando há dano colagenoso elevado, há diminuição significativa da resistência à propagação de trincas e da energia absorvida antes da falha, mesmo que a densidade mineral óssea esteja relativamente preservada (SIEVERTS *et al.*, 2022).

2.5 Uso de Biomateriais no Tratamento de Lesões Ósseas

Os biomateriais têm sido amplamente explorados na regeneração óssea como substitutos de enxertos ou como suportes (*scaffolds*) osteocondutivos, osteoindutivos ou osteopromotores, oferecendo estrutura e estímulos favoráveis para a migração, proliferação e diferenciação celular no sítio de defeito ósseo. Lee *et al.* (2022) destacam que os *scaffolds* ideais combinam porosidade adequada, biocompatibilidade, resistência mecânica e degradação controlada, permitindo a integração gradual com o osso nativo. Além disso, Zhang e cols.

(2020) ressaltam que estratégias modernas têm incorporado fatores de crescimento, drogas ou células nos biomateriais para aumentar a eficácia da regeneração óssea.

Biomateriais são compostos bioativos definidos como materiais sintéticos, inorgânicos ou uma combinação destes, capazes de produzir resposta biológica específica, ligação e interação entre o composto e o tecido, promovendo efeitos benéficos para o meio sem que haja toxicidade ou resposta imunológica. De maneira geral, os substitutos ósseos possuem algumas características como a presença de estruturas tridimensionais osteoindutoras altamente porosa, para garantir a circulação de nutrientes e fatores de crescimento, além de propriedades de superfície que favoreçam a migração, proliferação e diferenciação de diferentes tipos celulares de interesse local (PIRES *et al.*, 2015; SPEZZIA, 2020). Precisam ser biocompatíveis, apresentar biodegradação controlada e conter células ou moléculas biologicamente ativas indutoras de osteogênese e com características osteocondutoras, ter propriedades mecânicas condizentes com a região de implante e promover vascularização, cada uma dessas características objetivando o reparo e/ou regeneração tecidual (MOURA *et al.*, 2007; HENKEL *et al.*, 2013).

Diversas linhas de pesquisa em reparo ósseo têm sido desenvolvidas e os benefícios atribuídos percorrem desde a melhora no processo de consolidação (MIRANDA *et al.*, 2005), o aumento da angiogênese e estímulo da neoformação óssea (OLIVEIRA *et al.*, 2012) até a produção de matriz óssea e melhora da diferenciação celular (FLAUSSE *et al.*, 2013). Nos últimos anos, grandes avanços foram obtidos através da Engenharia de Tecidos no desenvolvimento de materiais bioativos combinados com células, com presença de arcabouços e fatores bioativos, formando biomateriais de diversas composições para uso em enxertia óssea como vidros, vitrocerâmicas, polímeros de diversas composições e nacre (madre-pérola) (RESWAN *et al.*, 2006; FLAUSSE *et al.*, 2013; HENKEL *et al.*, 2013).

Alguns substitutos ósseos podem ser de origem autógena, alógena, xenógena e aloplásticos. Podem também ser classificados como compósitos como o biovidro-poli-hidroxibutirato, polímeros como poliuretano de mamona, Ácido poli-L-lático – PLLA, Ácido poli-lático-co-glicólico – PLGA, cerâmicas como hidroxiapatita, tricálcio, materiais a base de cálcio e fosfato e metais ou ligas

metálicas como o titânio, todos com o mesmo propósito de serem usados para enxertia (MIGUEL, 2009).

Nos casos de grandes defeitos ósseos ou fraturas complexas, biomateriais “inteligentes” (*smart biomaterials*) que respondem a estímulos externos (como pH, temperatura, campos magnéticos ou luz) têm ganhado atenção. Wei *et al.*, (2022) descrevem como esses materiais podem liberar cargas terapêuticas de forma controlada ou modular seu comportamento conforme o microambiente da lesão, promovendo a cura óssea de modo mais eficiente. Song *et al.* (2024) aprofundam esse conceito ao discutir biomateriais programáveis que adaptam sua funcionalidade durante o reparo ósseo para otimizar suportes estruturais e regenerativos. Além disso, determinados elementos bioativos, como íons de zinco, têm sido incorporados em biomateriais para melhorar a osteogênese e a angiogênese e inibir a reabsorção óssea excessiva. Wen e cols. (2023) demonstraram que biomateriais à base de zinco promovem a proliferação de células ósseas, a atividade osteogênica e o crescimento vascular em modelos experimentais, sugerindo potencial clínico para tais formulações em terapias ósseas. Essa abordagem multifuncional pode acelerar o reparo e melhorar a qualidade do osso formado, especialmente em ambientes desafiadores de lesão ou deficiência de regeneração.

Até o momento não se tem conhecimento de trabalhos abordando o uso de materiais de carbonos para o uso na área de biomateriais. A partir de determinadas características desse material, sugerimos o uso destes materiais como biossubstituto ósseo a partir de modelo experimental de lesão em tibia de ratos.

2.6 Uso de Materiais de Carbono em Lesões Ósseas

O carbono ativado é um sólido de carbono poroso contendo sítios acessíveis para a ocorrência do fenômeno de adsorção ou ainda reações químicas. O termo ativado se refere a materiais de carbono produzidos por pirólise em temperaturas superiores de 500 a 800 °C e sua ativação entre 800 a 900 °C (DI BERNARDO, DANTAS, 2005; LEE *et al.*, 2017). Outros autores

mencionam temperaturas acima de 1000 °C (MARSH *et al.*, 1997).

O carbono ativado cujo principal componente é o carvão (60 a 95% de carbono), possui milhares de unidades superficiais específicas, ou seja, uma grande área superficial. Tem uma excelente capacidade adsorvente é muito poroso, tem uma excelente estabilidade química é inércia química (SEREDYCH *et al.*, 2003), podem ser obtidos por materiais lignocelulósicos, ossos, madeira, endocarpo de coco, nozes, sementes e sintéticos. Possui uma superfície específica alta e é muito poroso que proporciona uma área superficial interna que pode ser de 80 m²/g a 1200 m²/g (ROUQUEROL *et al.*, 1999; ROCHA, 2006).

No âmbito das aplicações médicas, o Carbono Ativado apresenta características interessantes e a principal está relacionada com a alta porosidade do material. A grande quantidade de poros pode como, por exemplo, ser utilizado, na adsorção de poluentes, na liberação de fármacos (RIBEIRO *et al.*, 2015), servindo como um catalizador físico para a proliferação celular.

Materiais de carbono, especialmente na forma de nanomateriais (como nanotubos de carbono, grafeno, óxido de grafeno e pontos de carbono), têm atraído atenção crescente na engenharia óssea por suas propriedades elétricas, mecânicas e de compatibilidade com células ósseas. Esses materiais podem ser incorporados em *scaffolds* como reforço estrutural e estimulador funcional, favorecendo a adesão celular, a difusão de nutrientes e a condução de sinais elétricos que potencializam a osteogênese. Em particular, a condutividade elétrica dos materiais de carbono pode ser explorada para aplicação de estímulos elétricos exógenos, promovendo a maturação da matriz óssea e acelerando a regeneração (ARAMBULA-MALDONADO, MEQUANINT, 2022).

O grafeno e seus derivados têm sido amplamente estudados como plataformas promissoras para regeneração óssea, por sua capacidade de induzir diferenciação osteogênica, além de servirem como reforço mecânico em compósitos. Por exemplo, *scaffolds* contendo grafeno exibem aumento da expressão de marcadores osteogênicos em osteoblastos e melhor integração in vivo em defeitos ósseos (GOVINDARAJAN *et al.*, 2023). Também, a utilização de materiais de carbono bidimensionais e unidimensionais permite mimetizar propriedades elétricas e estruturais do osso nativo, promovendo uma sinergia entre suporte mecânico e bioatividade (EIVAZZADEH-KEIHAN *et al.*, 2019).

Mais recentemente, os *carbon dots* (CDs) — nanomateriais de carbono

com diâmetro pequeno, e alta funcionalidade — têm sido introduzidos em estratégias de regeneração óssea. Eles permitem liberação controlada de fármacos, modulação genética e aprimoramento da diferenciação osteogênica, com baixa citotoxicidade e excelente biocompatibilidade (LIU *et al.*, 2025). Em estudo recente, scaffolds tridimensionais impressos contendo carbono puro demonstraram indução osteoindutiva eficiente, reforçando o potencial para tradução clínica dos materiais de carbono em terapias de reparo ósseo (PEI *et al.*, 2025).

2.7 Uso de Nanoprata no Controle de Infecções ósseas

O campo da nanomedicina desenvolveu várias classes de nanomateriais promissores, incluindo polímeros, partículas metálicas, nanocarbonos e outras plataformas importantes para aplicações que incluem administração de medicamentos e geração de imagens, entre outras. Embora várias nanopartículas tenham sido avaliadas por meio de estudos em humanos, ainda há a necessidade de acelerar novas estratégias habilitadas pela nanotecnologia que podem aumentar a eficácia e a segurança da terapia na clínica (LEE *et al.*, 2017).

Devido às suas características, as nanopartículas metálicas têm atraído significativa atenção da comunidade acadêmica, e suas possíveis aplicações incluem sensores ópticos, agentes bactericidas e fungicidas. A eficácia antimicrobiana da prata é conhecida desde tempos antigos (LANFAZANE, 2011). Embora o surgimento dos antibióticos tenha levado a uma diminuição no uso da prata, o aumento contínuo da resistência bacteriana e o aparecimento de novas cepas resistentes aos antibióticos mais potentes têm reacendido o interesse científico pela prata como um agente contra microrganismos.

O efeito antimicrobiano da prata é bastante conhecido, entretanto, o mecanismo de ação é apenas parcialmente compreendido. Segundo Liu *et al.* (2009) a interação de íons de prata com grupos tiol em proteínas resulta na inativação de enzimas respiratórias e na produção de espécies reativas de oxigênio.

Será demonstrado que o íon Ag^+ impede a replicação do DNA, afeta a estrutura e permeabilidade da membrana celular e causa danos à respiração

celular (LIU *et al.*, 2009; LANFAZANE, 2011; FERNANDES *et al.*, 2017*et al.*). As partículas nanométricas de prata exibem excelentes propriedades antimicrobianas devido à morfologia com faces altamente ativas, destacando-se o fato de a reatividade ser favorecida por facetas de alta densidade atômica (SALEH *et al.*, 2007).

Diversas pesquisas estão empregando nanopartículas de prata em materiais porosos para regular sua liberação. No entanto, esses estudos ainda são iniciais, e é necessário realizar mais investigações para compreender como a prata atua no controle de infecções bacterianas em lesões ósseas.

A nanop prata tem sido amplamente estudada por sua ação antibacteriana de largo espectro contra patógenos comumente envolvidos em infecções ósseas e de implantes, como *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Seu efeito se deve principalmente à liberação de íons Ag^+ , que interagem com proteínas, membranas e DNA bacterianos, provocando estresse oxidativo, destruição celular e inibição da formação de biofilme — um dos principais desafios terapêuticos em osteomielite crônica (DAKAL *et al.*, 2016; JEYARAMAN *et al.*, 2023). Além disso, o uso de AgNPs incorporadas a cimento ósseo, cerâmicas ou revestimentos metálicos confere proteção antimicrobiana local, prevenindo a adesão bacteriana em superfícies de implantes (JEYARAMAN *et al.*, 2023).

As estratégias de liberação controlada têm avançado significativamente, com incorporação de nanopartículas de prata em cimentos PMMA e biocerâmicas de fosfato de cálcio. Esses compósitos exibem forte atividade *in vitro* contra MRSA e MRSE, mantendo propriedades mecânicas adequadas e boa citocompatibilidade (CHOI *et al.*, 2023; PROKOPOVICH *et al.*, 2015).

Os estudos experimentais *in vivo* têm confirmado o potencial terapêutico da nanop prata. Em modelos de osteomielite em ratos, o uso de cimento contendo AgNPs reduziu inflamação e carga bacteriana, preservando a arquitetura óssea (CHOI *et al.*, 2023). Contudo, outros trabalhos mostraram que a eficácia depende de fatores como tamanho das partículas, concentração e velocidade de liberação iônica, e que doses elevadas podem gerar citotoxicidade (KEMAH *et al.*, 2018; JEYARAMAN *et al.*, 2023). Assim, a padronização dos métodos e a avaliação de segurança, em longo prazo, continuam sendo prioridades para aplicação clínica segura (HAUGEN *et al.*, 2022; JEYARAMAN *et al.*, 2023).

Em termos de perspectivas futuras, estudos têm explorado a combinação de prata com íons osteogênicos, como o estrôncio, para desenvolver revestimentos multifuncionais que unam propriedades antibacterianas e estímulo à regeneração óssea (KHEIRMAND-PARIZI *et al.*, 2024). Essa abordagem híbrida representa uma estratégia promissora para prevenir infecções e promover osteointegração em implantes ortopédicos, especialmente em pacientes com risco elevado de infecção pós-operatória (KUNG *et al.*, 2020; JEYARAMAN *et al.*, 2023).

2.8 Características da Terapia por Fotobiomodulação

A Terapia por Fotobiomodulação (PBM) é uma técnica que auxilia no tratamento de doenças inflamatórias, além de ser utilizado na cicatrização do organismo. Em reparo ósseo ocorre o efeito hemostático, aumentando a síntese proteica, por proliferação de fibrinas na formação do coágulo e como modulador da fase inflamatória, contribuindo com a formação de um tecido neoformado mais organizado (GENOVESE, 2007; PINHEIRO *et al.*, 2010).

Ainda são poucos os trabalhos demonstrando sua influência no tratamento associado com biomateriais em reparo ósseo, principalmente na influência nas propriedades biomecânicas do tecido ósseo que recebe tratamentos isolados ou associados.

A PBM é conhecida por acelerar o processo de cicatrização, estimular células, reduzir inflamações, auxiliar no reparo e regeneração modular sistemas imunológicos, reduzir a dor, promover microcirculação vascular e linfática. No entanto é muito importante salientar que os fótons não podem causar efeitos térmicos ao alvo biológico (LIU *et al.*, 2009; LANFAZANE, 2011). Fóton é o termo relacionado a um *quantum* de radiação eletromagnética, um pacote de radiação pequeno.

A PBM é composta por três conceitos importantíssimos, a fotobiologia; onde incluem os fenômenos biológicos que envolvem a radiação não ionizante. Respostas fotobiológicas correspondem a mudanças químicas ou físicas induzidas pela ação dos fótons. A radiação não ionizante produz estados excitados em moléculas por causa da absorção de fótons, as moléculas podem reagir com moléculas adjacentes, no entanto é comum e mais frequente sofrer

mudanças fotoquímicas e fotofísicas dentro de si mesma, ou seja, na sua própria estrutura molecular. A fotobiologia pode ser dividida em diversas áreas, mas apenas duas são primordiais para o entendimento da PBM (FERNANDES *et al.*, 2017).

Importante verificar que compõe a PBM a presença de três leis da fotoquímica, sendo que a Primeira lei afirma que a luz deve ser absorvida antes que ocorra a fotoquímica. O que essa lei diz exatamente é que para a luz ser absorvida deve-se saber quais os comprimentos de onda que a molécula pode absorver. Se os fótons de um comprimento de onda determinado não são absorvidos, não haverá então efeito fotobiológico. A Segunda lei da Fotoquímica estabelece que para cada fóton absorvido por um sistema químico apenas uma molécula é ativada pela reação fotoquímica (PLOTNIKOW, 1926). No entanto, têm exceções, lasers de maior potência podem ocorrer reações de dois fótons.

A PBM usa radiação não ionizante tanto na faixa do visível do espectro eletromagnético (400 a 760 nm) quanto no infravermelho (760 a 1000 nm). Quando o fóton é absorvido por uma molécula, os elétrons da molécula são elevados a um grau de maior energia. Essa molécula precisa perder essa energia extra e faz isso reemitindo um fóton de comprimento de onda mais longo na forma de fluorescência ou fosforescência ou ainda pode perder energia liberando calor ou por meio da fotoquímica (FERNANDES *et al.*, 2017).

A terapia com Laser de baixa intensidade, atualmente recebe o termo PBM e seu efeito tanto pode bioestimular como bioinibir, dependendo da condição do tecido alvo e dos parâmetros dosimétricos:

- Comprimento de onda (nm), que podem ser na faixa do visível do espectro eletromagnético (400 a 760 nm) quanto no infravermelho (760 a 1000 nm);

- Tempo de exposição (s) é o período em segundos que os fótons que incidirão na superfície do alvo biológico;

- Potência Média (mW) determina quantos fótons foram emitidos pelo equipamento, não pode haver engano ao seu valor. No caso de ser um equipamento de operação pulsada, os fótons são entregues de maneira pulsada e a potência varia de um valor máximo e zero, de forma que foi a potência média dos fótons que foi significativa para os cálculos dosimétricos. Quando o equipamento é de modo contínuo a potência dos fótons permanece constante

por todo período e é igual ao valor da potência média;

- Densidade de Potência ou Irradiância (W/cm^2) é a potência média incidente na superfície do alvo biológico, no entanto densidade de potência é um termo adequado quando nos referimos a potência média por unidade de área que sai do equipamento. Então quando a potência média (quantidade de fótons) incide no alvo biológico denominamos de Irradiância. Quando a potência média (quantidade de fótons) por unidade de área sai do equipamento denominamos de Densidade de potência;

- Energia (J) é a medida de quanto tempo o alvo biológico sustenta a dissipação da potência média, ou quanto trabalho os fótons são capazes de realizar;

- Exposição Radiante ou Fluência (J/cm^2) é a energia incidente na superfície do alvo biológico que também é densidade de energia, no entanto o termo correto a ser usado é exposição radiante (FERNANDES *et al.*, 2017).

Seu uso está presente em diversas áreas da medicina, odontologia e fisioterapia por provocar um efeito de estímulo biológico, sem causar nenhum dano nas funções celulares (GENOVESE, 2007).

As principais características do feixe de luz Laser é ser: coerente, (coerência espacial e temporal); monocromático; colimados; sem efeito térmico, não ultrapassar 2°C ; não pode ser ionizante (FERNANDES *et al.*, 2017). A luz Laser se encontra na região do espectro visível com comprimento de onda de 400 nm a 700 nm (Violeta ao Vermelho, respectivamente) e no espectro invisível com comprimento de onda de 700nm a 1000nm (Infravermelho próximo). A profundidade de penetração, ou alcance é promovida pelo tamanho do comprimento de onda. Quanto menor o comprimento de onda, menor é sua penetração em profundidade, no entanto tem mais absorção e menor espalhamento (KARU, LUBART, 2000).

A PBM usa a janela terapêutica (400 a 1000 nm) do espectro eletromagnético. Com o seu uso ocorre aumento na síntese de Trifosfato de Adenosina - ATP pelas mitocôndrias. Aumentando a diferenciação celular e a síntese de proteínas (KARU, LUBART, 2000).

2.9 Uso da Fotobiomodulação no Reparo Ósseo

A PBM também conhecida como terapia a laser de baixa intensidade (LLLT), tem sido amplamente estudada como uma estratégia não invasiva para estimular o reparo e regeneração óssea. A luz emitida por lasers e LEDs, em comprimentos de onda geralmente entre 630 e 940 nm, é absorvida por fotorreceptores intracelulares, especialmente pela enzima citocromo c oxidase, presente na mitocôndria, promovendo aumento da síntese de ATP, modulação de espécies reativas de oxigênio e ativação de vias de sinalização relacionadas à proliferação celular e diferenciação osteoblástica (HAMBLIN, 2018; RENNO *et al.*, 2017). Esses efeitos bioquímicos convertem energia luminosa em estímulo metabólico, acelerando o reparo ósseo em diferentes modelos experimentais e clínicos.

Estudos recentes mostram que a fotobiomodulação favorece a atividade osteogênica e angiogênica, fundamentais para a regeneração tecidual. Em modelos animais, o uso de lasers com comprimento de onda de 808 nm demonstrou aumento significativo da expressão de osteocalcina, colágeno tipo I e fosfatase alcalina, biomarcadores associados à formação óssea (CARVALHO *et al.*, 2020; DÖRTBUDAK *et al.*, 2022). Além disso, a FBM estimula a angiogênese local, melhorando o suprimento sanguíneo e o aporte de nutrientes, o que acelera a consolidação óssea após fraturas ou cirurgias. Esses efeitos têm sido observados tanto em reparos espontâneos quanto em associação com enxertos e biomateriais osteocondutores (SILVA *et al.*, 2023).

O Laser Infravermelho com comprimento de onda de 808 nm foi usado neste trabalho por penetrar em maior profundidade na pele para atingir o osso, aumentando a proliferação e diferenciação dos OB, favorecendo a cicatrização óssea no processo do reparo ósseo em decorrência de que muitos trabalhos realizados mostram uma melhor resposta para o reparo ósseo (Carvalho *et al.*, 2020; Renno *et al.*, 2017; Dörtbudak *et al.*, 2022).

Muitos trabalhos são realizados usando a PBM para estudo de tratamentos de forma isolada ou associada.

A PBM exerce seus efeitos benéficos no tecido através de diversos mecanismos, ao aplicar a luz sobre o tecido afetado, ela é absorvida pelas células e mitocôndrias, desencadeando uma série de reações bioquímicas e celulares. Essas incluem o aumento da produção de ATP, que é a fonte primária de energia celular, a modulação da atividade celular para promover a

regeneração tecidual, a redução da inflamação por meio da regulação dos mediadores pró e anti-inflamatórios, e a promoção da cicatrização de feridas ao estimular a migração e a proliferação celular. Esses efeitos combinados resultam em uma terapia não invasiva e segura que oferece benefícios terapêuticos significativos, incluindo alívio da dor, redução da inflamação e aceleração da cicatrização de feridas (EDUARDO, CARLOS DE PAULA, 2010).

Em fratura ósseas, o laser mais indicado é o de baixa potência com a aplicação de uma luz vermelha, com comprimento de onda na faixa de 600 a 700 nm, ou infravermelha, de 780 a 1100 nm, com o objetivo de otimizar a reparação tecidual, além de diminuir a intensidade do processo inflamatório e promover analgesia (GARCIA, THEODORO, 2020). Diante dos notáveis efeitos da FBM, vários estudos *in vitro*, *in vivo* e clínicos vem sendo realizados.

Em um estudo realizado por Silva (2009) foi avaliado o efeito da radiação diodo de As-Ga-Al em osteoblastos derivados do osso obtido da sutura palatina de ratos *Wistar* submetidos à disfunção palatina e posterior radiação com laser e um grupo controle sem radiação, os resultados obtidos foi que o grupo com a radiação do laser teve uma atividade proliferativa acelerada em relação ao grupo controle. Alguns estudos *in vivo* sugerem o grande potencial osteogênico, de forma que animais tratados com FBM apresentaram maior neoformação óssea e consequentemente melhor reparo ósseo em fraturas (MOSTAFAVINIA *et al.*, 2015; SELLA *et al.*, 2015).

A aplicação clínica da fotobiomodulação no campo odontológico e ortopédico tem crescido substancialmente, com evidências de redução da inflamação pós-operatória, aceleração da osteointegração de implantes e melhora da qualidade do osso neoformado. Apesar de sua eficácia comprovada em vários protocolos experimentais, a padronização de parâmetros como densidade de energia, tempo de exposição e comprimento de onda ainda é um desafio (HAMBLIN, 2018; SILVA *et al.*, 2023). Estudos controlados e ensaios clínicos multicêntricos continuam sendo necessários para validar e consolidar protocolos de uso seguro e eficaz da fotobiomodulação em humanos.

Entretanto, na literatura, não há um consenso estabelecido sobre os parâmetros ideais para a terapia de PBM. Existe uma considerável variabilidade em relação ao comprimento de onda, energia, frequência e número de aplicações observadas em diferentes estudos. Essa diversidade de abordagens

reflete a complexidade do campo da fototerapia e a necessidade contínua de pesquisas para determinar os protocolos mais eficazes e seguros. Entretanto, já é estabelecido que a faixa de 760 – 850 nm de comprimento de onda apresenta melhor penetração e resposta tecidual, de forma que a sua utilização tenha melhor efeito nos tecidos (BAYAT *et al.*, 2018).

3 OBJETIVO

Avaliar o efeito do uso de material de carbono impregnado com nanopartículas de prata (ACNS), associada à terapia por fotobiomodulação na organização óssea, proporção de colágeno e o reflexo nas propriedades mecânicas ósseas, em modelo experimental de lesão em tíbia de ratos.

3.1 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da associação das terapias PBM e ACNS sobre a resistência óssea, a partir de ensaio mecânico cíclico de flexão, determinando a Força máxima no momento da ruptura óssea (Fmax) e a Capacidade máxima de deformação (Dmax);
- Avaliar o efeito da associação das terapias PBM e ACNS na organização tecidual, a partir de lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina ou na proporção de colágeno, a partir de lâminas coradas com *Picrosirius*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e fatores éticos

Todos os procedimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia Translacional ou no Biotério da Universidade Nove de Julho – UNINOVE. Todos os procedimentos para a utilização dos animais de laboratório seguiram o guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da UNINOVE sob o número CEUA Nº 3946130819. Foram utilizadas neste experimento, ratos da linhagem *Rattus norvegicus* (*Wistar*), machos *Wistar* com idade de 3 a 5 meses (adultos), entre 180 – 250 g num total de 25 animais.

4.2 Grupos Experimentais

Os 25 animais foram randomizados e distribuídos em 5 grupos (Figura 2), com N=5 para cada grupo, a saber:

CTL: Grupo Controle Íntegro: Sem procedimento cirúrgico;

NT: Grupo com defeito ósseo e sem tratamento;

PBM: Grupo com defeito ósseo, irradiado com Laser na lesão óssea (830 nm, 6 J, 100 mW);

ACNS: Grupo com defeito ósseo e utilizado material de carbono impregnado com nanopartículas de prata;

PBM+ACNS: Grupo com defeito ósseo e utilizado material de carbono impregnado com nanopartículas de prata e irradiado imediatamente após a cirurgia com Laser nos seguintes parâmetros (808nm, 6J, 100 mW).

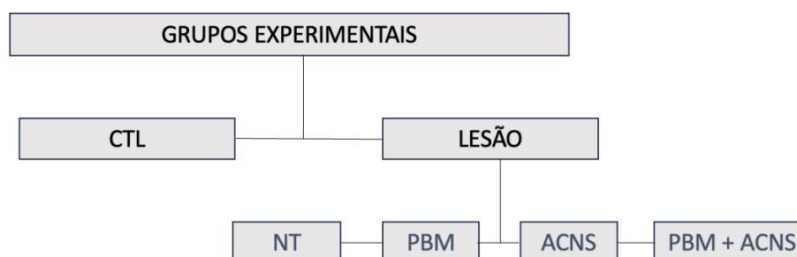


Figura 2: Tabela de Grupos. Fonte: autoria própria.

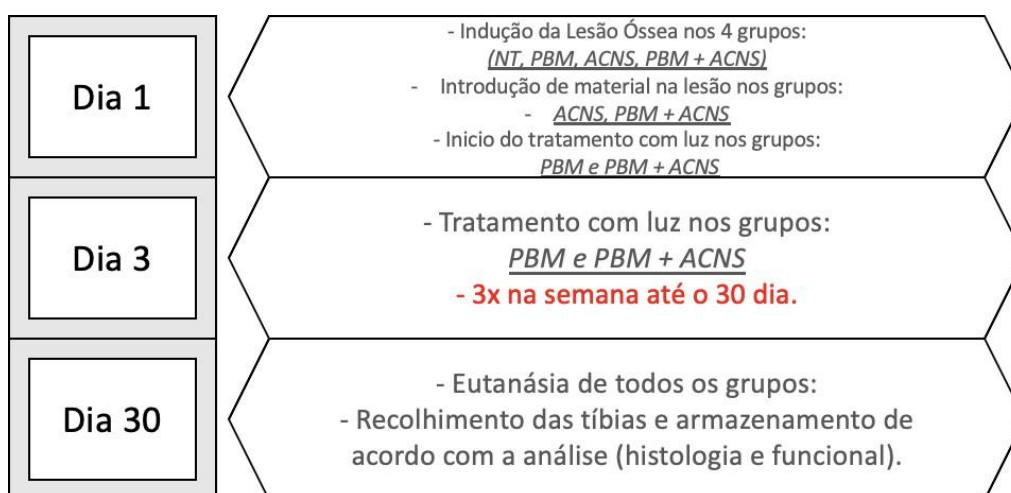
4.3 Método de Anestesia dos animais

Os animais foram pesados e anestesiados com associação de cloridrato de quetamina (90 mg/Kg) e Xilazina (10 mg/Kg). Os animais foram avaliados, com relação à ação da anestesia e em seguida foi realizada a lesão óssea em ambas as tíbias dos ratos. Foi utilizada Dipirona sódica (25 mg/Kg, via oral) durante 2 dias, para o controle da dor pós operatória.

4.4 Protocolo Experimental

Os Ratos foram distribuídos manualmente em cinco grupos. Os animais dos grupos NT, PBM, ACNS e PBM+ACNS foram anestesiados e a indução da lesão óssea foi realizada em ambas as tíbias. Imediatamente após a cirurgia os animais foram tratados de acordo com cada grupo experimental. O tratamento único com ACNS foi realizado imediatamente após a indução da lesão, e o material de carbono impregnado com nanoprata foi aplicado uma única vez, dentro do defeito ósseo, utilizando uma cureta de metal, até o completo preenchimento da lesão (Figura 3).

O tratamento com PBM foi realizado 3 vezes por semana, no período da tarde, durante 30 dias. No 30º dia, os animais foram eutanasiados com hiperdose de anestésico com associação de cloridrato de quetamina (270 mg/Kg) e Xilazina (30 mg/Kg) e as tíbias foram dissecadas e recuperadas para as análises biomecânicas e histológicas.



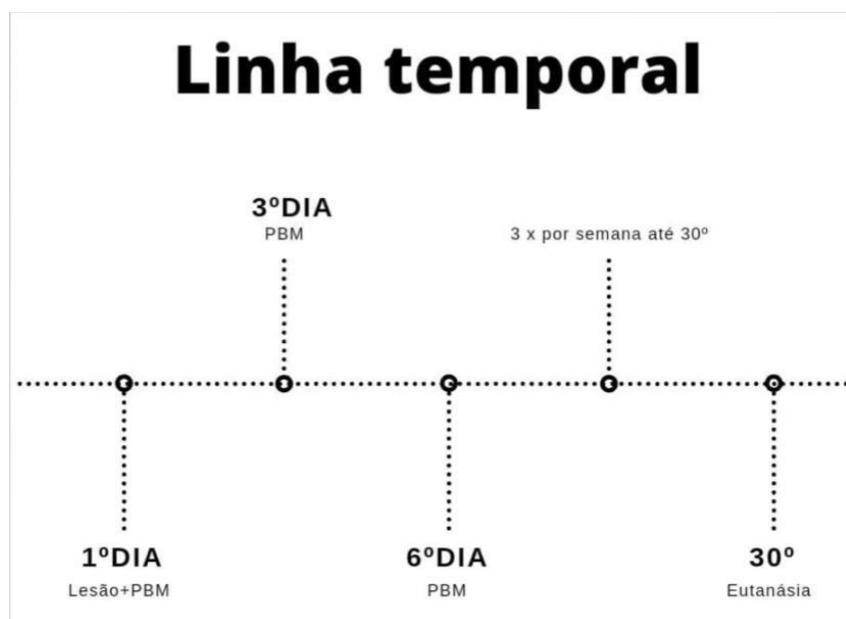


Figura 3: Delineamento experimental e linha temporal. Fonte: autoria própria.

4.5 Técnica de indução da lesão óssea

Para a cirurgia, os animais foram anestesiados, em seguida foi realizada a tricotomia e assepsia das áreas cirúrgicas. Em ambas as tíbias foram feitas uma incisão na parte pósteromedial, afastamento do músculo e exposição do osso. Na face medial do osso, a 10 mm da extremidade superior da epífise proximal, foi realizado um defeito ósseo com uma profundidade de 0,5mm ou até atingir a medula óssea, utilizando um motor de implante cirúrgico – VK Driller® Equipamentos Elétricos LTDA (1500 rpm), com uma broca cirúrgica cilíndrica helicoidal de implante Ø1.3 mm (KG Sorensen, SP-Brasil), penetrando perpendicularmente ao osso sempre com irrigação com soro fisiológico estéril (NaCl 0,9%) para evitar aquecimento. Foi suturado o músculo e depois a pele com fio de nylon monofilamentar 4-0 (Shalon). A cirurgia foi realizada nas mesmas condições para todos os animais e pelo mesmo operador (Figura 4).

Manteve-se uma distância entre a cabeça da tíbia e o ponto de perfuração por volta de 9 mm. Em seguida foi suturado o músculo e a pele com fio de *nylon* monofilamentar 4-0 (Shalon®) (PALLOTA, 2014).

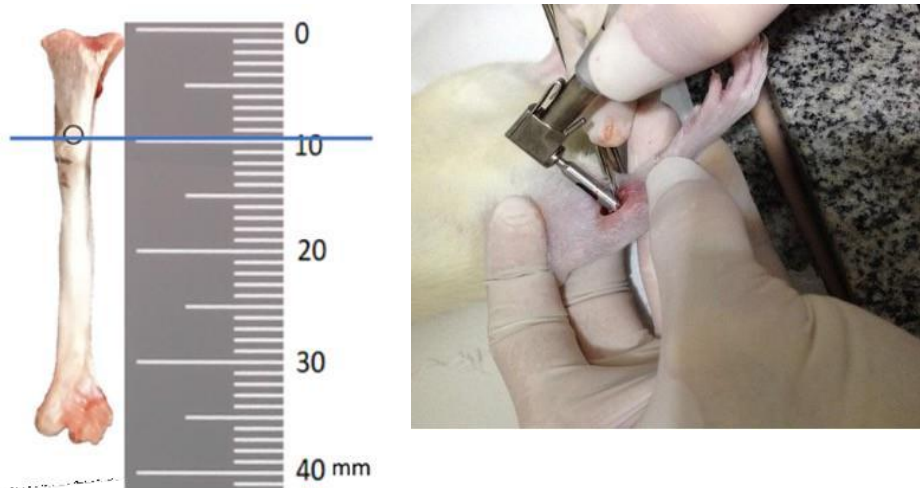


Figura 4: Defeito ósseo monocortical em tíbias, realizado com uma broca cirúrgica helicoidal de implante com 1.3 mm de diâmetro. Fonte: Acervo próprio.

Os animais voltaram para suas gaiolas específicas e ficaram aos cuidados do Biotério da Uninove. Após cirurgia, receberam a dose única de Pentanbionic® Veterinário Reforçado 2.400.000UI (Zoetis) - Dose: 0,02 mL – 200 g, dose única via IM. Esperou-se todos os ratos acordarem para administrar os seguintes analgésicos: Cronidor® 2% - Cloridrato de Tramadol a 2% de uso Veterinário (Agener União) - (5 mg/kg). Diluição (1:10): 0,5 mL de tramadol para 5 mL de soro estéril. Dose de 0,2 mL/200 g da solução por via subcutânea de 8/8 hs por 3 dias e Novalgina® - Dipirona Sódica 500 mg/mL: 1 gota (0,05 mL)/por quilo. Dose de 0,01 mL para 200 g, em diluição 1:10 (Dipirona/soro estéril), respectivamente, e foi administrado 0,1 mL/200 g da solução por via subcutânea, de 8/8hs por 3 dias. E retornaram para suas gaiolas de origem e mantidas sob os cuidados do Biotério da UNINOVE.

4.6 Tratamentos

4.6.1 Tratamento por fotobiomodulação

Para o grupo PBM, logo após realizada a lesão óssea foi feito uma aplicação utilizando laser de baixa intensidade (6 J-100 mW-808 nm) em contato

com a pele do animal, direcionado perpendicularmente a região da sutura, onde está localizada a lesão óssea (ponta do *Laser* foi protegida com filme plástico). Os animais foram colocados em suas respectivas gaiolas com livre acesso a água e ração e acondicionados no Biotério da UNINOVE. O tratamento foi repetido 3 vezes por semana num total de 12 aplicações. O equipamento *Laser* utilizado foi: *Duo MMOptics Laser* terapêutico. Emissor de Luz *Laser* – Diodo (AsGaAl). O aparelho foi aferido antes e após a utilização pelo Laboratório de Biofotônica da UNINOVE.

Os parâmetros dosimétricos utilizados estão detalhados no quadro 1 abaixo.

Quadro 1 Parâmetros dosimétricos. Equipamento: MMOptics Duo/Energy

Parâmetros Dosimétricos – Equipamento MMOptics Duo	
Emissor de Luz <i>Laser</i> - Diodo	AsGaAl
Comprimento de Onda	808 nm
Área de Saída do Feixe	0,028 cm ²
Potência	100 mW
Modo de Emissão	Contínua
Energia Radiante por Ponto	6 J
Exposição Radiante	214,28 J/cm ²
Ponto Único de Aplicação	Contato, Ponto único
Tempo de Radiação	60 s
Número de Aplicações (3x semana)	12

4.6.2 Tratamento com biomaterial de carbono

O precursor do biomaterial de carbono foi o resíduo do processo de polpação Kraft - Liquor Negro cedido pela Indústria Suzano Papel e Celulose que é uma empresa brasileira que tem como matéria prima o eucalipto. O biomaterial de carbono utilizado neste experimento foi desenvolvido e produzido no Laboratório de Moagem de Alta Energia, Materiais de Carbono e Compósitos para Altas Temperaturas - LM²C² (Escola Politécnica – USP).

Os grupos ACNS e PBM+ACNS, receberam o material de carbono uma

única vez, dentro da lesão óssea. O biomaterial de carbono ativado foi separado em *Eppendorf* e pesado 5 µg do material para cada animal, foi utilizado 2,5 µg para cada tíbia devido ao tamanho da lesão óssea. Após pesagem do material cada tubo recebeu 200 µl de água destilada e deixados em repouso por 48 hs, para reduzir a dispersão das partículas que foi inserida na cavidade do defeito ósseo. No dia em que foi realizada a lesão óssea, esta água foi aspirada, e empregado apenas o biomaterial de carbono. Em seguida foi realizada a sutura em duas etapas, sendo primeiro do tecido muscular e depois da pele do animal.

Os animais voltaram para suas gaiolas específicas com livre acesso a água e ração, e ficaram aos cuidados do Biotério da UNINOVE. Todos os animais receberam medicação de acordo com a descrição anterior (antibiótico e analgésico). Logo após a cirurgia os grupos (ACNS e PBM+ACNS) receberam a terapia de PBM na região demonstrada de forma ilustrativa (Figura 5).

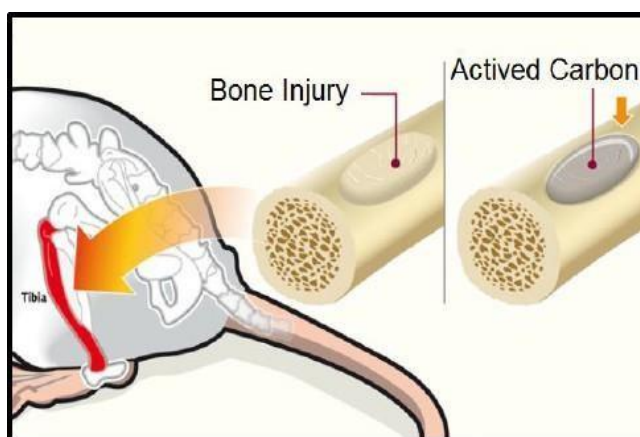


Figura 5: Ilustração da região do defeito ósseo e inserção do material de carbono e aplicação da PBM. *Fonte: Adaptado - Universidade Federal de São Carlos.*

4.7 Eutanásia e coleta de amostras

Os animais foram eutanasiados com hiperdosagem de Cetamina (270 mg/ml) e Cloridrato de Xilazina (30 mg/ml). As tíbias direitas e esquerdas foram removidas e lavadas com soro fisiológico estéril e colocadas individualmente em *Eppendorf* e armazenadas em recipiente com nitrogênio líquido -80 °C, e depois guardadas em freezer -80 °C para posteriormente serem utilizadas na análise de propriedades mecânicas ou em formol (10%) para análises histológicas.

4.8 Análises

4.8.1 Análise das propriedades mecânicas ósseas

Após a indução da lesão, os animais foram sacrificados após 30 dias e o osso foi removido para posteriores análises. Parte deste material foi utilizada imediatamente após a retirada, nos ensaios de flexão para a avaliação de suas propriedades mecânicas. A atividade normal do osso é formada por um conjunto de tensões aplicadas no tecido, divididas em forças de carregamento e descarregamento. Desta forma, foi aplicada uma sequência de forças de carregamento e descarregamento a fim de simular as condições de tensões reais do osso (Figura 6).

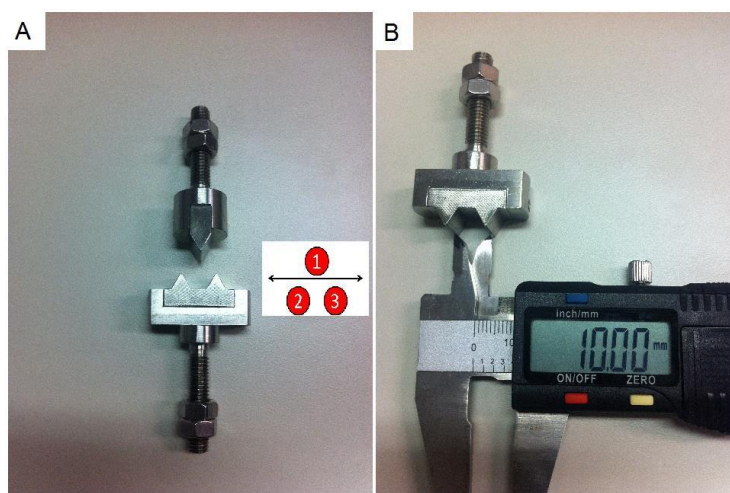


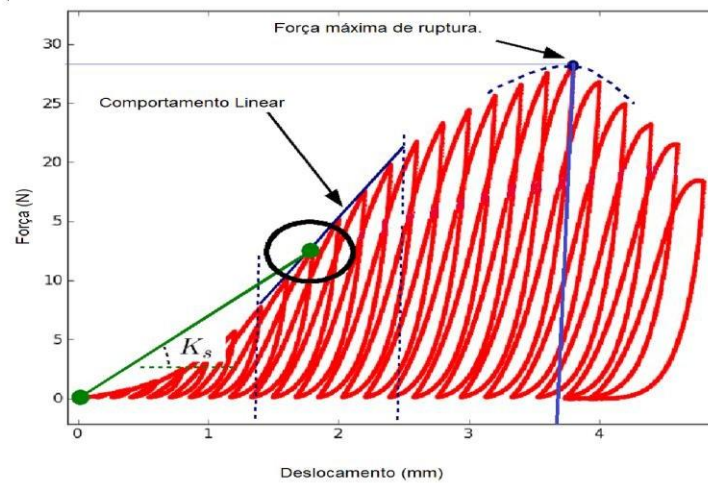
Figura 6: Dispositivo para ensaio de flexão em 3 pontos. Fonte: acervo próprio.

Primeiramente foram realizadas as medidas de comprimento, largura e altura da tíbia. Estes valores serão utilizados para detalhar as dimensões do material e padronização dos resultados. As tíbias foram colocadas horizontalmente no aparelho de teste mecânico (EMIC200) para ensaio de flexão em 3 pontos (Figura 8).

Durante a padronização do ensaio de flexão, foi utilizada uma velocidade de carregamento e descarregamento de 6 mm/min e acrescentado 0.3 mm durante cada carregamento. O ensaio de flexão foi interrompido automaticamente, após a ruptura óssea e foram analisados os seguintes parâmetros (Figura 7):

- Força de ruptura máxima ($F_{\max}$)
- Descolamento no momento da ruptura máxima ($D_{\max}$)

A



B

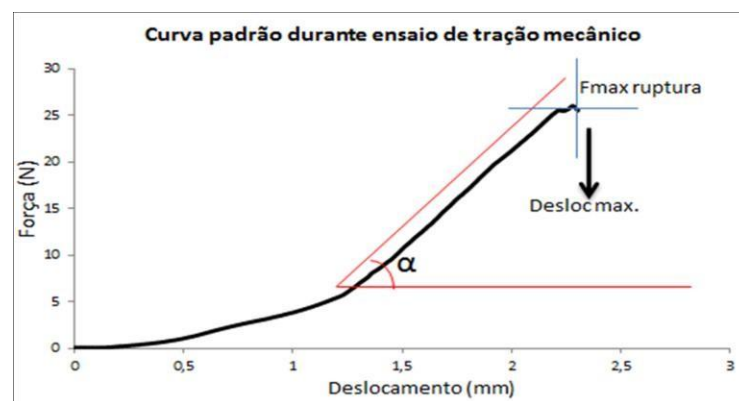


Figura 7: Gráfico do ensaio de flexão. A) Curva típica de registro durante a aplicação das forças de carregamento e descarregamento. B) Curva simplificada indicando a Força máxima e deslocamento no momento da ruptura. Fonte: Acervo próprio.

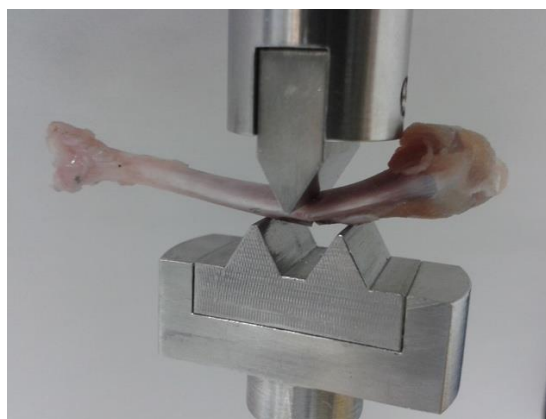


Figura 8: Posicionamento do osso tibial para ensaio mecânico. Fonte: Acervo próprio.

4.8.2 *Análise Histológica – Microscopia de luz (óptica)*

As amostras do tecido foram fixadas em formol a 10% por um período de 72 horas. Posteriormente as amostras foram descalcificadas, desidratadas e submetidas a uma série gradativa de banhos de álcool, começando com 50% e progredindo até o álcool absoluto 100% (SYNTH). Em seguida o tecido foi diafanizado com Xilol por 4 horas (SYNTH) para impregnação (embebição) e inclusão em Paraplast® das amostras. Em seguida, foram colocadas em recipientes de alumínio adequados, com Paraplast® fundido por 4 horas.

Após a impregnação, as amostras foram colocadas em um pequeno recipiente coberto com parafina e deixadas para solidificar, formando um bloco contendo o tecido. Para a microtomia foram realizados cortes com 5µm de espessura em micrótomo LEICA RM 2125 RT. Uma vez precedido o preparo das amostras os cortes foram colocados em lâminas para serem corados, com Hematoxilina-Eosina (H.E.) ou com *Picrosirius*. Após a coloração os cortes foram montados em lâminas permanentes para posteriores análises em microscópio óptico e fotografados através de sistema de microfotografia (*Olympus System Microscope Model CX 41 – Olympus PM10SP Automatic Photomicrographic System*).

As lâminas histológicas coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) foram utilizadas para avaliar a organização tecidual óssea na região da lesão. As lâminas coradas com *Picrosirius* foram utilizadas para avaliar a proporção de colágeno no tecido neoformado.

4.8.3 *Análise estatística*

Os dados foram expressos pela média e seu respectivo desvio padrão. Todos os valores foram submetidos a análise de variância *One-way ANOVA* os dados são paramétricos e *Post test* por *Tukey's Multiple Comparison*. Foi utilizado o programa GraphPad Prisma 5 para confecção dos gráficos e análises

estatísticas. Foi considerado o valor estatístico de significância de $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação Histológica – Organização Tecidual

A figura 9 mostra imagens histológicas representativas do tecido ósseo na região da lesão em tibia em 3 diferentes grupos. Em 7A, o grupo CTL apresenta tecido ósseo bem organizado, com distribuição homogênea de osteócitos na camada cortical óssea, com poucos canais vasculares. Em 7B, o grupo NT apresenta tecido ósseo ainda desorganizado, com presença de tecido de granulação (G). Observa-se em ambos os grupos PBM (7C), ACNS (7D) e PBM+ACNS (7E) a presença de osteócitos distribuídos de forma homogênea e aumento de canais vasculares na região cortical, quando comparados ao grupo CTL e NT.

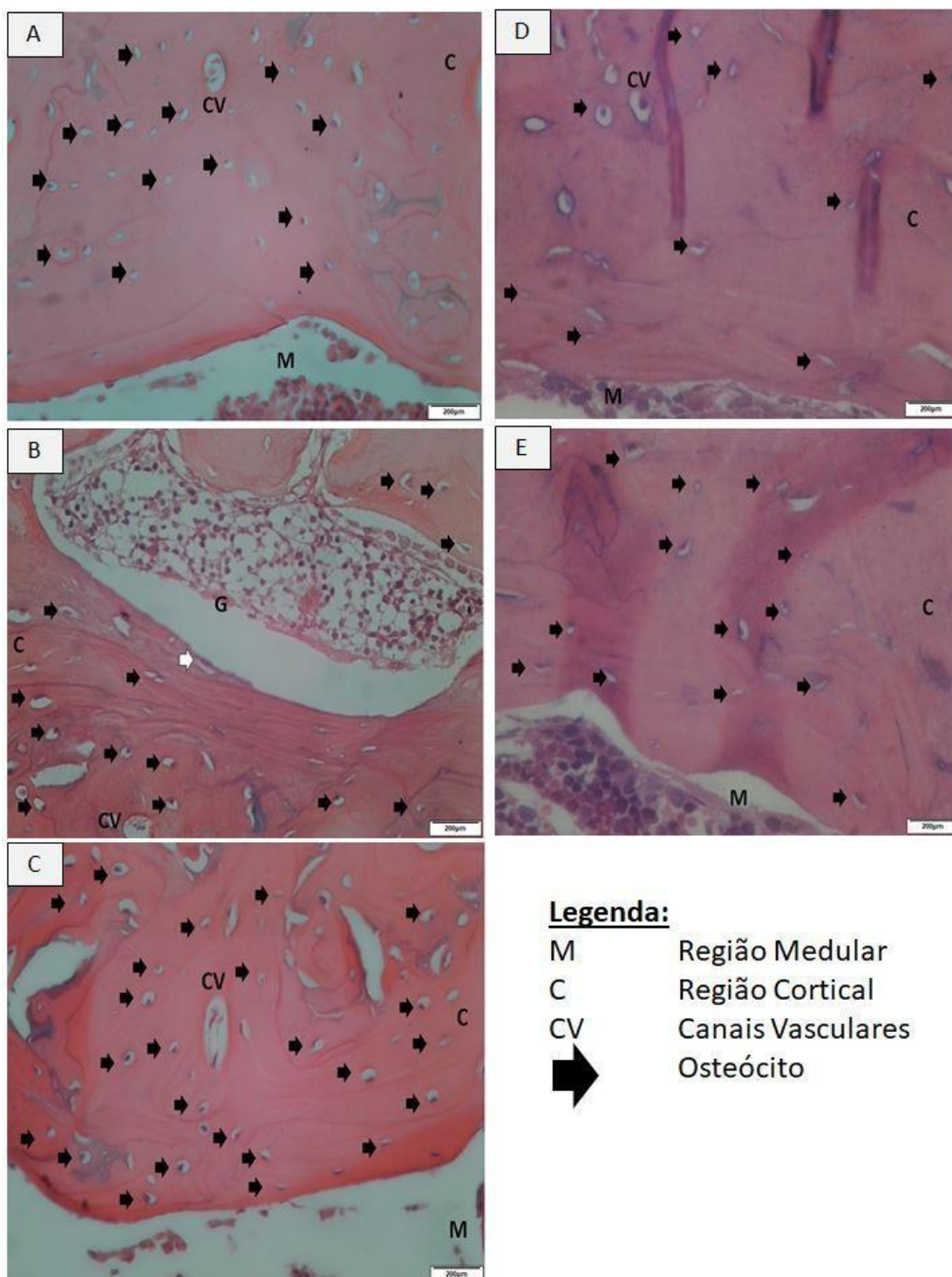


Figura 9: Cortes histológicos transversais das tíbias de ratos. (A) grupo **CTL** sem lesão óssea; (B) **NT**, com lesão óssea e sem tratamento. (C) lesão tratado com **PBM**. (D) grupo **AC+NS**, com lesão e material Carbono + nanoprata e finalmente (E) grupo com terapias associadas **PBM+ACNS**. Camada Cortical (**C**) e Medular (**M**); Canais vasculares (**CV**); Tecido de granulação (**G**). **Seta preta:** Osteócitos. Aumento (100X).

5.2 Avaliação da Força Máxima de Ruptura - Fmax

A figura 10 apresenta o gráfico da força máxima (Fmax) em Newtons das tíbias após ensaio cíclico de flexão. Não foi observada diferença de Fmax entre os grupos CTL, NT, PBM e ACNS. Somente o grupo com terapia associada (PBM+ACNS) apresentou aumento em Fmax quando comparado ao grupo NT.

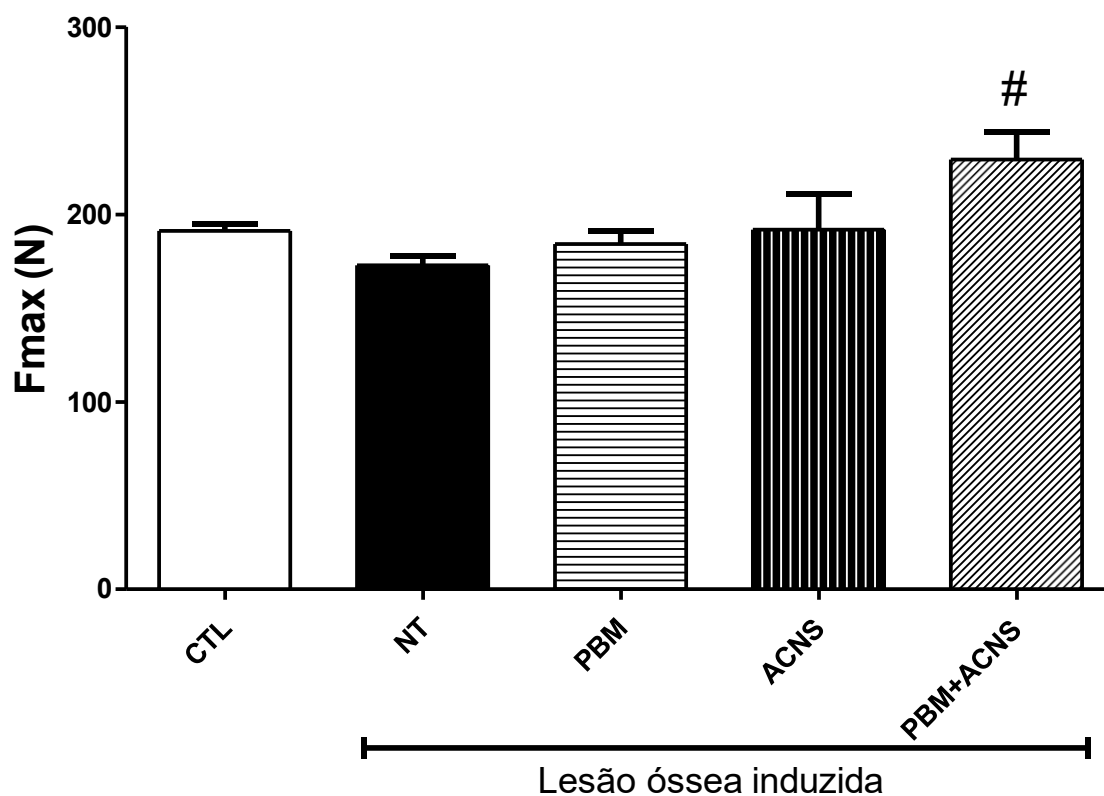


Figura 10: Gráfico da Força máxima durante ensaio de flexão cíclica no momento da ruptura óssea (Fmax). Grupos experimentais: Saudável (CTL) e lesão óssea sem tratamento (NT) ou tratados com Material de carbono impregnado com nanoprata (ACNS), com Fotobiomodulação (PBM) ou com a associação de todas as terapias (PBM+ACNS). # $p < 0,05$ Vs NT. Fonte: acervo próprio.

5.3 Avaliação da Deformação Óssea - Dmax

A figura 11 apresenta a capacidade de deformação máxima (Dmax) em milímetros, das tíbias de ratos após teste cíclico de flexão. Foi observada redução de Dmax no grupo NT quando comparado ao grupo CTL. Todos os grupos tratados mantiveram Dmax similar ao grupo CTL.

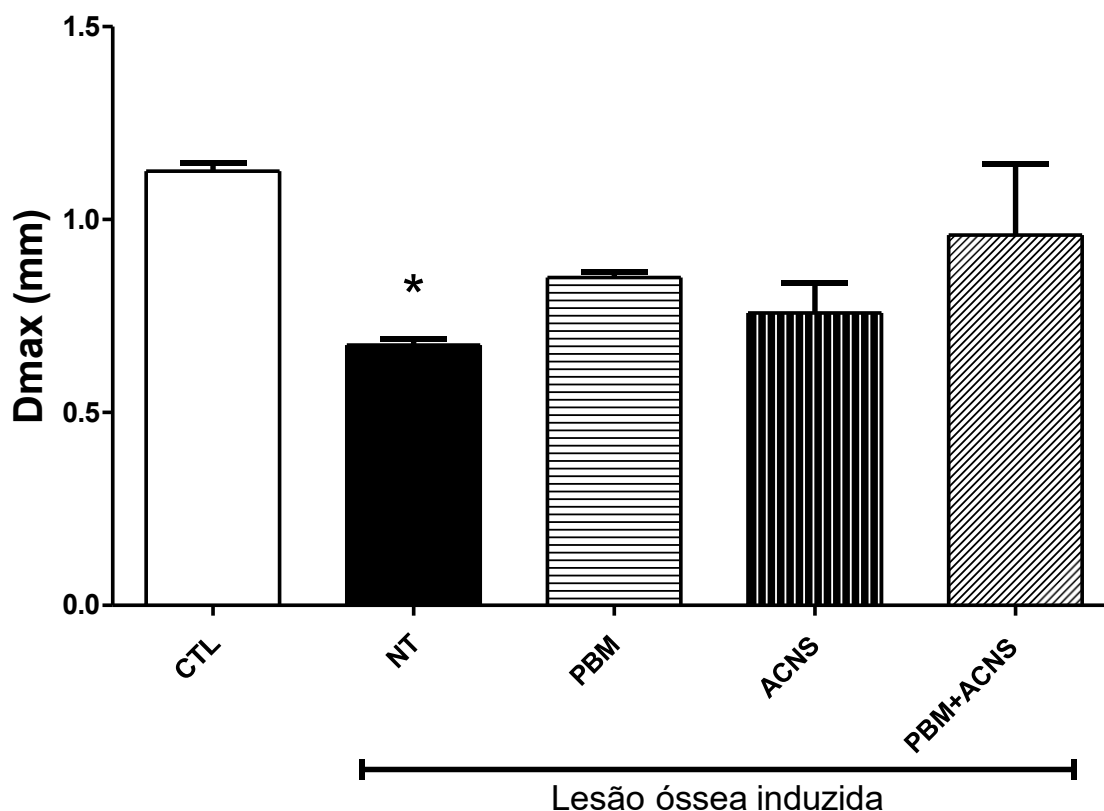
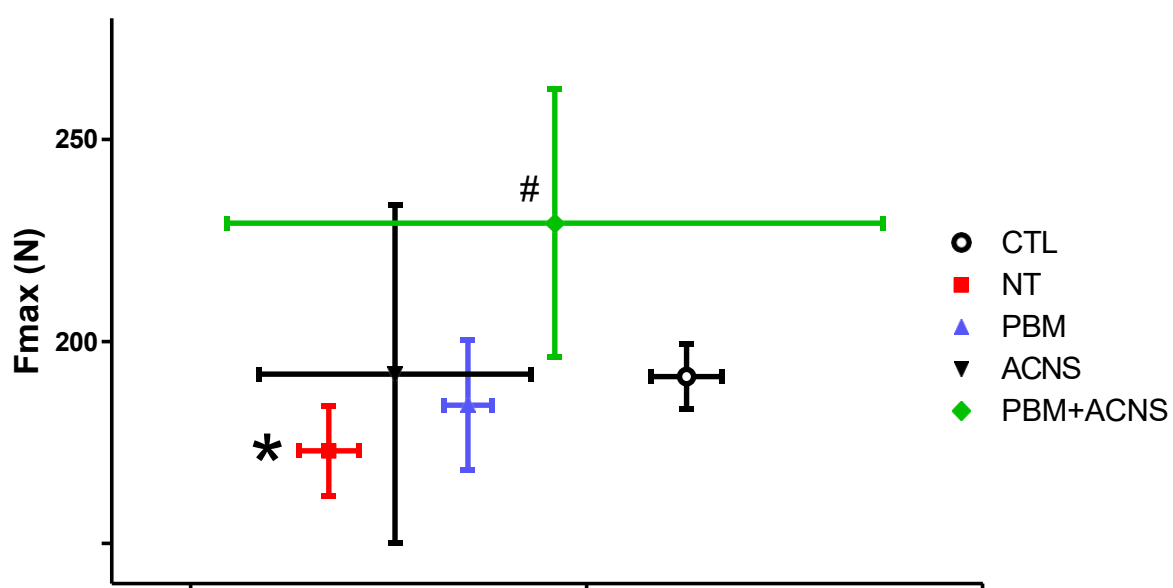


Figura 11: Gráfico da deformação máxima durante ensaio de flexão cíclica no momento da ruptura óssea (Dmax). Grupos experimentais: Saudável (CTL) e lesão óssea sem tratamento (NT) ou tratados com Material de carbono impregnado com nanoprata (ACNS), com Fotobiomodulação (PBM) ou com a associação de todas as terapias (PBM+ACNS). * $p < 0,05$ Vs CTL. Fonte: acervo próprio.

5.4 Relação entre Fmax e Dmax

A figura 12 mostra a relação entre Fmax e Dmax nas tíbias, após teste cíclico de flexão. Ambas a PBM e a PBM+ACNS são os grupos mais próximos ao grupo CTL. O grupo NT apresentou os menores valores de propriedades mecânicas (Fmax e Dmax) comparado ao grupo sem lesão óssea (CTL).



150

0.5

1.0

1.5

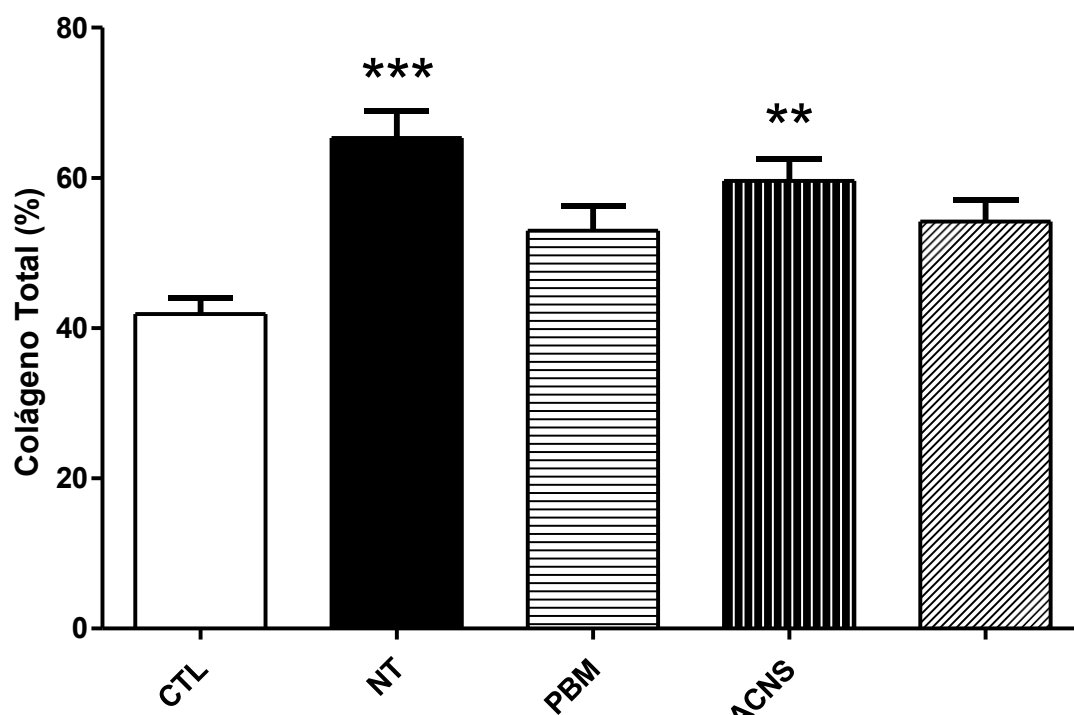
Dmax (mm)

Figura 12: Propriedades mecânicas da tíbia após indução da lesão óssea. Grupos experimentais: Saudável (CTL) e lesão óssea sem tratamento (NT) ou tratados com Material de carbono impregnado com nanop prata (ACNS), com Fotobiomodulação (PBM) ou com a associação de todas as terapias (PBM+ACNS). * $p < 0,01$ Vs CTL (Fmax) e # $p < 0,01$ Vs CTL (Dmax). Fonte: acervo próprio.

5.5 Quantificação do Colágeno Total

O gráfico abaixo mostra a proporção de colágeno total a partir da análise

histológica de lâminas coradas com *Picrosirius*. Os resultados indicam proporção de colágeno maior nos grupos NT e ACNS quando comparado ao grupo CTL. Ambos os grupos PBM e PBM+ACNS mantiveram a proporção de colágeno similar ao grupo CTL (Figura 13).



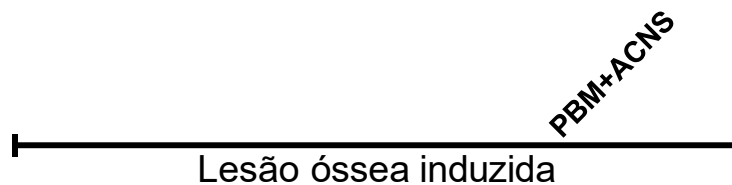


Figura 13: Gráfico da proporção de colágeno total. Grupos experimentais: Saudável (CTL) e lesão óssea sem tratamento (NT) ou tratados com Material de carbono impregnado com nanoprata (ACNS), com Fotobiomodulação (PBM) ou com a associação de todas as terapias (PBM+ACNS). ** $p < 0,01$ e $p < 0,001$ Vs CTL. Fonte: acervo próprio.

5.6- Imagens Histológicas da tíbia de ratos – Proporção de Colágeno

A figura 14 apresenta imagens histológicas transversais representativas das tíbias dos ratos de cada grupo experimental, na região da lesão óssea coradas com *Picrosirius* para avaliação da proporção de colágeno total. Em todas as imagens histológicas é possível observar a camada cortical (C) e medular (M), além da marcação do colágeno, representado pela coloração rosa. O grupo NT (B) apresenta maior região de transição entre osso maduro e imaturo. Os grupos tratados com PBM (C), com ACNS (D) e com terapias associadas PBM+ACNS (E) apresentaram redução do tecido de transição. A imagem F apresenta o gráfico com a quantificação de colágeno a partir da intensidade da coloração rosa, para cada grupo experimental.

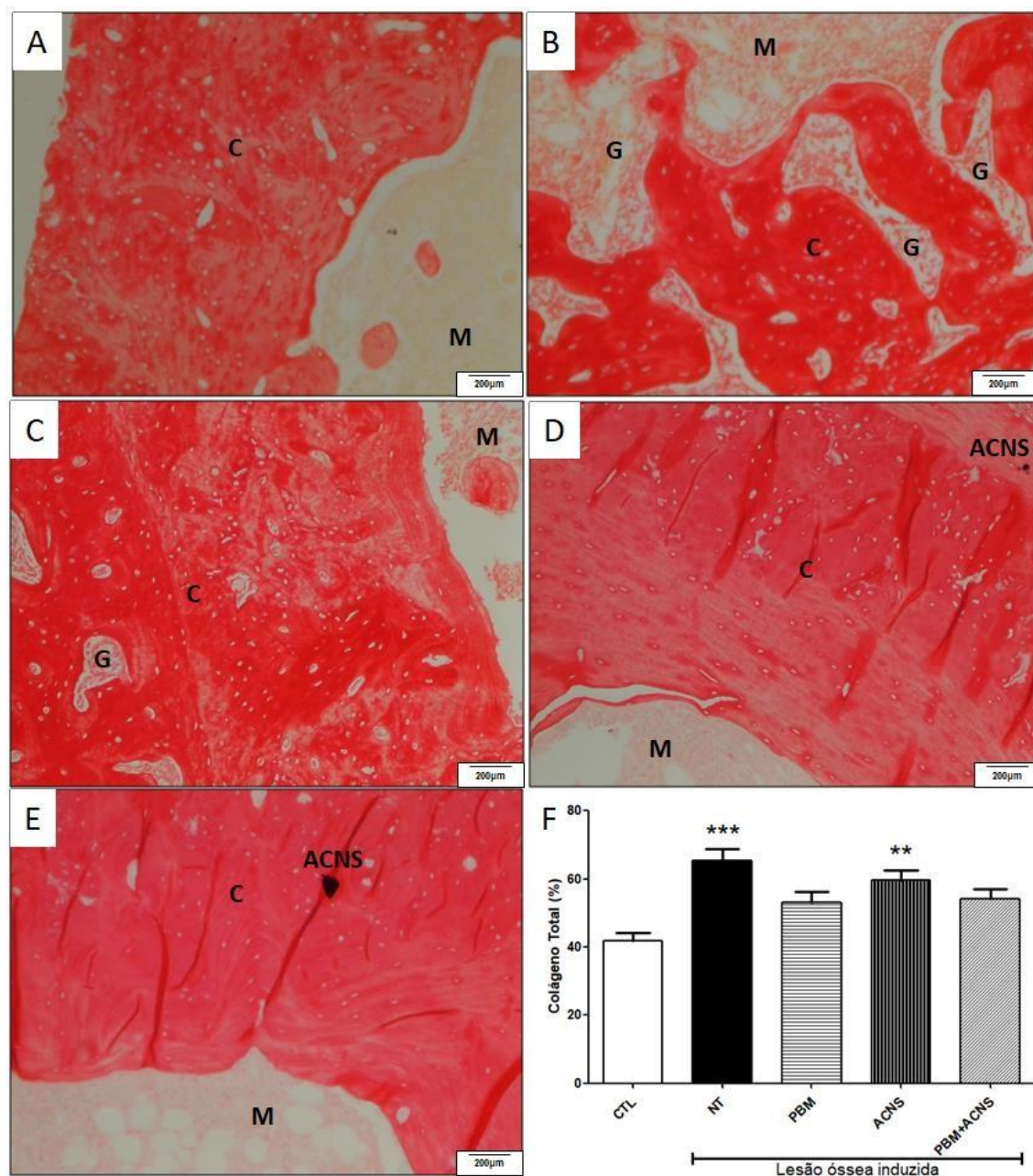


Figura 14: Imagens histológicas do tecido ósseo de tíbias de ratos coradas com *Picrosirius*. Em (A) Animais sem lesão óssea – CTL; Em (B) animais com lesão óssea sem tratamento – NT; Em (C) tratado com PBM; Em (D) tratado com ACNS; Em (E) terapias associadas PBM+ACNS e em (F) gráfico da quantificação de colágeno total. Legenda: C: Camada cortical; M: Camada medular; G: Tecido de granulação; ACNS: Material de carbono impregnado com nanoprata. Coloração Rosa = Colágeno. Fonte: acervo próprio.

6 DISCUSSÃO

As lesões ósseas provocam alterações estruturais que refletem na resistência tecidual. O processo de reparo é gradual com a finalidade de formar um novo tecido ósseo. A busca de biomateriais que possam ser utilizados como substitutos ósseos é uma estratégia para pacientes que necessitem de uma grande área para formação óssea (Kumar S, 2019; Zhang H, 2019). Paralelamente, o uso de terapia que auxilie neste reparo, como a Fotobiomodulação, representa uma vantagem no tratamento de lesões ósseas, agindo na modulação do processo inflamatório, auxiliando tanto no controle da dor, como no reparo tecidual (Bossini PS 2011; Tim, 2014; de Oliveira Gonçalves, 2016; Gurler G, 2018).

Neste trabalho, estudamos o efeito da terapia por fotobiomodulação sobre biomaterial de carbono impregnado com nanopartículas de prata utilizado em defeitos ósseos, em modelo experimental de lesão em tibia de ratos, avaliando aspectos morfológicos referentes à organização tecidual e a proporção de colágeno, bem como a resistência óssea, a partir de testes cíclicos de flexão. Nosso estudo observou que o tecido ósseo após 30 dias da indução da lesão e sem tratamento (NT), apresentou redução da capacidade de deformação (Dmax), quando comparado ao grupo sem lesão (CTL), além de aumento na proporção de colágeno total, bem como presença de tecido ósseo desorganizado, com região de transição entre tecido imaturo para maduro.

O modelo de lesão óssea utilizada neste estudo foi adaptado de trabalhos anteriores, sendo considerado um modelo experimental onde o defeito ósseo é padronizado com dimensão de lesão não crítica, permitindo o crescimento direcionado da região medular e cortical óssea (Bossini 2011; Tim 2013; Atasoy 2017). As alterações na organização tecidual observadas neste modelo experimental também foram apresentadas em outros estudos, com presença de tecidos de granulação na região no defeito ósseo (Tim, 2013), além de alteração no número de osteoblastos e atividade de osteoclastos, demonstrando que o reparo ósseo ainda não foi totalmente concluído.

O modelo de lesão também facilita a padronização da aplicação do biomaterial de carbono no local do defeito, possibilitando também o tratamento com PBM e posteriormente o acompanhamento do reparo, a partir das análises

histológicas e funcionais sugeridas neste estudo (Fangel 2011, Bossini 2011, Tim2013).

Neste trabalho, foi utilizado material de carbono impregnado com nanopartículas de prata dentro do defeito ósseo. Nossos resultados demonstraram que o grupo tratado com material de carbono impregnado com nanoprata (ACNS) manteve as propriedades mecânicas similares ao grupo sem lesão (CTL), além de promover melhor organização tecidual. No entanto, foi observado aumento na proporção de colágeno total, sugerindo menor calcificação da camada cortical.

Atualmente, são escassos os trabalhos que utilizam materiais de carbono como substituto ósseo. Pesquisas que utilizaram nanotubos de carbono no processo de reparo ósseo demonstraram os efeitos benéficos destes materiais na organização óssea, estimulando osteoblastos e modulando enzimas relacionadas com a formação do tecido ósseo. (Quiao 2022; Maher 2025; Silva SK 2022).

O material de carbono utilizado neste estudo possui algumas propriedades importantes que contribuem para o crescimento celular, como a presença de poros interconectados, o que favorece não só o crescimento celular, como a interação entre as células e sua matriz extracelular (Publio 2025). Outra característica deste material é sua capacidade de adsorção, que permite a impregnação por outros compostos, como as nanopartículas de prata (Qiao, 2022). As nanopartículas de prata são excelentes antimicrobianos e sua utilização em materiais compósitos poderia contribuir para o controle de infecções ósseas, como em casos de osteomielite. Os mecanismos antimicrobianos da prata não foram totalmente descritos, mas podem estar relacionados com a formação de íons de prata, com ação oxidante, agindo principalmente na parede e membrana das bactérias (Shanchez Lopes 2020; Qing Y 2018).

Apesar de estudos experimentais *in vivo* mostrarem resultados positivos do uso de materiais de carbono ativado no processo de reparo ósseo (Publio 2025), ainda é desconhecido os efeitos de compósitos de material de carbono ativado impregnados com nanopartículas de prata no tratamento único ou associado com terapia por fotobiomodulação na evolução do reparo ósseo, como apresentado neste estudo. Neste contexto, ao avaliar o grupo com defeito ósseo

e tratado exclusivamente com Fotobiomodulação (PBM), foi observada a manutenção tanto na proporção de colágeno como nas propriedades mecânicas do osso (Fmax e Dmax), apresentando valores similares ao grupo sem lesão (CTL). Nas análises histológicas, não foi observado tecido de granulação e o tecido ósseo, formado após a indução da lesão, apresentou osteoblastos distribuídos de forma homogênea, com presença de alguns canais vasculares.

Parâmetros de irradiação utilizados neste estudo já foram apresentados em pesquisas anteriores, com resultados promissores na melhora do reparo tecidual ósseo, facilitando a proliferação de osteoblastos e melhorando a organização da matriz extracelular (Rossi, 2024). Enzimas como a fosfatase ácida e alcalina, bem como moléculas como RANK-L e osteoprotegerina também são moduladas pela PBM, auxiliando tanto na atividade de osteoclastos e remodelação óssea, como na organização tecidual, a partir da formação de matriz extracelular e síntese de colágeno (Rodrigues 2015; de Oliveira Lss 2017). A PBM também estimula formação de canais vasculares e pode acelerar a formação óssea (Bossini 2011; Rossi 2024).

Estudos clínicos também já demonstraram que a PBM tem efeito analgésico, sendo considerada uma opção terapêutica para lesões e dores ortopédicas (RODRIGUES, 2024; E Silva YME 2025). Os mecanismos de ação da PBM no controle do processo inflamatório e da dor ainda não foram totalmente esclarecidos, mas já existem evidências do efeito da PBM no controle da COX-2 e da prostaglandina E2, auxiliando no processo de resolução da inflamação (Marcos RL 2011; Lopes-Martins 2022; Marcos RL, 2025). Os efeitos analgésicos estão relacionados tanto com o controle da inflamação, como com mecanismos de ação central, com controle rápido da dor (Fernandes G 2025; E Silva YME 2025;).

A PBM pode ser utilizada como tratamento único ou associada com outra terapia, como biomateriais, apresentando efeitos sinérgicos na proliferação de osteoblastos direcionando para uma melhor organização do tecido ósseo (Rossi, 2024). Neste trabalho, o uso das terapias associadas (PBM+ACNS) promoveu aumento da resistência óssea (Fmax) com manutenção da capacidade de deformação (DMax) similar ao grupo sem lesão (CTL). As terapias associadas também promoveram a organização tecidual com distribuição homogênea de osteoblastos no tecido ósseo formado, além de manter a proporção de colágeno

similar ao grupo controle. O tipo de análise biomecânica a partir de ensaios cíclicos de flexão óssea também mostrou apresentar vantagens em relação às análises monotônicas, sendo possível observar diferenças funcionais entre ossos saudáveis e com lesão, além das vantagens funcionais obtidas com a PBM (Labat RL 2014; Fangel 2011; Tim 2014).

Os resultados apresentados neste estudo são promissores para o uso de materiais com prata associado ou não com a fotobiomodulação, no processo de reparo ósseo. Estudos adicionais são importantes, a fim de avaliar o efeito antimicrobiano no material compósito utilizado, bem como sua relação com a PBM. Modelos experimentais de infecção óssea poderiam ser utilizados para avaliar uma possível ação antimicrobiana. Estudos *in vitro* com diferentes cepas de bactérias, bem como, com cultura de osteoblastos seriam importantes para a avaliação tanto antimicrobiana e seus mecanismos de ação, como o impacto no material impregnado com prata no crescimento celular ósseo. Seria também importante estudar diferentes parâmetros de irradiação no material impregnado com prata, uma vez que os comprimentos mais utilizados no processo de reparo tecidual estão entre o vermelho e o infravermelho (Eroglu 2021; Salehpour 2019; Rossi 2024), e a prata possui comprimento de onda próximo de 450nm, sendo fundamental avaliar sua ação antimicrobiana em parâmetros de irradiação diferentes.

Em resumo, ambos os tratamentos com biomaterial de carbono ativado impregnado com nanopartículas de prata ou a terapia por fotobiomodulação promoveram a organização do tecido ósseo e da proporção de colágeno, refletindo na resistência e na capacidade de deformação óssea similar ao grupo sem lesão. A terapia associada (PBM+ACNS) promoveu efeito sinérgico na resistência mecânica observado pelo aumento de Fmax, além de manter tanto a capacidade de deformação óssea como a organização tecidual similar ao grupo controle. O uso de materiais de carbono impregnado com nanopartículas de prata pode ser uma opção terapêutica para pacientes com infecções ósseas e a terapia por fotobiomodulação pode ser utilizada em associação ao material de carbono, auxiliando no processo de reparo ósseo.

7- CONCLUSÃO

Concluimos que o modelo de lesão óssea utilizado neste estudo promove alterações na organização tecidual com reflexo na redução da resistência mecânica. Ambas a terapia por Fotobiomodulação (*Laser* 808 nm; 6 J; 100 mW) bem como o uso de material de carbono impregnado com nanoprata utilizado no defeito ósseo mantém tanto a organização tecidual como as propriedades mecânicas da tíbia similares ao grupo saudável, sem lesão. A terapia combinada, utilizando PBM em tíbias com lesão e tratadas com biomaterial de carbono impregnado com nanoprata mantiveram a organização tecidual e a proporção de colágeno similar ao grupo controle e melhoraram a resistência mecânica das tíbias. Ambas a PBM como o material de carbono impregnado com prata, nos parâmetros de uso indicados neste estudo apresentaram efeitos positivos no processo de reparo ósseo, em modelo experimental de lesão em tíbia de ratos.

REFERÊNCIAS

- ABD-ELAAL AZ. *et al.* Evaluation of the effect of low-level diode laser therapy applied during the bone consolidation period following mandibular distraction osteogenesis in the human. *Int J Clin Oral Maxillofac Surg.* 2015;44(8):989-997.
- ABDEL-MAGEED AM. *et al.* Inflammatory immune response and its key roles in the process of bone fractures healing. *Edelweiss Applied Sci Technol.* 2024;8(6):8023-8028.
- ANTIPOV AP, GORDINA EM, MARKOV MA, BOZHKOVA SA. Influence of different methods of bone processing on bone mechanical properties. *Genij Ortopedii.* 2022;28(6):783-787.
- ARAMBULA-MALDONADO R, MEQUANINT K. Carbon-based electrically conductive materials for bone repair and regeneration. *Mater Adv.* 2022;3:5186-5206.
- ARAÚJO LK. Análise da eficiência de membranas poliméricas comerciais para regeneração óssea em defeitos cranianos de ratos. [Dissertação de Mestrado]. Sobral: Universidade Federal do Ceara; 2022.
- 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
- ARISAWA, E.A.L.; DA ROCHA, R.F.; CARVALHO, Y.R.; MORAES, E.; DE ALMEIDA, J.D. VILLA-FORTE, A. Ossos. Manual MSD. Versão Saúde para a família. Publicado em 22 set. 2022. Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt/casa/disturbios-osseos-articulares-e-musculares/biologia-do-sistema-musculoesquelitico/ossos>. Acesso: 18 nov. 2024. Influência da calcitonina na reparação óssea de tíbias de ratas ovariectomizadas. *Brazilian Dental Science*, 3(1), 2010.
- ASSIRATI, P.H.; MATTOS, P.A.; RODRIGUES, A.F.; KIDO, H.; PRATES, R.A.; PEREIRA, D.C.; DEL BEL, M.L.S.; LENZ, G.F.; LABAT, G.A.; MARCOS, R.L. Estudo experimental do uso de material de carbono impregnado com prata no processo de reparo ósseo e controle de infecção. *Anais do 9º Congresso Brasileiro de Carbono.* Vol. 1 (dez/2021). São Paulo, ABCarb, 2021.
- ASSIRATI, P.H.B. Fotobiomodulação associada a material de carbono particulado impregnado com partículas de nanop prata no reparo ósseo. São Paulo: Universidade Nove de Julho, 2019.
- ATCP DO BRASIL. Manual de Instalação e Operação. Software Sonelastic® 3.0
- ATRIA PJ, GILMORE LA, LEE AR, SHAWKY T, KWON RY. Skeletal adaptation to mechanical cues during homeostasis and repair. *Front Physiol.* 2023;14:1233920.

BAYAT, M.; *et al.* Effect of Low-Level Helium–Neon Laser Therapy on the Healing of Third-Degree Burns In Rats. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 83 (2), 2006.

BENSADOUN, R.J. Photobiomodulation or low-level laser therapy in the management of cancer therapy-induced mucositis, dermatitis and lymphedema. *Curr Opin Oncol.* 2020 Nov 17;30(4):226-232 Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29794809/>. Acesso: 16 nov. 2024.

BERNI EA, RIBEIRO C, ZUCOLOTTI V. Síntese de nanopartículas de prata para aplicação na sanitização de embalagens. São Carlos, Comunicado Técnico, n. 99, Embrapa, 2008.

BITTNER-FRANK M, DUC-UGWU IU, LEIMER L, MIDDLETON MK, WILDE F, KLOCKE A. *et al.* Cortical and trabecular mechanical properties in the femoral neck: differences in apparent modulus, yield stress, and damage accumulation. *JBMR Plus*. 2024;8(6):e10249.

BOLAMPERTI S, DE MORAES M, CHAPPARD D, DUBOEUF F, LEGRAND E, RONDEAU JM. *et al.* Bone remodeling: an operational process ensuring survival. *Bone Res*. 2022;10(1):68.

BOSSINI PS, RENNÓ AC, RIBEIRO DA, FANGEL R, RIBEIRO AC, LAHOZ MDE A, PARIZOTTO NA. Low level laser therapy (830 nm) improves bone repair in osteoporotic rats: similar outcomes at two different dosages. *Exp Gerontol*. 2012;47(2):136-42.

BOSSINI PS, RENNO ACM, RIBEIRO DA, FANGEL R, PEITZ O, ZANOTTO ED, PARIZOTTO NA. Biosilicate® and low-level laser therapy improve bone repair in osteoporotic rats. *J Tissue Eng Regen Med*. 2011;5(3):229-337.

CARVALHO PTC. *et al.* Effects of low-level laser therapy (808 nm) on bone healing in critical-size defects: histomorphometric and immunohistochemical analysis. *Lasers in Medical Science*. 2020;35(2):453-461.

CHAMUSCA, F.V.; REIS, S.R.A.; LEMAIRE, D.; MEDRADO, A.P. Mediadores do efeito sistêmico do processo inflamatório e terapias fotobiomoduladoras: uma revisão de literatura. *R. Ci. Med. Biol.* 2020 Nov 20;11(1):70-78. Available from: <https://portalseer.ufba.br/index.php/cmbio/article/view/5705>.

CHATTOPADHYAY S, RAINES RT. Collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers*. 2014;101(8):821-33.

CHENG F. *et al.* Effect of different acids on the extraction of pepsin-solubilised collagen containing melanin from silky fowl feet. *Food Chem*. 2009;113(2):563-567.

CHOI YS, KIM YH, AN HM, BAE SK, LEE YK. Efficacy of Silver Nanoparticles-Loaded Bone Cement against an MRSA Induced-Osteomyelitis in a Rat Model. *Medicina (Kaunas)*. 2023;59(4):811.

COSTA-JUNIOR, E.S.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F.; MANSUR, A.A.P.;

VASCONCELOS, W.L.; MANSUR, H.S Preparation and Characterization of Chitosan/Poly (Vinyl Alcohol) Chemically Crosslinked Blends for Biomedical Applications. *Carbohydr Polym.* 2009;76(9):472-481.

COWIN SC. *Bone Mechanics Handbook*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 2001.

CRUZ MAE. *et al.* Aspectos químicos da biomineralização óssea. *Quim Nova.* 2022;45(5):578-593.

CURREY JD. *Bones: Structure and Mechanics*. Princeton: Princeton University Press; 2002.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. *Química de alimentos de Fennema*. 4ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DAKAL TC, KUMAR A, MAJUMDAR RS, YADAV V. Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. *Front Microbiol.* 2016;7:1831.

De Oliveira Gonçalves JB, Buchaim DV, de Souza Bueno CR, Pomini KT, Barraviera B, Júnior RSF, Andreo JC, de Castro Rodrigues A, Cestari TM, Buchaim RL. Effects of low-level laser therapy on autogenous bone graft stabilized with a new heterologous fibrin sealant. *J Photochem Photobiol B.* 2016 Sep;162:663-668. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.07.023. Epub 2016 Jul 21. PMID: 27497370.

DI BERNARDO L, DANTAS ADB. *Métodos e técnicas de tratamento de águas*. 2ed. São Carlos: RiMa, 2005.

DINIZ, J.S.; DIONÍSIO, V.C.; NICOLAU, R.A.; PACHECO, M.T. Propriedades mecânicas do tecido ósseo: uma revisão bibliográfica. Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, 2014. Disponível em: http://biblioteca.univap.br/dados/INIC/cd/epg/epg4/epg4-13_a.pdf. Acesso: 18 nov, 2024.

DOMPE, C. *et al.* Photobiomodulation—Underlying Mechanism and Clinical Applications. *J. Clin. Med.* 2020 Nov 17, 9(6), 1724. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32503238/>. Acesso: 16 nov. 2024.

DÖRTBUDAK O, TÜZÜNER B, ONGU F. The biostimulatory effects of 808-nm diode laser therapy on bone regeneration after defect creation in rat calvaria. *Photobiomodul Photomed Laser Surg.* 2022;40(5):307-314.

E Silva YME, de Viveiros Tavares Alves P, Dalmaso RBM, de Oliveira APL, Duran CCG, Júnior JAS, Zamuner SR, de Souza Setubal Destro MF, Cecatto RB, Martins RÁBL, Liebano RE, Marcos RL. Photobiomodulation presents an anti-inflammatory effect, reflecting on the expression of receptors related to the pain process in a collagenase-induced tendinitis experimental model. *J Photochem Photobiol B.* 2025 Aug;269:113205. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2025.113205. Epub 2025 Jun 26. PMID: 40592080.

EBRAHIMI, T.; MOSLEMI, N.; ROKN, A.R.; HEIDARI, M.; NOKHBATOLFOGHAHAIE, H.; FEKRAZAD, R. The Influence of Low-Intensity

Laser Therapy on Bone Healing. Original Article, v. 9, n. 4, 2012.

EINHORN, T.A. Bone strength. The botlonline. Calcif. Tissue Int. v. 51, p. 333-339, 1992.

EINHORN TA, BILEZIKIAM JP, RAISZ LG. Mechanical proprieties of bone. *In* principles of bone biology. Academic Press California. USA. 27-37, 1996.

EINHORN TA, GERSTENFELD LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol*. 2015;11(1):45-54.

EIVAZZADEH-KEIHAN R. *et al*. Carbon based nanomaterials for tissue engineering of bone. *Int J Nanomed*. 2019;14: 6389-6401.

Eroglu B, Genova E, Zhang Q, Su Y, Shi X, Isales C, Eroglu A. Photobiomodulation has rejuvenating effects on aged bone marrow mesenchymal stem cells. *Sci Rep*. 2021 Jun 22;11(1):13067. doi: 10.1038/s41598-021-92584-3. PMID: 34158600; PMCID: PMC8219765.

Fangel R, Bossini PS, Renno AC, Ribeiro DA, Wang CC, Toma RL, Nonaka KO, Driusso P, Parizotto NA, Oishi J. Low-level laser therapy, at 60 J/cm² associated with a Biosilicate(®) increase in bone deposition and indentation biomechanical properties of callus in osteopenic rats. *J Biomed Opt*. 2011 Jul;16(7):078001. doi: 10.1117/1.3598847. PMID: 21806293.

Fernandes, G., Labat Marcos, R., Almeida dos Santos, S. *et al*. Photobiomodulation control the expression of MMP, TNF- α and NK-1 receptors, improving allodynia and cartilage resistance in rheumatoid arthritis model. *Lasers Med Sci* 40, 306 (2025). <https://doi.org/10.1007/s10103-025-04557-x>

FERNANDES KPS, FERRARI RAM, FRANÇA CM. Biofotônica Conceitos e Aplicações. São Paulo: Universidade Nove de Julho – UNINOVE, 2017. 258p.

FIELD RA. Ash and calcium as measures of bone in meat and bone mixtures. *Meat Sci*. 2000;55(3):255-264.

FLAUSSE A, HENRIONNET C, DOSSOT M, DUMAS D, HUPONT S, PINZANO A, MAINARD D, GALOIS L, MAGDALOW J, LOPEZ E, GILLET P, ROUSSEAU M. Osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal steam cells in hydrogel containing nacre powder. *J Biom Mat Res*. 2013;101^a(11):3211-3218.

FREITAS, K.A.B.S. Efeitos da fotobiomodulação (laser 660nm) no extravasamento de antraciclina: estudo experimental. Botucatu: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2020.

GAGLIARDI IC. Avaliação biomecânica do reparo ósseo em tíbias de ratos, análise da influência da onda de choque focal. [Tese de Mestrado]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2020.

GENOVESE WJ. Laser de Baixa Intensidade: Aplicações terapêuticas em odontologia. São Paulo: Santos; 2007.

GOMES, C.F.; SCHAPOCHNIK, A. The therapeutic use of low intensity laser (LLLT) in some diseases and its relation to the performance in speech therapy. *Distúrb. comun.* 2020 Nov 08; 29 (3): 570-8. Available from: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-881883>.

GOVINDARAJAN D. *et al.* Graphene: A Multifaceted Carbon-Based Material for Bone Tissue Engineering Applications. *ACS Omega.* 2023;9(1):67-80.

GUEDES NA, AMARAL-LABAT G, CARVAS CZ, LENZ E SILVA GFB. Material de carbono nano-microporoso derivado do licor de polpação kraft. In. 7º Congresso Brasileiro de Carbono – Carbono 2017, 204-207.

GUERREIRO JAP. Análise in vivo da osteocondutividade de biomateriais a base de colágeno, hidroxiapatita e queratina derivados de subprodutos da indústria avícola. [Dissertação de Mestrado]. Sobral: Universidade Federal do Ceará; 2019.

Gurler G, Gursoy B. Investigation of effects of low level laser therapy in distraction osteogenesis. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg.* 2018 Dec;119(6):469-476. doi: 10.1016/j.jormas.2018.05.006. Epub 2018 Jun 7. PMID: 29885471.

HADJIARGYROU M. *et al.* Transcriptional profiling of bone regeneration. Insight into the molecular complexity of wound repair. *J Biol Chem.* 2002;277(33):30177-30182.

HAMBLIN MR. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. *AIMS Biophysics.* 2018;5(4):337-361.

HAMMERSCHMIDT, K.S.A.; SANTANA, R.F. Saúde do idoso em tempos de pandemia Covid-19. *Cogitare Enferm.* 2020;25:e72849.

HENKEL J, WOODRUFF MA, EPARI DR, STECK R, GLATT V, DICKINSON IC, CHOONG PFM, SCHUETZ MA, HUTMACHER DW. Bone regeneration based on tissue engineering conceptions – a 21st century perspective. *Bone Res.* 2013;3:216-248.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo 2022. Recuperado em 12 novembro, 2024. Disponível em: http://www.censo2022.ibge.gov.br/resultados_do_censo2022.php.

JEYARAMAN M, JEYARAMAN N, NALLAKUMARASAMY A. *et al.* Silver nanoparticle technology in orthopaedic infections. *World J Orthop.* 2023;14(9):662-668.

JUNQUEIRA E, CARNEIRO A. *Histologia Básica.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J. *Histologia básica: texto e atlas.* 12ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013.

KARU TI, LUBART R. Effects of Low-Power Light on Biological Systems V. *Proceedings of SPIE.* 2000.

KARU, T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys.* 2020 Nov 17;56(5): 691-704. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2651364/>. Acesso: 16 nov. 2024.

KAWASAKI K, SHIMIZU N. Effects of low-energy laser irradiation on bone remodeling during experimental tooth movement in rats. *Lasers in Surgery and Medicine* 2000;26:282-291.

KEMAH B, UZER G, TURHAN Y, ÖZTURAN B, KILIÇ B, GÜLTEPE BS. *et al.* Effects of Local Application of Nano-silver on Osteomyelitis and Soft Tissue Infections: An Experimental Study in Rats. *J Bone Joint Infect.* 2018;3:43-49.

Kerem Turgut ATASOY <https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2017.vol31.0007>

KHAJURIA DK., RAZDAN R., MAHAPATRA D., Medicamentos para o tratamento da osteoporose: revisão. *Revista Brasileira de Reumatologia* 2011; 51: 372–382

KHAJURIA DK., RAZDAN R., MAHAPATRA DR., Descrição de um novo método de ooforectomia em ratas. *Revista Brasileira de Reumatologia* 2012; 52: 466–470.

KHEIRMAND-PARIZI M, GHAVIMI MA, FARMANBAR N, PARIVAR K. Effectiveness of strontium/silver-based titanium surface modifications on antibacterial and osteogenic performance: a systematic review. *Front Bioeng Biotechnol.* 2024;12:1346426.

KIERSZENBAUM AL, TRES LL. *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology.* 5th ed. Philadelphia: Elsevier; 2016.

KOGA H, KITAOKA T. On-paper Synthesis of Silver Nanoparticles for Antibacterial Applications. In: PEREZ, David Pozo (Org.). *Silver Nanoparticles.* Vukovar: In- tech, 2010. Cap. 14.

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.

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;97(8):624-32.

Kumar S, Nehra M, Kedia D, Dilbaghi N, Tankeshwar K, Kim KH. Nanotechnology-based biomaterials for orthopaedic applications: Recent advances and future prospects. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2020 Jan;106:110154. doi: 10.1016/j.msec.2019.110154. Epub 2019 Sep 2. PMID: 31753376.

KUNG JC, LIN YT, DING SJ. Antibacterial Activity of Silver-Containing 80S Bioactive Ceramic Powders against MRSA. *Nanomaterials* (Basel).

2020;10(7):1264.

KUO YJ, TSUANG FY, SUN JS, LIN CH, CHEN CH, LI JY. *et al.* Calcitonin inhibits sdcp-induced osteoclast apoptosis and increases its efficacy in a rat model of osteoporosis. PLoS ONE. 2012;7(7): E40272.

LANFAZANE RJ. Photobiomodulation, tissue and effects and bystanders. Photomed Laser Surg. 2011;29(8):519-20.

LEE DK. *et al.* Clinical validation of a nanodiamond-embedded thermoplastic biomaterial. Proc Natl Acad Sci USA. 2017;114(45):E9445-E9454.

LEE SS, RAO RR, ROCKWOOD DN. *et al.* Scaffolds for bone-tissue engineering: state of the art and new perspectives. Biofabrication. 2022;14(2):022001.

LEW DP, WALDVOGEL FA. Osteomyelitis. Lancet. 2004;364(9431):369-79.

LI Q. *et al.* Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. Water Res. 2008;42(18):4591-4602.

LIMA SS, BRAITENBACH BPF, LIMA FQ, MARCHIONNI T, MENDES CMC, MEDRADO ARAP. Análise quanti e semiquantitativa do colágeno no reparo tecidual – um estudo comparativo. Rev Cienc Med Biol. 2022;21(3):644-649.

Lin CY, Kang JH. Mechanical Properties of Compact Bone Defined by the Stress–Strain Curve Measured Using Uniaxial Tensile Test: A Concise Review and Practical Guide. *Materials*. 2021;14(15):4224.

LIN Z, RIOS HF, VOLK SL, SUGAI JV, JIN Q, GIANNOBILE WV. Gene expression dynamics during bone healing and osseointegration. J Periodontol. 2011;82(7):1007-1017.

LIU C. *et al.* Carbon dots-based drug delivery for bone regeneration. Front Bioeng Biotechnol. 2025;13:1613901.

LIU TC. *et al.* Homeostatic photobiomodulation. Front Optoelectron. 2009;2(1):1-8.

LIZARELLI, R.F.Z. Reabilitação biofotônica orofacial: fundamentos e protocolos clínicos. 2ed. São Carlos: Compacta; 2018.

LUGER E J, ROCHKIND S, WOLLMAN Y, KOGAN G, DEKEL S. Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. Lasers in Surgery and Medicine 1998;22:97-102.

MA C, LI Q, FAN J, LIN Q, ZHANG R, LYU M, *et al.* Biomechanics and mechanobiology of the bone matrix. Bone Res. 2022;10(1):45.

MAGRI AMP. *et al.* Photobiomodulation guided healing in a sub-critical bone defect in calvarias of rats. Laser Therapy. 2019;28(3):171-179.

MAHER N, MAHMOOD A, FAREED MA, KUMAR N, ROKAYA D, ZAFAR MS.

An updated review and recent advancements in carbon-based bioactive coatings for dental implant applications. *J Adv Res.* 2025;72:265-286.

Marcos RL, Arnold G, Magnenet V, Rahouadj R, Magdalou J, Lopes-Martins RÁ. Biomechanical and biochemical protective effect of low-level laser therapy for Achilles tendinitis. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2014 Jan;29:272-85. doi: 10.1016/j.jmbbm.2013.08.028. Epub 2013 Sep 9. PMID: 24126100.

Marcos RL, Evaristo MM, de Almeida-Mattos P, Capeloa CN, Aguilera Cantero JMM, Prates RA, Silva Junior JA, Serra AJ, Longo L, Parizotto NA, Lopes Martins RÁB. Photobiomodulation Controls the Expression of Lipoxin Receptors, Promoting the Resolution of the Inflammatory Process in an Experimental Tendinitis Model. *J Orthop Res.* 2025 May;43(5):1035-1044. doi: 10.1002/jor.26063. Epub 2025 Mar 5. PMID: 40045730.

Marcos RL, Leal Junior EC, Messias Fde M, de Carvalho MH, Pallotta RC, Frigo L, dos Santos RA, Ramos L, Teixeira S, Bjordal JM, Lopes-Martins RÁ. Infrared (810 nm) low-level laser therapy in rat achilles tendinitis: a consistent alternative to drugs. *Photochem Photobiol.* 2011 Nov-Dec;87(6):1447-52. doi: 10.1111/j.1751-1097.2011.00999.x. Epub 2011 Oct 7. PMID: 21910734.

MARSELL, R.; EINHORN, T. A. The biology of fracture healing. *Injury.* 2011;42(6):551-555.

MARSH H, HEINTZ EA, RODRIGUES-REINOSO F. Introduction to carbono Technologies. Alicante: Publicaciones de la Universidad de Alicante; 1997.

MATTOS PA., LABAT-MARCOS R., Efeito da Fotobiomodulação associada ao uso do Carvão Ativado no processo de reparo ósseo em tibia de ratos- aspectos morfológicos, bioquímicos e biomecânicos. Tese de Doutorado em Biofotônica, 2017.

MÉLLO, D.C. Terapia por fotobiomodulação modula a organização tecidual e manutenção das propriedades mecânicas em modelo experimental de lesão cutânea. São Paulo: UNINOVE, 2021.

MESCHER AL. Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas. 15th ed. New York: McGraw-Hill; 2018.

MIGUEL LDP. Avaliação comparativa do reparo ósseo em fêmur de ratos submetidos a enxerto bovino composto ou inorgânico. [Dissertação de Mestrado]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2009.

MIOT, H.A.; BRIANEZI, G. Análise morfométrica do colágeno dérmico a partir da segmentação por conglomerados (clusters) de cor. *Anais Brasileiros de Dermatologia.* 2010;85(3):361-4. doi: <https://doi.org/10.1590/S0365-05962010000300010>.

MIRANDA ES, CARDOSO FTS, MEDEIROS-FILHO JF, BARRETO ADR, TEIXEIRA RMM, WANDERLEY AL, FERNANDES KE. Organic and inorganic bone graft use in rabbits radius surgical fractures repair: na experimental and comparative stud. *Acta Ortop Bras.* 2005;13(5):245-248.

MOLETTA, N.R. Caracterização e aplicação do carvão ativado produzido a partir de biomassa amilácea. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

MORRISON JH., BRINTON RD., SCHIMIDT PJ., GORE AC., Estrogen, Menopause, and the Aging Brain: How Basic Neuroscience Can Inform Hormone Therapy in Women. *J Neurosci.* 2006;26(41):10332-10348.

MOURA J, TEIXEIRA LN, RAVAGNANI C, PEITL-FILHO O, ZANOTTO ED, BELOTI MM, PANZERI H, ROSA AL, OLIVEIRA PT. In vitro osteogenesis on a highly bioactive glass-ceramic (Biossilicate®). *J Biomed Mater Res.* 2007;82:545-557.

MURATA M. Collagen biology for bone regenerative surgery. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg.* 2012;38(6):321.

NAIR A. *et al.* Characterization of collagen response to bone fracture healing: SHG microscopy shows transition from Type II to Type I collagen. *Sci Rep.* 2022;12(1):17843.

OLIVEIRA MR. *et al.* Tissue Engineering. *J Craniofac Surg.* 2013;24(4):e394-e396.

OLIVEIRA P, FERNANDES KR, SPERANDOIS EF, PASTOR FA, NONAKAS KO, PARIZOTTO NA, RENNO ACM. 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.* 2012;47:102-107.

ORIMO, H. The mechanism of mineralization and the Role of Alkaline Phosphatase in Health and Disease. *J. Nippon Med Sch.* 2010, 77 (1).

OVSIANIKOV A, KHADEMHOSEINI A, MIRONOV V. The Synergy of Scaffold-Based and Scaffold-Free Tissue Engineering Strategies. *Trends Biotechnol.* 2018;36(4):348-357.

OZAWA Y, SHIMIZU N, KAARIYA G, ABIKO Y. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. *Bone* 1998;22:347-354.

OZAWA, Y.; SHIMIZU, N.; KARIYA, G.; ABIKO, Y. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at Early stages of cell culture in rat calvarial cells. 1998, apr. 22(4):347-54.

PALLOTTA RC., Avaliação do efeito da radiação laser de baixa potência e do plasma rico em fibrina na reparação óssea em ratos. 2014 doi:10.11606/t.42.2014.tde-25112014-143302

PALLOTTA, R.R.; BJORDAL, J.M.; FRIGO, L.; LEAL JUNIOR, E.C.; TEIXEIRA, S.; MARCOS, R.L. *et al.* Infrared (810-nm) low-level laser therapy on rat experimental knee inflammation. *Lasers Med Sci.* 2012; 27(1):71-8.

PEI X. *et al.* 3D-Printed Carbon Scaffolds With Osteoinductivity via Nanotopography-Mediated Mechanotransduction. *Adv Funct Mater.* 2025;35(42): 2505379.

PHANIENDRA, A.; JESTADI, D.B.; PERIYASAMY, L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 2020 Nov. 17]:30, 11–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25646037/>. Acesso: 16 nov. 2024.

PINHEIRO ALB, OLIVEIRA MAM, MARTINS PPM. Biomodulação da cicatrização óssea pósimplantar com o uso da laserterapia não-cirúrgica: Estudo por microscopia eletrônica de varredura. *Rev FOUFBA*. 2010;22:12-19.

PINHEIRO, A.L.B.; BRUGNERA JÚNIOR, A.; ZANIN, F.A.A. Aplicação do laser na odontologia. São Paulo: Ed. Santos, 2010.

PINHEIRO, A.L.B.; SOARES, L.G.P.; DA SILVA, A.C.P.; SANTOS, N.R.S.; DA SILVA, A.P.L.T.; NEVES, B.L.R.C.; *et al.* The use of photobiomodulation therapy or LED and mineral trioxide aggregate improves the repair of complete tibial fractures treated with wire osteosynthesis in rodents. *Lasers Med Sci*, v. 36, n. 4, p. 735-42, 2020.

PIRES ALR, BIERHALZ ACK, MORAES AM. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. *Quim. Nova*. 2015;38(7):957-971.

PIRES-OLIVEIRA, D.A.; OLIVEIRA, R.F; AMADEI, S.U.; PACHECO-SOARES, C.; ROCHA, R.F. Laser 904nm action on boner epairin rats with osteoporosis. *Osteoporos Int*. v. 12, p. 2109-14, 2010.

PLOTNIKOW I. Concerning the fundamental laws of photochemistry. *Transact Faraday Soc*. 1926;21(3):0484-0488.

PROKOPOVICH P, KÖBRICK M, BROUSSEAU E, PERNI S. Potent antimicrobial activity of bone cement encapsulating silver nanoparticles capped with oleic acid. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2015;103(2):273-281.

PUBLIO ML. *et al.* 2025. Activated Carbon As a Bone Substitute: Enhancing Mechanical and Morphological Properties in a Rat Tibia Defect Model. *J Adv Med Med Res*. 2025;37(1):23-40.

QIAO K, XU L, TANG J, WANG Q, LIM KS, HOOPER G, WOODFIELD TBF, LIU G, TIAN K, ZHANG W, CUI X. The advances in nanomedicine for bone and cartilage repair. *J Nanobiotechnol*. 2022;20(1):141.

Qing Y, Cheng L, Li R, Liu G, Zhang Y, Tang X, Wang J, Liu H, Qin Y. Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies. *Int J Nanomedicine*. 2018 Jun 5;13:3311-3327. doi: 10.2147/IJN.S165125. PMID: 29892194; PMCID: PMC5993028.

RENNO ACM. *et al.* Effects of 808 nm laser therapy on bone tissue repair in rats: histological and biomechanical evaluation. *Photomedicine and Laser Surgery*.

2017;35(1):31-38.

RESWAN K, CHEN QZ, BLAKER JJ, BOCCACCINI AR. Biodegradable and bioactive porous Polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomater.* 2006;27(18):3413-3431.

RIBEIRO GV, RIGO C, VARGAS AC, GRESSLER LT, FOLETTTO EL. Obtenção de carvão ativado impregnado com íons metálicos para fins bactericida. *In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina.* 2015.

ROCHA WD. Carvão ativado a partir de resíduos agrícolas e suas aplicações na adsorção de íons metálicos. [Dissertação de Mestrado]. Ouro Preto: Universidade Federal de Ouro Preto; 2006.

RODRIGUES, E. Efeitos da fotobiomodulação na reabilitação de pacientes com patologias traumato-ortopédicas: revisão integrativa. *Revista Ciência Plural.* 2024; 10(1): e31518.

RHO JY, KUHN-SPEARING L, ZIOUPOS P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Med Eng Phys.* 1998;20(2):92-102.

ROSS MH. *Histologia. Texto e Atlas.* 2ª ed. São Paulo: Média Panamericana, 1989.

ROSS MH, PAWLINA W. *Histología. Correlación con biología celular y molecular.* Barcelona: Wolters Kluwer, 2016.

ROSS MH, PAWLINA W. *Histology: A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology.* 8th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2020.

ROSSI JO, ARAUJO EMC, CAMARGO MEC, FERREIRA JUNIOR RS, BARRAVIERA B, MIGLINO MA, NOGUEIRA DMB, REIS CHB, GIL GE, VINHOLO TR, SOARES TP, BUCHAIM RL, BUCHAIM DV. Effectiveness of the association of fibrin scaffolds, nanohydroxyapatite, and photobiomodulation with simultaneous low-level red and infrared lasers in bone repair. *Materials (Basel).* 2024;17(17):4351.

ROWE PSN. Physiology, Bone Remodeling. *In: StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.

SALEH BEA, TEICH MC. *Fundamentals of photonics.* New Jersey: John Wiley & Sons; 2007.

Salehpour F, Cassano P, Rouhi N, Hamblin MR, De Taboada L, Farajdokht F, Mahmoudi J. Penetration Profiles of Visible and Near-Infrared Lasers and Light-Emitting Diode Light Through the Head Tissues in Animal and Human Species: A Review of Literature. *Photobiomodul Photomed Laser Surg.* 2019 Oct;37(10):581-595. doi: 10.1089/photob.2019.4676. Epub 2019 Sep 25. PMID: 31553265.

Sánchez-López E, Gomes D, Esteruelas G, Bonilla L, Lopez-Machado AL,

Galindo R, Cano A, Espina M, Ettcheto M, Camins A, Silva AM, Durazzo A, Santini A, Garcia ML, Souto EB. Metal-Based Nanoparticles as Antimicrobial Agents: An Overview. *Nanomaterials* (Basel). 2020 Feb 9;10(2):292. doi: 10.3390/nano10020292. PMID: 32050443; PMCID: PMC7075170.

SANTOS, H.S.; MAYNARD, L.G.; SALES, T.O.; BARROS, P.C.; TEIXEIRA, M.M.; MOTA, F.M.B.; SILVA Jr.; J.C.; SANTOS, A.E.G. O Potencial terapêutico da fotobiomodulação no manejo do AVC: uma revisão sistemática. *Brazilian Journal of Health Review*, Curitiba, v. 7, n. 2, p. 01-13, mar./apr., 2024.

SEREDYCH M, CHARMAS B, JABŁÓŃSKA-PIKUS T, GIERAK A. Preparation of synthetic carbon adsorbents and investigation on porous structure of obtained adsorbents with α s method. *Mater Chem Physics*. 2003;82(1);165-172.

SIEVERTS M. *et al.* Unraveling the effect of collagen damage on bone fracture toughness. *Nat Commun*. 2022;13(1):1234.

SILVA SK, PLEPIS AMG, MARTINS VDCA, HORN MM, BUCHAIM DV, BUCHAIM RL, PELEGRINE AA, SILVA VR, KUDO MHM, FERNANDES JFR, NAZARI FM, DA CUNHA MR. Suitability of Chitosan Scaffolds with Carbon Nanotubes for Bone Defects Treated with Photobiomodulation. *Int J Mol Sci*. 2022;23(12):6503.

SIMS NA, MARINO S, GOLDRING SR. Osteoclast-derived coupling factors: origins and state-of-play. *J Bone Miner Res*. 2024;39(10):1377-96.

SIMÕES, H.B. Efeito da fotobiomodulação laser no reparo de defeitos ósseos em fêmur de ratos preenchidos ou não com cimentos à base de silicato de cálcio. Salvador: UFBA, 2022.

SMITH KC. The photobiological basis of low level laser radiation therapy. *Laser Ther*. 1991;3:19-24.

SONG P, XU B, TIAN Y. *et al.* Programmable biomaterials for bone regeneration. *Matter*. 2024;7(3):782-804.

SOURVANOS, D.; POON, J.; LANDER, B; *et al.* Improving Titanium Implant Stability with Photobiomodulation: A Review and Meta-Analysis of Irradiation Parameters. *Photobiomodul Photomed Laser Surg*. 2023;41(3):93-103.

SOUZA DTC., NETO LFM., *Laserterapia no Reparo Ósseo*. 2010

SOUZA MPG. Diagnóstico e tratamento da osteoporose – Artigo de atualização. *Revista Brasileira de Ortopedia*, vol.45 n3, maio/junho 2010.

SOUZA, S.L.S. ALMEIDA, A.L.P.F.; FREITAS, N.R. *Regeneração óssea guiada associada à fotobiomodulação*. São Paulo: FOB/USP, 2023. Disponível em: <https://revistaimplantnews.com.br/fotobiomodulacao-e-biomateriais/>. Acesso: 18 nov. 2024.

SPEZZIA S. Biomateriais. *Rev Fac Cienc Med*. 2020;22(2):83-4.

TABAKOGLU, H.O.; SANI, M.M.; UBA, A.I.; ABDULLAHI, U.A. Assessment of circular wound healing in rats after exposure to 808-nm laser pulses during specific healing phases. *Lasers Surg Med.* 2016; 48:409-15.doi: <https://doi.org/10.1002/lsm.22462>.

Tim CR, Pinto KN, Rossi BR, Fernandes K, Matsumoto MA, Parizotto NA, Rennó AC. Low-level laser therapy enhances the expression of osteogenic factors during bone repair in rats. *Lasers Med Sci.* 2014 Jan;29(1):147-56. doi: 10.1007/s10103-013-1302-9. Epub 2013 Mar 21. PMID: 23515631.

TIM, C.R.; BOSSINI, P.S.; KIDO, H.W.; MALAVAZI, I.; KRESS, M.R.V.; CARAZZOLLE, M.F.; *et al.* Low-level laser therapy induces an upregulation of collagen gene expression during the initial process of bone healing: a microarray analysis. *J Biomed Opt*, v.21, n.8, p.1-9, 2016b.

TRELLES MA, MAYAYO E. Bone Frature Consolidates Faster With Low Power Laser. *Lasers In Surgery and Medicine* 1987;7:36-45.

VIEIRA JCAGH. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 1999; 43(6):415-422.

VILLA-FORTE, A. Ossos. Manual MSD. Versão Saúde para a família. Publicado em 22 set. 2022. Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt/casa/dist%C3%BArbios-%C3%B3sseos-articulares-e-musculares/biologia-do-sistema-musculoesquel%C3%A9tico/ossos>. Acesso: 18 nov. 2024.

VINCENZO G, MARCOS NG, IROCY GK. Fatores de crescimento e diferenciação óssea. Efeitos sobre o processo de consolidação da fratura: Presente e futuro. *Rev Bras Med.* 2000.

YU H, ZHANG J, TIAN L, WANG G, ZHAO Z. Repair mechanisms of bone system tissues based on single-cell transcriptome analysis. *Cell Biol Toxicol.* 2025;41(1):45-60.

WANG F, METZNER F, OSTERHOFF G, ZHENG L, SCHLEIFENBAUM S. The role of bone marrow on the mechanical properties of trabecular bone: a systematic review. *BioMedical Eng OnLine.* 2022;21(1):80.

WANG H. A review of the effects of collagen treatment in clinical studies. *Polymers.* 2021;13(22):3868.

WEI H, LUO Y, LI W. *et al.* Recent advances in smart stimuli-responsive biomaterials for bone therapeutics and regeneration. *Bone Res.* 2022;10(1):14.

WEN X, ZHANG Y, LI T. *et al.* Zinc-based biomaterials for bone repair and regeneration. *J Mater Chem B.* 2023;11(34):6934-6948.

Zhang H, Yang L, Yang XG, Wang F, Feng JT, Hua KC, Li Q, Hu YC. Demineralized Bone Matrix Carriers and their Clinical Applications: An Overview. *Orthop Surg.* 2019 Oct;11(5):725-737. doi: 10.1111/os.12509. Epub 2019 Sep 8.

PMID: 31496049; PMCID: PMC6819172.

ZHANG LY, LI X, LI J, YANG Z, WU J. Recent Advances in Biomaterials for the Treatment of Bone Defects. *Organogen*. 2020;16(4):113-125.

ZECHA, J.A.E.M. *et al*. Low level laser therapy/photobiomodulation in the management of side effects of chemoradiation therapy in head and neck cancer: part 1: mechanisms of action, dosimetric, and safety considerations. *Support Care Cancer*. 2020 Nov 17;24(6):2781-92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26984240/>. Acesso: 16 nov. 2024.

ZOROWITZ, R.D.; GILLARD, P.J.; BRAININ, M. Poststroke spasticity: sequelae and burden on stroke survivors and caregivers. *Neurology*, v. 80, n. 3 Supplement 2, p. S45-S52, 2023.

8- ANEXO

Anexo A – Certificado Comissão de Ética no Uso de Animais



Universidade Nove de Julho
*Comissão de Ética no
 Uso de Animais*

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Biomateriais de Carbono e Compósitos (carbono-óxido de grafeno-nanopartículas de prata-grafeno) em reparo ósseo", protocolada sob o CEUA nº 8675271021 (ID 000275), sob a responsabilidade de **Rodrigo Labat Marcos** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho (CEUA/UNINOVE) na reunião de 08/12/2021.

We certify that the proposal "Carbon and Composite Biomaterials (carbon-graphene oxide-silver-graphene nanoparticles) in bone repair", utilizing 60 Heterogenics rats (60 males), protocol number CEUA 8675271021 (ID 000275), under the responsibility of **Rodrigo Labat Marcos** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Nove de Julho University (CEUA/UNINOVE) in the meeting of 12/08/2021.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 12/2021 a 12/2023 Área: Biofotônica Aplicada Às Ciências da Saúde

Origem: Biotério - Unidade Vergueiro

Espécie: Ratos heterogênicos

Linhagem: Wistar

sexo: Machos

idade: 3 a 6 meses

Peso: 250 a 350 g

Quantidade: 60

São Paulo, 20 de setembro de 2024


 Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos
 Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Universidade Nove de Julho


 Profa. Dra. Stella Regina Zamuner
 Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Universidade Nove de Julho