



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

RODOLPHO JOSÉ DA SILVA BARROS

**DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAL ÓSSEO
DESCELULARIZADO ENRIQUECIDO COM HIDROGEL DE OSSO
FETAL BOVINO**

VITÓRIA, ES

2024

RODOLPHO JOSÉ DA SILVA BARROS

**DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAL ÓSSEO
DESCELULARIZADO ENRIQUECIDO COM HIDROGEL DE OSSO
FETAL BOVINO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira

VITÓRIA, ES

2024

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

B277d Barros, Rodolpho José da Silva, 1986-
DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAL ÓSSEO
DESCELULARIZADO ENRIQUECIDO COM HIDROGEL
DE OSSO FETAL BOVINO / Rodolpho José da Silva Barros. -
2024.
155 p. : il.

Orientador: Breno Valentim Nogueira.
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal
do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

I. Nogueira, Breno Valentim. II. Universidade Federal do
Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Ata da 31ª sessão de Defesa de Tese do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, do discente Rodolpho José da Silva Barros, realizada às nove horas do dia dez de outubro de dois mil e vinte e quatro, tese intitulada “DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAL ÓSSEO DESCELULARIZADO ENRIQUECIDO COM HIDROGEL DE OSSO FETAL BOVINO”. A sessão pública foi realizada em formato online, por meio de videoconferência. O presidente da Banca, Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira (orientador), apresentou os demais membros da comissão examinadora constituída pelos Doutores: Marco Cesar Cunegundes Guimarães, membro titular interno; Jairo Pinto de Oliveira, membro titular interno à Ufes; Carlos Magno da Costa Maranduba, membro titular externo à UFES e Rafaela Aires, membro titular externo à UFES e em seguida, passou a palavra para o aluno que apresentou a sua proposta de Tese. Terminada a apresentação, a banca reuniu-se em separado e concluiu por considerar o doutorando **APROVADO** na defesa de Doutorado. Eu, Breno Valentim Nogueira, que presidi a Banca de defesa, assino a presente Ata, juntamente aos demais membros e dou fé. Vitória, 10 de outubro de 2024.

Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira - Orientador
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães – Membro titular interno
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Jairo Pinto de Oliveira – Membro titular interno à UFES
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof.- Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba - Membro titular externo à UFES
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa.- Dra. Rafaela Aires - Membro titular externo à UFES
Universidade de Vila Velha

Documento assinado digitalmente
 **CARLOS MAGNO DA COSTA MARANDUBA**
Data: 15/10/2024 21:01:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>



Campus Universitário Maruípe – Av. Maruípe, 1468 – Maruípe, Vitória – ES | 29047-185 |
Tel. e Fax: (27) 3335-9501 | <http://www.biotecnologia.ufes.br/> | pgbiotecnologia@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
BRENO VALENTIM NOGUEIRA - SIAPE 2499820
Departamento de Morfologia - DM/CCS
Em 14/10/2024 às 17:47

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link: <https://api-lepisma.prod.uks.ufes.br/arquivos-assinados/1011054?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
MARCO CESAR CUNEGUNDES GUIMARAES - SIAPE 2622289
Departamento de Morfologia - DM/CCS
Em 14/10/2024 às 17:49

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link: <https://api-lepisma.prod.uks.ufes.br/arquivos-assinados/1011056?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
JAIRO PINTO DE OLIVEIRA - SIAPE 3831306
Departamento de Morfologia - DM/CCS
Em 14/10/2024 às 18:25

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link: <https://api-lepisma.prod.ukf.ufes.br/arquivos-assinados/1011076?tipoArquivo=O>



Documento assinado digitalmente

RAFAELA AIRES

Data: 16/10/2024 10:53:26-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

RODOLPHO JOSÉ DA SILVA BARROS

**DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAL ÓSSEO
DESCELULARIZADO ENRIQUECIDO COM HIDROGEL DE OSSO
FETAL BOVINO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Avaliada em 11 de outubro de 2024.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira

Universidade Federal do Espírito Santo

Orientador

Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba

Universidade Federal de Juiz de Fora

Examinador Externo

Prof. Dr. Jairo Pinto de Oliveira

Universidade Federal do Espírito Santo

Examinador Externo

Profa. Dra. Rafaela Aires

Universidade Vila Velha

Examinador Externo

Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães

Universidade Federal do Espírito Santo

Examinador Interno

VITÓRIA, ES

2024

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e do discernimento. Pela força concedida para mudar o que pode ser mudado, pela resignação para aceitar o que não pode ser mudado, e sobretudo pela sabedoria para poder distinguir uma coisa da outra.

A toda minha família, pelo apoio incondicional em todos os momentos. De maneira especial aqui são representados especialmente por minha esposa Brunna e meu filho Augusto José, que transmitem todo o amor e força que me impulsiona incansavelmente todos os dias pela busca de nossos sonhos e conquistas familiares.

A toda equipe “Bioboners”, em especial aqui representados por Affonso, Thaís e Fernanda e Ezio, saibam que este trabalho não poderia ter sido realizado sem a imensa colaboração de vocês. As mãos e dedicação de vocês estiveram incansavelmente e atuantes em todas as etapas desta pesquisa. Que time, muito obrigado!

Ao querido amigo, professor e orientador Dr. Breno Valentim Nogueira, pela oportunidade, parceria, pelos ensinamentos contínuos na vida acadêmica e pessoal, pelo exemplo de integridade, educação, cordialidade e espiritualidade que representa para todos que estão à sua volta. Que honra foi participar desse trabalho e desfrutar mais um tempo da vida ao seu lado. Valeu mesmo, muito obrigado mestre!

Ao Professor e amigo Dr. Jairo Pinto de Oliveira por todo apoio no desenvolvimento dos ensaios da pesquisa, pelas horas incessantes na discussão de metodologias, interpretação de resultados, revisão de textos, bem como pela pronta disponibilidade na avaliação do presente trabalho. Faço questão também de lembrar que você sempre esteve comigo desde o primeiro osso serrado, quando ainda nem sabíamos por quais caminhos iríamos passar. Obrigado amigo!

Aos Professores, Dra Flávia de Paula, Dra Rafaela Aires, Dr. Marco Cunegundes e Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba, pela humildade e disponibilidade, e por também contribuírem desde o primeiro momento com o desenvolvimento e análise

do presente trabalho. Pelo enriquecimento sempre nobre das discussões em prol do desenvolvimento científico, minha sincera gratidão!

À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), em especial ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC), ao Núcleo de Bioengenharia Tecidual NBT, ao Núcleo de Genética Humana e Molecular – NGHM, ao Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR), ao Laboratório de Fisiologia Molecular e Inteligência Artificial – PPGCF, e ao Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares (LABIOM).

Aos amigos e companheiros de trabalho do Biotério Central do CCS/UFES, Jailson Melo Henriques e José dos Santos Amaral, sem vocês no suporte das ações este caminho certamente teria sido mais longo.

Ao frigorífico Mafrical por ceder as amostras de tecido ósseo *in natura*, bem como, ao Instituto Federal do Espírito Santo (IFES), aqui representado de modo especial pelo Professor Dr. Thiago de Melo Costa Pereira, imenso parceiro e colaborador de nosso grupo científico e trabalhos de pesquisa.

Às agências de fomento da pesquisa: a Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES): Edital No 01/2020 – SPIN OFF; T.O. No 105/2021), a CAPES e ao ICEPI.

“Senhor, graças e louvores sejam dados a todo momento
Quero te louvar na dor, na alegria e no sofrimento
E se em meio à tribulação, eu me esquecer de ti
Ilumina minhas trevas com tua luz”

Nelsinho Corrêa

RESUMO

BARROS, R.J.S. **Desenvolvimento de biomaterial ósseo descelularizado enriquecido com hidrogel de osso fetal bovino**. 2024. 155 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo, Brasil.

O mercado global de materiais de enxerto ósseo está projetado para crescer a uma taxa de 6-7% ao ano até 2032. As estratégias convencionais de enxerto ósseo já não são consideradas suficientes ou adequadas para a maioria dos tratamentos. O desenvolvimento de biomateriais descelularizados derivados de tecidos de origem animal (xenoenxertos) oferece uma estratégia promissora e viável. A similaridade estrutural entre os ossos animais e humanos, juntamente com a técnica de descelularização, pode resultar em um biomaterial de alta qualidade, que oferece suporte mecânico, preserva a matriz orgânica e fornece estímulos biológicos essenciais para a regeneração tecidual. Ossos bovinos adultos e fetais foram descelularizados para a produção de biomateriais (blocos, grânulos e hidrogel) com níveis residuais de DNA inferiores a 50 ng/mg e níveis de SDS abaixo de 2 µg/mg de tecido seco. Ensaios termogravimétricos (DSC e TGA) e espectroscopia de infravermelho (FTIR e Raman) demonstraram a adequada preservação das matrizes ósseas mineral e orgânica. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a análise de composição elementar (EDS e CHNS-O) confirmaram a preservação da microestrutura e da composição bioquímica da matriz óssea. Estabilidade de pH, ausência de metais pesados e a esterilidade foram comprovadas. Testes comparativos demonstraram que os biomateriais descelularizados, particularmente os derivados de osso fetal, apresentam superioridade em porosidade, densidade, capacidade de suporte mecânico e composição orgânica em comparação com outros biomateriais. Testes in vitro revelaram ausência de citotoxicidade e maior capacidade de estimular a proliferação de células mesenquimais e fibroblastos. Os resultados indicam que a produção de biomateriais de osso bovino descelularizado revestido com hidrogel fetal pode contribuir para uma melhor biocompatibilidade dos implantes e ajudar a suprir a demanda global por materiais de enxerto ósseo.

Palavras-chave: Biomateriais, descelularização óssea, matriz extracelular, enxerto ósseo, osso fetal, hidrogel.

ABSTRACT

BARROS, R.J.S. **Development of a decellularized bone biomaterial enriched with fetal bovine bone hydrogel.** 2024. 155 p. Thesis (Doctorate in Biotechnology) – Postgraduate Program in Biotechnology, UFES, Espírito Santo, Brazil.

The global bone graft material market is projected to grow at a rate of 6-7% annually until 2032. Conventional bone grafting strategies are no longer considered sufficient or adequate for most treatments. The development of decellularized biomaterials derived from animal tissues (xenografts) offers a promising and viable strategy. The structural similarity between animal and human bones, along with the decellularization technique, can result in a high-quality biomaterial that provides mechanical support, preserves the organic matrix, and supplies essential biological stimuli for tissue regeneration. Adult and fetal bovine bones were decellularized to produce biomaterials (blocks, granules, and hydrogel) with residual DNA levels lower than 50 ng/mg and SDS levels below 2 µg/mg of dry tissue. Thermogravimetric assays (DSC and TGA) and infrared spectroscopy (FTIR and Raman) demonstrated the adequate preservation of both the mineral and organic bone matrices. Scanning electron microscopy (SEM) and elemental composition analysis (EDS and CHNS-O) confirmed the preservation of the microstructure and biochemical composition of the bone matrix. pH stability, absence of heavy metals, and sterility were verified. Comparative tests showed that the decellularized biomaterials, particularly those derived from fetal bone, exhibit superior porosity, density, mechanical support capacity, and organic composition compared to other biomaterials. In vitro tests revealed no cytotoxicity and a higher ability to stimulate the proliferation of mesenchymal cells and fibroblasts. The results indicate that the production of decellularized bovine bone biomaterials coated with fetal hydrogel could contribute to better biocompatibility of implants and help meet the global demand for bone graft materials.

Keywords: Biomaterials, bone decellularization, extracellular matrix, bone graft, fetal bone, hydrogel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Composição química e estrutura multiescala do osso natural (Gao et al, 2017.).....	27
Figura 2 - Diferenciação de osteoblastos e osteoclastos do tecido ósseo (adaptado de SROMOVA et al., 2023.).....	29
Figura 3 - Identificação das principais regiões anatômicas de ossos longos e chatos (Adaptado de FORTE, Y. S., 2022.).....	30
Figura 4 - Localização do periósteo e endósteo no tecido ósseo (Adaptado de FORTE, Y. S., 2022.).....	32
Figura 5 - Etapas da ossificação intramembranosa. (a) Agrupamento de células mesenquimais, diferenciação em osteoblastos e formação do centro de ossificação. (b) Aprisionamento de osteoblastos no osteóide e diferenciação em osteócitos. (c) Formação de trabéculas e periósteo. (d) Formação de osso cortical na face externa do osso trabecular. (Adaptado de FORTE, Y. S., 2022.).....	34
Figura 6 - Etapas da ossificação endocondral. (a) Diferenciação de células mesenquimais em condrócitos com produção do molde cartilaginoso do futuro tecido ósseo. (b) Os vasos sanguíneos na borda do modelo de cartilagem trazem osteoblastos que depositam um colar ósseo. (c) Os capilares penetram na cartilagem formando o centro primário de ossificação. (d) Crescimento cartilaginoso nas extremidades e remodelamento ósseo na cavidade medular. (e) Formação do centro secundário de ossificação. (f) Permanência de cartilagem hialina na placa de crescimento e na superfície articular. (Adaptado de Oregon State Education.).....	36
Figura 7 - Remodelamento ósseo. (Adaptado de FORTE, Y. S., 2022.).....	38
Figura 8 - Estágios progressivos do reparo ósseo: (a) Coagulação e formação do hematoma da lesão. (b) Formação de calos internos e externos. (c) Substituição da cartilagem dos calos por osso trabecular. (d) Remodelação óssea. (Adaptado de Oregon State Education.).....	40
Figura 9 - Esquema ilustrativo da implantação de um biomaterial de implante como material de enxerto para o reparo ósseo. (Adaptado de LI et al., 2022.).....	41
Figura 10 - Esquema ilustrativo da classificação de enxertos e materiais substitutos ósseos utilizados em odontologia. (Adaptado de Zhao et al., 2021.).....	44

Figura 11 - Esquema representativo das principais alternativas de enxerto investigadas para regeneração do tecido ósseo (BATTAFARANO et al., 2021.).....	48
Figura 12 - Valor de DNA Residual (ng/mg) por peso seco de ossos descelularizados (FD e AD) e seus respectivos controles (osso in natura, FC e AC). Fetal Controle (FC, n=12), Fetal Descelularizado (FD, n=12), Adulto Controle (AC, n=12) e Adulto Descelularizado (AD, n=12). Os dados estão expressos em média $\pm$ EPM; (*p<0,0001 FC vs FD; # p<0,0001 AC vs AD; Teste t de Student não pareado).	76
Figura 13 - (A) Concentração percentual de SDS residual presente nos biomateriais adulto e fetal na apresentação bloco em função do número de lavagens em PBS durante o processo de descelularização. (B) Valor percentual correspondente à remoção de SDS dos mesmos materiais durante as respectivas lavagens.	77
Figura 14 - Concentração percentual (%) de SDS residual no tecido ósseo fetal (bloco) e no efluente de lavagem (PBS) durante o processo de descelularização...	80
Figura 15 - Teste de Compressão de biomateriais liofilizados (apresentação bloco, n=5). (A) Valor de carga máxima total (N) suportada por unidade de amostral. (B) Valor de carga máxima total (N) corrigido pelo valor da massa (mg) da unidade amostral. Os dados estão expressos em média $\pm$ EPM; (*p<0,0001 Bio-Oss Collagen vs Fetal Descelularizado; #p<0,0001 Bio-Oss Collagen vs Adulto Descelularizado; †p<0,0002 FD vs AD; ANOVA de uma via, pos hoc Teste de Tukey).....	86
Figura 16 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de cortes transversais de osso fetal bovino descelularizado nas apresentações bloco (A, C e E) e grânulo (B, D e F), sem revestimento (A e B) e com revestimento por hidrogel (C, D, E e F). Barra de escala: 100 μ m e 50 μ m respectivamente.....	88
Figura 17 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de cortes transversais de osso adulto bovino descelularizado nas apresentações bloco (A, C e E) e grânulo (B, D e F), sem revestimento (A e B) e com revestimento por hidrogel (C, D, E e F). Barra de escala: 100 μ m e 50 μ m respectivamente.....	89

Figura 18 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de cortes transversais dos biomateriais Bio-Oss®-Geistlich (A), Cerabone®-Straumann (B), Fetal descelularizado (C) e Adulto descelularizado (D) submetidos ao ensaio de porosidade. Barra de escala: 500 µm.....	92
Figura 19 - Tamanho médio dos poros (µm) analisado nos diferentes biomateriais (n=80): Bio-Oss®-Geistlich, Cerabone®-Straumann, Fetal descelularizado (FD) e Adulto descelularizado (AD). Os dados estão expressos em média ± EPM; (*p<0,0001 Bio-Oss vs Cerabone; #p<0,0001 Bio-Oss vs AD; †p<0,0001 Cerabone vs FD; &p<0,0001 FD vs AD; ANOVA de uma via, pos hoc Teste de Tukey).....	93
Figura 20 - Análise da Composição Elementar CHNS-O dos nas amostras de diferentes biomateriais (n=6): Bio-Oss®-Geistlich, Orthogen®-Baumer, fetal descelularizado (FD) e adulto descelularizado (AD). Os dados estão expressos em média ± EPM.....	97
Figura 21 - Análise do valor de massa percentual correspondente ao teor de matriz orgânica, proteínas e matriz mineral (cinzas) de diferentes biomateriais processados por combustão completa em analisador CHNS-O.....	99
Figura 22 - Análise Termogravimétrica (TGA) de biomaterial fetal.	101
Figura 23 - Análise termogravimétrica (TGA) de biomaterial adulto.....	102
Figura 24 - Análise termogravimétrica (DSC) de biomaterial fetal.....	105
Figura 25 - Análise termogravimétrica (DSC) de biomaterial Adulto.....	106
Figura 26 - Espectro da Análise por FTIR das amostras de diferentes biomateriais (n=3): Bio-Oss Collagen®-Geistlich, Orthogen®-Baumer, fetal descelularizado (FD) e adulto descelularizado (AD).....	108

Figura 27 - Espectro da Análise do Espalhamento Raman Normalizado das amostras de diferentes biomateriais (n=3): Bio-Oss Collagen®-Geistlich, Fetal Descelularizado (FD) e Adulto Descelularizado (AD). (A) Espectro Raman Normalizado das diferentes amostras analisadas com potência do laser na amostra de ~300 mW (B) Espectro Raman Normalizado das diferentes amostras analisadas com potência do laser na amostra de ~80 mW..... 112

Figura 28 - Resultado da análise de esterilidade para amostras de osso adulto (AG 76-78) e fetal (FG 02-04) 114

Figura 29 - Aspecto das amostras de biomateriais fetal descelularizado revestido com hidrogel de ECM-fb liofilizado envasadas antes (a) e após (b) processo esterilização por gama com dose de 17,5 kGy.....115

Figura 30 - Resultado da análise de endotoxinas das amostras de osso adulto (AG 01) e fetal (FG 05) 117

Figura 31 - Resultado da análise do teste de pirogênio in vivo da amostra de biomaterial fetal (FG 11-18) 118

Figura 32 - Gráfico da análise do teste de viabilidade celular média in vitro de amostras de biomaterial fetal e adulto descelularizados revestidas com hidrogel de ECM-fb liofilizado (n=3)..... 120

Figura 33 - Resultado da análise do teste de viabilidade celular média in vitro de amostras de biomaterial fetal e adulto descelularizados revestidas com hidrogel de ECM-fb liofilizado (n=3). Valores expressos em média $\pm$ EPM. (*p<0,05 FD vs Demais Grupos; #p<0,05 AD vs Demais Grupos; ANOVA de duas vias, pos hoc Tukey)..... 120

Figura 34. Gráfico do padrão da titulação de pH de amostras estéreis de biomaterial fetal descelularizado revestido com hidrogel de ECM-fb sob manutenção em diferentes veículos de diluição..... 123

Figura S1 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de super resolução de fibras colágenas que formam a cobertura do hidrogel sobre o biomaterial ósseo fetal descelularizado. MEV-FEG, Equipamento Apreo 2 - ThermoFischer, magnificação 10.000 x e 20.000 x.....	145
Figura S2 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de super resolução de fibras colágenas que formam a cobertura do hidrogel sobre o biomaterial ósseo fetal descelularizado. MEV-FEG, Equipamento Apreo 2 - ThermoFischer, magnificação 10.000 x e 20.000 x.....	146
Figura S3 – Identificação visual da marca da empresa Biobone, Bioengenharia Tecidual Em Enxertos Osseos LTDA, CNPJ: 37.727.835/0001-58.....	149
Figura S4 – Pesquisa do Mercado Nacional (Brasil) de enxertos ósseos em 2019. Fonte: IQVIA™ Confidential - Market Sizing Kheiros (2019). Dados provenientes de pesquisa primária (n = 22 especialistas da área).....	150

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média e erro padrão médio (EPM) das densidades real e aparente (g/cm ³) de biomateriais adulto (n=5) e fetal (n=5) descelularizados.....	82
Tabela 2 - Médias e erro padrão da média (EPM) dos elementos químicos identificados por energia dispersiva de raios-x (EDS) nas amostras de diferentes biomateriais (n=3): Bio-Oss®-Geistlich, Cerabone®-Straumann, fetal descelularizado (FD) e adulto descelularizado (AD).....	95
Tabela 3 - Médias e erro padrão da média (EPM) dos valores percentuais em massa dos elementos químicos CHNS-O identificados por combustão completa em amostras de diferentes biomateriais (n=6): Bio-Oss®-Geistlich, Orthogen®-Baumer, fetal descelularizado (FD) e adulto descelularizado (AD).....	97
Tabela 4 - Médias e desvio padrão dos valores de viabilidade celular de amostras de biomaterial fetal descelularizado revestido com hidrogel de ECM-fb liofilizado (FD, n=3).....	121
Tabela 5 - Média e desvio padrão (incerteza) da concentração de metais pesados nas amostras de osso bovino fetal descelularizado revestido com hidrogel de ECM-fb (n=3).....	124
Tabela S1 - Lista de reagentes utilizados na pesquisa.....	143

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D – Tridimensional

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas

AC - Adulto Controle

AD - Adulto Descelularizado

CCS – Centro de Ciências da Saúde

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CGRE - Coordenação Geral de Acreditação do INMETRO

CPID – Centro De Pesquisa, Inovação E Desenvolvimento

CTM's – Células-Tronco Mesenquimais

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

ECM – Matriz Extracelular

ECM-fb – Matriz extracelular de osso fetal

EDS - Espectroscopia de Raios X por Energia Dispersiva

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

EUA - Estados Unidos da América

FAPES – Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo

FC – Fetal Controle

FD – Fetal Descelularizado

FTIR - Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

HCl – Ácido Clorídrico

ICEPI - Instituto Capixaba de Ensino, Pesquisa e Inovação em Saúde

IFES - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

ISO/IEC – International Organization for Standardization / International Electrotechnical Commission

LABION - Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares

LACAR - Laboratório de Caracterização Ambiental

LUCCAR - Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins

MEC – Matriz Extracelular

MEV – Microscopia Eletrônica De Varredura

MTT – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide

N – Nitrogênio

NaCl – Cloreto De Sódio

NaOH – Hidróxido De Sódio

NBR - Norma Brasileira

NBT – Núcleo De Bioengenharia Tecidual

NGHM – Núcleo de Genética Humana e Molecular

PBS – Tampão Fosfato De Sódio

pH – Potencial Hidrogeniônico

SDS – Dodecil Sulfato De Sódio

SFB – Soro Fetal Bovino

SIF/MAPA – Inspeção Federal do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Tris-HCl – Tris Hidroximetil Aminometano Cloridrato (Hcl)

TSB – Caldo de Caseína da Soja

UFES - Universidade Federal Do Espírito Santo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1 O TECIDO ÓSSEO.....	25
2.2 FORMAÇÃO ÓSSEA.....	32
2.3 REMODELAMENTO ÓSSEO.....	37
2.4 CICATRIZAÇÃO E REPARO ÓSSEO.....	38
2.5 MATERIAIS DE IMPLANTE E DE ENXERTO PARA TRATAMENTO ÓSSEO.....	41
2.6 BIOENGENHARIA DE TECIDOS ÓSSEOS.....	43
2.6.1 Biomateriais Substitutos Ósseos.....	44
2.6.2 Desenvolvimento de Substitutos Ósseos por Descelularização.....	48
3 JUSTIFICATIVA.....	53
4 OBJETIVOS.....	54
4.1 OBJETIVO GERAL.....	54
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	54
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
5.1 COLETA DO MATERIAL.....	55
5.2 DESCELULARIZAÇÃO.....	56
5.2.1 Descelularização de Osso Bovino Fetal.....	57
5.2.2 Descelularização de Osso Bovino Adulto.....	57
5.3 PRODUÇÃO DO HIDROGEL.....	58
5.4 BIOMATERIAL DESCELULARIZADO REVESTIDO COM HIDROGEL.....	59
5.5 ANÁLISE DO PROCESSO DE DESCELULARIZAÇÃO.....	60
5.5.1 Quantificação de DNA Residual.....	60
5.5.2 Quantificação de SDS residual.....	61
5.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS BIOMATERIAIS DESCELULARIZADOS ENRIQUECIDOS COM HIDROGEL.....	62
5.6.1 Densidade	62
5.6.2 Compressão.....	63
5.6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV.....	63
5.6.3.1 Porosidade.....	64
5.6.3.2 Composição Elementar Por Energia Dispersiva De Raios X (EDS).....	65
5.6.4 Composição Elementar Por CHNS-O.....	65
5.6.5 Análise termogravimétrica (DSC e TGA).....	66
5.6.6 Espectroscopia Por Infravermelho Com Transformada De Fourier (FTIR).....	66
5.6.7 Espectroscopia de Espalhamento Raman.....	67

5.6.8 Esterilidade.....	67
5.6.9 Endotoxinas e Pirogênio.....	68
5.6.10 Proliferação Celular e Citotoxicidade.....	69
5.6.10.1 Teste de Viabilidade Celular <i>In Vitro</i> (Células-Tronco Mesenquimais com características fibroblásticas).....	69
5.6.10.2 Teste de Citotoxicidade <i>In Vitro</i> (fibroblastos).....	71
5.6.11 Caracterização Complementar.....	72
5.6.11.1 Titulação de pH.....	72
5.6.11.2 Metais Pesados.....	73
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DE DADOS	73
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
6.1 DO PROCESSO DE DESCELULARIZAÇÃO.....	74
6.1.1 Quantificação de DNA.....	74
6.1.2 Quantificação de SDS residual.....	76
6.2 DA CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	81
6.2.1 Densidade.....	81
6.2.2 Compressão.....	82
6.2.3 Da Microscopia Eletrônica por Varredura – MEV.....	87
6.2.3.1 Análise Morfológica.....	87
6.2.3.2 Porosidade.....	90
6.2.3.3 Composição Elementar Por Energia Dispersiva De Raios X (EDS).....	93
6.2.4 Composição Elementar CHNS-O.....	96
6.2.5 Análise Termogravimétrica (DSC e TGA).....	100
6.2.6 Espectroscopia Por Infravermelho Com Transformada De Fourier (FTIR).....	106
6.2.7 Raman.....	108
6.2.8 Análise de Esterilidade.....	113
6.2.9 Análise de Endotoxinas e Pirogênio.....	115
6.2.10 Proliferação Celular e Citotoxicidade.....	118
6.2.10.1 Teste Viabilidade Celular <i>In Vitro</i> (Células-Tronco Mesenquimais com características fibroblásticas).....	118
6.2.10.2 Teste de Citotoxicidade <i>In Vitro</i> (fibroblastos).....	121
6.2.11 CARACTERIZAÇÃO COMPLEMENTAR.....	122
6.2.11.1 Titulação de pH.....	122
6.2.11.2 Metais Pesados.....	123
7 CONCLUSÃO.....	125
8 REFERÊNCIAS.....	126
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	143

1 INTRODUÇÃO

A incidência mundial de doenças e desordens ósseas tem apresentado crescimento acentuado na última década, tal fato está relacionado a um contexto global de inversão da pirâmide etária, aumento da expectativa de vida, e envelhecimento das populações (FONSECA et al., 2024.). Doenças como obesidade, hipertensão, diabetes e osteoporose, estão intimamente relacionadas ao envelhecimento (MULINARI-SANTOS et al., 2023.), e são consideradas as principais causas de mortalidade e morbidade em idosos, principalmente, devido ao risco aumentado da ocorrência de fraturas ósseas (SARAFRAZI et al., 2021.).

A ausência ou diminuição da disponibilidade óssea pode resultar em perda da função e diminuição da qualidade de vida. Nos EUA, para adultos com mais de 50 anos, estima-se uma prevalência de baixa massa óssea em torno de 43,1% da população (SARAFRAZI et al., 2021.). De acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde OMS, entre 32% e 42% dos idosos acima de 70 anos sofrem ao menos um episódio de queda por ano (LISBOA et al., 2021).

A alta prevalência de fragilidade tecidual associada ao maior risco de quedas, tem contribuído para uma maior frequência da ocorrência de fraturas, o que já tem sido considerado como grave problema de saúde pública, pois resulta em pior qualidade de vida, dependência funcional, graves consequências físicas e psicológicas para pacientes e familiares, além de causar grande impacto negativo na economia e na previdência social, devido aos altos custos hospitalares que estão associados aos tratamentos e suporte de vida (FONSECA et al., 2024.).

Além dos vieses inerentes do comprometimento do sistema osteo-locomotor, a perda óssea também tem causado grandes prejuízos no que diz respeito à saúde bucal e à qualidade de vida das pessoas devido às perdas dentárias, principalmente para aquelas com menor acesso à saúde básica. De acordo com dados da Pesquisa Nacional de Saúde do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, cerca de 33,4% das pessoas maiores de 18 anos utilizam algum tipo de prótese dentária no Brasil, 34 milhões de brasileiros adultos já perderam 13 ou mais dentes, e pelo menos outros 14 milhões vivem sem nenhum dente na boca (IBGE, 2020.).

A exodontia de dentes permanentes, a doença periodontal e o trauma bucal são os principais casos relacionados ao processo de reabsorção do osso alveolar, que consiste na perda óssea, que é o principal impasse para reabilitação oral de pacientes (DOS ANJOS, et al. 2021.).

A insuficiência óssea clínica, seja de ordem ortopédica ou odontológica, é definida como uma descontinuidade na integridade do tecido ósseo, e para regeneração adequada, geralmente, requer tratamento cirúrgico com a utilização de materiais que promovam estabilização mecânica e/ou o preenchimento com algum tipo de enxerto no local onde ocorreu a perda ou injúria tecidual (SHRIVATS et al., 2014.).

A demanda mundial por enxertos é alta, o transplante ósseo é considerado o segundo tipo de transplante mais realizado no mundo, ficando atrás apenas da transfusão de sangue (FERNANDEZ-YAGUE et al., 2015.). Embora o transplante de tecido ósseo autógeno (do próprio paciente) ou alógeno (doador da mesma espécie) ainda seja considerado o padrão ouro de substituição óssea, grandes desvantagens limitam a sua escolha, principalmente, devido a baixa quantidade e disponibilidade de tecido viável para implantação (GHANAATI et al., 2014.).

Um maior risco de transmissão de doenças, maior grau de invasividade e morbidade devido a necessidade de mais de uma cirurgia, além de impedimentos culturais ou religiosos, e o elevado custo dos procedimentos também são impedimentos constantemente relatados. Quando esses tratamentos são demandados por pacientes considerados críticos, idosos, habitantes de regiões remotas ou com menor acesso assistencial à saúde, essas considerações limitam ainda mais a escolha dos métodos (GHANAATI et al., 2014.).

As possibilidades de tratamentos ortopédicos e odontológicos para insuficiência óssea são diversas, porém, ainda muito desafiadoras (SHRIVATS et al., 2014.). Na prática cirúrgica assistencial ainda existe escassez de técnicas adequadas, mas principalmente de materiais em quantidade e qualidade suficiente que permitam substituir, restaurar ou regenerar o osso em condições mais acessíveis (FERNANDEZ-YAGUE et al., 2015.), o que reflete em uma grande necessidade clínica nas áreas de cirurgia ortopédica, espinhal, odontológica, craniana e maxilofacial.

Na última década, o uso de osso xenógeno (de outra espécie animal), mas especialmente de origem bovina, tem sido impulsionado e amplamente explorado como promissor material de enxerto, tanto nos tratamentos, quanto no desenvolvimento de novas tecnologias de substitutos ósseos biocompatíveis (BHATTACHARJEE et al., 2017.), pois, além da similaridade estrutural, da pronta disponibilidade e do baixo custo estimado de produção (SAWKINS *et al.*, 2013.), também pode ser desenvolvido para apresentar baixo risco de aplicação, o que pode possibilitar a redução do tempo de cirurgia e de recuperação dos pacientes por resultar em menores danos causados durante o tratamento (NEFJODOVS et al., 2023.).

As estatísticas mundiais indicam que aproximadamente 2,2 milhões de procedimentos de enxerto ósseo em ortopedia e odontologia foram realizados em 2021 (CODREA et al., 2021.), custando cerca de 664 milhões de dólares (ZHAO, et al., 2021.). Estima-se que o número de procedimentos cirúrgicos para reparação de defeitos ósseos cresça aproximadamente 13% ao ano e que 50% de todos os procedimentos de implantes dentários realizados vão utilizar enxertos ósseos (BALDWIN, et al., 2019.).

De acordo com dados publicados pelo relatório da Fortune Business Insights (2024), o mercado global de substitutos de investimentos ósseos atingiu a marca de US\$ 3,81 bilhões em 2023, está projetado para alcançar US\$ 4,04 bilhões em 2024, e crescerá aproximadamente 6,5% ao ano até 2032, quando atingirá o montante expressivo de cerca de US\$ 6,67 bilhões comercializados. Por esse motivo, a investigação e o desenvolvimento de novas tecnologias de reparo ósseo continuam sendo uma linha de pesquisa promissora devido à crescente demanda e ao baixo estoque de substitutos ósseos

Abordagens terapêuticas mais modernas, desenvolvidas com enfoque em bioengenharia de tecidos e em medicina regenerativa tem se revelado estratégias interessantes, que prometem transformar o mercado, os tipos de tratamento e as formas de reconstrução óssea (SHRIVATS et al., 2014.). Por essa mesma linha de inovação, através do desenvolvimento científico na área da Bioengenharia Tecidual, a matriz óssea extracelular descelularizada, principalmente bovina, tem sido investigada como uma opção interessante para produção de biomateriais de

implante com capacidade para superar as limitações clínicas de autoenxertos e aloenxertos (FERNANDEZ-YAGUE et al., 2015.), pois a partir de uma matéria-prima de origem xenógena, são preservadas propriedades estruturais, mecânicas e biológicas com imenso potencial a ser explorado (CODREA et al., 2021.).

Anteriormente, já havíamos descrito um protocolo de descelularização para produção de matrizes ósseas descelularizadas, com potencial para utilização no tratamento do osso esponjoso bovino adulto e fetal (BARROS, 2018.). No presente estudo, buscamos aprimorar esse método de descelularização e priorizamos a caracterização da constituição físico-química e estrutural dos biomateriais produzidos a partir de matrizes ósseas descelularizadas, de modo a desenvolver novas alternativas biotecnológicas de material de enxerto e compará-las com outros substitutos ósseos similares que já são amplamente utilizados pelo mercado mundial de enxertos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é um tipo de tecido conjuntivo que desempenha processos essenciais nos organismos, pois está envolvido em diversas funções fisiológicas relacionadas à sustentação mecânica postural e dos movimentos, proteção de órgãos, estabelecimento do tamanho e forma corporal, além de contribuir na homeostasia mineral do metabolismo do cálcio e na produção de elementos hematopoiéticos (CASTRO-CESEÑA et al., 2013.).

As propriedades do tecido ósseo estão diretamente relacionadas à constituição de sua matriz extracelular (MEC). O osso apresenta em sua estrutura, uma composição de matriz extracelular constituída de duas partes: a mineral e a orgânica. A porção mineral, ou inorgânica, é composta principalmente por fosfato de cálcio na forma de hidroxiapatita (60-65%), enquanto que a porção orgânica (30-35%) é composta por células, glicoproteínas (colágeno tipo I, III e V), proteoglicanos de baixo peso molecular (CORADAZZI, 2003.), proteínas não colágenas (osteocalcina, osteonectina, osteopontina, sialoproteína óssea e RANK-L) e lipídios. O restante da composição óssea é caracterizada por cerca de 5-10% de água (GALIA, 2004.).

A forma como as moléculas presentes na matriz mineral e orgânica do tecido ósseo estão organizadas é complexa e única, formam uma estrutura firme e cristalizada (TABRIZIAN et al., 2023.), compostas de fibras de colágeno alinhadas e altamente mineralizadas, que desempenham papéis fundamentais na formação da microestrutura, manutenção da resistência mecânica, regulação do recrutamento e atividade das células ósseas (MANZINI et al., 2021.), e devido a isso, quaisquer alterações nas composições químicas ou estruturais das fases inorgânicas e orgânicas da MEC podem alterar consideravelmente a microestrutura, a resistência mecânica, e a citocompatibilidade do tecido ósseo (SROMOVA et al., 2023;.).

De acordo com a sua forma, os ossos podem ser classificados anatomicamente em quatro tipos: ossos longos, curtos, planos e irregulares. No nível macroscópico, o tecido ósseo é dividido em osso trabecular (esponjoso) e osso cortical (compacto). O osso trabecular é mais poroso (40–95%), por esse motivo, apresenta menor resistência à compressão e uma grande área de superfície que lhe confere maior

atividade metabólica do que o osso cortical, que por sua vez, possui um número menor de poros (5–15%) que lhe confere um aspecto quase sólido (MANZINI et al., 2021.).

Enquanto o osso cortical corresponde a cerca de 80% da quantidade total de osso do esqueleto, o osso trabecular constitui os 20% restantes. Todos os ossos são compostos de osso esponjoso e cortical, presentes em porcentagens diferentes e específicas para cada tipo de osso. O osso cortical aparece como um osso externo denso circundando o espaço da medula, enquanto o osso trabecular consiste em placas e hastes trabeculares internas, construindo uma rede semelhante a um favo de mel no compartimento da medula (Figura 1) (GAO et al, 2017.).

Microscopicamente, no osso cortical predominam estruturas denominadas ósteons, que são estruturas cilíndricas de cerca de 200 μm de diâmetro, com camadas concêntricas de lamelas (com espessura de 3–7 μm) enroladas em torno de um canal central (Canal de Havers) com vasos sanguíneos e nervos, que corre paralelo ao eixo longitudinal do osso, o que conferem efetiva resistência à curvatura (BATTAFARANO et al., 2021.).

No osso trabecular as lamelas estão dispostas na forma de hastes (50–300 μm) e placas de trabéculas, conferindo uma extensa e forte rede porosa com dutos interligados, que além do transporte de substâncias, também permitem funcionalmente a distribuição de cargas mecânicas (BATTAFARANO et al., 2021.), o que minimiza o risco de fraturas, mesmo sob condições extremas (TABRIZIAN et al., 2023.).

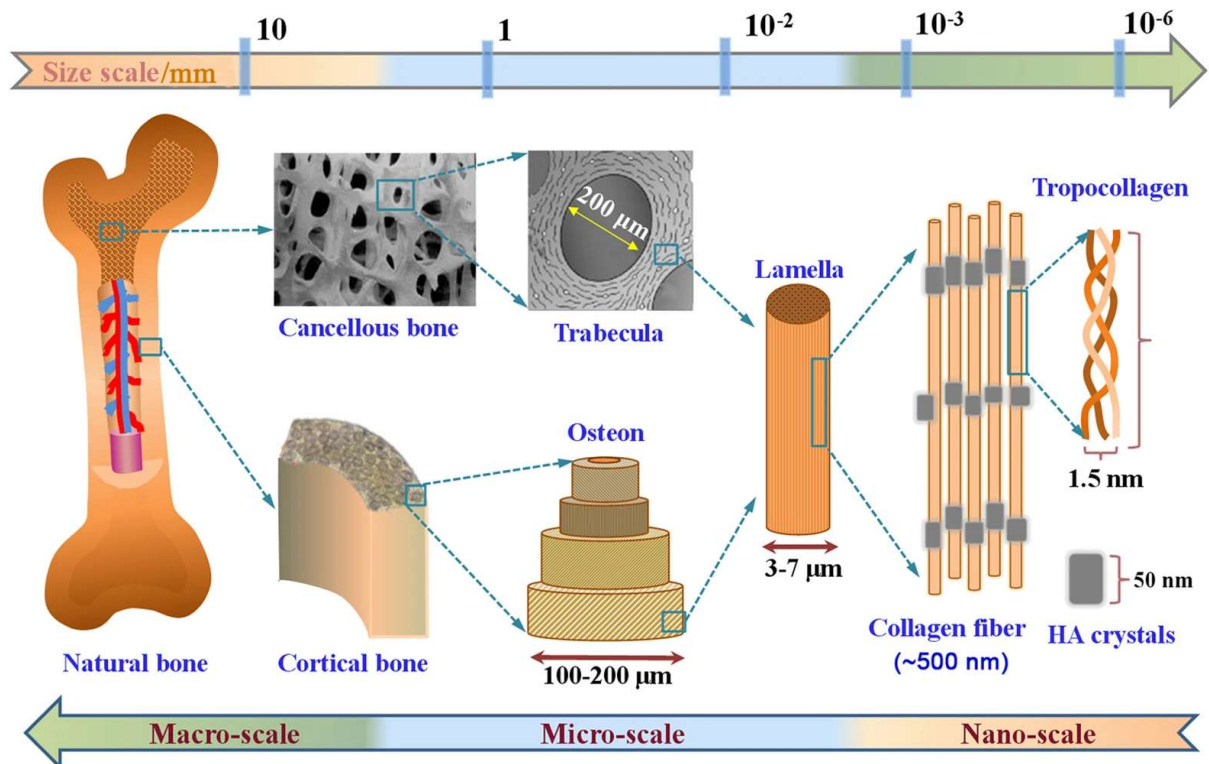


Figura 1 - Composição química e estrutura multiescala do osso natural (Gao et al, 2017.).

Quanto à composição celular, são quatro os tipos de células encontradas no tecido ósseo: células-tronco mesenquimais (MSC ou progenitoras), osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Os três primeiros tipos celulares representam diferentes estágios do processo de diferenciação celular da linhagem mesenquimal (osteoblástica), enquanto que os osteoclastos são provenientes da linhagem de células hematopoiéticas e imunes (Figura 2) (SROMOVA et al., 2023.).

Na verdade, as células ósseas e imunes compartilham o mesmo microambiente e regulam-se mutuamente. As MSC representam a população de células-tronco osteoprogenitoras adultas localizadas no osso que possuem duas propriedades básicas, a autorrenovação clonogênica e a diferenciação de linhagem multipotencial (osteogênica, condrogênica e adipogênica) (MANZINI et al., 2021.). Os osteoblastos representam 4-6% da população total de células ósseas e são amplamente conhecidos por sua função de formação óssea. São derivados das MSC que, após se comprometerem com a linhagem osteogênica, se diferenciam em progenitores de

osteoblastos que expressam os genes Runx2 (fator de transcrição relacionado a Runt 2) e Col1a1 (colágeno 1a1) (BATTAFARANO et al., 2021.).

Os pré-osteoblastos evoluem para osteoblastos maduros quando sofrem mudanças morfológicas, tornando-se células grandes e cuboidais. Essa transição está relacionada à síntese da matriz óssea que ocorre em duas etapas: a deposição de uma matriz orgânica feita por colágeno e proteínas não colagênicas, seguida por sua mineralização subsequente com as fases vesicular e fibrilar. Nesse estágio, os osteoblastos maduros podem sofrer apoptose, se tornarem osteócitos ou células de revestimento ósseo (SROMOVA et al., 2023).

Os osteócitos são as células mais abundantes no tecido ósseo, são reconhecidas como o último estado de diferenciação dos osteoblastos, permanecendo embutidos na matriz, residindo dentro das lacunas ósseas (MANZINI et al., 2021.). São consideradas células-chave para o desenvolvimento das funções esqueléticas normais, pois, além de desempenharem papel fundamental na manutenção da homeostase do fósforo, ainda atuam na mecanotransdução, agindo como “sensores mecânicos” que promovem a conversão de forças físicas em sinais bioquímicos que resultam no orquestramento da remodelação óssea, promovendo a regulação direta das atividades celulares de osteoblastos e osteoclastos (SROMOVA et al., 2023.).

Os osteoclastos, por sua vez, são células gigantes multinucleadas, responsáveis pela reabsorção óssea que ocorre através da dissolução da fase inorgânica da MEC e da degradação de proteínas de colágeno (MANZINI et al., 2021.). São originárias de células-tronco pluripotentes da medula óssea, se diferenciam a partir da fusão de células mononucleares da linhagem hematopoiética, sob a influência de vários fatores, como o fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), e RANKL (receptor ativador do fator nuclear κ B ligante) que é expresso por osteoblastos (BATTAFARANO et al., 2021.).

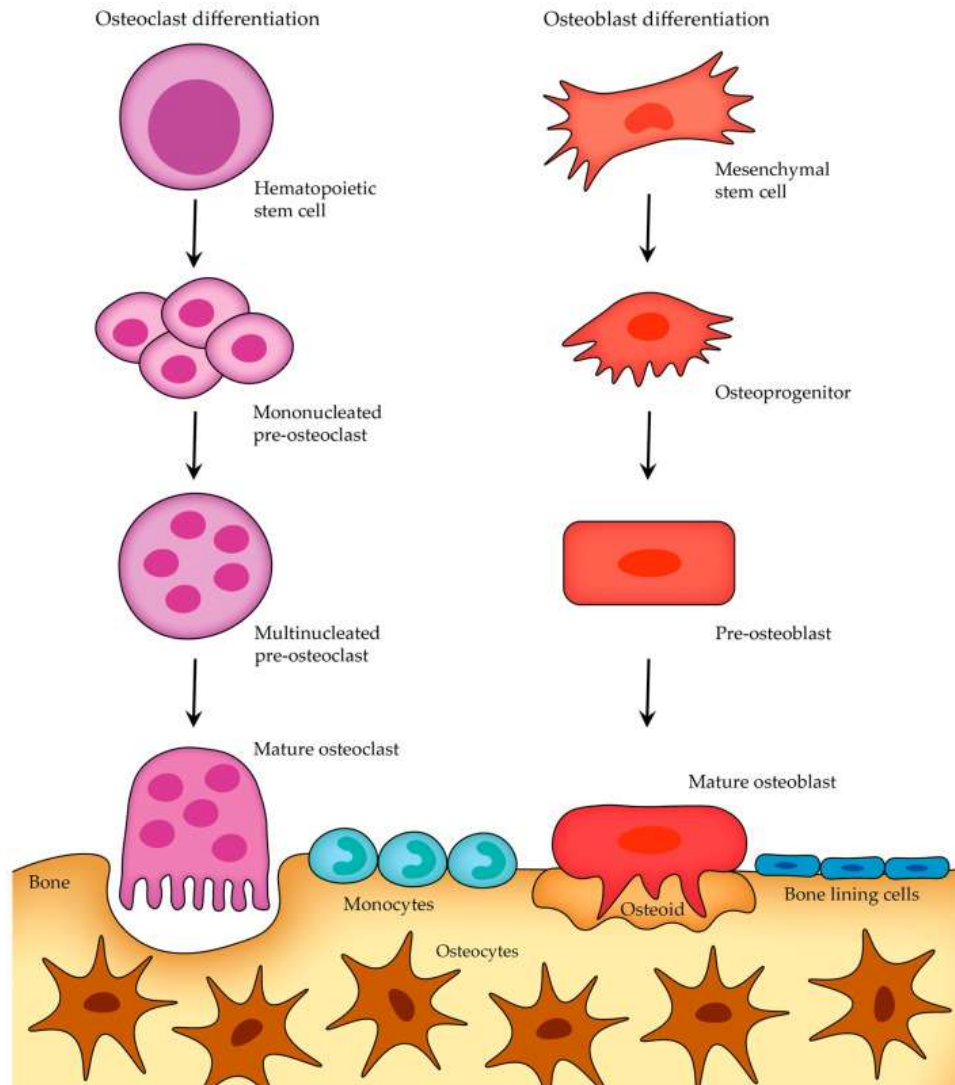


Figura 2 - Diferenciação de osteoblastos e osteoclastos do tecido ósseo (adaptado de SROMOVA et al., 2023.).

No que diz respeito à anatomia (Figura 3), de maneira particular, apenas nos ossos chatos são encontradas duas camadas de osso cortical envolvendo uma porção central de osso trabecular de maneira quase homogênea por toda a extensão do tecido. Diferentemente, nos ossos longos são reconhecidas pelo menos três regiões distintas: diáfise, epífise e metáfise (FORTE, Y. S., 2022.).

A diáfise compreende a porção média do osso, que é constituída quase que integralmente por osso cortical e possui um canal interior denominado canal medular, que é preenchido com medula óssea amarela; as epífises são as porções

das extremidades ósseas, que também estão revestidas por uma fina camada de osso cortical, mas são predominantemente compostas por osso trabecular (MANZINI et al., 2021.).

Entre a diáfise e as epífises são identificadas as metáfises, também compostas por osso trabecular, compreendem a região de interseção entre o canal medular e osso esponjoso epifisário mais denso, local onde pode-se observar nos animais em crescimento a presença da placa de crescimento (complexo metafisário ou placa epifisária). A placa de crescimento apresenta uma camada de cartilagem hialina, que junto com o osso esponjoso circundante, forma uma região onde ocorre o desenvolvimento ósseo e o alongamento cortical. Na idade adulta, a placa de crescimento é substituída por osso esponjoso, resultando na fusão completa da epífise com a metáfise (SROMOVA et al., 2023.).

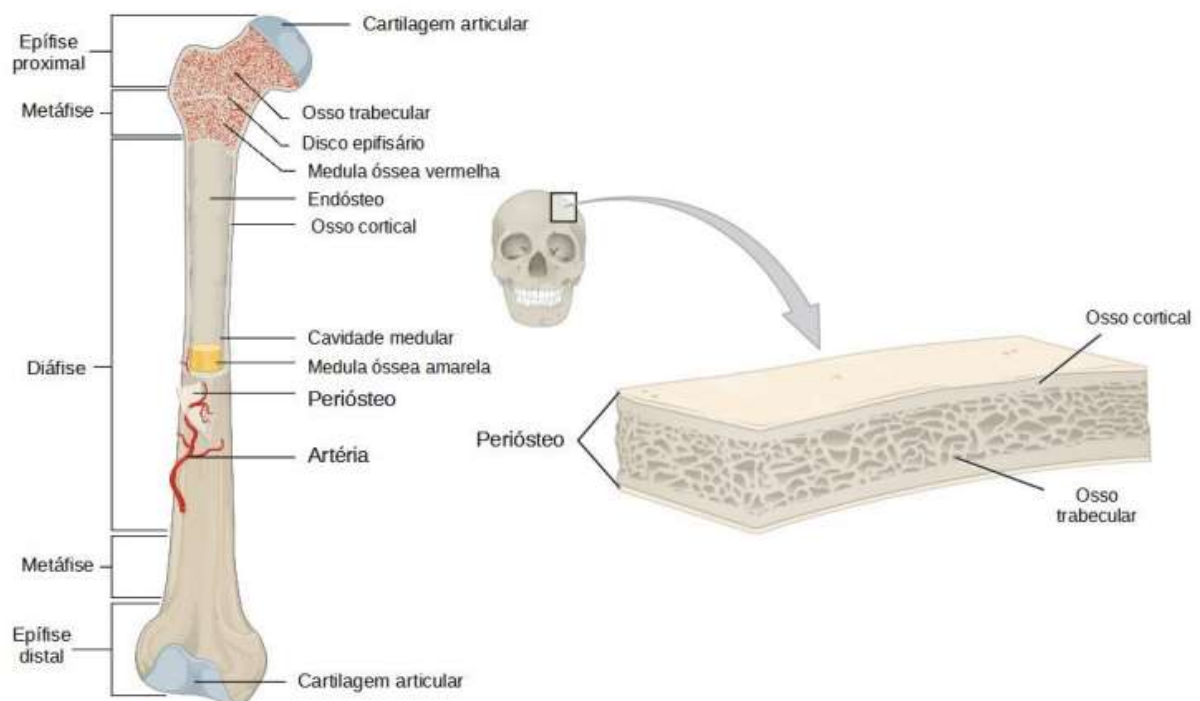


Figura 3 - Identificação das principais regiões anatômicas de ossos longos e chatos (Adaptado de FORTE, Y. S., 2022.).

Em relação ao revestimento tecidual, são descritos dois tipos de superfícies ósseas, a endosteal e a periosteal (Figura 4) (FORTE, Y. S., 2022.). A superfície endosteal (endóstio) compreende uma fina membrana que cobre toda a superfície interna do osso, composta por uma camada de células osteoprogenitoras achatadas e fibras de colágeno tipo III, também conhecidas como fibras reticulares. O endóstio atua como um canal para a transferência de cálcio entre a matriz óssea e o sangue, auxilia na formação tecidual na deposição e na absorção de cálcio. Quanto a sua localização pode ser dividido em três tipos: endóstio cortical (reveste a cavidade da medula óssea), endóstio intracortical (reveste ósteons e Havers) e endóstio endocortical (reveste as trabéculas) (SROMOVA et al., 2023.).

A superfície periosteal (perióstio) por sua vez é composta por uma dupla camada membranosa que reveste externamente todo o tecido ósseo, estando ausente apenas nas regiões onde ocorrem a fixação de tendões ou ligamentos, nas extremidades ósseas cobertas por cartilagem articular e na superfície de ossos do tipo sesamóide (FORTE, Y. S., 2022.).

A camada externa do perióstio é uma membrana fibrosa, caracterizada pela presença de tecido conjuntivo irregular e denso, composta por fibroblastos, fibras de colágeno, elastina, nervos e microvasos. A camada interna do perióstio é também chamada de camada celular ou osteogênica, pois está em contato direto com a superfície óssea, local onde estão localizadas as células osteoprogenitoras. A camada interna atinge sua espessura máxima no feto e vai se tornando cada vez mais fina com o avanço da idade, tornando-se indistinguível da camada fibrosa na fase adulta, principalmente, em função da diminuição da concentração de células e de vasos sanguíneos (SROMOVA et al., 2023.).

O perióstio desempenha funções importantes relacionadas à nutrição, ao crescimento e reparo do tecido ósseo. Os vasos sanguíneos localizados no perióstio são responsáveis por suprir a superfície externa e interna do osso (até certo ponto), e são acompanhados por nervos e fibras vasomotoras que controlam a distribuição e circulação sanguínea (FORTE, Y. S., 2022.).

Devido ao seu rico sistema de suprimento sanguíneo, o perióstio apresenta um número significativo de pericitos endoteliais, células que estão em contato direto

com células endoteliais capilares e que podem se transformar em vários tipos de células, inclusive osteoblastos, portanto, atuando também como uma reserva local de células osteoprogenitoras. As células osteoprogenitoras localizadas dentro do periósteo são células-tronco multipotentes, importantes para o reparo tecidual pois podem estimular a regeneração óssea no caso de uma fratura, mas também são cruciais para o crescimento da circunferência óssea por meio da aposição de superfície (SROMOVA et al., 2023.).

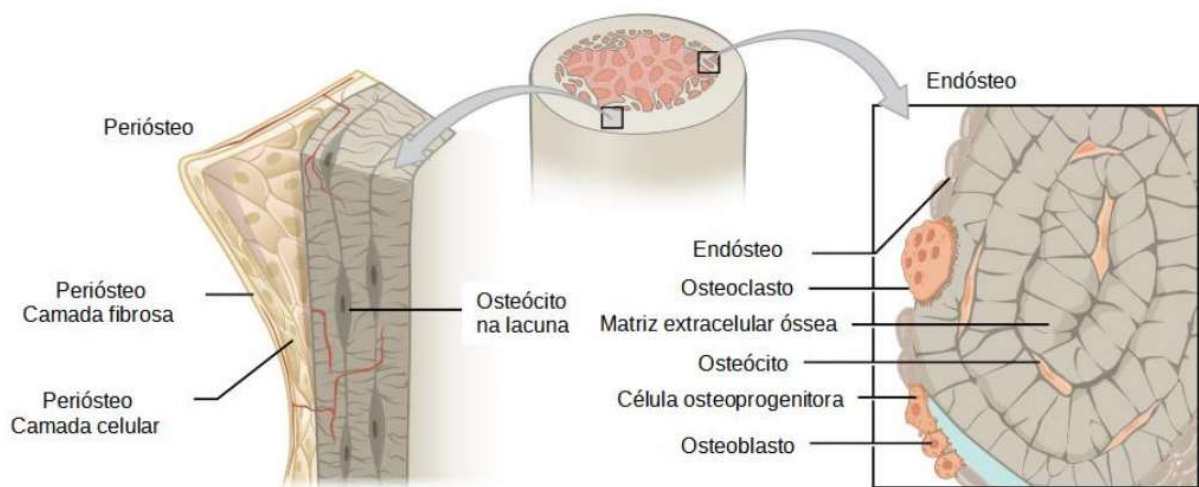


Figura 4 - Localização do periósteo e endósteo no tecido ósseo (Adaptado de FORTE, Y. S., 2022.).

2.2 FORMAÇÃO ÓSSEA

O processo de formação óssea, naturalmente, pode ocorrer por dois mecanismos distintos chamados ossificação intramembranosa e ossificação endocondral. O desenvolvimento ósseo por ossificação intramembranosa (Figura 5) ocorre basicamente em ossos do tipo planos e chatos (como escápula e ossos do crânio), comumente está ligado ao desenvolvimento embrionário, mas também pode ocorrer após o nascimento, durante os processos de cicatrização óssea (FORTE, Y. S., 2022.).

A formação do osso ocorre a partir do tecido conjuntivo mesenquimal, onde células MSCs se agregam e começam a se especializar em células osteoprogenitoras,

osteoblastos e células vasculares. Osteoblastos recém formados iniciam a secreção de matriz orgânica extracelular (osteóide) rica em colágeno e proteoglicanos, capazes de se ligar ao cálcio. À medida que a matriz vai se tornando mais mineralizada e dura, vão sendo formados os centros de ossificação, onde os osteoblastos aprisionados na matriz se diferenciam em osteócitos, e as células osteoprogenitoras localizadas ao redor dos centros se diferenciam em novos osteoblastos. (MANZINI et al., 2021.).

As áreas mesenquimais que permanecem não ossificadas e tornam-se a fontes originárias do endóstio e perióstio. Em um processo contínuo, a matriz extracelular vai sendo depositada ao redor dos vasos sanguíneos, ocorre fusão dos centros de ossificação, internamente são formadas as trabéculas ósseas, enquanto que na camada mais externa, osteoblastos presentes na matriz não mineralizada perióstio formam a camada de osso cortical (SROMOVA et al., 2023.).

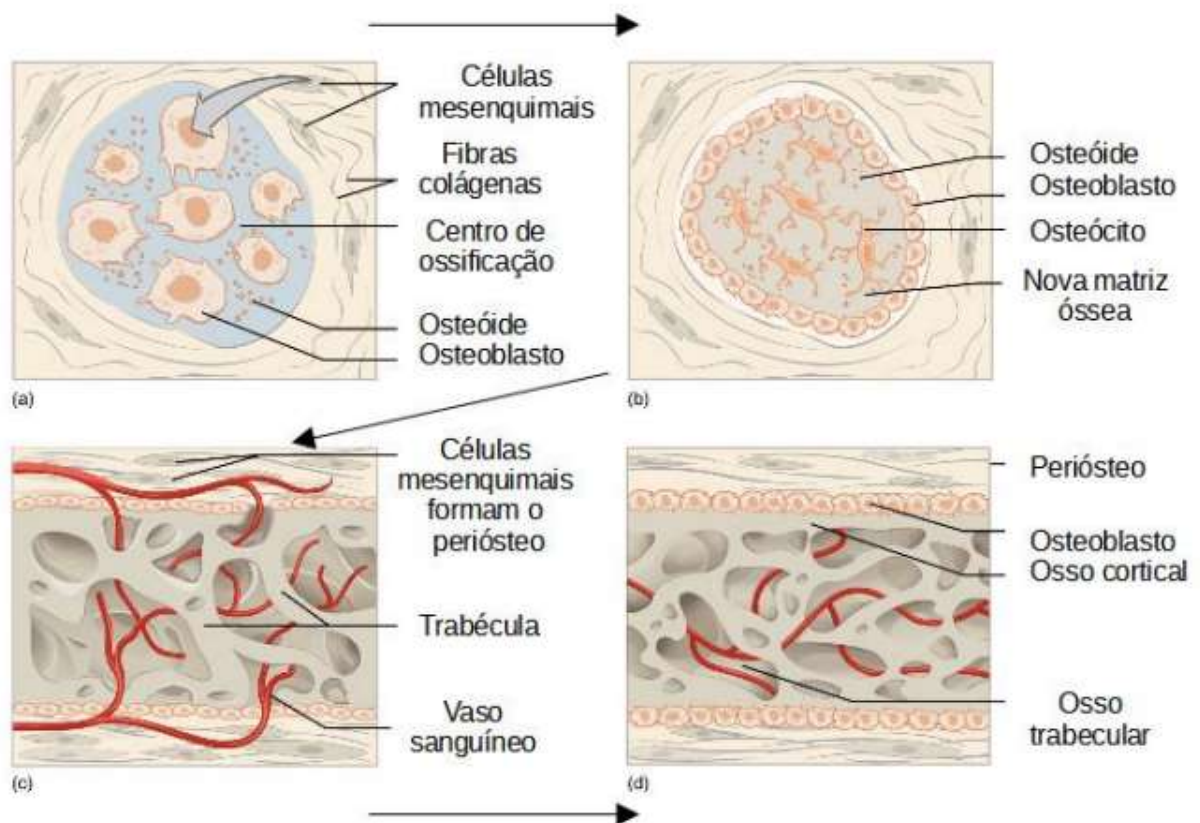


Figura 5 - Etapas da ossificação intramembranosa. (a) Agrupamento de células mesenquimais, diferenciação em osteoblastos e formação do centro de ossificação. (b) Aprisionamento de osteoblastos no osteóide e diferenciação em osteócitos. (c) Formação de trabéculas e perióstio. (d) Formação de osso cortical na face externa do osso trabecular. (Adaptado de FORTE, Y. S., 2022.).

A ossificação endocondral (Figura 6) é a responsável pela formação da maioria dos ossos do corpo, inicia-se durante a embriogênese, a partir da 6^a e 8^a semana de desenvolvimento, quando as MSCs se diferenciam em condroblastos, proliferam e passam a produzir uma matriz cartilaginosa que servirá de molde para o tecido ósseo (FORTE, Y. S., 2022.).

Conforme o tecido cartilaginoso primário é formado, os vasos sanguíneos que estão presentes no local trazem células osteoprogenitoras e osteoblastos que se depositam ao redor da cartilagem e começam a sintetizar um colar de matriz óssea que dará origem à diáfise. Este colar dificulta a difusão de nutrientes na região, o que induz a hipertrofia, calcificação e posterior morte de condrocitos. A partir de

então, ocorre invasão por novos vasos sanguíneos no molde cartilaginoso, adesão de células osteoprogenitoras e diferenciação em osteoblastos que iniciam o ciclo de substituição da cartilagem por matriz extracelular óssea, resultando no primeiro centro de ossificação, que se expande em direção às epífises (MANZINI et al., 2021.).

No esqueleto dos fetos, as epífises ainda são cartilaginosas, após o nascimento ocorre o mesmo processo de ossificação e substituição da matriz, dando origem ao segundo centro de ossificação. Ao final do processo de desenvolvimento toda a cartilagem é substituída, com exceção das placas de crescimento e da cartilagem hialina presentes nas regiões articulares das epífises. Assim como a ossificação intramembranosa, a ossificação endocondral também não se limita ao desenvolvimento embrionário, ela também desempenha um papel crucial durante os processos cicatriciais e cura de fraturas (SROMOVA et al., 2023.).

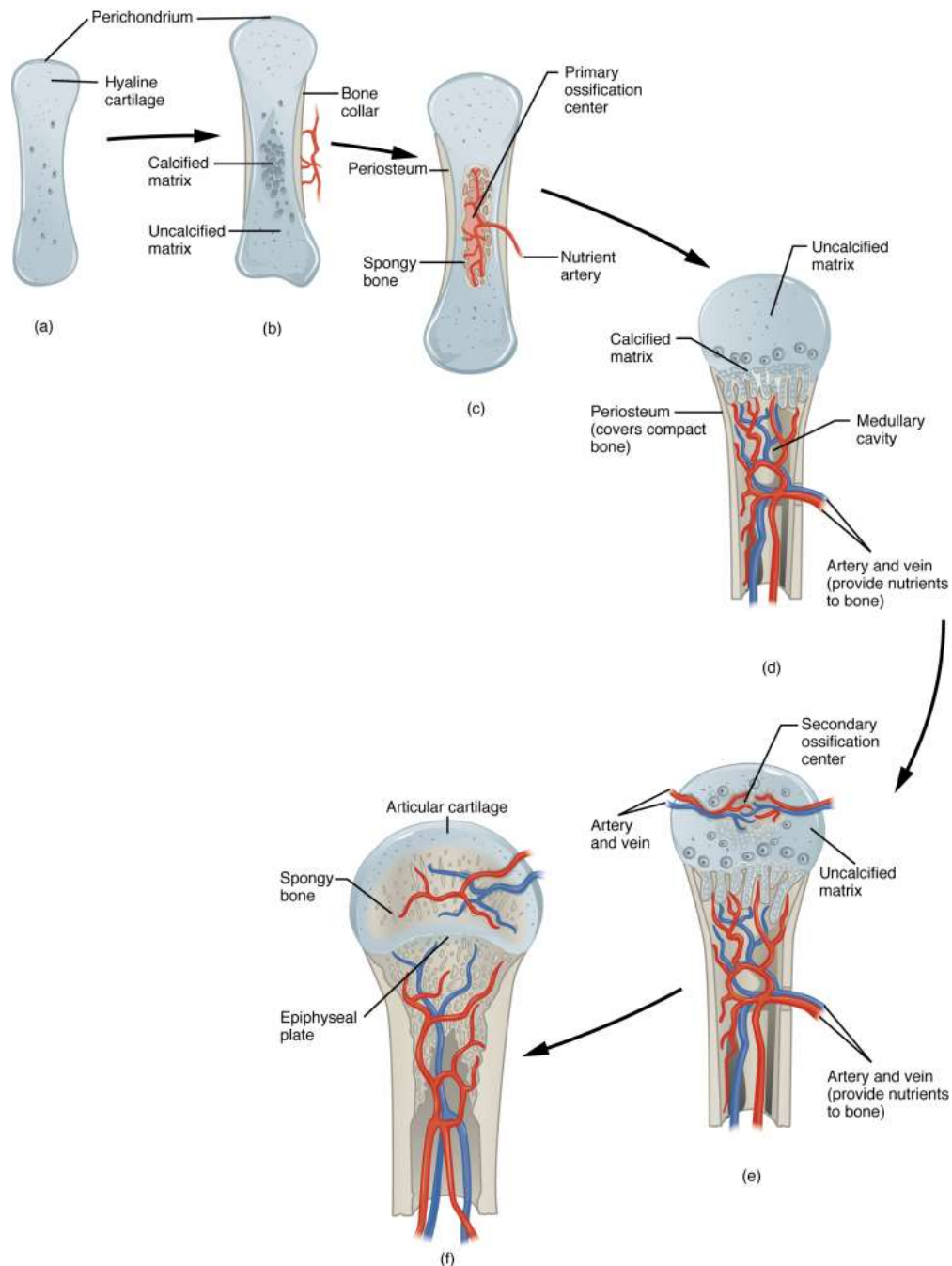


Figura 6 - Etapas da ossificação endocondral. (a) Diferenciação de células mesenquimais em condrócitos com produção do molde cartilaginoso do futuro tecido ósseo. (b) Os vasos sanguíneos na borda do modelo de cartilagem trazem osteoblastos que depositam um colar ósseo. (c) Os capilares penetram na cartilagem formando o centro primário de ossificação. (d) Crescimento cartilaginoso nas extremidades e remodelamento ósseo na cavidade medular. (e) Formação do centro secundário de ossificação. (f) Permanência de cartilagem hialina na placa de crescimento e na superfície articular. (Adaptado de Oregon State Education.).

2.3 REMODELAMENTO ÓSSEO

O remodelamento ósseo é um mecanismo dinâmico pelo qual os ossos continuamente mudam sua forma em função de respostas fisiológicos e/ou mecânicas (Figura 7). É o processo pelo qual o organismo promove a manutenção da força, resistência e flexibilidade do osso, além de garantir a homeostase mineral (FORTE, Y. S., 2022.). Tem início antes do nascimento e continua ao longo de toda a vida de um indivíduo, e está baseado em dois processos fundamentais: a formação óssea por osteoblastos e reabsorção óssea por osteoclastos (MANZINI et al., 2021.).

Essas atividades de formação e reabsorção são coordenadas para moldar o osso de forma eficaz, embora mutuamente reguladas, ocorrem de maneira independente em diferentes regiões, e simultaneamente em todo o esqueleto (FORTE, Y. S., 2022.). A taxa de remodelação óssea pode sofrer flutuações significativas ao longo da vida, apresentando uma rápida taxa durante o crescimento que tende a diminuir gradualmente até que o pico de massa óssea seja alcançado (MANZINI et al., 2021.).

De modo geral, em condições normais, há um equilíbrio preciso entre a quantidade de reabsorção e de formação óssea, que é rigorosamente mantido para que não haja mudanças bruscas a cada ciclo de renovação. Apesar disso, além da idade, a taxa de remodelação também é influenciada por outros fatores tais como genética, atividade física, nutrição, funções hormonais e uso de medicamentos, que na fase adulta, e principalmente em circunstâncias patológicas, podem alterar intensamente esse equilíbrio (SROMOVA et al., 2023.).

É sabido que com o avanço da idade e do desenvolvimento, existe uma tendência natural de que os ossos cresçam em espessura, devido à adição de “osso novo” na superfície externa (aposição periosteal) e remoção de “osso antigo” proveniente da superfície interna (reabsorção endosteal) (FORTE, Y. S., 2022.).

Todo esse processo de remodelamento ocorre basicamente em cinco estágios diferentes: ativação, reabsorção, reversão, formação e mineralização (MANZINI et al., 2021.).

independente da causa, seja por descontinuidade (fratura), deficiência ou insuficiência, é sabido que atualmente não existem tratamentos farmacológicos únicos que permitam a cura óssea de maneira simples e eficaz (SHEEN et al., 2023.).

A cicatrização e/ou o reparo do tecido ósseo são totalmente dependentes de um processo regenerativo complexo e dinâmico que envolve a estabilização mecânica, a disponibilidade e integridade tecidual, e principalmente, a vascularização e a atividade celular no local (SHEEN et al., 2023.).

São descritos dois tipos básicos de cicatrização óssea: a cicatrização primária, ou direta, que resulta na construção de um novo osso a partir da ossificação intramembranosa, onde osteoblastos e osteoclastos atuam em um processo de remodelação óssea para unir estruturas lesionadas que mantêm contato entre si (OREGON STATE EDUCATION; RODRIGUEZ-MERCHAN, E.C., 2021.).

A cicatrização secundária (Figura 8), ou indireta, por sua vez, é um processo mais complicado, de modo semelhante à formação óssea endocondral, depende da formação primordial de moldes cartilagosos para posteriormente formar uma nova área óssea (OREGON STATE EDUCATION; RODRIGUEZ-MERCHAN, E.C., 2021.).

Esse processo tem início quando o sangue liberado de vasos lesionados no periósteo, ósteons e/ou cavidade medular coagulam formando um hematoma (OREGON STATE EDUCATION; RODRIGUEZ-MERCHAN, E.C., 2021.). Apesar do hematoma promover aumento momentâneo no fornecimento de nutrientes, a interrupção do fluxo sanguíneo resulta na morte de células ósseas no local da lesão, o que favorece a diferenciação de células-tronco do endósteo em condrócitos, que passam a produzir e depositar matriz fibrocartilaginosa no local formando o calo interno (SHEEN et al., 2023.).

De maneira concomitante, condrócitos periosteais e osteoblastos também atuam para formar um calo externo formado por matriz óssea e cartilaginosa. Juntos esses calos moles temporários encapsulam e estabilizam o local da lesão. Posteriormente, os osteoclastos reabsorvem o osso morto, ao mesmo tempo que as células osteogênicas se tornam ativas promovendo a substituição da cartilagem dos calos

por osso trabecular, formando um novo calo ósseo também chamado de calo duro (SHEEN et al., 2023.).

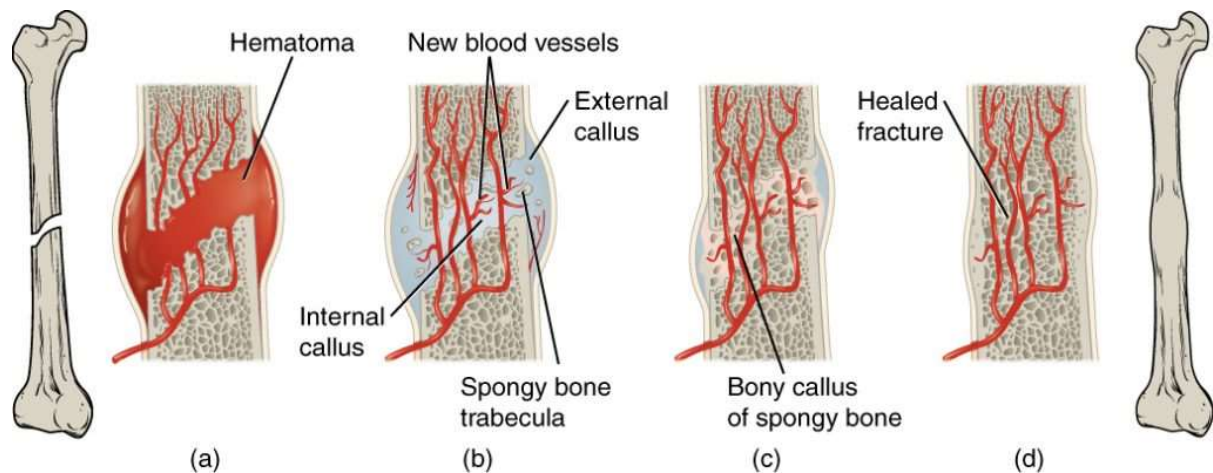


Figura 8 - Estágios progressivos do reparo ósseo: (a) Coagulação e formação do hematoma da lesão. (b) Formação de calos internos e externos. (c) Substituição da cartilagem dos calos por osso trabecular. (d) Remodelação óssea. (Adaptado de Oregon State Education.).

Apesar de serem descritos isoladamente, é comum perceber a ocorrência de ambos os processos cicatriciais primário e secundário ocorrendo durante a cicatrização de lesões ósseas (RODRIGUEZ-MERCHAN, E.C., 2021.).

Vale ressaltar que, independente da conduta terapêutica utilizada, os princípios e estágios cicatriciais abordados tendem a ser os mesmos (SHEEN et al., 2023.), desse modo, a utilização por exemplo de enxertos ósseos e biomateriais de implante (Figura 9), normalmente, apresentam o mesmo tipo de comportamento e estágios para cicatrização (LI et al., 2022.), com exceção da necessidade de uma fase inicial de infiltração mais extensa, onde vasos sanguíneos e células precisam migrar e aderir aos materiais, para viabilizar a atividade biológica, que posteriormente promoverá a osteointegração do material externo ao osso nativo (ZHAO et al., 2021.).

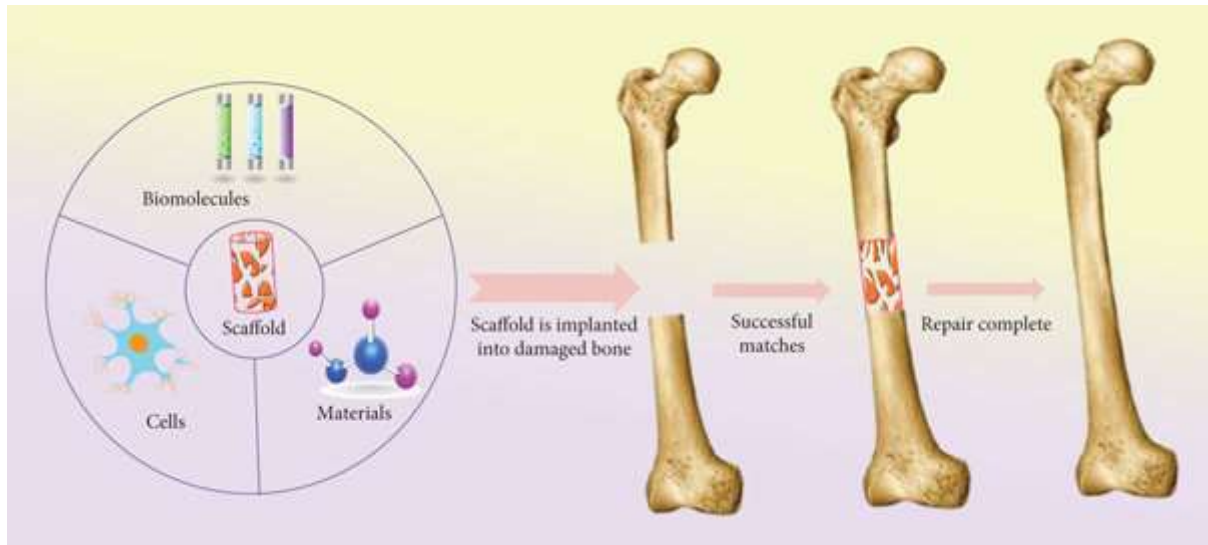


Figura 9 - Esquema ilustrativo da implantação de um biomaterial de implante como material de enxerto para o reparo ósseo. (Adaptado de LI et al., 2022.).

2.5 MATERIAIS DE IMPLANTE E DE ENXERTO PARA TRATAMENTO ÓSSEO

Historicamente, de acordo com achados arqueológicos, as primeiras fraturas ósseas curadas encontradas em humanos pré-históricos datam de pelo menos 46 mil anos atrás. Após milhares de anos utilizando apenas os princípios de tração e imobilização como único tratamento disponível para fraturas ósseas, a primeira fixação externa verdadeiramente realizada foi aplicada há apenas 120 anos, quando o cirurgião belga Albin Lambotte introduziu o termo “osteossíntese” e “fixação do osso com utilização de dispositivos mecânicos” (DE ARAÚJO et al., 2023.).

Com o passar do tempo, desenvolvimento de antissépticos, anestesiologia e possibilidades diagnósticas de imagem óssea, o tratamento das inconformidades ósseas tem se mostrado cada vez mais especializados e exigentes (DE ARAÚJO et al., 2023.).

Além da correção de fraturas tradicionais, os defeitos ósseos de tamanho crítico são considerados os principais desafios clínicos a serem tratados tanto na ortopedia quanto na odontologia. São caracterizados pela ausência de osso em quantidade importante, o que geralmente ocorre como consequência de má formação congênita,

osteogênese imperfeita, doença degenerativa, infecção grave, lesões traumáticas, não-união de fraturas ou excisão de tumores (CHENG et al., 2014.).

Por haver necessidade primária de preenchimento, que pode estar associada ou não a outros comprometimentos teciduais, o tratamento clínico quase sempre é difícil e desafiador, o que geralmente, demanda a utilização de implantes e grande quantidade de material de enxerto para preencher a área defeituosa, fornecer suporte mecânico e orientar o crescimento de novos tecidos durante o tratamento ósseo reconstrutivo (CHENG et al., 2014.).

Nesse contexto, o tratamento ósseo ainda é muito dependente das fontes e da qualidade biológica dos materiais de implante disponíveis para sua utilização (ZHAO et al., 2021.). A principal função dos enxertos ósseos é fornecer suporte mecânico e estimular a osteo-regeneração com o objetivo final de substituição óssea. Nesse aspecto, o ideal é que estejam presentes as quatro propriedades biológicas essenciais para o desempenho dessa função: osteocondução, osteoindução, osteogênese, e osteointegração (GHANAATI et al. 2014.).

A osteocondução se refere à capacidade de um material em servir como um andaime bioativo no qual as células hospedeiras podem crescer, permitindo que vasos, osteoblastos e células progenitoras hospedeiras migrem para a matriz interconectada (GHANAATI et al. 2014.).

A osteoindução é a capacidade de recrutamento de células-tronco hospedeiras para o local do enxerto, onde proteínas locais e outros fatores induzem a diferenciação de células-tronco em osteoblastos (GHANAATI et al. 2014.). Vários fatores de crescimento influenciam esse processo, incluindo fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGFs), fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) e fatores de crescimento transformadores- β (TGFs- β) (ZHAO et al., 2021.).

Osteogênese se refere à formação de novo osso, que ocorre por meio de osteoblastos ou células progenitoras que passam a estar presentes no material de enxerto, e por fim, a osteointegração refere-se a capacidade do material utilizado se ligar funcionalmente, quimicamente e biologicamente, à superfície do osso nativo passando a fazer parte de sua composição (GHANAATI et al. 2014.).

Por essa linha, no que diz respeito à utilização e desenvolvimento de biomateriais substitutos ósseos, o desafio científico atual é garantir que essas quatro propriedades fundamentais possam estar ativas e presentes nos materiais de implante durante sua aplicação no tecido (ZHAO et al., 2021.).

2.6 BIOENGENHARIA DE TECIDOS ÓSSEOS

A bioengenharia de tecidos é a área da ciência que estuda a restauração da forma e da função dos tecidos. No que diz respeito ao tecido ósseo, utiliza abordagens que envolvem a combinação de biomateriais e de células vivas, que em condições especiais conferem estímulos bioquímicos e físicos adequados para incentivar a regeneração e formação óssea (GRUSKIN et al., 2012.).

Com base nas propriedades fundamentais e nos critérios mínimos de aplicabilidade, sabe-se que para produção de um biomaterial substituto ósseo ideal, é imprescindível que o produto seja constituído por uma rede porosa altamente conectada, de tamanho suficiente que permita a migração celular, troca de fluidos, crescimento, e vascularização do tecido. Além disso, deve favorecer o desenvolvimento celular, ser capaz de suportar cargas mecânicas inerentes do estímulo compressivo funcional do osso, e principalmente, não gerar resposta imune no hospedeiro (SHRIVATS et al., 2014.).

O desenvolvimento de biomateriais com esse grau de eficiência e segurança, com capacidade para modular sua funcionalidade em resposta aos ambientes fisiológicos e mecânicos dinâmicos encontrados *in vivo*, continua sendo um desafio importante para a Bioengenharia de Tecidos. Nesse contexto, apesar do constante progresso na compreensão das propriedades biológicas e físico-mecânicas relacionadas ao reparo do tecido ósseo, pode-se dizer, que ainda existem poucas tecnologias implantáveis, que apresentam características biomiméticas e bioresponsivas que de fato resultem em soluções clínicas efetivas e com bons resultados (FERNANDEZ-YAGUE et al., 2015.).

2.6.1 Biomateriais Substitutos Ósseos

Ao longo do tempo, uma grande variabilidade de biomateriais têm sido desenvolvidos e testados com a finalidade de serem utilizados como substitutos ósseos (FERNANDEZ-YAGUE et al., 2015.), e basicamente, têm sido classificados quanto à fonte de origem da sua matéria-prima, e quanto ao grupo de componentes que os constituem (SHRIVATS et al., 2014.), podendo ser produtos originados de materiais inorgânicos ou orgânicos, e que ainda podem apresentar constituintes naturalmente derivados, mistos ou sintéticos (Figura 10) (ZHAO et al., 2021.).

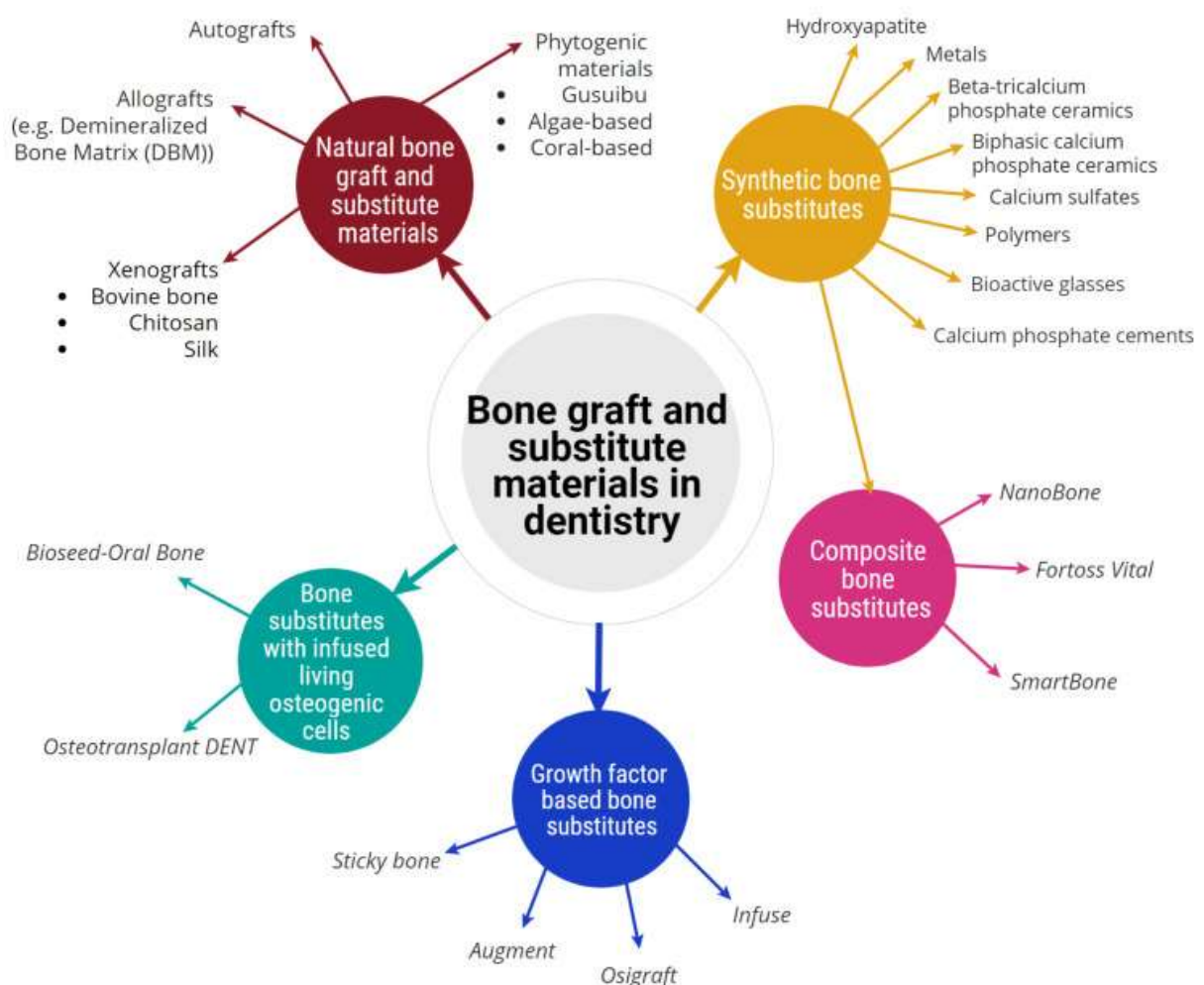


Figura 10 - Esquema ilustrativo da classificação de enxertos e materiais substitutos ósseos utilizados em odontologia. (Adaptado de Zhao et al., 2021.).

Apesar de grande esforço científico para melhoria de produtos sintéticos, a preferência por substitutos ósseos derivados do osso natural (DONG et al., 2009.), das mais variadas formas, ainda são unanimidade na escolha para aplicação clínica, estima-se que até 90% de todos os procedimentos de enxerto ósseo realizados em todo o mundo utilizam um enxerto ósseo natural ou um material substituto orgânico (ZHAO et al., 2021.).

Os materiais de origem natural são definidos como aqueles que foram derivados de uma fonte biológica viva, podem ser subdivididos em três principais subcategorias: autoenxertos, aloenxertos, xenoenxertos (DONG et al., 2009.).

O autoenxerto (osso do próprio paciente), ainda é considerado o padrão ouro da prática clínica, pois apresenta todas as propriedades essenciais de um substituto ósseo sem haver preocupação quanto a sua histocompatibilidade e imunogenicidade. No entanto, sua utilização tem se limitado a aplicação em defeitos ósseos relativamente menores, pois apresenta limitações de uso consideráveis, tais como: restrição da quantidade de material disponível para coleta, necessidade de cirurgia adicional, maior morbidade relacionada à ferida secundária, risco de sangramento excessivo, infecção, inflamação, e desenvolvimento de dor crônica no sítio de coleta (ZHAO et al., 2021.).

Como alternativa imediata ao autoenxerto, os aloenxertos (osso da mesma espécie) podem ser obtidos de um doador vivo compatível ou de fontes ósseas cadavéricas, sendo preparados para utilização de três formas: fresco, congelado ou liofilizado (DONG et al., 2009.).

Os materiais de aloenxerto frescos e congelados tendem a apresentar propriedades osteoindutoras preservadas e maior resistência estrutural e capacidade de osteointegração do que os mesmos materiais liofilizados (DONG et al., 2009.), no entanto, atualmente raramente são utilizados, pois pode apresentar risco de rejeição, toxicidade e transmissão de doenças, especialmente HIV e hepatite, para pacientes transplantados (ZHAO et al., 2021.).

Além disso, os aloenxertos também encontram resistência de ordem regulatória e cultural, não estando disponível em alguns locais por questões religiosas, por

proibição da comercialização de tecidos humanos, por dificuldade logística, mas principalmente, pela escassez dos tecidos e devido ao elevado preço do material (ZHAO et al., 2021.).

Uma opção derivada do aloenxerto que tem sido amplamente utilizada é a matriz óssea desmineralizada (DBM), um biomaterial de origem humana que é tratado com ácido para remoção da matriz mineral, e exposição da matriz orgânica subjacente, rica em proteína morfogenética óssea (BMP) e fatores de crescimento, como TGF- β e FGF. Esses fatores de crescimento podem estimular a diferenciação de células-tronco mesenquimais (MSCs) em osteoblastos, conferindo uma ótima capacidade osteoindutora (ZHAO et al., 2021.).

Apesar de apresentar estrutura trabecular semelhante a do tecido original, o que permite a formação óssea após o crescimento vascular e a infiltração de células progenitoras, DBM ainda carece de suporte estrutural, que resulta em propriedades mecânicas ruins, o que limita sua utilização apenas ao preenchimento de pequenos defeitos ósseos (ZHAO et al., 2021.).

Os xenoenxertos, por sua vez, são materiais derivados de uma espécie geneticamente não relacionada ao hospedeiro, obtidos principalmente de tecidos animais, são devidamente tratados para não haver risco de imunogenicidade (ZHAO et al., 2021.).

Felizmente, ossos de diferentes espécies possuem entre si uma estrutura tecidual similar (ZHANG et al., 2012.), e devido à sua pronta disponibilidade e baixo custo (LEI et al., 2015.), podem ser amplamente explorados para serem utilizados como substitutos ósseos de alta qualidade, capazes de criar um microambiente favorável ao crescimento ósseo, pois apresentam uma arquitetura trabecular e porosa que lhe conferem alto potencial osteocondutivo, permitindo a invasão de vasos sanguíneos e células ósseas hospedeiras, que induzem a ossificação e a osteointegração (GHANAATI et al., 2014.).

O tratamento com xenoenxertos foi descrito pela primeira vez há mais de 500 anos pelo cirurgião do Império Otomano Ibrahim Bin Abdullah, ao realizar cranioplastia em cães e cabras (DE ARAÚJO et al., 2023.). Na última década, houve uma crescente demanda pelo uso e desenvolvimento de xenoenxertos provenientes de ossos

desproteinizados (BI et al., 2013.), tecidos tratados em alta temperatura para eliminação de todos os componentes orgânicos, resultando em um produto de baixa imunogenicidade e que exhibe propriedades estruturais muito semelhantes ao osso humano, podendo ser utilizados como materiais de enxerto osteocondutores muito eficazes (CASTRO-CESEÑA et al., 2013.).

Diversas são as apresentações comerciais disponíveis no mercado de implantes, dentre as principais citam-se os materiais derivados de ossos bovinos (Bio-Oss®, Endobon®, OsteoGraf® e Cerabone®) (ZHAO et al., 2021.), e suínos (OsteoBiol®), intensamente utilizados pela clínica odontológica e ortopédica mundial (MIYAUCHI et al., 2022.).

Apesar de serem amplamente utilizados, os xenoenxertos desproteinizados, assim como diversos outros materiais substitutos ósseos, servem unicamente como uma alternativa de preenchimento estrutural para que ocorram processos osteo-regenerativos. Portanto, do ponto de vista clínico, são pouco eficazes, pois satisfazem apenas o princípio da osteocondutividade, carecendo de maior potencial para solucionar os problemas cruciais relacionados às respostas osteointegrativas da relação enxerto x hospedeiro (SHRIVATS et al., 2014.).

A taxa de sucesso de um enxerto ósseo está cada vez mais dependente de outras propriedades tais como biocompatibilidade, bioreabsorvibilidade, esterilidade, integridade estrutural, porosidade adequada para crescimento vascular, plasticidade, facilidade de manuseio, custo e resistência à compressão (HOLZAPFEL et al., 2013.).

O alinhamento desse conjunto de propriedades tende a contribuir para que haja maiores chances de ocorrência de processos osteo-regenerativos bem-sucedidos (DE ARAÚJO et al., 2023.). Estratégias de engenharia de tecido de próxima geração têm priorizado produtos de regeneração óssea que não apenas sustentem fisicamente os defeitos ósseos, mas que possam também favorecer química e biologicamente os fatores de crescimento e células que estarão presentes no tecido (Figura 11) (BATTAFARANO et al., 2021.).

É imprescindível que os dispositivos demonstrem maior versatilidade e multifuncionalidade (DE ARAÚJO et al., 2023.), que possibilitem o enriquecimento

com células (MIYAUCHI et al., 2022.), o transporte e a capacidade de liberação de fármacos ou substâncias estimulantes, o reconhecimento de receptores, e a possibilidade biodegradabilidade programada (ZHAO et al., 2021.)

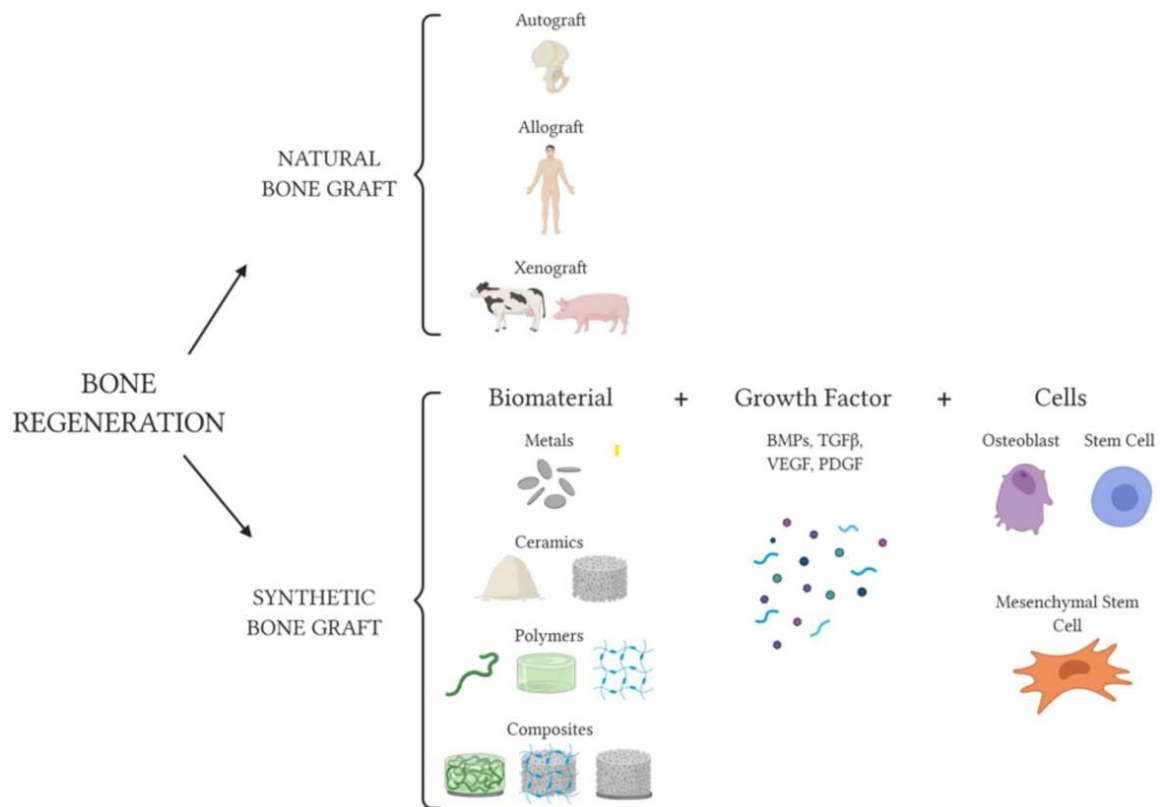


Figura 11 - Esquema representativo das principais alternativas de enxerto investigadas para regeneração do tecido ósseo (BATTAFARANO et al., 2021.).

2.6.2 Desenvolvimento de Substitutos Ósseos por Descelularização

Nos últimos anos tem sido frequentemente demonstrado o papel fundamental da matriz extracelular (ECM) tecidual em processos regenerativos de diversos órgãos (CRAPO et al., 2011.). Nesse contexto, a técnica de descelularização tecidual surge como uma alternativa de processamento particularmente interessante para a produção de biomateriais (WANG et al., 2015.), pois tem a capacidade de promover a remoção do conteúdo celular antigênico presente nos tecidos, e ao mesmo tempo, pode preservar os demais constituintes estruturais essenciais presente na matriz (BADYLAK et al., 2011.).

Quando realizada no tecido ósseo, a descelularização contribui para o desenvolvimento de um arcabouço especializado (MANSOUR et al., 2017.), de suporte tridimensional que mantém a preservação da porção inorgânica e orgânica nativa do osso (PAPADIMITROPOULOS et al., 2015.), resultando em um meio adequado e propício para desenvolvimento das células ósseas (FU et al., 2016.).

A aplicação dessa técnica pode contribuir para minimizar os problemas atuais de biocompatibilidade dos enxertos convencionais, pois a matriz extracelular é frequentemente poupada de resposta imunitária (CRAPO et al., 2011.).

Desde que produzidos adequadamente, os biomateriais descelularizados não apresentam potencial imunogênico entre as diferentes espécies, pois não contém conteúdo celular vivo ou em quantitativo remanescente suficiente para gerar rejeição ou a transferência de doenças (BADYLAK et al., 2011.).

Uma vez preservada a sua capacidade estrutural básica de suporte e função osteocondutora através da matriz mineral (LU et al., 2013.), a matriz extracelular descelularizada, por meio dos demais compostos orgânicos osteogênicos presentes, tais como proteínas e fatores de crescimento que são importantes para sinalização e adesão celular, pode fornecer um substrato especializado que contribui para acelerar a proliferação e a diferenciação durante o processo de cicatrização tecidual e incorporação do biomaterial (BENDERS et al., 2013.).

A utilização de enxertos ósseos provenientes de biomateriais de ECM descelularizada é uma alternativa viável para apoiar o desenvolvimento de produtos mais osteoindutores, e de maior especificidade tecidual, capaz de favorecer a atividade celular e potencializar a regeneração óssea (CHENG et al., 2014.), o que contribuiria para superar as restrições práticas e limitações clínicas dos enxertos atualmente utilizados, podendo inclusive, representar um caminho mais rápido para o avanço tecnológico de desenvolvimento de biomateriais de maior potencial do que pela investigação de matrizes sintéticas bioartificiais (STEIJVERS et al., 2022).

Na literatura são descritos diversos protocolos de descelularização óssea que podem variar de acordo com o tipo de material utilizado e a finalidade dos arcabouços produzidos. De modo geral, envolvem a utilização de métodos físicos

com etapas de limpeza ultrassônica, lavagem sob diferentes condições de pressão e temperatura e congelamento, além de tratamentos químicos que incluem a utilização de detergentes iônicos como dodecil sulfato de sódio (SDS) e o Triton X-100, álcool e peróxido de hidrogênio, e de métodos enzimáticos complementares (BENDERS et al., 2013.).

Dependendo do método de preparo, a ECM descelularizada pode conter além de proteína colágena abundante, diferentes níveis de proteínas não colágenas, glicoproteínas e proteoglicanos, além de fatores de crescimento, como fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator transformador de crescimento ($TGF\beta$) e proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) (PAPADIMITROPOULOS et al., 2015.).

Enquanto a rede de colágeno presente na matriz extracelular fornece estrutura osteocondutora e algum efeito de osteoindução (SAWKINS et al., 2013.), as demais proteínas constituintes da matriz óssea são as que exibem efeito osteoindutor importante (MOORE et al., 2011.), principalmente as proteínas morfogenéticas ósseas, que juntamente com fatores de crescimento, são responsáveis pelo início de cascata de quimiotaxia de células osteoprogenitoras e diferenciação de células ósseas. Ambos os efeitos são importantes, mas é a natureza osteoindutora que permite que a regeneração óssea ocorra por todo o material e não apenas nas bordas (STEIJVERS et al., 2022.).

O desenvolvimento de ECM descelularizada óssea eficiente depende da preservação de fatores bioativos que são derivados do osso de origem. É sabido que pequenas alterações composicionais da matriz extracelular podem promover diferentes comportamentos celulares nos tecidos, o que também permite afirmar que arcabouços descelularizados de tecidos em diferentes estágios de desenvolvimento, tendem a promover diferentes intensidades de resposta quando utilizados como biomateriais de implante (BENDERS et al., 2013.).

O uso de ECM recuperado de um osso maduro, pode não corresponder à quantidade e qualidade de sinalização necessária para induzir uma nova formação ou regeneração óssea (BENDERS et al., 2013.). Matrizes extracelulares mais jovens tendem a apresentar maior concentração de substâncias e maior capacidade de

ativação dos fatores de crescimento presentes nos tecidos (PAPADIMITROPOULOS et al., 2015.).

Basicamente, tal fato ocorre devido às diferentes condições de velocidade de desenvolvimento tecidual, onde há diferenças no tipo de sinalização e na estrutura tecidual presente, que contribuem para uma diferente na modulação da atividade celular. Nesse contexto da regeneração óssea, apesar das matrizes adultas normalmente apresentam características arquitetônicas e estruturais mais condizentes com a necessidade dos pacientes, é esperado que biomateriais desenvolvidos a partir de matrizes descelularizadas provenientes de tecidos fetais, jovens ou em pleno desenvolvimento sejam mais eficazes em promover resposta biológica do que as matrizes adultas ou senis (PAPADIMITROPOULOS et al., 2015.).

Além da disponibilidade de fatores de crescimento provenientes de matrizes extracelulares jovens, a disponibilidade de um microambiente mecânico propício presente no interior e na superfície dos biomateriais também parece ser determinante para favorecer a adesão e expansão inicial de células, principalmente das osteoprogenitoras (LEE et al., 2011.).

Nesse sentido, estudos têm demonstrado que a utilização de hidrogéis de matriz extracelular descelularizada, como estratégia aditiva à composição dos biomateriais (FU et al., 2016.), pode contribuir para diminuir a rigidez, aumentar a elasticidade (ALOM et al., 2018.), a capacidade de osteoindução e de osteogênese, pois facilitam o transporte de substâncias, o deslocamento e a sobrevivência celular nas matrizes (SHIHJYE, et al., 2014.).

No presente estudo, foi idealizada a produção de biomateriais a partir de tecido ósseo bovino descelularizado enriquecido com hidrogel de matriz óssea fetal descelularizada, como estratégia para o desenvolvimento de novas alternativas biotecnológicas de material de enxerto com maior potencial osteoindutivo. Para avaliar se as estruturas descelularizadas revestidas com hidrogel fetal mantiveram potencial para aplicação clínica, foi priorizada a análise de uma série de testes para caracterização da constituição físico-química, estrutural, biológica e de toxicidade

dos biomateriais produzidos, de modo a compará-los com outros substitutos ósseos similares amplamente utilizados pelo mercado mundial de enxertos.

3 JUSTIFICATIVA

A importância deste estudo reside na necessidade crescente de alternativas inovadoras e de produção de biomateriais mais eficientes que superem as limitações dos enxertos ósseos convencionais. Inserido no contexto de um mercado global em expansão, devido ao envelhecimento geral da população e ao aumento do número de procedimentos cirúrgicos ortopédicos e odontológicos, o desenvolvimento de biomateriais descelularizados revestidos com hidrogel oferece uma solução promissora para superar essas limitações. A pesquisa justifica-se pela capacidade dos biomateriais descelularizados em preservar a matriz orgânica, incluindo colágeno e fatores bioativos essenciais, enquanto o revestimento com hidrogel amplifica suas propriedades regenerativas e sua interação com o tecido nativo. Ao propor uma abordagem que combina segurança, funcionalidade e escalabilidade, este trabalho não só responde às demandas clínicas e tecnológicas do setor, mas também contribui significativamente para os avanços na bioengenharia de tecidos e na medicina regenerativa, com resultados que podem impactar diretamente na melhoria da qualidade de vida de pacientes que necessitam de reconstruções ósseas.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver biomateriais descelularizados produzidos a partir de tecidos ósseos bovinos adultos e fetais.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar e quantificar a presença de conteúdo residual de DNA e SDS nos biomateriais produzidos com tecido ósseo bovino descelularizado.
- Investigar e quantificar a presença de possíveis contaminantes endotoxinas bacterianas e metais pesados nos biomateriais produzidos com tecido ósseo bovino descelularizado.
- Avaliar a microarquitetura tecidual e a resistência físico-estrutural dos biomateriais produzidos com tecido ósseo bovino descelularizado quando comparados a outros biomateriais similares disponíveis no mercado.
- Avaliar a composição química molecular e elementar presente dos biomateriais produzidos com tecido ósseo bovino descelularizado quando comparados a outros biomateriais similares disponíveis no mercado.
- Avaliar a biocompatibilidade *in vitro* de biomateriais produzidos com tecido ósseo bovino descelularizado.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Núcleo de Bioengenharia Tecidual (NBT), do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (CCS-UFES), localizado em Vitória-ES; e no Centro de Pesquisa, Inovação e Desenvolvimento (Cpid) localizado em Cariacica-ES. Para desenvolvimento da pesquisa houve autorização prévia da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES – Proposta nº 48/2018).

5.1 COLETA DO MATERIAL

Os ossos bovinos fetais e adultos foram coletados imediatamente após o abate de fêmeas gestantes em abatedouro frigorífico (Frigorífico Cariacica S.A – MAFRICAL, Cariacica - ES) devidamente inspecionado e certificado pelo Serviço de Inspeção Federal do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (SIF/MAPA/Brasil).

Foram utilizados ossos de bovinos machos adultos e de fetos com idade gestacional entre sete e oito meses de desenvolvimento. Após a coleta, o material foi acondicionado em sacos plásticos e armazenado em caixas térmicas contendo gelo, e transportados imediatamente (30 minutos) até o NBT, local onde foram devidamente limpos e dessecados.

Após a limpeza e dissecação, os ossos foram serrados com utilização de serra fita elétrica de bancada. Para o presente estudo foram selecionadas apenas as áreas específicas dos centros de ossificação endocondral dos côndilos e da região de metáfise de ossos longos como fêmur, tíbia, rádio/ulna e úmero. O osso esponjoso foi extraído do local na forma de blocos de tamanho aproximado de 3,0 x 2,0 x 1,0 cm (comprimento x largura x altura). Os blocos foram acondicionados em sacos plásticos e armazenados em caixas térmicas contendo gelo, e transportados até o NBT. Todos os blocos ósseos foram previamente lavados em água corrente antes de serem distribuídos em frascos de 500mL contendo aproximadamente 50 gramas de amostra em cada frasco.

5.2 DESCELULARIZAÇÃO

Os processos de descелularização inicialmente utilizados foram baseados nos protocolos padrões já estabelecidos por nosso grupo de pesquisa conforme descrito no registro de patente BR1020180037269 “Biomaterial de osso descелularizado enriquecido com hidrogel de matriz extracelular óssea descелularizada” (Material Suplementar - Lista de Depósitos de Patente).

De maneira resumida, o protocolo inicial patenteado (BR1020180037269) descrevia o processo de tratamento dos tecidos ósseos por imersão em solução detergente (Triton 1-3%, Dodecil Sulfato de Sódio– SDS 0,1-2,5%, ou outra), sob agitação de 200-500 rpm, durante 24 a 96 horas, até que o material apresente quantidade de DNA amostral inferior a 50 ng. Ato contínuo, recomenda insistente lavagem com solução tampão (PBS pH 7,4-7,8 ou outra), seguida de secagem em estufa com temperatura controlada entre 25-50 °C por pelo menos 12 a 48 horas, com posterior liofilização e esterilização dos produtos. Para produção do gel, utiliza-se o mesmo material *in natura* congelado em nitrogênio líquido, triturado em pequenos fragmentos, seguido de desmineralização em solução ácida (HCl 0,1-2,5 N ou outra) sob agitação de 200-500 rpm, em temperatura ambiente, durante 24 a 96 horas, lavado exaustivamente com água destilada, seco e desengordurado em solução clorofórmio/metanol, sob agitação de 200-500 rpm, em temperatura ambiente, durante 1 a 3 horas. Ato contínuo, lavagem insistente em água destilada, secagem, descелularização por imersão em solução enzimática (Tripsina 0,01%-0,5% e EDTA 0,01-0,2% ou outra), sob agitação de 200-500 rpm, a 37 °C, durante 12 a 48 horas, até que o material apresente quantidade de DNA amostral inferior a 50 ng. Em continuidade, tratamento em solução antibiótica e antifúngica 1% (Estreptomicina/Penicilina, Gentamicina ou outra), sob agitação de 200-500 rpm, a 4°C, durante 12 a 48 horas, com posterior liofilização. A partir do conteúdo liofilizado estéril, faz-se a digestão enzimática com solução ácida (HCl 0,01-0,1N) de Pepsina 0,5-2,5mg/ml, sob agitação com barra magnética, à temperatura ambiente, durante 48 a 120 horas para produção da matriz digerida com conservação em freezer a temperatura de -80 °C. A partir da matriz digerida, faz-se a neutralização por solução de NaOH 0,05-0,5N e solução tampão (PBS pH 7,4-7,8 ou outra) a 4 °C, com posterior gelificação a 37°C por pelo menos 1 a 6 horas. O biomaterial final é produzido por imersão da matriz sólida no gel resultante da própria matriz

descelularizada, de modo que o hidrogel preencha as porosidades ali presentes e seja capaz de revestir todo o material.

5.2.1 Descelularização de Osso Bovino Fetal

Os blocos de osso esponjoso bovino fetal (50g) foram incluído em garrafas de vidro com tampa e lavados sob imersão em 400mL de solução tampão Tris-HCl (10 mM, pH 7,8) com Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA) 0,2% e Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 1%. A lavagem descelularizante ocorreu sob agitação contínua (160 rpm) e temperatura controlada (36°C), durante 96 horas, em incubadora Shaker com agitação orbital (Modelo SL-222 / Solab). As soluções foram completamente trocadas a cada 12 horas.

Ao fim das 96 horas de lavagem em solução descelularizante, os blocos foram lavados brevemente (30 minutos) em solução clareadora de Peróxido de Hidrogênio 40 volumes (adaptado de LEI et al., 2015.), seguido de extensa lavagem em solução tampão PBS (1x) durante 96 horas, sendo mantidas as mesmas condições de agitação, temperatura e trocas de solução. Após a lavagem, os ossos foram levados ao NBT para secagem em estufa a 37°C, durante 48 horas. Após secagem as amostras no formato bloco foram armazenadas em freezer -80 °C ou encaminhadas para moagem em moinho de lâminas circulares para produção de material particulado com granulometria de 0,5 - 2 mm. O material particulado após moagem também foi envasado e armazenado em freezer -80 °C.

5.2.2 Descelularização de Osso Bovino Adulto

Os blocos de osso esponjoso bovino adulto (50g) foram incluído em garrafas de vidro com tampa e lavados sob imersão em 400mL de solução tampão Tris-HCl (10 mM, pH 7,8) com Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA) 1,6% e Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 4%. A lavagem descelularizante ocorreu sob agitação contínua (160 rpm) e temperatura controlada (36°C), durante 96 horas, em Incubadora Shaker com agitação orbital (Modelo SL-222 / Solab). As soluções foram completamente trocadas a cada 12 horas.

A cada 24 horas de lavagem em solução descelularizante, era realizada uma pausa para realização de uma breve lavagem desengordurante (30 minutos), que baseava-se na troca da solução descelularizante por uma solução 1:1 de metanol:clorofórmio sob mesmas condições de agitação e temperatura. Ao todo foram feitas 4 lavagens desengordurantes, uma a cada 24 horas de protocolo. Ao fim da lavagem desengordurante sempre eram realizadas duas lavagens breves (30 minutos com solução tampão PBS (1X) antes de ser reintroduzida a solução descelularizante para continuidade da descelularização.

Ao fim das 96 horas de lavagem em solução descelularizante, os blocos foram lavados brevemente (30 minutos) em solução clareadora de Peróxido de Hidrogênio 40 volumes (adaptado de LEI et al., 2015.), seguido de extensa lavagem em solução tampão PBS (1x) durante 96 horas, sendo mantidas as mesmas condições de agitação, temperatura e trocas de solução. Após as lavagens, os ossos foram levados ao NBT para secagem em estufa a 37°C, durante 48 horas. Após secagem as amostras no formato bloco foram armazenadas em freezer -80 °C ou encaminhadas para moagem em moinho de lâminas circulares para produção de material particulado com granulometria de 0,5 - 2 mm. O material particulado após moagem também foi envasado e armazenado em freezer -80 °C.

5.3 PRODUÇÃO DO HIDROGEL

A produção de hidrogel seguiu o protocolo desenvolvido e padronizado por nosso grupo de pesquisa, conforme descrito por Leal Rabello (2023).

A partir de ossos bovinos fetais descelularizados moídos, previamente preservados em freezer -80 °C, foi idealizada a extração da matriz extracelular óssea fetal (ECM-fb) para produção de hidrogel. O processo teve início com a etapa de desmineralização do material granulado descelularizado por imersão em solução HCl (0,5M), na proporção de 25 mL/g de osso, sob agitação 200 rpm, 23,0 °C, durante 24 horas.

Após o tempo de desmineralização, foram realizadas dez lavagens rápidas (15 minutos cada), nas mesmas condições de agitação e temperatura, com proporção de cem mL de solução para cada um grama de tecido descelularizado (100 mL/g).

Sequencialmente foram realizadas uma lavagem com ácido peracético 0,2%, 10 lavagens de 15 minutos com água destilada (100 mL/g), e duas lavagens com PBS (1x) estéril nas mesmas condições já descritas. Após lavados, os conteúdos foram liofilizados (Liofilizador K108 da Liotop®) no Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares - LABION / CCS / UFES, e posteriormente armazenados a - 80°C.

A produção do hidrogel fetal foi realizada de acordo com o protocolo adaptado de Sawkins *et al.* (2013). Os ossos moídos descelularizados e desmineralizados, foram digeridos com pepsina 1 mg/mL em HCl 0,01M, para formação de solução pré-gel (matriz digerida) na concentração 10 mg/mL, que foi armazenada a -20 °C até o uso.

Para ocorrência da formação do gel de ECM-fb, foi realizada a ressuspensão da matriz digerida com a adição de 1/10 do volume de matriz com PBS 10x (pH 7,4), que posteriormente teve o pH corrigido para 7,4 com a adição de NaOH (0,1M). Nesta etapa, todas as soluções eram utilizadas refrigeradas e mantidas à temperatura de 4°C. A gelificação ocorreu quando a matriz digerida ressuspensa e de pH 7,4 foi mantida em estufa 37 °C por aproximadamente uma hora.

5.4 BIOMATERIAL DESCELULARIZADO REVESTIDO COM HIDROGEL

Finalizados os processo de descelularização óssea (adulto e fetal) e de produção de hidrogel (fetal), foi idealizada a produção de biomateriais descelularizados revestidos com hidrogel ECM-fb.

Os tecidos ósseos descelularizados fetal ou adulto, em formato bloco ou grânulo, foram envasados com hidrogel de matriz extracelular óssea fetal (ECM-fb) em frasco de vidro na proporção de uma grama de tecido ósseo descelularizado para 4 mL de hidrogel fetal (1 g : 4 mL). Os frascos de vidro contendo os biomateriais foram vedados e liofilizados (Liofilizador K108 da Liotop®) no Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares - LABION / CCS / UFES, durante 48 horas.

Após liofilização, o biomaterial revestido apresentava o tecido descelularizado seco (granulado ou bloco) envolto em pó fino de hidrogel fetal. Os frascos foram tampados, lacrados, identificados e encaminhados para esterilização por irradiação gama na dose de 17,5 kGy, realizado no Núcleo do Laboratório de Irradiação Gama

do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear - CDTN em Belo Horizonte-MG, com a utilização de um irradiador multipropósito de categoria II, equipado com uma fonte de Cobalto-60, armazenada à seco.

5.5 ANÁLISE DO PROCESSO DE DESCELULARIZAÇÃO

5.5.1 Quantificação de DNA Residual

Para essa análise, utilizou-se o protocolo de extração salina do estudo de Hanotte *et al.* (1992), adaptado por David Vieites - U.C. Berkeley. Foram analisadas as amostras de biomaterial no formato grânulo (adulto, fetal e seus respectivos controles *in natura*), e as amostras de hidrogel adulto e fetal.

As amostras de biomateriais no formato grânulo: fetal descelularizado (FD, n=12) e adulto descelularizado (AD, n=12), e as amostras de osso *in natura* fetal controle (FC, n=12) e adulto controle (AC, n=12) foram devidamente preparadas em tubos de polipropileno de 2 mL com tampa rosqueável (FastPrep®, Qbiogene), contendo a proporção de 100 mg de tecido para cada 1 mL de solução PBS (pH 7,4) e uma esfera cerâmica (FastPrep®, Qbiogene) estéreis. Os tubos preparados foram processados em homogeneizador de amostras (Modelo FASTPREP–24™ 5G, MP BIOMEDICALS), sob velocidade calibrada (6 m/s), em quatro ciclos de 30 segundos de duração. Entre cada ciclo, os tubos contendo as amostras foram refrigerados em gelo durante cinco minutos (SARAH BECK-CORMIER, 2018.). Este processamento de desintegração das amostras para melhor exposição do material biológico ósseo foi realizado no Laboratório de Biotecnologia do Instituto Federal do Espírito Santo - Campus Vila Velha.

As amostras de osso granulado previamente homogeneizadas e as amostras de hidrogel foram secas em equipamento liofilizador (K108 da Liotop®) no Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares - LABION / CCS / UFES, durante 24 horas.

Todas as amostras secas (10 mg) foram adicionadas em microtubos estéreis de 2 mL contendo solução de lise composta por 410 µL de buffer de extração (0,2 mL de solução Tris 1M pH 8,0 / 0,4 mL de solução NaCl 5M / 0,4 mL de solução EDTA

0,5M pH 8,0 / 19 mL de água ultrapura), 80 µL de SDS 10% e 15 µL de proteinase K (20 µg/µL).

Os microtubos contendo as amostras e a solução de lise foram incubados a 55°C *overnight* e em seguida, centrifugados a 13.700 rpm por 5 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para novos microtubos e adicionou-se 180 µL de NaCl 5M. As amostras foram homogeneizadas até a formação de um precipitado de cor branca.

Os microtubos foram novamente centrifugados a 13.700 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi transferido para novos microtubos e foram adicionados 800 µL de isopropanol gelado. Houve nova homogeneização e centrifugação a 13.700 rpm, agora por 7 minutos. O sobrenadante foi descartado. No microtubo remanescente, foram adicionados 250 µL de etanol à 80% homogeneizados suavemente. Os microtubos foram centrifugados a 13.700 rpm por mais 7 minutos, e a eles novamente foram adicionados 250 µL de etanol à 80% e homogeneizados suavemente. Fez-se novamente a centrifugação dos microtubos a 13.700 rpm por 7 minutos e o sobrenadante foi descartado. O etanol residual foi evaporado à 55 °C por 30 minutos em estufa estéril.

O DNA contido nos microtubos das amostras foi ressuspenso em 50 µL de água ultrapura e mantidos *overnight* em geladeira (4 °C) para diluição. Por fim, procedeu-se com leitura das amostras, em triplicata, em equipamento espectrofotômetro (Modelo NanoDrop® 2000, Thermo Scientific) no Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares (LABIOM) do Centro de Ciências da Saúde – CCS/UFES.

5.5.2 Quantificação de SDS residual

A análise de SDS residual foi elaborada utilizando uma adaptação do ensaio de azul de metileno descrito por ZVAROVA *et al.* (2016).

Primeiramente, foi confeccionada uma curva padrão de SDS a partir de uma solução de SDS a 2%. Foram transferidos 1 mL da solução de SDS a 2% para um tubo contendo 1 mL de azul de metileno a 0,0125%. A partir dessa solução de concentração de SDS a 1% foram realizadas diluições seriadas, totalizando onze pontos distintos de diluição, sendo obtidas amostras com faixa de concentração

entre 1,0% e 0,0025%. Em seguida, prosseguiu-se com a leitura das diluições em triplicata em aparelho Espectrofotômetro (Ocean optics, modelo USB 2000) na faixa de 650 nm, no Laboratório de Nanomateriais Funcionais do Centro de Ciências da Saúde – CCS/UFES.

Para a mensuração de SDS residual, foram utilizadas amostras dos tecidos ósseos e dos efluentes das diversas etapas de lavagem no processo de descelularização, além da verificação nos próprios biomateriais finais liofilizados (100 mg). Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

As amostras dos biomateriais nas apresentações grânulos e fragmento (bloco) foram previamente processadas em homogeneizador de amostras (Modelo FASTPREP–24™ 5G, MP BIOMEDICALS) conforme descrito no Item 5.5.1.

Para quantificação, optou-se pela padronização do volume de 40 µL de cada amostra, que foram transferidos para tubos de 15 mL e em seguida, pipetados igualmente em cada tubo o volume de 3,96 mL de solução de azul de metileno a 0,0125%. As amostras foram agitadas e deixadas em repouso por cerca de 30 minutos.

Após essa etapa foi adicionado 8 mL de clorofórmio em cada tubo, que foram novamente agitados e deixados em repouso por mais 30 minutos. Foi realizada a leitura de absorção das diluições em triplicata no UV-Vis, em escala de 200 a 800 nm, no mesmo aparelho espectrofotômetro, utilizando-se água ultrapura para leitura do branco.

5.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS BIOMATERIAIS DESCELULARIZADOS ENRIQUECIDOS COM HIDROGEL

5.6.1 Densidade

A densidade real (g/cm^3) foi determinada a partir de cálculos baseados na relação massa/volume dos biomateriais, sem considerar o espaço vazio existente entre as partículas das amostras. O ensaio foi realizado por meio de picnometria em gás

hélio, conforme descrito por Sampaio E Silva (2010), sob condições laboratoriais de 48% umidade e 23,0  C de temperatura. Foram utilizadas amostras de biomaterial adulto e fetal na apresentação de grânulos (0,5 - 2 mm) revestidos com hidrogel de ECM-fb liofilizado (n=5).

Devido a especificidade dos biomateriais, tendo em vista a porosidade e a existência de espaço vazio entre o grânulos, também foi analisada a densidade aparente (g/cm^3), a partir de cálculos baseados na massa dos biomateriais, pela técnica de hidratação prévia em água durante 24 horas (Princípio de Arquimedes), conforme descrito por Sampaio E Silva (2010), sob condições laboratoriais de 48% umidade e 21,4  C de temperatura. Para verificação da densidade aparente utilizou-se o mesmo padrão de amostras anterior: biomateriais adulto e fetal na apresentação de grânulos (0,5 - 2 mm) revestidos com hidrogel de ECM-fb liofilizado (n=5).

5.6.2 Compressão

O ensaio de compressão baseou-se no protocolo adaptado da metodologia de CANEVAROLO, 2003. Foi utilizado equipamento Instron EMIC, modelo 23-30, com célula de carga de 30 KN e velocidade de ensaio de 1,3 mm/min, sob condições laboratoriais de 48% umidade e 21,4  C de temperatura.

Foram utilizados blocos de biomaterial adulto e fetal, com dimensões padronizadas de 3,0 x 2,0 x 1,0 cm (comprimento x largura x altura) revestidos com hidrogel de ECM-fb liofilizado (n=5). Para fins comparativos, também foi utilizado sob mesmas condições de teste, o produto comercial Geistlich Bio-Oss  Collagen (n=5).

5.6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

Para análise prévia da morfologia dos ossos fetal e adulto descelularizados, foi utilizada a microscopia por varredura (MEV) com objetivo de visualizar o aspecto geral dos tecidos recobertos com hidrogel e a presença de poros na superfície dos biomateriais. Foram utilizadas amostras de biomaterial adulto e fetal no formato bloco, de dimensões padronizadas de 3,0 x 2,0 x 1,0 cm (comprimento x largura x

altura) e no formato forma de grânulos (0,5 - 2 mm), com e sem revestimento com hidrogel de ECM-fb liofilizado.

As amostras liofilizadas foram previamente cobertas por ouro em metalizador (Desk V, Denton Vacuum), e em seguida, foram analisadas com a utilização de microscopia eletrônica de varredura (Jeol, JEM6610 LV operado a 20KV com filamento de Tungstênio), no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR-CCS-UFES). Foram analisadas cerca de 15 imagens de cada amostra, obtidas aleatoriamente, em aumentos de 100 a 500 vezes.

5.6.3.1 Porosidade

Para o ensaio de porosidade foram utilizadas amostras de biomaterial adulto e fetal na forma de grânulos (0,5 - 2 mm) revestidos com hidrogel de ECM-fb liofilizado. Para efeito de comparação também foram utilizados na análise dois produtos comerciais que são amplamente difundidos no mercado: Biomateriais granulados Bio-Oss®-Geistlich (1-2 mm) e Cerabone®-Straumann (1-2 mm).

As amostras liofilizadas foram previamente cobertas por ouro em metalizador (Desk V, Denton Vacuum), e em seguida, foram analisadas com a utilização de microscopia eletrônica de varredura (Jeol, JEM6610 LV operado a 20KV com filamento de Tungstênio), no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR-CCS-UFES).

A partir das imagens obtidas por MEV, foi realizada a mensuração do diâmetro dos poros presentes em cada imagem das amostras dos biomateriais. Para esta análise, utilizou-se o plugin Diameter J do software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, EUA) (HOTALING et al., 2015). Foram analisadas 10 imagens de cada amostra, obtidas aleatoriamente em um aumento de 50 vezes. A porosidade foi determinada a partir do tamanho médio dos poros medidos nas imagens de cada biomaterial.

5.6.3.2 Composição Elementar Por Energia Dispersiva De Raios X (EDS)

Foram utilizadas amostras de biomaterial adulto e fetal na forma de grânulos (0,5 - 2 mm) revestidos com hidrogel de ECM-fb liofilizado. Para efeito de comparação também foram utilizados na análise dois produtos comerciais que são amplamente difundidos no mercado: Biomateriais granulados Bio-Oss®-Geistlich (1-2 mm) e Cerabone®-Straumann (1-2 mm). As amostras liofilizadas foram previamente cobertas por ouro em metalizador (Desk V, Denton Vacuum).

Para visualização das amostras, captura de imagens e determinação da composição elementar por energia dispersiva de raios X (EDS), foi utilizado microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JEM6610 LV operado a 20KV com filamento de Tungstênio), equipado com detector de raios X (Bruker XFlash 6/10), localizado no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR-CCS-UFES). Foram analisadas 3 imagens de cada amostra obtidas aleatoriamente em um aumento de 50x.

5.6.4 Composição Elementar Por CHNS-O

Para quantificação dos elementos químicos estruturais tais como Carbono (C), Hidrogênio (H) e Nitrogênio (N), e enxofre (S), e Oxigênio (O) foram utilizadas amostras de biomaterial adulto e fetal nas apresentações bloco (1,0 x 1,0 x 2,0 cm) revestidos com hidrogel liofilizado. Para efeito de comparação foram analisadas também amostras dos produtos comerciais Bio-Oss Collagen®-Geistlich bloco (1,0 x 1,0 x 2,0 cm) e Orthogen®-Baumer bloco (0,5 x 1,5 x 1,5 cm).

A quantidade de amostra utilizada foi padronizada em 3-4 mg (n=6), armazenadas em cápsulas de tungstênio, que foram analisadas por combustão completa com a utilização de equipamento FlashSmart Elemental Analyzer (Thermo Scientific, EUA) do Laboratório de Caracterização Ambiental - LACAR do Centro de Pesquisa Inovação e Desenvolvimento do Espírito Santo - CPID.

5.6.5 Análise termogravimétrica (DSC e TGA)

Para caracterização termogravimétrica dos biomateriais foram realizadas a Análise Termogravimétrica (TGA) e a Análise Térmica Diferencial (DSC). Para ambos os testes (TGA e DSC) foram utilizadas amostras de biomaterial adulto e fetal na forma de grânulos (0,5 - 2 mm) revestidos com hidrogel liofilizado.

Para o ensaio de TGA utilizou-se da adaptação das metodologias de MONTEIRO et al. 2001; CANEVAROLO, 2003; e AZEVEDO et al. 2009. Foi utilizado equipamento Shimadzu, módulo termogravimétrico TGA-50, com porta amostra metálico de platina, taxa de aquecimento de 10 °C/min, em saturação de nitrogênio com vazão de 50 mL/min, e faixa de temperatura de trabalho de 25 a 800 °C. O peso de amostra utilizado foi padronizado em 10 mg.

Para o ensaio de DSC utilizou-se da adaptação das metodologias de MONTEIRO et al. 2001; CANEVAROLO, 2003; e AZEVEDO et al. 2009. Foi utilizado equipamento DSC Shimadzu, modelo DSC-60, com porta amostra metálico de alumínio, taxa de aquecimento de 10 °C/min, em saturação de nitrogênio com vazão de 50 mL/min, e faixa de temperatura de trabalho de -100 a 300 °C. O peso de amostra utilizado foi padronizado em 5 mg.

5.6.6 Espectroscopia Por Infravermelho Com Transformada De Fourier (FTIR)

Para o ensaio de espectroscopia por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram utilizadas amostras de biomaterial adulto e fetal nas apresentações bloco (1,0 x 1,0 x 2,0 cm) revestidos com hidrogel liofilizado. Para efeito de comparação foram analisadas também amostras dos produtos comerciais Bio-Oss Collagen®-Geistlich bloco (1,0 x 1,0 x 2,0 cm) e Orthogen®-Baumer bloco (0,5 x 1,5 x 1,5 cm).

As amostras foram analisadas em triplicata, com utilização Equipamento Alpha II Bruker, do com faixa espectral de 400-4000 cm⁻¹, Resolução de 400 cm⁻¹, 32 varreduras por amostra, umidade de 5,8%, em condições ambientais 44% de umidade e 27,5 °C de temperatura, no Laboratório de Fisiologia Molecular e Inteligência Artificial, do Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas -

PPGCF/UFES, em Vitória-ES. Para análise das amostras bloco, optou-se pela leitura direta de fragmentos com tamanho mínimo de meio centímetro de altura, largura e comprimento (0,5 x 0,5 x 0,5 cm). A análise espectral de comparação foi realizada com software Origin Pro 8.5 (Origin Lab Corporation, Northampton, MA, EUA).

5.6.7 Espectroscopia de Espalhamento Raman

Para o ensaio de espectroscopia de espalhamento RAMAN foram utilizadas amostras de biomaterial adulto e fetal nas apresentações bloco (1,0 x 1,0 x 2,0 cm) revestidos com hidrogel liofilizado. Para efeito de comparação foram analisadas também amostras dos produtos comerciais Bio-Oss Collagen®-Geistlich bloco (1,0 x 1,0 x 2,0 cm) e Orthogen®-Baumer bloco (0,5 x 1,5 x 1,5 cm).

O espalhamento Raman foi realizado com equipamento da Metrohm Instant Raman Analyzer - MIRA DS com comprimento de onda de excitação de 1064 nm, faixa espectral de 400 a 3000 cm^{-1} e laser de 785 nm. As amostras foram analisadas em triplicata no Laboratório de Caracterização Ambiental - LACAR do Centro de Pesquisa Inovação e Desenvolvimento do Espírito Santo - CPID em Cariacica-ES. A quantidade de amostra utilizada foi padronizada em 0,5g de cada biomaterial. Os dados foram analisados e os gráficos tratados em software Origin Pro 8.5 (Origin Lab Corporation, Northampton, MA, EUA).

5.6.8 Esterilidade

O ensaio para análise da esterilidade foi realizado de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, conforme metodologia descritas na ISO 11737-2:2019 (teste de inoculação direta, em meio TSB 28-32 °C, análise ao 7º e 14º dia).

Foram utilizadas amostras em triplicata de biomaterial adulto e fetal nas apresentações bloco, com dimensões padronizadas de 3,0 x 2,0 x 1,0 cm (comprimento x largura x altura), e grânulos (0,5 - 2 mm), revestidos com hidrogel.

5.6.9 Endotoxinas e Pirogênio

A verificação de possível contaminação residual de bactérias gram-negativas foi realizada pela determinação de endotoxinas bacterianas, baseadas no método Gel Clot (qualitativo), seguido da análise quantitativa pela técnica da cinética turbidimétrica, com *spike* de endotoxinas em diluições seriadas (padrão), conforme estabelecido pela United States Pharmacopeia and National formulary USP 43 NF 38, 2020, Method 85. Para esta análise foram utilizadas amostras estéreis de biomaterial adulto e fetal na apresentação de grânulos (0,5 - 2 mm) revestidos com hidrogel de ECM-fb liofilizado (n=5).

De maneira complementar, o ensaio de pirogênio tem como objetivo verificar *in vivo* a possibilidade de desenvolvimento de reação febril causada pelo contato com uma determinada amostra. Para realização deste ensaio foram utilizadas amostras de biomaterial fetal na apresentação grânulo (0,5 - 2 mm) revestidos com hidrogel de ECM-fb. O ensaio clínico foi baseado no protocolo recomendado pela United States Pharmacopeia USP 43 - NF 38, 2020, Method 151, onde a amostra, em condição estéril, foi extraída em incubadora a 37°C por 1 hora, na proporção de 1g de biomaterial para 40 mL de solução de cloreto de sódio 0,9%.

Após a extração, o extrato foi filtrado para remoção dos particulados e o volume obtido foi reservado para inoculação nos animais. Foram utilizados três coelhos da espécie *Oryctolagus cuniculus*, linhagem Nova Zelândia, sexo fêmeas, com 6 meses de idade, provenientes da Granja RG, Suzano - SP. Os animais saudáveis, sem alterações clínicas detectáveis, foram alojados em gaiolas específicas para espécie de acordo com normas e legislações vigentes, proporcionando a integridade e o bem-estar animal. Os animais foram aclimatados por um período mínimo de 5 dias antes do início do ensaio, em fotoperíodo de 12/12 horas. A alimentação dos animais foi composta de ração convencional para a espécie e água potável.

Durante o período do ensaio, o sistema teste foi mantido em sala com temperatura entre 16,7 e 17,6°C, umidade relativa do ar entre 54,2 e 70,8%. Para realização do ensaio, os animais foram colocados em contentores específicos para a espécie e aclimatados por um período mínimo de trinta minutos. Após o período de aclimação, a temperatura controle dos animais foi mensurada por via retal

(temperatura base para a determinação de qualquer elevação de temperatura). Em seguida, foi realizada a inoculação das soluções teste (solução fisiológica controle + extrato da amostra), por via endovenosa, na veia marginal da orelha, na dose de 10 mL/Kg de peso vivo, de maneira gentil e vagarosa.

Após a aplicação das soluções teste, a temperatura dos animais foi continuamente monitorada em intervalos de aproximadamente 30 minutos pelo período de 3 horas. Os animais foram observados durante todo o período do ensaio quanto à presença de alterações clínicas e tiveram suas temperaturas corporais registradas.

5.6.10 Proliferação Celular e Citotoxicidade

5.6.10.1 Teste de Viabilidade Celular *In Vitro* (Células-Tronco Mesenquimais com características fibroblásticas)

Amostras de células humanas mesenquimais foram obtidas do Núcleo de Genética Humana e Molecular da UFES (NGHM-UFES). Estas células foram isoladas com base na metodologia descrita por Zuk et. al. (2001), a partir de doações de tecido adiposo humano, de aproximadamente 0,5 cm² de diâmetro, provenientes de cirurgias ortopédicas realizadas no Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória, Vitória-ES, conforme aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (Parecer CAAE: nº 2.171.595).

A partir do estabelecimento da cultura secundária, foram realizados testes de diferenciação celular (condrogênica, adipogênica e osteogênica), pelo grupo de pesquisa do NGHM-UFES coordenado pela Dra Flavia de Paula, o que permitiu classificar o material como células-tronco mesenquimais de características fibroblásticas (CTM's), que foram gentilmente cedidas ao NBT para realização dos estudos de biocompatibilidade de hidrogéis e demais biomateriais ósseos.

No NBT, para cultura de rotina, as denominadas CTM's foram incubadas a 37°C, 5% CO₂, com meio basal *Stable Cell*[™] DMEM-high glucose (Sigma Aldrich, EUA) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen, South America)

e 1% (v/v) de antibiótico/antimicótico (Sigma Aldrich, EUA). A troca do meio de cultura foi realizada a cada 3 dias. As células foram visualizadas e fotografadas através do microscópio Axio Observer 3 (Zeiss).

Foram utilizadas, em triplicata, amostras estéreis de biomaterial adulto e fetal na apresentação bloco revestidas com hidrogel de ECM-fb liofilizado. Para garantir a adequada extração, as amostras foram previamente processadas em homogeneizador de amostras (Modelo FASTPREP-24™ 5G, MP BIOMEDICALS) conforme descrito no Item 5.5.1. Nas amostras homogeneizadas foram adicionados meio de cultura padrão na proporção de 1:2, e incubadas durante pelo menos 24 horas para extração, sob mesmas condições de meio e incubação das células teste.

O sistema teste foi estabelecido utilizando-se CTM's humanas depositadas em placas de 24 poços na densidade de 1×10^4 células/poço ($500 \mu\text{L} \pm 2 \mu\text{L}$). Diretamente sobre as células foram inoculados os extratos obtidos das amostras ($250 \mu\text{L}$), aplicados sem diluições, centrifugação ou correção de pH, em triplicata, durante 24 ± 2 horas e 48 ± 2 horas, sob as mesmas condições de cultura anteriormente citadas. Como grupo controle, foram estabelecidos poços contendo apenas 1×10^4 células ($500 \mu\text{L}$) + $250 \mu\text{L}$ de meio completo puro.

Após o período de exposição, os extratos foram devidamente aspirados e substituídos por meio de cultura completo, seguido de $50 \pm 2 \mu\text{L}$ de solução MTT (5 mg/mL) a $450 \mu\text{L}$ de DMEM-*High Glucose* durante 4 horas, a 37°C e a 5% CO_2 . Após esse período, a solução MTT de cada poço foi descartada e substituída por $500 \mu\text{L}$ de álcool isopropílico, a placa foi novamente incubada durante 1 hora, 37°C , para dissolução dos cristais formados. A leitura das amostras foi realizada em seguida, com utilização de leitor de placas na absorbância a 570 nm em espectrofotômetro (Modelo Varioskan Flash, Thermo Fisher) no Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares - LABION / CCS / UFES.

A viabilidade celular foi obtida através do seguinte cálculo:

$$\text{VC\%} = (\text{Média da absorbância dos tratados} / \text{Média dos controles}) \times 100$$
, conforme descrito por WANG et al. (2011).

5.6.10.2 Teste de Citotoxicidade *In Vitro* (fibroblastos)

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* seguiu a metodologia descrita pelas normativas ISO 10993-5:2009 (anexo D) e ISO 10993-12:2012, que baseiam-se na medição da viabilidade celular via desidrogenase mitocondrial descrita por SCUDIERO et. al., 2011). Foram utilizadas células caracterizadas como fibroblastos, isolados de tecidos conjuntivo subcutâneo, areolar e adiposo, de camundongos machos CH3/An com 100 dias de vida, estabelecidas na linhagem L-929 (NCTC clone 929), lote LCI-G38-V00, provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro/Brasil.

As células foram propagadas a partir de estoques de cultivo em garrafas de 25cm² ou 75cm² em meio de cultura Dulbecco Eagle's modificado (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de L-glutamina, mantidas a $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, em atmosfera de $5,0 \pm 0,2\%$ CO₂, por aproximadamente 48 horas, até que atingissem densidade de confluência em torno de 80%. O sistema teste foi estabelecido em placa de 96 poços, contendo 1×10^4 células por poço, em meio de cultura Dulbecco Eagle's modificado (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de L-glutamina, mantidas a $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, em atmosfera de $5,0 \pm 0,2\%$ CO₂, por aproximadamente 24 ± 2 horas para que fosse estabelecida a formação de monocamada celular.

Foram utilizadas, em triplicata, amostras estéreis de biomaterial fetal na apresentação bloco revestidas com hidrogel de ECM-fb liofilizado. A extração das amostras foi realizada na proporção de 0,2g de material para 1mL de veículo de extração, incubadas durante pelo menos 24 horas, sob as mesmas condições de meio e de cultivo das células teste. Foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente, os materiais polietileno de alta densidade (PEAD) e látex natural.

Os extratos obtidos das amostras foram aplicados sem diluições, centrifugação ou correção de pH, em quatro replicatas ($100 \pm 2 \mu\text{L}$), diretamente sobre o sistema teste por pelo menos 24 ± 2 horas, sob as mesmas condições de cultura anteriormente citadas. Após o período de exposição, os extratos foram devidamente aspirados e substituídos por meio de cultura completo, seguido de $20 \pm 2 \mu\text{L}$ de MTS/PMS. Após cerca de 120 ± 10 minutos de incubação, foi realizada a leitura em

espectrofotômetro a um comprimento de onda de 490 ± 2 nm (comprimento de onda de referência de 620 nm).

O cálculo da viabilidade celular é realizado a partir da seguinte fórmula:

$$V.C\% = \left(\frac{\text{Média das leituras da densidade óptica dos poços de células tratados}}{\text{Média da leitura da densidade óptica dos poços de células não tratados}} \right) \times 100.$$

5.6.11 Caracterização Complementar

Para melhor caracterização dos possíveis produtos de implante, após realização dos testes de viabilidade celular e de citotoxicidade, foi idealizada a investigação complementar para verificação quanto à titulação de pH e à presença de metais pesados.

5.6.11.1 Titulação de pH

Foi realizada a análise da titulação de pH de amostras estéreis do produto final do biomaterial fetal na apresentação de grânulos (0,5 - 2 mm) revestido com hidrogel de ECM-fb liofilizado.

Para realização do ensaio foi padronizada quantidade de amostra similar à utilizada para extração no teste de citotoxicidade, sendo mantida a proporção de 1g de amostra imersa em 5mL de veículo (solução PBS, água, meio de cultura DMEM), em frasco de vidro padrão de envase dos produtos. A mensuração do pH das amostras foi realizada de maneira contínua durante 24 horas, no NBT, com a utilização de equipamento phmetro digital de bancada devidamente calibrado (Marca Hanna Instruments, modelo Ph21, Série: 820196).

5.6.11.2 Metais Pesados

O ensaio quanto à presença de metais foi realizado conforme metodologia adaptada da ABNT NBR 10422 (2013), DIN EN 15837 (2010), e TEIXEIRA et al.(2017), no qual as amostras foram previamente preparadas em sistema aberto com digestão ácida em solução aquosa (HCl 5%) e microondas, para posterior análise pela técnica de espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente - ICP/OES (Equipamento Thermo/iCAP 7400 Duo - com plasma induzido de argônio).

Foi realizada a detecção da concentração total (mg/kg) dos metais (arsênio, cádmio, chumbo e mercúrio) presentes nas amostras estéreis do produto final do biomaterial fetal na apresentação de grânulos (0,5 - 2 mm) revestido com hidrogel de ECM-fb liofilizado (n=6).

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA E TRATAMENTO DE DADOS

A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism Versão 9.1.0 (GraphPad Software; San Diego, Califórnia, EUA, Versão Completa).

Os dados foram analisados quanto à normalidade utilizando o teste Shapiro-Wilk. Todos os dados apresentados encontravam-se dentro de uma distribuição Gaussiana (comparado ao teste de normalidade com $\alpha = 0,05$). Foi aplicado o teste *t* de *Student* não pareado para comparação entre dois grupos isoladamente, e para múltiplas comparações foi utilizado o teste ANOVA, uma ou duas vias, seguido do *post hoc* de Tukey ou Sidak. Os resultados das análises foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), e foram considerados significativos quando o valor de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 DO PROCESSO DE DESCCELULARIZAÇÃO

6.1.1 Quantificação de DNA

O valor médio de DNA residual apresentado pelo biomaterial descelularizado fetal foi de $25,88 \pm 5,46$ ng/mg de tecido seco, enquanto que o tecido ósseo fetal *in natura* apresentou valor médio de 10.330 ± 2.253 ng/mg. Para o biomaterial descelularizado adulto foi mensurado o valor médio de DNA residual de $39,92 \pm 2,66$ ng/mg de tecido seco, enquanto que seu respectivo controle, tecido ósseo adulto *in natura* apresentou valor médio de $457,26 \pm 43,71$ ng/mg (Figura 12).

Com base nesses resultados, percebe-se, inicialmente, que o tecido ósseo adulto controle (AC) apresentou conteúdo de DNA consideravelmente menor do que o tecido ósseo fetal (FC). De maneira similar, LEI *et al.* (2015) afirmam que esta observação pode ter relação com o tipo de amostra e maior nível de mineralização observado no osso adulto, pois sendo mais compacto, menos trabecular e menos poroso, pode apresentar menor teor de conteúdo orgânico em seu interior, como sangue e células por exemplo que contribuem diretamente na quantificação da análise.

Quanto aos resultados de DNA remanescentes nos biomateriais descelularizados, o se comparar os valores médios mensurados, conforme esperado, observa-se que houve diferença estatística (* $p < 0,0001$) relacionada ao tratamento em ambos os biomateriais, fetal e adulto, e seus respectivos controles, o que em termos gerais amostrais, corresponde a uma expectativa de eficiência de remoção de DNA em torno de 99,75% para o osso fetal, e de 91,26% para o osso adulto, quando submetidos aos processos de descelularização propostos.

É sabido que teores remanescentes de DNA, quando presentes em matrizes descelularizadas, podem ser considerados potenciais fontes causadoras de problemas de citocompatibilidade (*in vitro*), e de inflamação, fibrose ou rejeição após

implantação (*in vivo*). Por outro lado, diversos pesquisadores da área de bioengenharia de tecidos afirmam, dentre outros critérios pré-estabelecidos, que matrizes descelularizadas com valores de resíduos de DNA abaixo de 50 ng/mg de tecido seco são consideradas seguras para implantação, pois proporcionalmente, representam quantidades residuais muito pequenas exógenas ao organismo, e por esse motivo, não seriam suficientes para gerar resposta inflamatória crônica importante, resumindo-se apenas a uma resposta inicial transicional (adaptativa), correlacionada à taxa de absorção e incorporação do material.

De fato, parece haver um esforço e consenso científico científico global para produção de matrizes descelularizadas com concentração residual de DNA inferior a 50 ng/mg de tecido seco, sendo este o primeiro limiar de segurança atualmente preconizado para a continuidade e desenvolvimento de possíveis candidatos à biomateriais de implante descelularizados (BADYLAK et al., 2011; CRAPO et al., 2011; XING et al., 2014; SABETKISH et al., 2015; KARGAR-ABARGHOUEI et al., 2018; ALSHAIKH et al., 2019; EMAMI et. al, 2021.). Nesse mesmo sentido, pode-se afirmar que os protocolos de descelularização utilizados foram suficientes para promover a remoção de DNA dos biomateriais fetal e adulto produzidos, pois apresentaram valores residuais em níveis adequados e aceitáveis para posterior implantação.

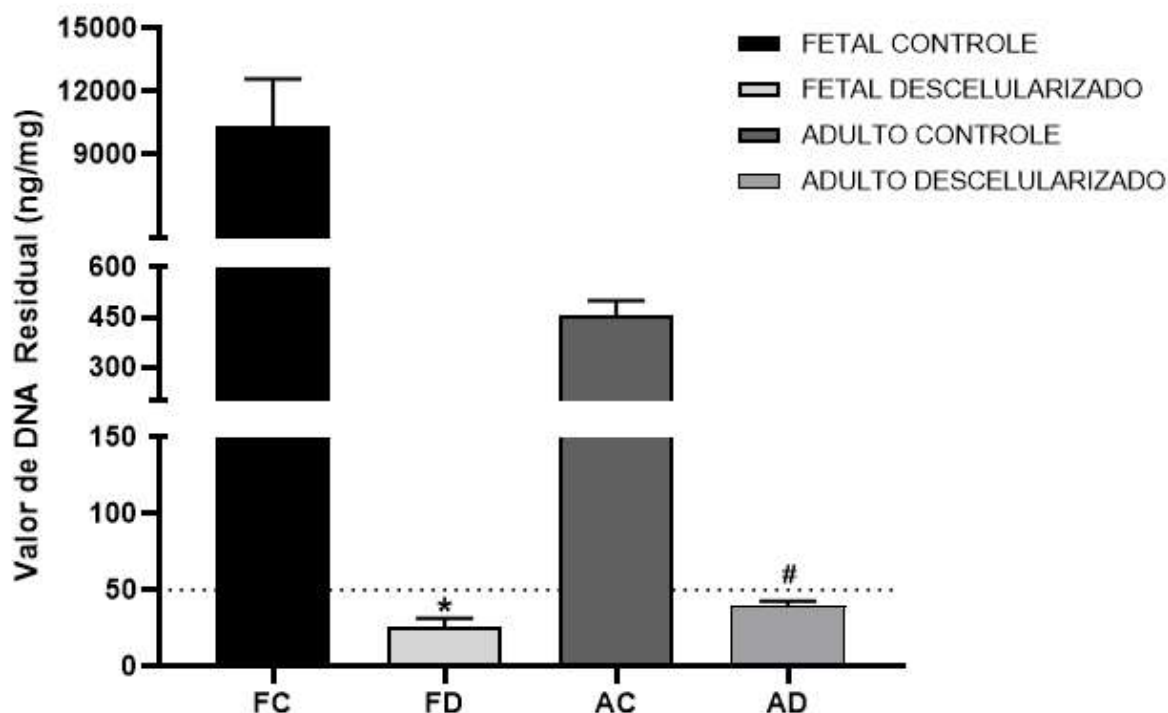


Figura 12 - Valor de DNA Residual (ng/mg) por peso seco de ossos descclularizados (FD e AD) e seus respectivos controles (osso in natura, FC e AC). Fetal Controle (FC, n=12), Fetal Descclularizado (FD, n=12), Adulto Controle (AC, n=12) e Adulto Descclularizado (AD, n=12). Os dados estão expressos em média $\pm$ EPM; (* $p < 0,0001$ FC vs FD; # $p < 0,0001$ AC vs AD; Teste t de Student não pareado).

6.1.2 Quantificação de SDS residual

Os dados apresentados nos gráficos da Figura 13 (A) demonstram o comportamento do decaimento da concentração de SDS residual presente nos tecidos ósseos adulto e fetal (apresentação bloco) nas etapas de lavagem em PBS (13 ciclos x 12 horas) no processo de descclularização. Pode-se afirmar que finalizadas todas as etapas de lavagem, em média, são mantidos nos biomateriais adulto e fetal descclularizados concentrações residuais de SDS inferiores a 0,01% (100 mg/L), respectivamente, 0,007% (70 mg/L) e 0,005% (50 mg/L).

De maneira complementar, na Figura 13 (B), sob forma de um gráfico de regressão linear, foram apresentados os valores percentuais (%) de remoção de SDS residual dos mesmos materiais em função do mesmo número de lavagens durante os

respectivos processos de descélularização. A a linha de tendência observada demonstra que ambos os tecidos em tratamento, adulto e fetal, apresentaram comportamento similar de remoção de SDS entre o nono e o décimo ciclo de lavagem, quando a concentração de SDS residual atingiram valores inferiores a 0,01% (100 mg/L), representando uma eficiência de remoção em torno de 99,8% no osso adulto e 99,1% no osso fetal a partir desse ponto.

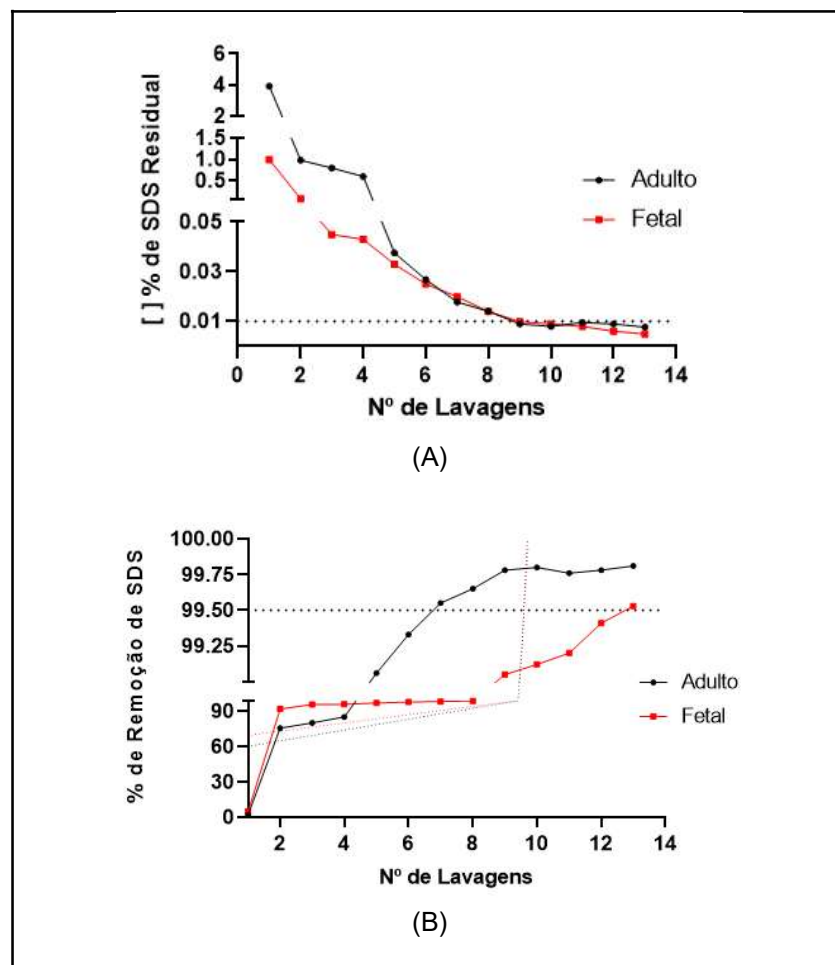


Figura 13 - (A) Concentração percentual de SDS residual presente nos biomateriais adulto e fetal na apresentação bloco em função do número de lavagens em PBS durante o processo de descélularização. (B) Valor percentual correspondente à remoção de SDS dos mesmos materiais durante as respectivas lavagens.

A integridade da MEC descélularizada idealizada como biomaterial de implante pode ser danificada em três estágios: durante o processo de descélularização; durante a preservação ou transplante; e após transplante no corpo do receptor. Para evitar tais

danos, após a eliminação de células e dos componentes nucleares no processo de descelularização, é crucial remover adequadamente os detergentes utilizados no processo para que não ocorra resposta inflamatória no hospedeiro.

O Dodecilsulfato de sódio (SDS, formulação: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4\text{Na}$) tem sido amplamente utilizado como surfactante iônico nos protocolos de descelularização, pois tem a capacidade de dissolver a membrana citoplasmática, remover células e material genético mantendo colágeno e glicosaminoglicanos (GAGs). No entanto, também pode reduzir a quantidade de fatores de crescimento e GAGs, o que sugere a aplicação da menor dose eficaz deste agente durante o processo de descelularização.

Nesse mesmo contexto, é sabido que um processo de lavagem prolongado também pode prejudicar a ultraestrutura e as propriedades mecânicas da MEC, embora numerosas lavagens resultem em maior remoção de SDS, também podem destruir a sua integridade. Sendo assim, nos processo produtivos, é fundamental que os níveis residuais de detergente das matrizes atinjam níveis satisfatórios, que minimizem seus efeitos citotóxicos, porém, evitando-se lavagens excessivas (GILBERT et al. 2006; GRATZER et al. 2006; GILPIN & YANG 2017; GHORBANI et al., 2021.).

De acordo com Cebotari et al. (2010), os níveis de resíduos de SDS devem estar abaixo de 50 mg/L em matrizes descelularizadas para não influenciar negativamente no processo de adesão celular. Ao analisar nossos dados, percebemos que apesar da alta eficiência de remoção do SDS (99,8% e 99,1%), entre a nona e décima lavagem, a concentração residual dos biomateriais adulto e fetal ainda encontravam-se em torno de 100 mg/L, portanto, duas vezes acima do limite tóxico proposto por Cebotari et. al. (2010). Cabe salientar aqui, que a continuidade das lavagens por mais tempo parece solucionar esta questão, uma vez que, até o 13º ciclo de lavagem percebe-se contínua queda de concentração do SDS atingindo níveis mais próximos aos aceitáveis, em torno de 70 mg/L e 50 mg/L.

Sob outro ponto de vista, Keane et al. (2015) afirmam que os resultados de SDS residual também podem ser mensurados e analisados levando-se em consideração a quantidade de resíduos por peso seco de matriz descelularizada. Nesse caso,

descrevem que a perda de citotoxicidade do SDS nos arcabouços foi identificada em concentrações em torno de 10 µg/mg de peso seco de matriz.

Por esse mesmo modo, também podemos fazer esta análise com nossos biomateriais produzidos. Vale lembrar que durante nosso processamento, utilizamos a proporção de 100 mg de matriz seca de cada biomaterial (adulto e fetal) para extração em 1 mL de solvente, conforme métodos descritos nos Itens 5.5.1 e 5.5.2. Sendo assim, os resultados de resíduos de SDS anteriormente expressos em torno de 100 mg/L (100 µg/mL), também podem ser interpretados como 100 µg/100 mg, ou, 1 µg de SDS por 1 mg tecido seco.

Por essa mesma correlação, ao analisarmos nossos dados SDS residual com base na relação com o peso seco das amostras, percebe-se que nossos biomateriais a partir do nono ciclo de lavagem já apresentavam resultados inferiores a 1 µg/mg de tecido seco, chegando a atingir níveis de SDS residual em torno de 0,70 µg/mg e 0,50 µg/mg, nos biomateriais adulto e fetal respectivamente, durante a continuidade do processo de lavagem. É importante relatar que estes valores de resíduos de SDS são muito inferiores a 10 µg/mg, e portanto, estariam dentro da margem de segurança para citotoxicidade relatada por Keane et al. (2015).

De maneira complementar, realizamos uma análise simultânea para avaliar o nível da concentração de SDS presente no tecido ósseo fetal e no efluente durante o processo de lavagem em PBS. Pode-se afirmar que durante o processo de lavagem, ocorre o decaimento gradativo da concentração de SDS residual nos tecidos, de maneira similar ao decaimento da concentração no diluente.

É possível deduzir que o efeito da troca de meio, realizado a cada hora nas primeiras doze horas, é relevante e impacta diretamente na velocidade de arrasto do SDS residual tecidual para o efluente. Por outro lado, também pode-se inferir que o maior tempo de lavagem, ciclos de 12 horas, favorece a maior concentração de SDS residual no diluente (Figura 14). Este achado é particularmente interessante, pois pode sugerir um ajuste futuro em nossos protocolos. De acordo com Nakayama et al. (2010), protocolos de descelularização que utilizam menores concentrações e menor tempo de exposição à detergentes iônicos como o SDS, tendem a promover

menores efeitos indesejados aos constituintes remanescentes da matriz extracelular descelularizada.

De modo semelhante, acreditamos que o aumento no fluxo de lavagens, com maiores volumes e frequência de troca de soluções, poderão contribuir para acelerar o processo de descelularização e possivelmente reduzir ainda mais o teor residual de SDS nos nossos biomateriais. Especificamente em nosso modelo de processamento, acreditamos que o desenvolvimento de um sistema biorreator que permita um fluxo contínuo de entrada e saída da solução de lavagem seja ideal para otimizar o processo.

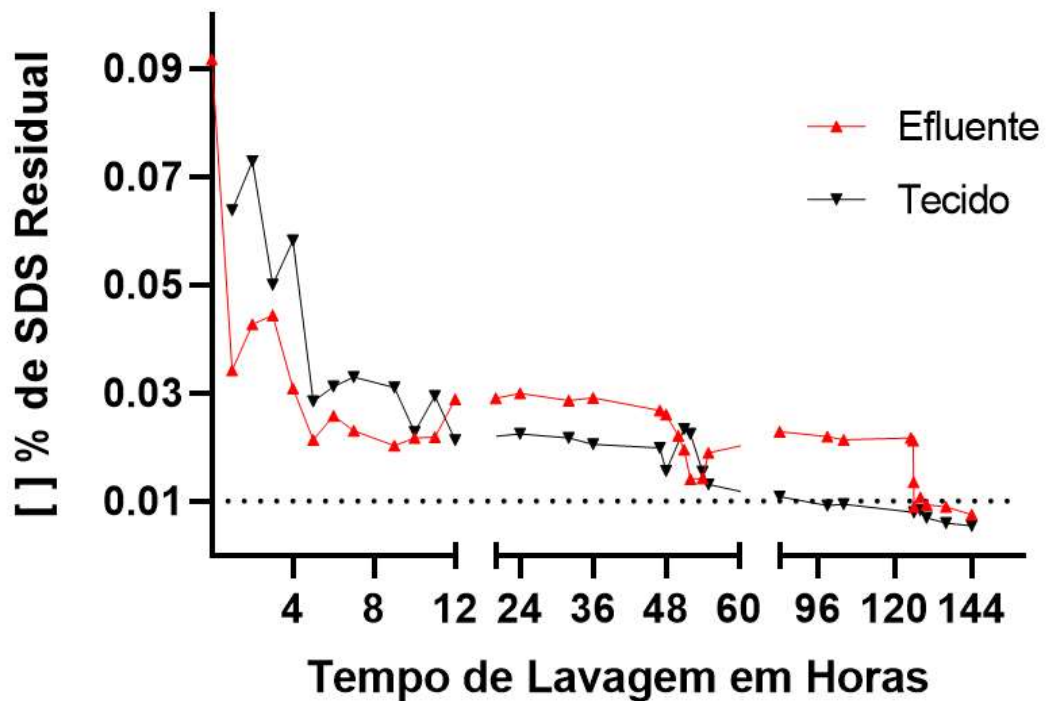


Figura 14 - Concentração percentual (%) de SDS residual no tecido ósseo fetal (bloco) e no efluente de lavagem (PBS) durante o processo de descelularização.

6.2 DA CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

6.2.1 Densidade

De acordo com Sampaio e Silva (2010), na análise da densidade real, considera-se apenas o volume do conjunto de grãos que compõem a amostra, sem considerar o espaço vazio existente no interior (porosidade) ou entre eles. Para densidade aparente, considera-se o volume total da amostra, inclusive os espaços vazios entre os grãos que a compõem. No presente trabalho, foi verificado que ambos os valores de densidade real e aparente das amostras de biomaterial fetal foram estatisticamente maiores do que aqueles encontrados para o biomaterial adulto (Tabela 1).

Segundo Lu et al. (2013), o tecido ósseo humano compacto e poroso apresenta densidade real que pode variar de 1,0 a 2,1 g/cm³. Sanada (2007) relata que a densidade média aparente do osso trabecular e cortical variam entre 0,31 e 1,85 g/cm³. De maneira similar, Galia et al. (2011) relataram que a densidade do osso bovino liofilizado utilizado em implantes varia entre 0,67 a 1,87 g/cm³. Por sua vez, Ribeiro (2011) encontrou valores de 1,3 g/cm³ e 0,63 g/cm³ para densidade real e aparente do osso bovino calcinado. Com base nesses dados, e de acordo com os valores apresentados na Tabela 1, pode-se afirmar que ambos os biomateriais, adulto e fetal, apresentaram valor médio de densidade real e aparente que demonstram estar na faixa de normalidade esperada para tecidos ósseos bovino, e similares ao humano.

Vale a pena ressaltar que foi evidenciada diferença estatística nas duas análises, entre os dois biomateriais adulto e fetal. O valor de 1,3062 corresponde à razão entre os valores médios de densidade real fetal e adulto, e permite inferir que, quando comparados isoladamente, sob mesma condição de massa, espera-se que biomaterial adulto apresente um volume 30,62% maior do que o biomaterial fetal. Seguindo o mesmo raciocínio anterior, ao se comparar os valores médios de densidade aparente dos biomateriais fetal e adulto, o valor da razão seria de 2,2524, ou seja, quando comparados sob mesma condição de massa, espera-se

que biomaterial adulto apresente um volume 125,24% maior do que o biomaterial fetal.

Esta diferença considerável entre os valores de densidade real (30,62%) e aparente (125,24%) das amostras adulto e fetal pode ser explicada por particularidades inerentes das próprias amostras analisadas.

Os tecidos ósseos fetal e adulto naturalmente apresentam diferentes graus de porosidade e mineralização. Apesar do material fetal ser naturalmente mais poroso do que o adulto, durante a descelularização, os dois diferentes protocolos utilizados certamente contribuem de maneira distinta para a desmineralização e desengorduramento dos tecidos, o que pode ter influência direta sobre a massa/volume, conseqüentemente, sobre a densidade dos biomateriais. Isto explicaria o fato do material adulto, mesmo sendo mais compacto *in natura*, ao final do processo de descelularização ter se apresentado menos denso que o material fetal.

Tabela 1 - Média e erro padrão médio (EPM) das densidades real e aparente (g/cm³) de biomateriais adulto (n=5) e fetal (n=5) descelularizados

Biomaterial	Densidade Real (g/cm ³)	Densidade Aparente (g/cm ³)
Adulto	1,5061 ± 0,0009 *	0,4199 ± 0,0106 *
Fetal	1,9674 ± 0,0050	0,9458 ± 0,034
Razão Fetal/Adulto	1 : 1,3062	1 : 2,2524

Nota: Os dados estão expressos em média ± EPM; (*p<0,0001 Adulto vs Fetal; ANOVA de duas vias, *pos hoc* Teste de Sidak).

6.2.2 Compressão

Na Figura 15A, foram demonstrados os valores de carga máxima (N) obtidos pelo teste de compressão das unidades amostrais (sem correção). Verificou-se que as unidades amostrais de biomateriais descelularizados fetal (23.168,40 ± 2.193,52 N) e adulto (24.989,20 ± 4,64 N), respectivamente, apresentaram capacidade de

resistência ao teste de compressão mecânica muito superior aquela observada no biomaterial comercial Bio-OSS® Collagen ($382,27 \pm 39,81$ N).

Cabe informar que todas as amostras testadas do biomaterial adulto atingiram o limite máximo de quantificação do equipamento, o que contribui para um pequeno valor de erro padrão médio das amostras. Nesse mesmo contexto, vale pontuar que durante os testes das amostras de biomaterial fetal, três amostras atingiram o limite máximo de quantificação do equipamento, e duas amostras sofreram ruptura na faixa de 19.000-21.000 N, o que fica evidenciado no maior valor de erro padrão médio apresentado.

A presente análise de carga máxima suportada é importante pois consegue demonstrar, inicialmente, o comportamento das unidades (blocos) de cada material quando submetidas ao equipamento e ao teste de força, porém, neste caso, não levam em consideração o tamanho das amostras, o que pode ser considerado um viés de análise, pois, apesar de exibirem tamanhos similares entre si, os blocos ósseos descelularizados apresentam padrões de formato, peso e porosidade variados, e diferentes daquele apresentado padrão pelo dispositivo controle comercial. Nesse sentido, para adequada correlação entre os materiais, faz-se necessária a apresentação dos resultados de resistência à carga com a devida correção em função da massa em gramas das amostras testadas.

De acordo com a segunda Lei de Newton (Princípio Fundamental da Dinâmica), a força resultante é igual ao produto da massa pela aceleração ($F = m.a$). Nesse mesmo contexto, uma vez que o valor da aceleração da análise é padronizada pelo equipamento, pode-se comparar a correlação dos resultados de cada material testado, a partir da razão entre a força resultante do material com sua respectiva massa (DA SILVA E PEIXOTO, 2016.).

Utilizando-se desta correlação matemática, os resultados de carga máxima suportada (força resultante em N) corrigidos pela massa (g) das amostras foi apresentado na Figura 15B. Com base nesses resultados, pode-se inferir de maneira segura e significativa que o biomaterial comercial Bio-OSS® Collagen ($3,82 \pm 0,33$ N/mg) apresentou capacidade para resistência à compressão inferior à dos biomateriais descelularizados fetal ($29,85 \pm 1,40$ N/mg) e adulto ($32,67 \pm 0,01$ N/mg).

É possível afirmar que os produtos descelularizados fetal e adulto são pelo menos 7,81 e 8,55 vezes mais resistentes, respectivamente, que o material controle comercial. Estes valores, ainda que subestimados, eram esperados e corroboram com a aparência física macroscópica das amostras, uma vez que o produto comercial controle Bio-Oss Collagen®-Geistlich demonstra ser mais macio e mais friável (de aparência semelhante à isopor), enquanto que os biomateriais descelularizados mantêm o aspecto de dureza e resistência mais similar ao do osso natural.

Além da diferença para o controle, a significância estatística também ocorreu entre o desempenho dos produtos descelularizados, o que, provavelmente, tem relação com a variabilidade das amostras. Diferentemente do biomaterial adulto que é mais homogêneo, o biomaterial fetal naturalmente é mais trabecular, podendo apresentar maior variabilidade dos níveis de porosidade dependendo da região do corte, do local de extração, da idade do feto ou do tamanho do osso *in natura* utilizado que foi utilizado como matéria-prima.

Para além do presente trabalho, acreditamos que novas análises, com equipamento mais robusto que permita a investigação de carga em faixas superiores a 25.000 N, seriam ideais para identificarmos, em níveis mais sensíveis e confiáveis, a exata carga máxima de compressão suportada por nossos biomateriais descelularizados, isso poderia inclusive, tornar ainda mais expressiva a diferença de desempenho dos biomateriais fetal e adulto em relação ao controle.

Nesta presente análise, a amostra Bio-Oss Collagen®-Geistlich foi escolhida como controle por ser a única opção disponível que apresentava similaridade de composição com nossos produtos descelularizados, pois, ambos tratavam-se de arcabouço ósseos com enriquecimento por colágeno tipo I. Apesar disso, também concluímos que, para melhor comparabilidade dos biomateriais adulto e fetal em termos estruturais, no que se refere ao ensaio de suporte mecânico, também seria oportuna a comparação a outros tipos de controles, como por exemplo, outros arcabouços que apresentem preservadas as características básicas de maior mineralização e dureza, ou seja, que também apresentem maior capacidade de sustentação estrutural. Independente disso, vale pontuar, que os resultados de compressão até aqui descritos por nossa análise, tanto do material comercial

controle, quanto dos biomateriais descelularizados (adulto e fetal), já são similares àqueles descritos por Sanada (2007), ao investigar diferentes modos de resistência em ossos humanos mineralizados e desmineralizados.

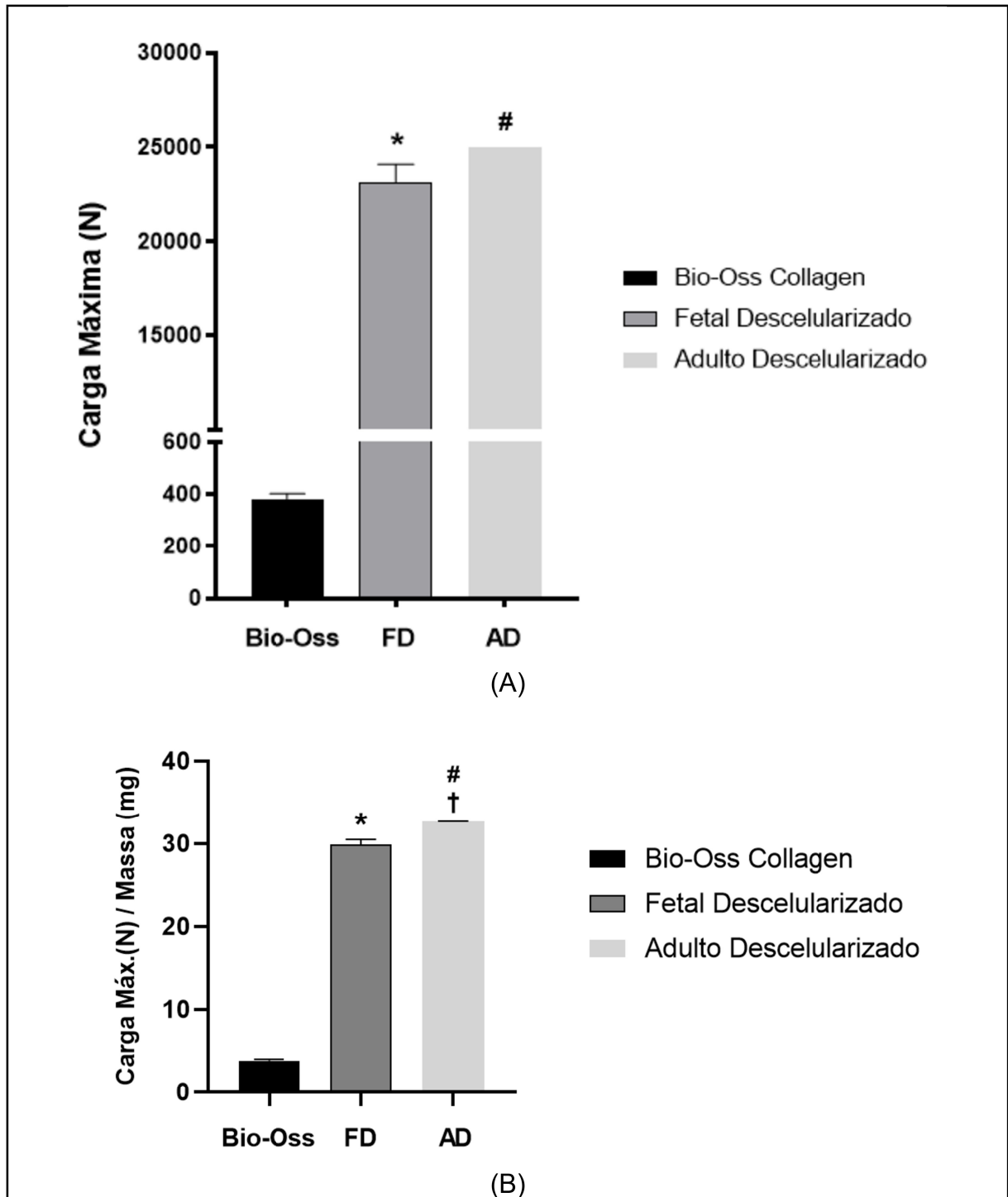


Figura 15 - Teste de Compressão de biomateriais liofilizados (apresentação bloco, n=5). (A) Valor de carga máxima total (N) suportada por unidade de amostral. (B) Valor de carga máxima total (N) corrigido pelo valor da massa (mg) da unidade amostral. Os dados estão expressos em média $\pm$ EPM; (* $p < 0,0001$ Bio-Oss Collagen vs Fetal Descelularizado; # $p < 0,0001$ Bio-Oss Collagen vs Adulto Descelularizado; † $p < 0,0002$ FD vs AD; ANOVA de uma via, pos hoc Teste de Tukey).

6.2.3 Da Microscopia Eletrônica por Varredura - MEV

6.2.3.1 Análise Morfológica

Ao analisar as Figuras 16 e 17, pode-se perceber o aspecto liso e limpo da superfície mineral dos tecidos ósseos fetal e adulto descelularizados, bem como, a existência de poros vazios em ambos os biomateriais. Em seguida, com o recobrimento das amostras por hidrogel liofilizado, é possível perceber a alteração da textura da superfície dos biomateriais analisados, que passam a apresentar aspecto mais rugoso e com conteúdo salpicado, além da existência de pequenos filamentos de hidrogel liofilizado ao redor e no interior dos poros visualizados.

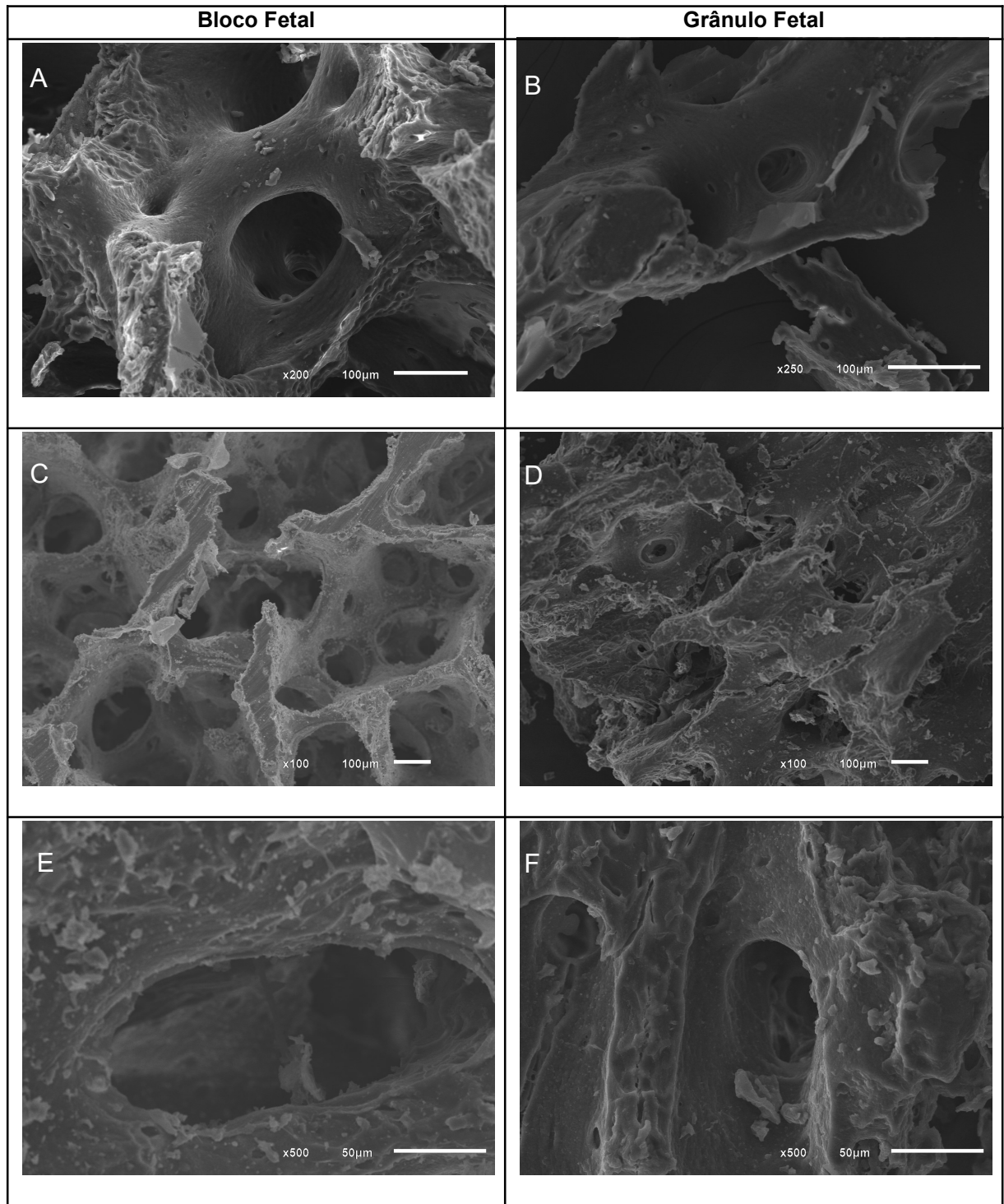


Figura 16 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de cortes transversais de osso fetal bovino descelularizado nas apresentações bloco (A, C e E) e grânulo (B, D e F), sem revestimento (A e B) e com revestimento por hidrogel (C, D, E e F). Barra de escala: 100 µm e 50 µm respectivamente.

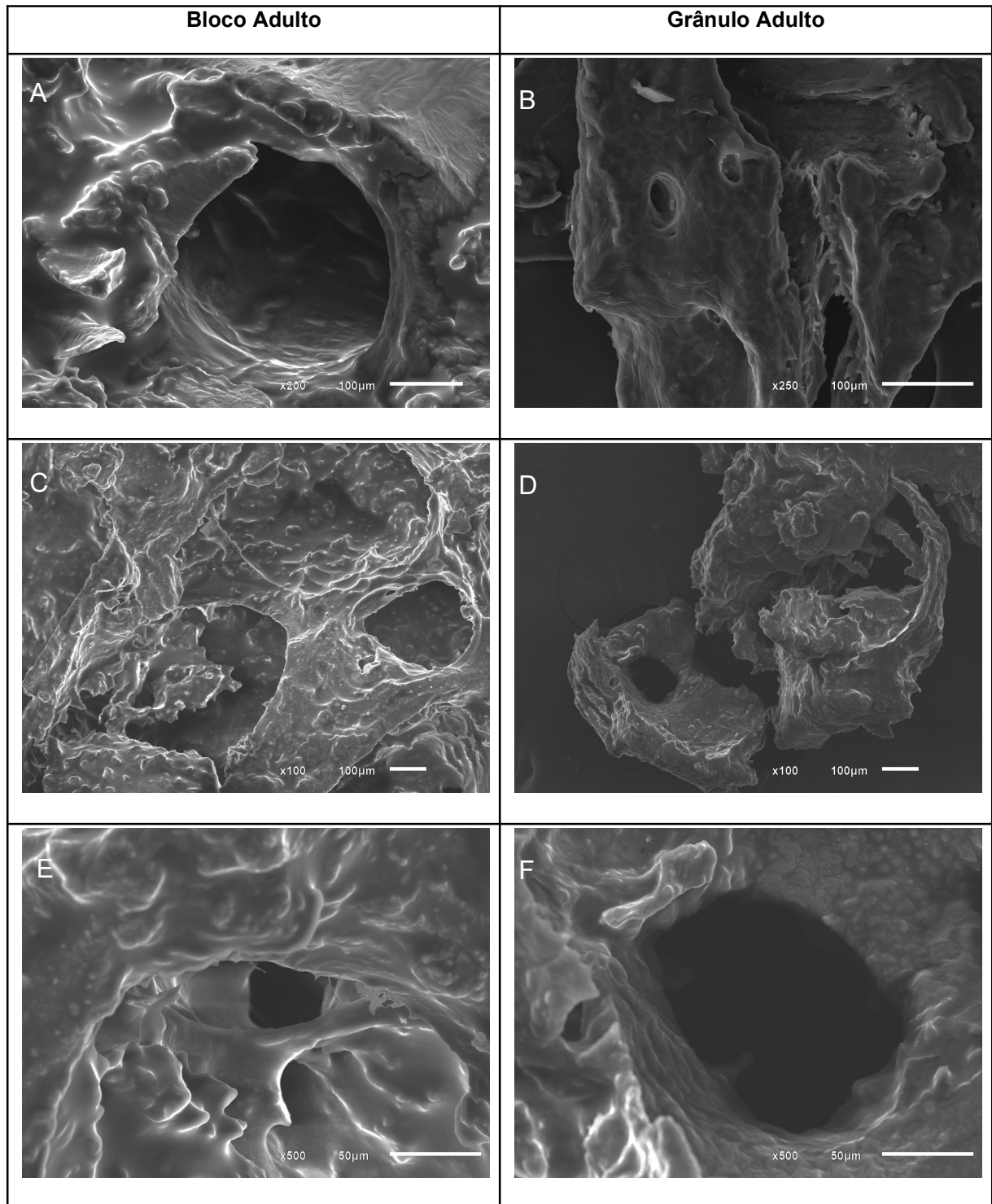


Figura 17 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de cortes transversais de osso adulto bovino descelularizado nas apresentações bloco (A, C e E) e grânulo (B, D e F), sem revestimento (A e B) e com revestimento por hidrogel (C, D, E e F). Barra de escala: 100 µm e 50 µm respectivamente.

6.2.3.2 Porosidade

O tamanho e o número de poros influencia diretamente na porosidade dos biomateriais (KARAGEORGIOU e KAPLAN, 2005.) De acordo com Zhang et al. (2012), um material de enxerto ósseo ideal deve fornecer espaço suficiente para as células infiltrantes se fixarem, proliferarem e produzirem nova matriz extracelular. Nesse contexto, o tamanho dos poros e a porosidade dos materiais são considerados fundamentais para a formação óssea.

Na Figura 18 estão demonstradas as marcações utilizadas para mensuração do diâmetro dos poros presentes nas amostras dos biomateriais Bio-Oss®-Geistlich, Cerabone®-Straumann, fetal descelularizado e adulto descelularizado, submetidas ao ensaio de porosidade. Conforme observado, as amostras dos produtos Bio-Oss e fetal (A e C), visualmente demonstram possuir mais poros e ser mais porosas do que as amostras dos produtos Cerabone e adulto (B e D) observados na mesma imagem.

O tamanho médio dos poros dos diferentes biomateriais analisados também foi demonstrado na Figura 19. Com base nos resultados desta análise, pode-se afirmar que o biomaterial Bio-Oss, que é o líder do mercado mundial, demonstrou ter tamanho médio de poro ($351,33 \pm 106,38$) estatisticamente superior ao dos biomateriais Cerabone ($192,47 \pm 82,41$) e adulto descelularizado ($218,49 \pm 59,94$), porém, similar ao do biomaterial fetal ($307,00 \pm 68,75$). Do mesmo modo, o biomaterial fetal apresentou tamanho de poro estatisticamente superior aos produtos Cerabone e adulto descelularizado. Cerabone e adulto descelularizado não divergiram estatisticamente.

Zhang et al. (2012) afirmam que são considerados poros ideais aqueles com tamanho superior a 300 μm , e porosidade variando de 70 a 80%, o que favorece maior vascularização e osteogênese do tecido, pois permite adequada troca e fornecimento de oxigênio e nutrientes. De maneira complementar, Cruz et. al. (2007) afirmam que a presença de poros com diâmetro inferiores a 50 μm não promovem bom desenvolvimento celular nos implantes, portanto não devem ser predominantes nas amostras.

Com base nos resultados dados da Figura 19, é possível afirmar que todos os biomateriais apresentam tamanho de poro médio superior a 50 μm , no entanto, apenas Bio-Oss e o biomaterial fetal descelularizado demonstraram possuir tamanhos médios superiores a 300 μm de diâmetro conforme recomendado pela literatura. Este achado pode estar relacionado com a idade dos tecidos ósseos utilizados como matéria-prima para produção de cada biomaterial.

Naturalmente, à medida que osso cresce e o animal envelhece, ocorre diminuição da proporção de osso trabecular em relação ao cortical, ou seja, os ossos fetais/jovens mais porosos vão sendo mineralizados, e quando se tornam maduros e adultos, passam a apresentar maior área de tecido compacto/cortical, que naturalmente possui menor porosidade (LEI *et al.*, 2015.).

De acordo com as informações de rótulo, o produto Bio-Oss é produzido a partir de osso esponjoso de bovino jovem, similar ao nosso biomaterial fetal descelularizado. Por outro lado, o produto Cerabone é produzido com osso bovino adulto, do mesmo modo que o nosso produto adulto descelularizado.

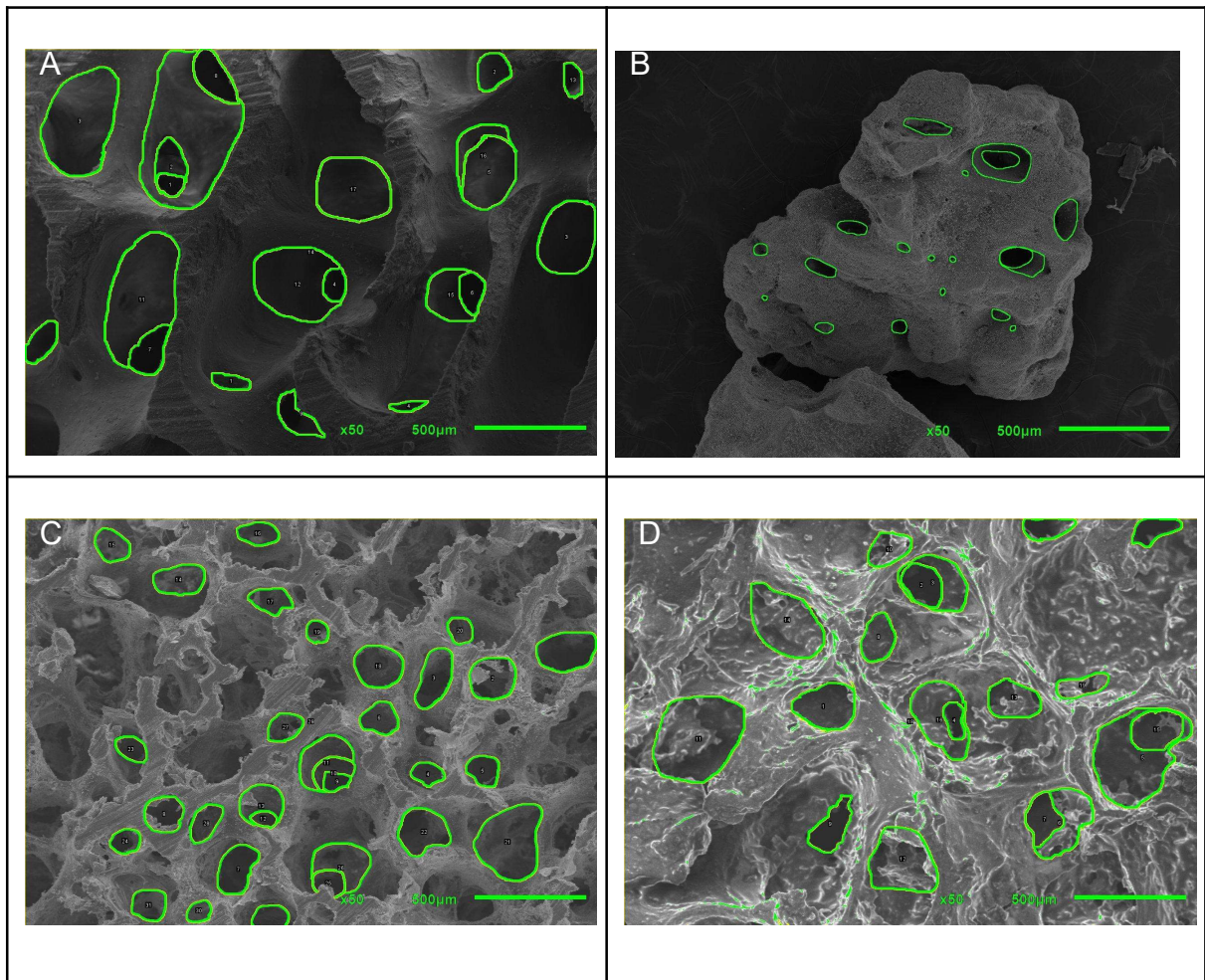


Figura 18 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de cortes transversais dos biomateriais Bio-Oss®-Geistlich (A), Cerabone®-Straumann (B), Fetal descelularizado (C) e Adulto descelularizado (D) submetidos ao ensaio de porosidade. Barra de escala: 500 µm.

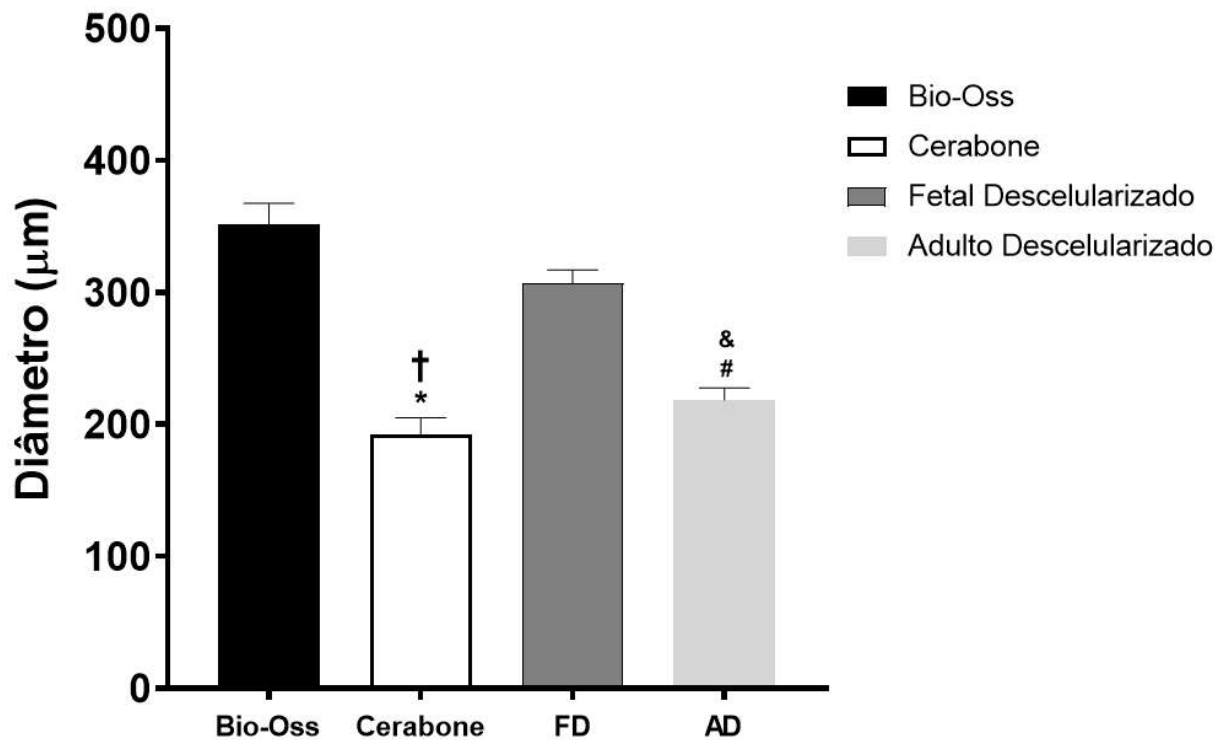


Figura 19 - Tamanho médio dos poros (μm) analisado nos diferentes biomateriais ($n=80$): Bio-Oss®-Geistlich, Cerabone®-Straumann, Fetal descelularizado (FD) e Adulto descelularizado (AD). Os dados estão expressos em média $\pm$ EPM; (* $p<0,0001$ Bio-Oss vs Cerabone; # $p<0,0001$ Bio-Oss vs AD; † $p<0,0001$ Cerabone vs FD; & $p<0,0001$ FD vs AD; ANOVA de uma via, *pos hoc* Teste de Tukey).

6.2.3.3 Composição Elementar Por Energia Dispersiva De Raios X (EDS)

Os valores médios percentuais normalizados da quantificação dos elementos químicos identificados nas diferentes amostras de biomateriais foram apresentados na Tabela 2.

Na presente análise foram identificados preliminarmente elementos químicos característicos de composição da matriz óssea, que são idênticos aos elementos identificados por autores que fizeram análise similar em ossos humanos (GALIA, 2004; CRUZ *et al.*, 2007.). Nesse momento, optamos por priorizar a análise e discussão apenas dos resultados referentes aos elementos Cálcio e Fósforo, uma vez que os demais elementos serão melhor discutidos e caracterizados na sessão

seguinte (Item 6.2.3.4) que trata especificamente da Composição Elementar CHNS-O.

De acordo com Perdikouri et al. (2015), a identificação dos elementos químicos presentes no osso podem ser alterados por diversas razões ao longo da vida, inclusive pela dieta. As taxas de cálcio e fósforo e sua correlação (Ca/P ou Ca:P) são frequentemente utilizadas como indicativos de mineralização e qualidade óssea, seus valores podem variar dependendo da região analisada, da ocorrência de áreas de cicatrização ou lesões, onde sabidamente se estabelecem os calos ósseos que possuem composição diferente daquela encontrada na região de tecido ósseo sadio.

Com base nos resultados da Tabela 2, foi realizado o cálculo da correlação das concentrações percentuais de cálcio e fósforo (Razão Ca/P), encontrada para cada amostra analisada. A taxa média e o erro padrão médio da correlação entre Ca/P encontrados nas amostras foi: Bio-Oss ($1,99 \pm 0,03$), Straumann ($2,14 \pm 0,02$), FD ($2,51 \pm 0,04$) e AD ($2,10 \pm 0,04$), sendo que apenas o biomaterial fetal demonstrou desempenho estatisticamente diferente dos demais biomateriais.

Os resultados da Razão Ca/P ($> 2,0$) das amostras de biomateriais analisadas no presente estudo são semelhantes àqueles descritos por Perdikouri et al. (2015) que analisaram tecidos ósseos cicatriciais em áreas de fratura. Por outro lado, Zhang et al. (2012) e Pettinicchio et. al. (2012) relataram valores de correlação Ca/P $< 2,0$, quando investigaram substitutos ósseos minerais ou calcinados como substitutos ósseos humanos.

Nesse contexto, podemos inferir que o biomaterial fetal analisado parece apresentar características de composição mineral mais semelhantes às do tecido ósseo cicatricial ou em desenvolvimento do que os demais biomateriais testados.

De acordo com Pettinicchio et. al. (2012), no osso sadio, a razão molar Ca/P aumenta conforme há o aumento da calcificação, isto devido à maior taxa de deposição de hidroxapatita no tecido. Segundo Perdikouri et al (2015), a margem percentual de cálcio e fósforo identificada na composição da hidroxapatita óssea pode variar entre 18,5-62% para cálcio e 8,7-27% para fósforo.

Ao analisar nossos dados, percebemos que a faixa percentual mensurada para cálcio e fósforo nos biomateriais controle (Bio-Oss e Cerabone) estão de fato dentro da margem relatada por Perdikouri et al. (2015), no entanto, dos biomateriais descelularizados adulto e fetal estão muito abaixo.

Vale lembrar que nossos tecidos descelularizados revestidos com hidrogel tendem a apresentar maior composição de matriz orgânica do que os biomateriais controle (desproteinizados ou calcinados), desse modo, e por se tratar aqui de uma análise quantitativa percentual preditiva, é aceitável considerar que a maior identificação de teor de carbono nas amostras descelularizadas tenha contribuído proporcionalmente para uma menor expressão percentual dos demais elementos, o que pode ter mascarado os valores obtidos para cálcio e fósforo, contribuindo portanto, para a menor concentração percentual desses elementos.

Tabela 2 - Médias e erro padrão da média (EPM) dos elementos químicos identificados por energia dispersiva de raios-x (EDS) nas amostras de diferentes biomateriais (n=3): Bio-Oss®-Geistlich, Cerabone®-Straumann, fetal descelularizado (FD) e adulto descelularizado (AD).

Elementos	Bio-Oss	Cerabone	FD	AD
Carbono (%)	17,34 ± 0,87 *#	20,18 ± 1,54 *#	68,54 ± 0,58	65,51 ± 1,09
Nitrogênio (%)	5,40 ± 0,15	5,14 ± 0,33	5,61 ± 0,09	6,77 ± 0,72
Oxigênio (%)	43,39 ± 2,16 *#	35,25 ± 1,98	23,34 ± 0,47	21,14 ± 0,51
Fósforo (%)	11,30 ± 0,86 *#	12,54 ± 1,01 *#	0,71 ± 0,04 †	2,11 ± 0,01
Cálcio (%)	22,56 ± 2,04 *#	26,88 ± 2,09 *#	1,79 ± 0,09 †	4,45 ± 0,06
Razão Ca/P	1,99 ± 0,03 *	2,14 ± 0,02 *	2,51 ± 0,04 †	2,10 ± 0,04

Valores expressos em média ± EPM. (*p<0,05 FD vs Bio-Oss/Cerabone; #p<0,05 AD vs Bio-Oss/Cerabone; †p<0,05 FD vs AD; &p<0,05 Bio-Oss vs Cerabone; ANOVA de duas vias, *pos hoc* Teste de Tukey).

6.2.4 Composição Elementar CHNS-O

Os valores médios percentuais de massa dos elementos químicos (carbono, hidrogênio, nitrogênio, enxofre e oxigênio) identificados nas diferentes amostras de biomateriais foram apresentados na Tabela 3, e os resultados da análise elementar por CHNS-O ilustrados na forma de gráfico na Figura 20.

Pode-se observar que foram demonstrados os principais elementos químicos que estão presentes na constituição molecular orgânica dos tecidos, especialmente, da matriz orgânica extracelular do tecido ósseo adulto e fetal revestidos com hidrogel quando comparados aos produtos controles similares do mercado.

Os resultados obtidos demonstram que, exceto enxofre, todos os demais elementos identificados nos biomateriais descelularizados (adulto e fetal) apresentaram valores estatisticamente superiores aos identificados nos produtos controle (Bio-Oss® e Orthogen®). Esta observação era esperada, uma vez que a maior presença de matriz orgânica presente nos tecidos descelularizados revestidos com hidrogel contribui para um maior percentual dos elementos da análise.

Tabela 3 - Médias e erro padrão da média (EPM) dos valores percentuais em massa dos elementos químicos CHNS-O identificados por combustão completa em amostras de diferentes biomateriais (n=6): Bio-Oss®-Geistlich, Orthogen®-Baumer, fetal descelularizado (FD) e adulto descelularizado (AD).

Elementos (%)	Bio-Oss	Orthogen	FD	AD
Carbono (C)	6,85 ± 1,92 *#&	11,37 ± 0,83 *#	16,72 ± 0,73 †	29,58 ± 1,84
Hidrogênio(H)	1,13 ± 0,33 *#	2,17 ± 0,20 *#	2,93 ± 0,18 †	4,80 ± 0,27
Nitrogênio (N)	1,73 ± 0,74 *#	2,88 ± 0,18 *#	4,50 ± 0,52	4,68 ± 1,29
Enxofre (S)	0,10 ± 0,06	0,12 ± 0,04	0,17 ± 0,03	0,16 ± 0,04
Oxigênio (O)	5,95 ± 0,11 *#&	9,88 ± 0,70 *#	15,32 ± 0,06 †	20,18 ± 0,36

Valores expressos em média ± EPM. (*p<0,05 FD vs Bio-Oss/Orthogen; #p<0,05 AD vs Bio-Oss/Orthogen; †p<0,05 FD vs AD; &p<0,05 Bio-Oss vs Cerabone; ANOVA de duas vias, *pos hoc* Teste de t de Student não pareado para comparação entre dois grupos).

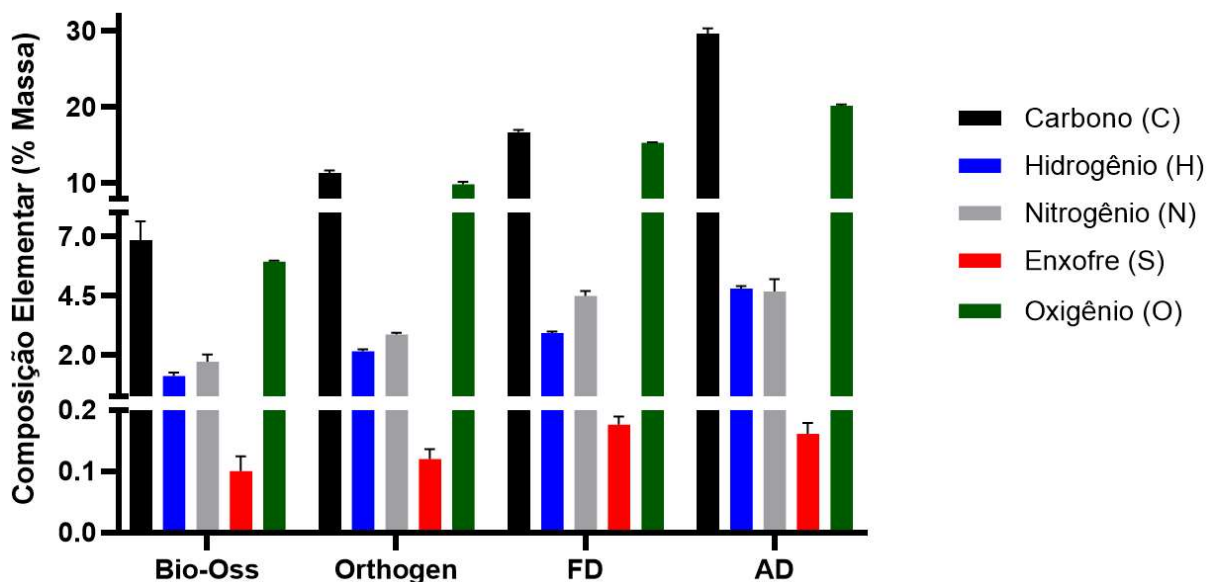


Figura 20 - Análise da Composição Elementar CHNS-O dos nas amostras de diferentes biomateriais (n=6): Bio-Oss®-Geistlich, Orthogen®-Baumer, fetal descelularizado (FD) e adulto descelularizado (AD). Os dados estão expressos em média ± EPM.

De acordo com Lourenço et al. (2002)(Adaptado de JONES, 1931.) o teor de proteínas de uma determinada amostra pode ser calculado a partir do teor de nitrogênio obtido no CHNS, para isso, utiliza-se a seguinte fórmula:

$$\text{Teor de proteína (mg/kg)} = \text{Teor de nitrogênio (\%)} \times 6,25 \text{ (fator de correlação)}$$

Com base nos resultados obtidos na análise por CHNS-O, juntamente com o teor de matriz mineral (cinzas) e de matriz orgânica, a partir da correlação com teor de nitrogênio, foi calculado o teor de proteínas dos biomateriais analisados e apresentados na Figura 21, onde percebe-se a nítida diferença na composição percentual de matrizes orgânicas e minerais entre os diferentes biomateriais controle e descelularizados.

Como esperado, os arcabouços descelularizados mantêm em sua composição maior percentual de matriz orgânica preservada (entre 40-60%), que difere completamente dos demais produtos controle, que apresentam predominantemente matriz mineral (>80%) em sua estrutura.

Vale ressaltar que a composição do tecido ósseo *in natura* geralmente está condicionada a 50-60% matriz mineral, 10% de água, e 30-40% de matriz orgânica (CHEN et al., 2011). A matriz mineral corresponde a uma parcela considerável do peso ósseo, de modo que mínimas alterações em sua composição são suficientes para causar grandes mudanças na proporção de massa do tecido. Sendo assim, uma vez que os produtos analisados estavam liofilizados (secos), não havendo massa considerável de água, pode-se admitir que o padrão de composição mensurado dos tecidos descelularizados demonstram ser mais próximos daqueles apresentados pelo tecido ósseo *in natura*, do que os apresentados pelos biomateriais comerciais.

Em relação aos níveis estimados de proteínas, os valores encontrados também foram maiores nos produtos descelularizados do que nos controles. Como esperado, os biomateriais adulto e fetal revestidos com hidrogel apresentaram níveis de proteína duas vezes maior do que dos produtos similares. Vale ressaltar que os produtos controle são reconhecidos por serem desproteinizados e posteriormente

enriquecidos durante o sua fabricação com aditivos de colágeno exógeno (humano ou suíno), enquanto que os nossos biomateriais adulto e fetal apresentaram níveis protéicos conservados inerentes exclusivamente da própria matriz bovina extracelular descelularizada, proveniente do tecido e do revestimento.

Entre os produtos descelularizados, apesar do valores de proteína estimados serem similares após a correção com base no valor de nitrogênio (adulto = 29,28% e fetal = 28,17%), houve diferença considerável nos níveis estimados de matriz orgânica corrigidos pela massa entre as amostras adulto (58,85%) e fetal (39,86%). Este achado pode estar relacionado principalmente ao maior efeito de desmineralização do protocolo de descelularização do osso adulto, bem como pelo maior nível de engorduramento do tecido.

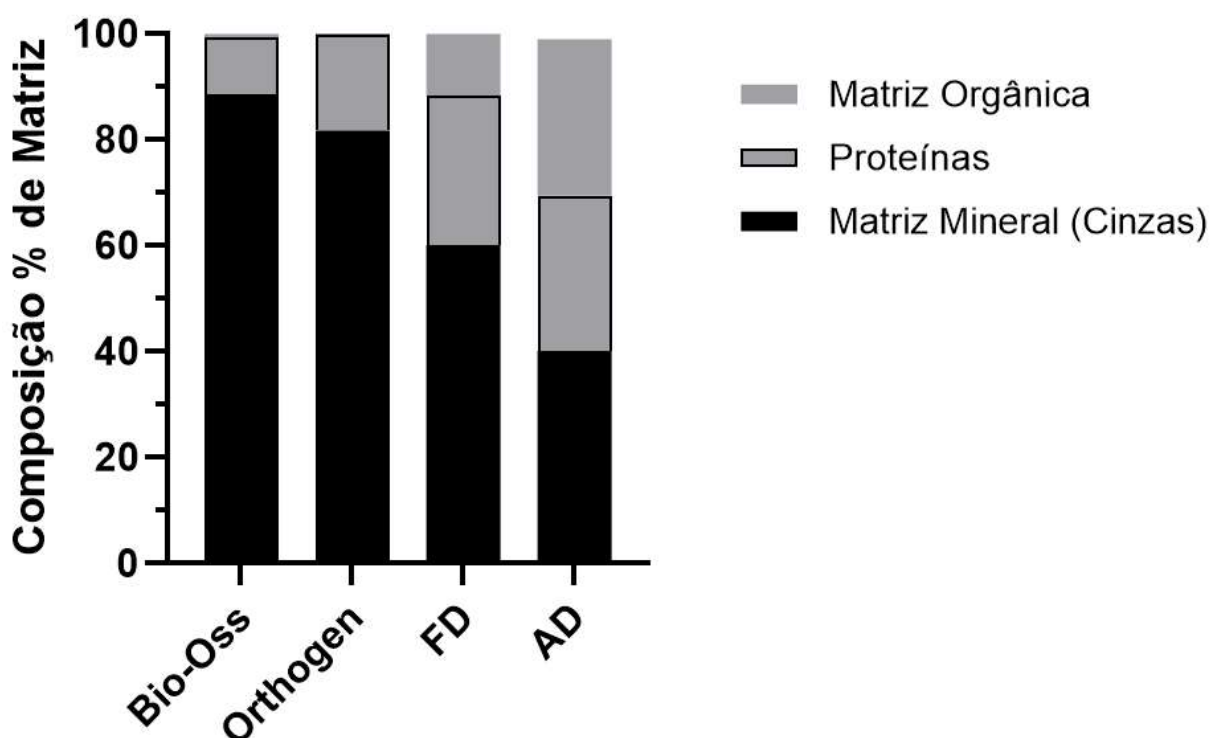


Figura 21 - Análise do valor de massa percentual correspondente ao teor de matriz orgânica, proteínas e matriz mineral (cinzas) de diferentes biomateriais processados por combustão completa em analisador CHNS-O.

6.2.5 Análise Termogravimétrica (DSC e TGA)

Os resultados das análises termogravimétricas (TGA) das amostras de biomaterial adulto e fetal estão apresentados, respectivamente, nas Figuras 22 e 23. Pode-se perceber que os biomateriais adulto e fetal apresentaram padrão similar de estabilidade térmica nas temperaturas analisadas, tendo sido observadas as maiores perdas percentuais em massa a partir dos 250 °C, com picos de degradação entre 350-450 °C, seguido de 450-800 °C.

As menores perdas de massa ocorrem até 150 °C e estão atribuídas à evaporação de água das amostras (desidratação). A partir de 250 °C, quando ocorrem as perdas mais severas, ocorre a fase de decomposição, que está relacionada à combustão dos componentes orgânicos da matriz, perda de água estrutural e início de cristalinização da hidroxiapatita. A partir de 450 °C são evidenciados os efeitos da fase de inversão, quando ocorre decomposição térmica do carbonato da hidroxiapatita da matriz mineral, atingindo a última fase de fusão e sinterização a partir de 750 °C (ELLINGHAM et al., 2015).

Os valores observados de resíduo estável à temperatura de 800 °C do biomaterial adulto (41,52%) e fetal (63,89%) demonstraram maior perda de massa do biomaterial adulto. Este achado está de acordo com os resultados observados na análise elementar por CHNS (Item 6.2.3.4), onde foram demonstrados valores similares para teor de cinzas de ambas as amostras adulto e fetal.

Estudos similares de termogravimetria TGA apontam níveis estáveis para resíduos de aproximadamente 60% da massa de tratamento para ossos bovinos ou humanos (CHEN et al., 2011; GALIA et al., 2011; ELLINGHAM et al., 2015.). Em nossa análise apenas o biomaterial adulto apresentou manutenção de massa inferior ao descrito na literatura.

A maior perda de massa do biomaterial adulto durante o aquecimento pode estar relacionada à diferença de protocolo utilizado no processo de descelularização. Apesar de ter apresentado pontos de degradação na mesma faixa de temperatura do fetal, o material adulto terminou a análise TGA com menor quantidade de resíduo estável, o que pode estar relacionado, primariamente, ao maior nível de gordura presente na amostra, bem como, a uma menor manutenção de matriz mineral ao

final do processo de descelularização. Este resultado, juntamente com as demais análises realizadas anteriormente, contribui para a percepção de que o processo de descelularização do osso adulto é potencialmente mais desmineralizante e degradante do que o processo de descelularização fetal, pois há evidente perda de massa mineral ao final do processo.

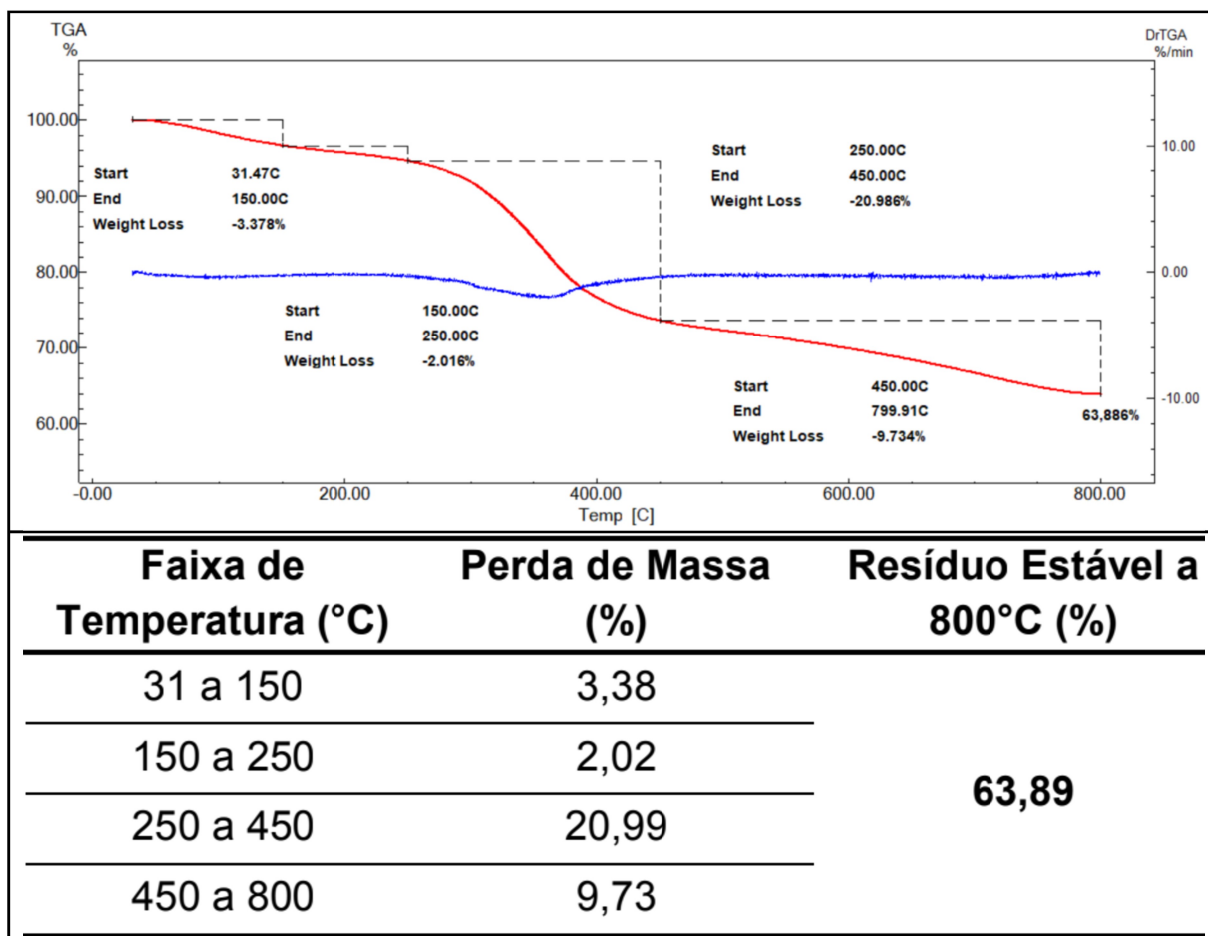


Figura 22 - Análise Termogravimétrica (TGA) de biomaterial fetal.

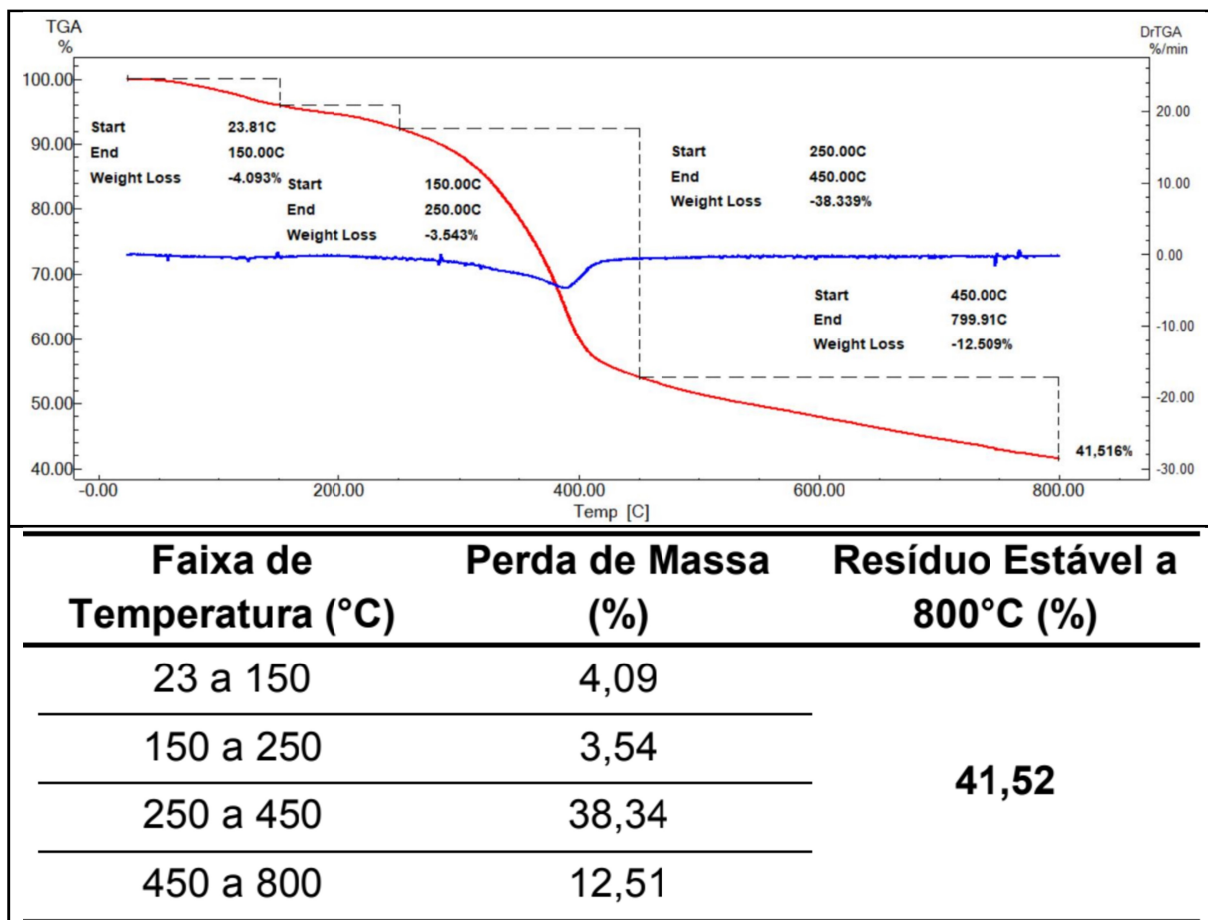


Figura 23 - Análise termogravimétrica (TGA) de biomaterial adulto.

De maneira complementar, sabe-se que as transições entálpicas (endotérmicas ou exotérmicas) evidenciadas na análise DSC são as responsáveis pela mudança da temperatura e indicam mudanças de fases (fusão, oxidação e vaporização) entre outras reações químicas nos materiais analisados. Os resultados das análises termogravimétricas (DSC) das amostras de biomaterial fetal e adulto estão apresentados, respectivamente, nas Figuras 24 e 25.

Pode-se perceber na Figura 24, durante os dois ciclos de aquecimento do biomaterial fetal, duas regiões de interesse principal: entre 72,01-87,17 °C, que evidenciam a região térmica de desnaturação e degradação do colágeno, e posteriormente, o pico de 216,41 °C, que está relacionado à temperatura de transição vítrea de aspecto cristalino da hidroxiapatita.

Ao analisar os resultados do biomaterial adulto, também percebe-se a identificação de outras regiões térmicas (Figura 25). De maneira diferente do biomaterial fetal, no osso adulto houveram sinais térmicos nas regiões de menor aquecimento, entre as faixas de 7,76-8,62 °C (PINTÉR et al., 2009.), entre 17,07-17,75 °C e entre 38,22-39,20 °C, que podem corresponder às regiões de fusão de diferentes tipos de ácidos graxos formadores de lipídios (MIZOBE et al., 2013.).

Apesar da tentativa de remoção durante o processo de desengorduramento, a identificação dessas faixas térmicas no osso adulto descelularizado corroboram com os achados da análise elementar (CHNS-O) que sugere maior teor orgânico, provavelmente de origem lipídica presente nesse material.

Nas regiões de maior aquecimento do biomaterial adulto (Figura 25), houve comportamento similar ao das amostras de biomaterial fetal (Figura 24), sendo mensuradas regiões térmicas de interesse de 75,88 °C e a faixa entre 196,40-218,72 °C, que também correspondem às regiões de degradação do colágeno e hidroxiapatita, respectivamente.

Segundo Miles e Avery (2011), dependendo do tipo de material a desnaturação úmida do colágeno pode ocorrer em análises DSC a partir de 36 °C, com picos de estabilidade na região térmica de 64 °C. Em matrizes ósseas desmineralizadas, o teor de hidratação dos tecidos influencia diretamente na temperatura de estabilidade da molécula, sendo observados picos de decomposição mais próximos a 90 °C em ossos com menor teor de água.

De acordo com Bueno et al. (2014), os resultados da calorimetria DSC podem ser influenciados pela estrutura molecular dos constituintes do tecido. Durante o processo de formação e enovelamento, as fibras de colágeno perdem moléculas de água de hidratação, que são substituídas por ligações cruzadas entre os grupos funcionais de cadeias moleculares adjacentes, o que promove a aproximação das fibras. Essa nova estruturação e arranjo molecular é influenciada pelos diferentes níveis ou tipos de ligações cruzadas da molécula e pelo grau de mineralização, que resulta nas diferentes formas de enovelamento da tripla-hélice do colágeno, causadas pela lenta difusão de reagentes no tecido.

Tais afirmações vão de encontro com os resultados obtidos em nossa análise, que demonstram diferentes níveis de degradação observados na faixa entre 70,0-82,7 °C. Em nossas análises com amostras liofilizadas, as regiões térmicas de desnaturação de colágeno estavam localizadas na faixa de 72,01-87,17 °C para o biomaterial fetal e 75,88 °C para o biomaterial adulto, de maneira similar ao resultados descritos por Miles e Avery (2011) e Bueno et al. (2014).

De maneira complementar, CHARMAS, B. (2013) afirma que a maior porosidade de um biomaterial favorece a distribuição do calor de forma mais homogênea, desse modo, materiais mais porosos tendem a apresentar transição térmica em temperaturas mais baixas do que os menos porosos em análises DSC.

No presente estudo, apesar do biomaterial fetal ter demonstrado inicialmente ser mais poroso do que o adulto, acreditamos que as pequenas diferenças de temperaturas de fusão também possam ter ocorrido em função dos diferentes níveis de mineralização e densidade apresentados pelos tecidos, conforme já discutido anteriormente.

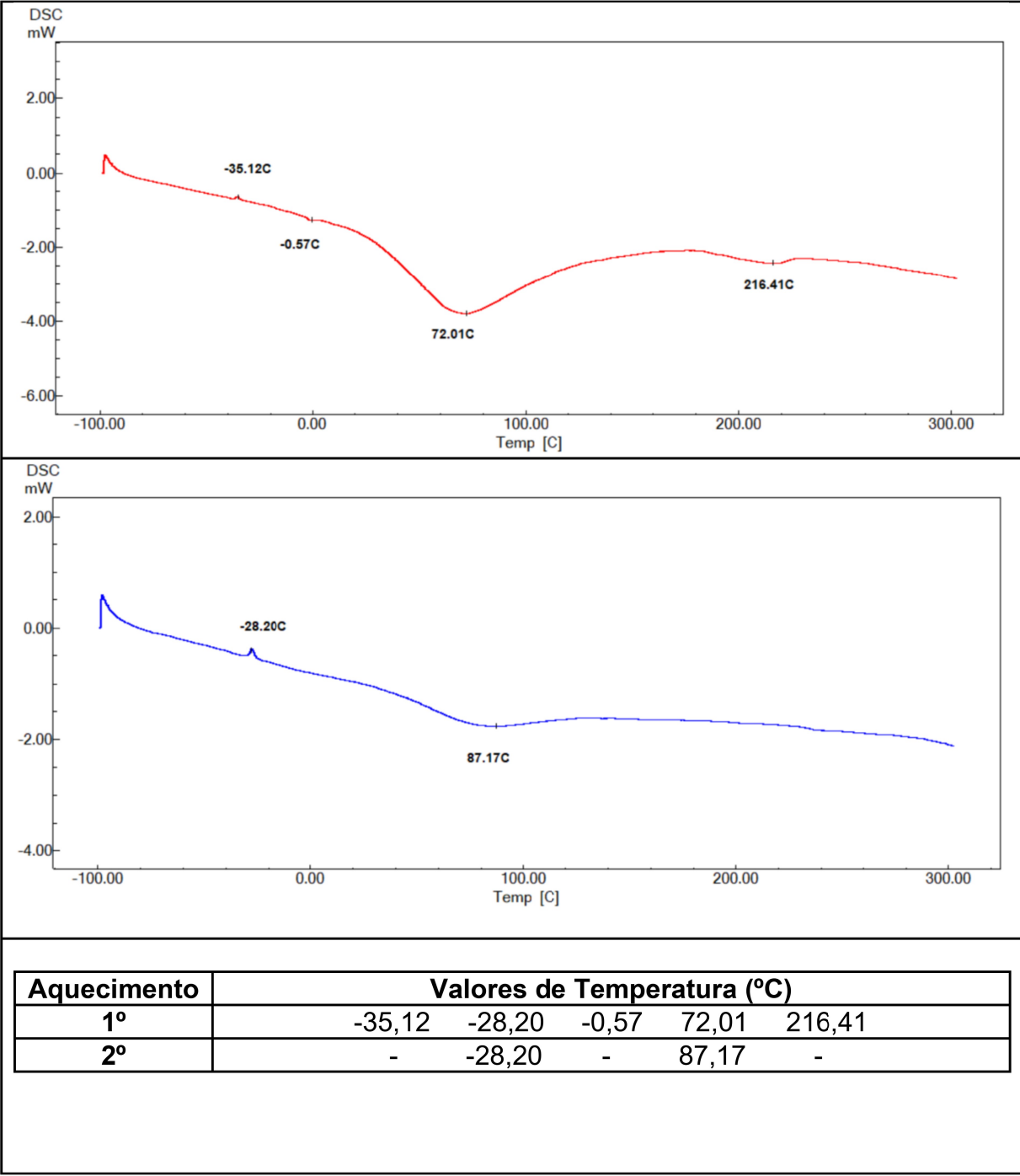


Figura 24 - Análise termogravimétrica (DSC) de biomaterial fetal.

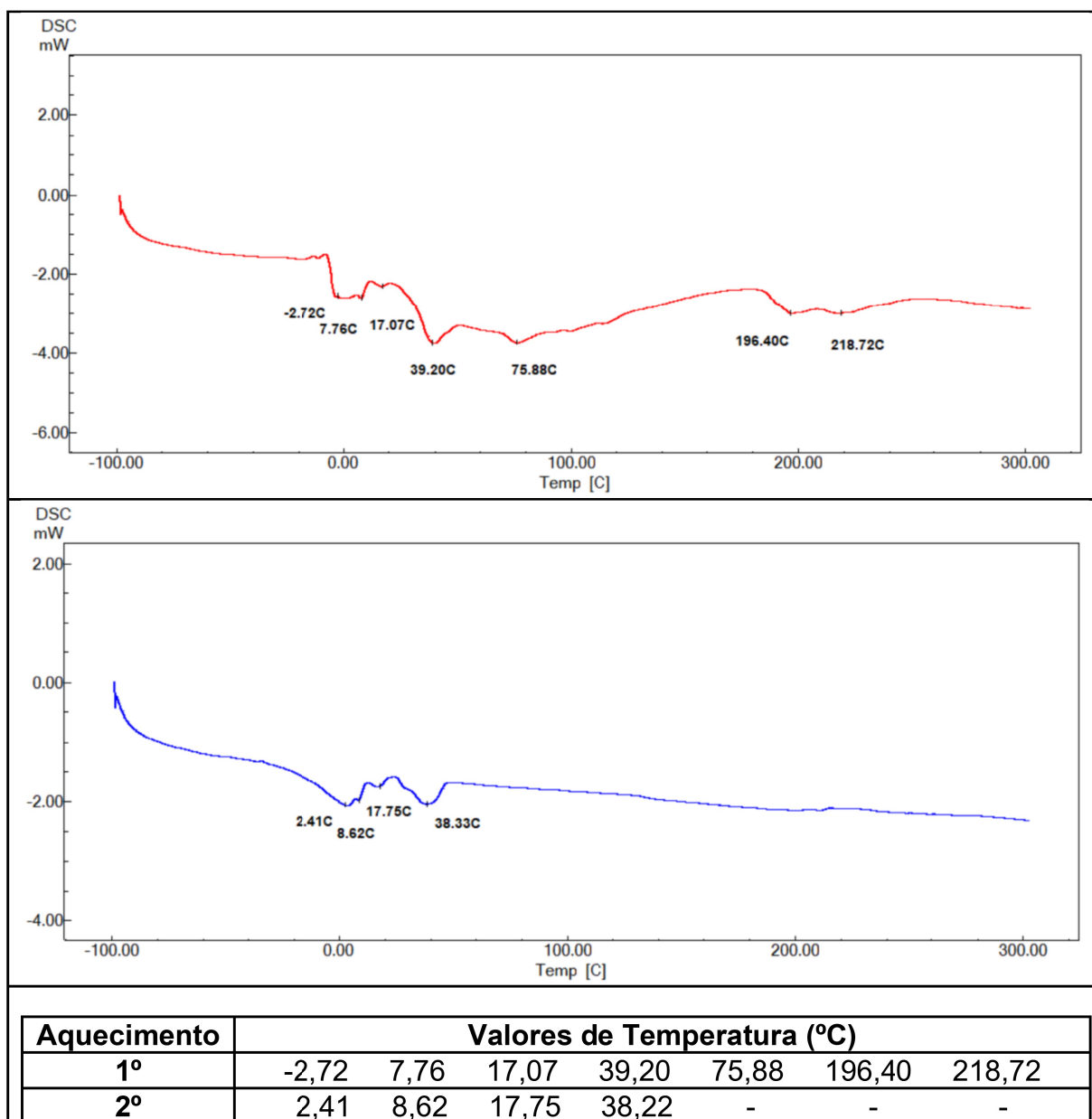


Figura 25 - Análise termogravimétrica (DSC) de biomaterial Adulto.

6.2.6 Espectroscopia Por Infravermelho Com Transformada De Fourier (FTIR)

Os resultados da análise do espectro por FTIR de diferentes biomateriais estão demonstrados na Figura 26 onde pode-se perceber a representação da manutenção de picos de ondas característicos do tecido ósseo presentes em praticamente todas as amostras. De acordo Stuart (2006), as vibrações mais intensas na região de 3100-2800 (cm^{-1}) são correspondentes ao estiramento do CH_2 característico dos sistemas lipídicos. Em nosso trabalho, foram identificados picos que podem ser

atribuídos a vibração assimétrica e simétrica de CH₂ em 2.924 (cm⁻¹) e 2.843 (cm⁻¹), respectivamente. Vale salientar que estas vibrações só foram observadas nos materiais descelularizados, portanto, ausentes nas amostras controle, o que pode demonstrar a maior preservação de estruturas orgânicas lipídicas estruturais presentes nas matrizes descelularizadas.

A faixa de 1200-2000 (cm⁻¹) pode ser relacionada, de maneira generalizada, à região de absorção correspondente com aos constituintes da matriz orgânica óssea, ao mesmo passo que as vibrações entre 1500-1700 (cm⁻¹) correspondem a resíduos de peptídeos e proteínas ósseas, que podem ser identificadas tanto em amostras de ossos corticais saudáveis quanto em amostras de tecidos ósseos regenerados (HUNG et al., 2016; ADACHI et al., 2020.)

Em nossa análise, observamos em todas as amostras analisadas picos em 1640 (cm⁻¹) e em 1525 (cm⁻¹) que correspondem aos sinais da amida I e amida II de proteínas como o colágeno, além de picos em 1.438 (cm⁻¹) que parecem corresponder a vibração de abano (wagging) do CH₂ em banda lipídica. Curiosamente, identificamos apenas na amostra de biomaterial adulto descelularizado um sinal proeminente em 1160 (cm⁻¹). Conforme descrito por Stuart (2006), acreditamos que esta vibração corresponde ao alongamento de ligações tipo C-O-C, características em substâncias químicas como álcoois e éteres, o que nesse contexto, sugere estar relacionado ao tipo de tratamento de desengorduramento sofrido pelo osso adulto durante o processo de descelularização.

De maneira abrangente, Adachi et al. (2020) também afirmam em seus trabalhos que vibrações observadas na faixa entre 400-1200 (cm⁻¹) estão relacionadas à composição da rede mineral óssea. Sabe-se que a matriz mineral do osso é composta principalmente por fosfato de cálcio na forma de nanocristais de hidroxiapatita (HA). No entanto, diferentemente do HA sintético, ao longo do tempo, a matriz mineral óssea natural, também é incorporada com outros constituintes como carbonato (5–8%), cátions (Mg²⁺, K⁺, Na⁺) e ânions (F⁻, Cl⁻) traço que contribuem para formação de um HA carbonatada com variados graus de cristalinidade durante o preenchimento das lacunas da rede (UNAL et al., 2018).

Segundo Stuart (2006), a faixa de detecção dos modos de vibração ν_1 e ν_3 do íon fosfato (PO_4^{3-}) geralmente está estabelecida entre 950-1100 (cm^{-1}), enquanto que para o íon carbonato (CO_3^{2-}) pode ser identificada entre 800-880 (cm^{-1}) e 1410-1450 (cm^{-1}). Em nosso trabalho, observamos em todas as amostras picos característicos em 1025 (cm^{-1}) que acreditamos estar relacionados ao fosfato, enquanto que aqueles observados em 863 (cm^{-1}) podem estar relacionados ao modo de vibração ν_2 do carbonato. Assim como informado por Stuart (2006), também observamos picos proeminentes em 565 (cm^{-1}) e 707 (cm^{-1}), que são correspondentes aos modos de vibração ν_4 do íon fosfato e do carbonato de cálcio (CaCO_3), respectivamente.

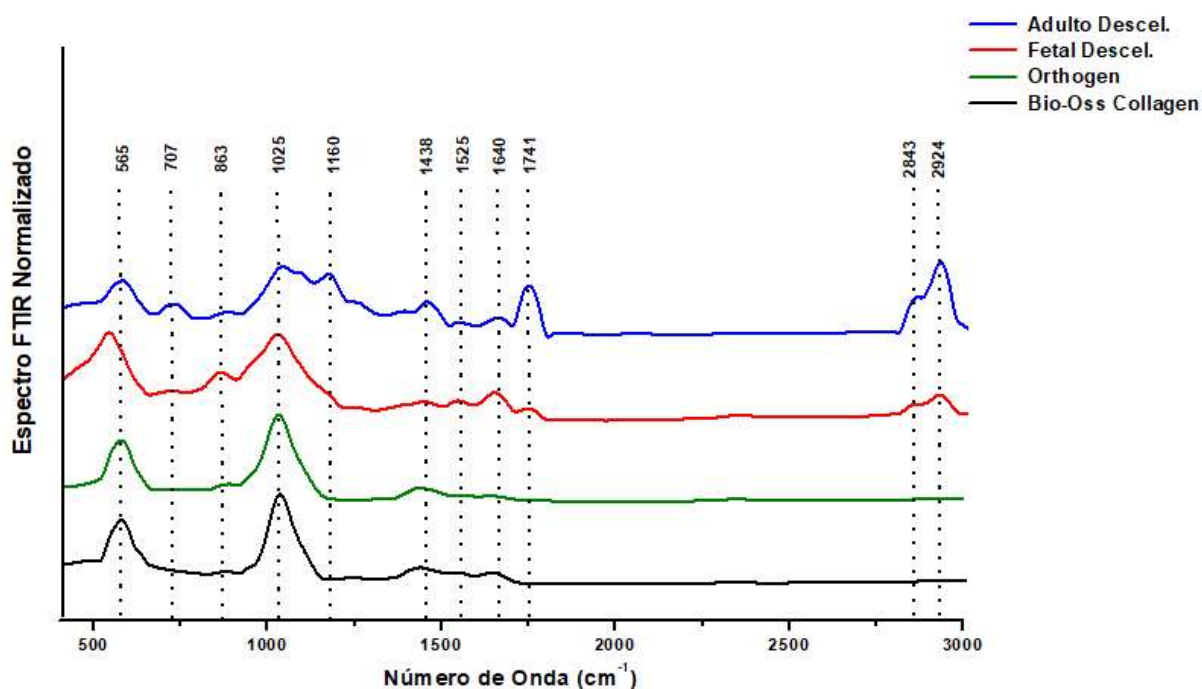


Figura 26 - Espectro da Análise por FTIR das amostras de diferentes biomateriais (n=3): Bio-Oss Collagen®-Geistlich, Orthogen®-Baumer, fetal descclularizado (FD) e adulto descclularizado (AD).

6.2.7 Raman

Os resultados da análise do espalhamento Raman dos diferentes biomateriais estão demonstrados na Figura 27 (A e B), nas quais pode-se identificar espectros

característicos do tecido ósseo, inerentes tanto da matriz mineral quanto da matriz orgânica presente nas amostras.

As vibrações referentes à matriz mineral óssea, geralmente, apresentam espectros com picos que variam entre 429-1034 (cm^{-1}) para ligações tipo fosfato, e na região de 960-1073 (cm^{-1}) para carbonatos, que são os dois principais constituintes minerais da hidroxiapatita.

É sabido que devido à estrutura altamente cristalina do osso, esse tecido exibe uma dispersão Raman muito forte, e seus espectros podem mudar significativamente em função da idade, do grau de reticulação e da mineralização do osso cortical. Desse modo, é esperado que uma maior cristalinidade óssea possa ser demonstrada também com uma maior evidência das bandas de fosfato e de carbonato mineral presentes nos tecidos maduros sadios (BERGHOLT et al., 2019.).

Em nossa análise, encontramos em todas as amostras, vibrações como picos em 428 (cm^{-1}) que correspondem ao modo de vibração ν_2 de alongamento simétrico do íon fosfato da hidroxiapatita. Também evidenciamos sinais consideráveis em 524 (cm^{-1}) que são atribuídos a faixa de alongamento das ligações de dissulfeto S-S do colágeno incorporado na matriz mineral, enquanto que os picos proeminentes em 585-587 (cm^{-1}) correspondem aos modos de vibração ν_4 do íon fosfato da hidroxiapatita. Verificamos também, que nas faixas anteriormente citadas, o biomaterial fetal apresentou picos e largura de espectro (normalizado) inferiores àqueles apresentados pelos demais biomateriais adultos (descelularizado e controle), sugestivamente, esse achado pode estar relacionado ao menor grau de mineralização e amadurecimento que era esperado para o tecido fetal (MORRIS & MANDAIR, 2011; TALARI et al., 2014.).

Em uma faixa espectral superior, a banda mineral de fosfato é muito intensa próxima à região de 960 (cm^{-1}), sendo este o marcador mais comumente usado para tecido ósseo, que corresponde ao modo ν_1 (PO_3^{-4}) característico de apatitas carbonatadas (MORRIS & MANDAIR, 2011; TALARI et al., 2014; BERGHOLT et al., 2019.).

Em nosso estudo, todas as amostras apresentaram este intenso sinal com pico específico em 960 (cm^{-1}). Aparentemente, apenas o biomaterial adulto apresentou pico menos pronunciado nesta faixa, porém com um maior alargamento do sinal, o que pode estar relacionado aos achados anteriores de menor densidade e maior desmineralização da amostra. De maneira similar entre os grupos testados também foi possível identificar sinais próximos a 1073 (cm^{-1}), que correspondem às vibrações atribuídas tanto ao alongamento simétrico do carbonato de cálcio, quanto ao alongamento simétrico do fosfato ($\nu_3 \text{PO}_3^{-4}$, 1076 cm^{-1}) presentes na hidroxiapatita (MORRIS & MANDAIR, 2011; TALARI et al., 2014; BERGHOLT et al., 2019.).

No que diz respeito aos sinais característicos da matriz orgânica óssea, com desempenhos parecidos e por maior proximidade nos nossos biomateriais testados, conseguimos demonstrar sinais vibração em 1033 (cm^{-1}), que podem ser correspondentes ao aminoácido fenilalanina presente em diferentes conteúdos de colágeno, bem como, a vibração em 1066 (cm^{-1}), que pode ser atribuída à prolina, principal aminoácido constituinte do colágeno (TALARI et al., 2014.).

De maneira singular, conseguimos identificar apenas no biomaterial fetal um pico em 1163 (cm^{-1}) que pode ser corresponde ao aminoácido tirosina constituinte do colágeno tipo I. A tirosina geralmente encontra-se localizada nas regiões não helicoidais dos telopeptídeos, nas extremidades do tropocolágeno (monômeros do Colágeno Tipo I). Este pico identificado de tirosina é particularmente interessante e específico na matriz extracelular fetal, pois, demonstra a intensa taxa de reabsorção/substituição de colágeno tipo I em condições de ocorrência de formação óssea muito ativa, o que é um efeito condizente e esperado para a velocidade de crescimento observada no osso fetal (KAJANTIE et al., 2001; NAKANO et al., 2005. GOISSIS, 2007; TALARI et al., 2014.).

Outro resultado particular foi por nós observado no material controle, que apresentou um pico em 1491 (cm^{-1}), região corresponde à vibração de alongamento C-N ligada ao plano flexão CH em cátions de radicais amino, que acreditamos estar relacionados especificamente ao tipo de colágeno (1488 cm^{-1}) presente e adicionado neste produto (KAJANTIE et al., 2001; NAKANO et al., 2005. GOISSIS, 2007; TALARI et al., 2014.).

A região espectral de 1600–1700 (cm^{-1}) é amplamente adotada para avaliar a integridade estrutural das fibras de colágeno, em nosso estudo, observamos um pico característico em 1618 (cm^{-1}) em todas as amostras analisadas, que parece estar relacionado à vibração na região da amida I das bandas de colágeno da matriz óssea (TALARI et al., 2014; WALTHER et al., 2022.)

As vibrações que encontramos em nosso trabalho correspondentes ao pico de 1745 (cm^{-1}), que prolongam-se até 1825 (cm^{-1}), parecem estar relacionadas à diferentes níveis de presença de fosfolipídios e triglicerídeos, que de fato, tendem a estar mais presentes em amostras provenientes de ossos adultos do que em ossos fetais. Em nossa análise, curiosamente, os biomateriais apresentaram diferentes espectros a partir de 1900 (cm^{-1}). Os biomateriais controle e fetal descelularizado apresentaram ondas de sinais entre 1950-2150 (cm^{-1}), com pico em 2010 (cm^{-1}), que não foi observado no osso adulto descelularizado. No mesmo sentido, apenas o biomaterial controle também apresentou um pico expressivo em 2489 (cm^{-1}). Por outro lado, apenas o biomaterial adulto descelularizado apresentou sinal em 2882 (cm^{-1}).

De acordo com nossa revisão bibliográfica, estes sinais parecem estar relacionados aos diferentes tipos de cadeias carbônicas orgânicas e conteúdos lipídicos presentes nos biomateriais. As vibrações na região de 2100-2250 (cm^{-1}) parecem ser correspondente às ligações de estiramento tipo C-N e $\text{C}\equiv\text{N}$, enquanto que da região de 2300-2500 (cm^{-1}) podem corresponder às vibrações de estiramento tipo OH-NH-CH. Por fim, sinais entre 2800-3100 (cm^{-1}) podem ser atribuídos ao alongamento assimétrico de vibrações de CH_3 e CH_2 principalmente presentes em lipídeos e ácidos graxos. Estes resultados estão de acordo com o que foi demonstrado em análises anteriores, e sugerem maior presença de conteúdo orgânico lipídico nos biomateriais proveniente de ossos adultos (MORRIS & MANDAIR, 2011; CRANE et al., 2013; TALARI et al., 2014; WALTHER et al., 2022.).

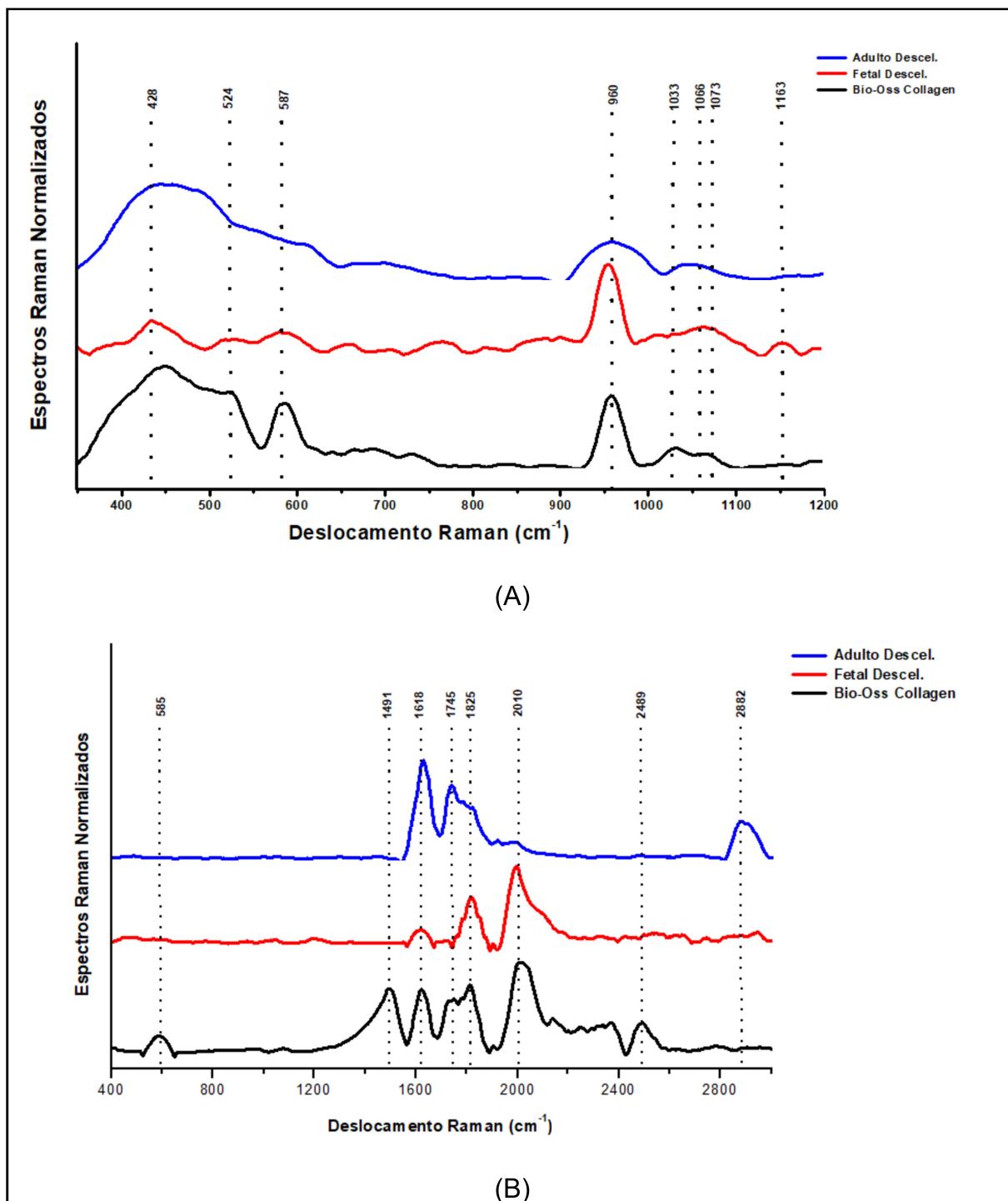


Figura 27 - Espectro da Análise do Espalhamento Raman Normalizado das amostras de diferentes biomateriais (n=3): Bio-Oss Collagen®-Geistlich, Fetal Descelularizado (FD) e Adulto Descelularizado (AD). (A) Espectro Raman Normalizado das diferentes amostras analisadas com potência do laser na amostra de ~300 mW (B) Espectro Raman Normalizado das diferentes amostras analisadas com potência do laser na amostra de ~80 mW.

6.2.8 Análise de Esterilidade

Os resultados das análises de esterilidade por inoculação direta das amostras de biomaterial adulto e fetal previamente irradiadas por radiação gama (Dose 17,5 kGy) foram apresentados na Figura 28.

Pode-se evidenciar que, para ambos os biomateriais adulto e fetal devidamente envasados em frascos de vidro com tampa e lacre, o método aplicado foi eficaz em promover a esterilização, comprovada por ausência de crescimento microbiano na análise.

Oportunamente, também demonstramos na Figura 29 a mudança de aparência na tonalidade do vidro dos frascos de envase do biomateriais, que assumem o aspecto de coloração âmbar após o processo de irradiação. Esta mudança na coloração é um sinalizador característico amplamente utilizado na indústria farmacêutica, que também utilizamos em nosso trabalho para controle e visualização prévia da ocorrência de tratamento nas amostras de biomateriais irradiadas.

Mundialmente, parece não haver ainda um consenso sobre o método ideal de esterilização de biomateriais de enxerto. Diversos são os processos químicos (BALSY et. al., 2008.) e/ou físicos que podem promover a esterilização óssea (GALIA et al., 2008.), dentre eles, alternativas como o uso de autoclavagem, desidratação em álcool absoluto, e tratamento com óxido de etileno (CASTIGLIA et. al., 2015.) são citados, porém, o comprometimento da capacidade osteogênica e da manutenção de resistência mecânica nos tecidos tratados parecem ser os maiores desafios a serem superados (NICK et al., 2013.). Por esse aspecto, a irradiação gama parece ser o agente esterilizante mais apropriado para uso no osso desmineralizado e em biomateriais de implante em uso clínico, tem sido a forma mais comum de esterilização utilizada, sendo considerada um dos métodos mais aceitáveis de descontaminação em tecidos humanos (ISO 11137-2, 2006; NGUYEN et. al., 2008.).

Doses de irradiação entre 15 e 35 kGy tem sido amplamente adotadas e recomendadas, principalmente, por apresentar efeito esporicida e eficácia esterilizante, com bom nível de penetração no tecido sem causar comprometimento da capacidade indutiva óssea (ISO 11137-2, 2006.). Por outro lado, sabe-se que o

aumento da dose de irradiação pode também promover danos gradativos sobre a matriz de colágeno (NGUYEN et. al., 2008.), o que pode influenciar diretamente sobre a propriedade mecânica óssea, resultando em perda da capacidade de absorção de energia e menor resistência à propagação de rachaduras (NICK et al., 2013.). Nesse contexto, é consensual que deve-se optar sempre pela menor dose irradiante necessária capaz de promover efeito esterilizante com o menor dano estrutural possível (BALSY et. al., 2008; GALIA et al., 2008; CASTIGLIA et. al., 2015.). Em nosso trabalho demonstramos eficiente efeito esterilizante com a utilização da dose baixa de 17,5 kGy (entre 15,0 e 25,0 kGy), que é a dose mundialmente recomendada para esterilização de dispositivos médicos, e que parece não promover comprometimento mecânico mensurável em biomateriais de implante.

MICROBIOLOGIA - ESTERILIDADE		
<u>Biomaterial Fetal - Amostra FG 02-04</u>		
Análise	Resultado	Referência
Esterilidade	Amostra Estéril	ISO 11737-2-2019 Inoculação Direta
TSB 28-32 °C (7º Dia)	Ausência de Crescimento Microbiano	ISO 11737-2-2019
TSB 28-32 °C (14º Dia)	Ausência de Crescimento Microbiano	ISO 11737-2-2019
<u>Biomaterial Adulto - Amostra AG 76-78</u>		
Análise	Resultado	Referência
Esterilidade	Amostra Estéril	ISO 11737-2-2019 Inoculação Direta
TSB 28-32 °C (7º Dia)	Ausência de Crescimento Microbiano	ISO 11737-2-2019
TSB 28-32 °C (14º Dia)	Ausência de Crescimento Microbiano	ISO 11737-2-2019

Figura 28 - Resultado da análise de esterilidade para amostras de osso adulto (AG 76-78) e fetal (FG 02-04).

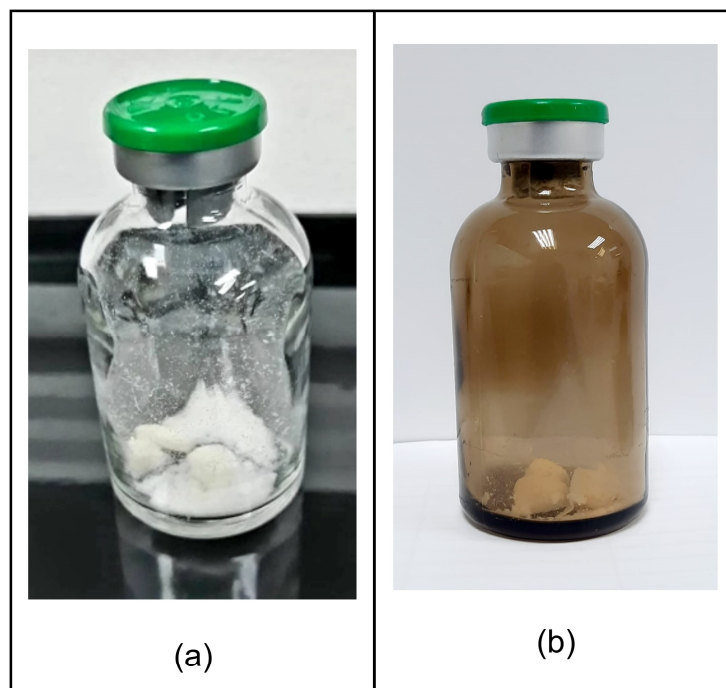


Figura 29 - Aspecto das amostras de biomateriais fetal descelularizado revestido com hidrogel de ECM-fb liofilizado envasadas antes (a) e após (b) processo esterilização por gama com dose de 17,5 kGy.

6.2.9 Análise de Endotoxinas e Pirogênio

No controle de qualidade de implantes, a contaminação por endotoxinas bacterianas (substratos pirogênicos) frequentemente está associada à ocorrência de febre clínica, no entanto, sabe-se que outras substâncias liberadas por diversos materiais estranhos ao organismo também podem causar esse efeito colateral (GALIA et al., 2008.). Por esse motivo, nos estudos de biocompatibilidade, normalmente faz-se uso da avaliação complementar do potencial pirogênico, como estratégia para verificar se existe possibilidade de manifestação clínica de febre associada à origem alérgica ou infecciosa (SANDHYA et al., 2017.).

No presente estudo, os resultados das análises de endotoxinas das amostras de biomaterial adulto e fetal estéreis foram apresentados na Figura 30. Pode-se afirmar que ambos os biomateriais adulto (3490 EU/dispositivo) e fetal (13300 EU/dispositivo) apresentam contaminação por endotoxinas com concentração muito superior às aceitáveis para dispositivos médicos (limite máximo de 20

EU/dispositivo) conforme recomendado pela United States Pharmacopeia 43, NF38 - 2020.

Os resultados da análise para o Teste complementar de Pirogênio *in vivo*, com amostra de biomaterial fetal estéril, foram apresentados na Figura 31, onde pode-se perceber também a constatação de resultados não satisfatórios, demonstrados pela elevação de temperatura corporal superior a 0,5 °C nos três animais utilizados, bem como, pelo resultado da soma de variação da temperatura corporal dos três animais (3,7 °C), superior a 3,3 °C que é o limite de referência aceitável para o teste de pirogênio na implantação *in vivo* (United States Pharmacopeia 43-NF38, 2020).

Sabe-se que reações de origem pirogênica em função da contaminação por endotoxinas estão intimamente associadas aos processos de fabricação, devendo sua avaliação fazer parte rotineira das medidas de controle e de produção de qualquer biomaterial (GALIA et al., 2008). Apesar do resultado prévio apresentado de inconformidade para endotoxinas, a realização do teste complementar de implantação foi determinante para verificar se alteração clínica de ordem inflamatória, associada à presença das endotoxinas, representava de fato risco potencial à possível implantação dos dispositivos nos animais. Ademais, o resultado do teste também foi importante, pois antecipadamente, determinou a suspensão dos demais ensaios de implantação clínica programada em outros animais, até a produção de um novo lote de biomateriais livre de contaminação por endotoxinas, o que está totalmente de acordo com os princípios éticos experimentais relacionados ao cuidado e pesquisa com uso de animais (DBCA-CONCEA, 2022.).

A identificação das inconformidades de contaminação por endotoxinas e de reação positiva ao teste de pirogênio, apesar de indesejáveis para biomateriais, eram passíveis de ocorrer no presente trabalho, uma vez que a contaminação por bactérias está diretamente relacionada à condição ambiental, das condições de manuseio e de processamento que a matéria-prima (osso) foi submetida durante a produção dos biomateriais em condição laboratorial e experimental. Nesse contexto, acreditamos que durante todo o processo produtivo, várias foram as possíveis fontes de contaminação bacteriana, dentre elas, citamos: as diversas manipulações não estéreis ocorridas desde a coleta, limpeza e corte da matéria-prima (osso *in natura*), o processo de descelularização como um todo que fez uso de inúmeras etapas de

lavagem sem o controle de utilização de água e demais reagentes estéreis, além das possíveis contaminações cruzadas inerentes das etapas finais de secagem, moagem e envase, que fizeram uso de diversos equipamentos e utensílios em ambientes não controlados ou estéreis. Para solução desta inconformidade, pensando em um produto final de aplicabilidade clínica de melhor qualidade, observamos que será necessário realizar o processo produtivo dos lotes de biomateriais em ambiente (fabril ou laboratorial) mais controlado, para que haja maior uniformidade e garantia de segurança das condições ambientais de produção, principalmente, no que diz respeito ao cuidado durante a manipulação, à qualidade de ar e água, além da condição de pureza e de esterilidade dos demais reagentes, equipamentos e utensílios utilizados durante todo o processo de descélularização, secagem e envase dos produtos.

ENDOTOXINAS		
<u>Biomaterial Fetal - Amostra FG 05</u>		
Análise	Resultado	Referência
Endotoxinas Bacterianas	13300 EU / dispositivo	United States Pharmacopeia 43, NF38 - 2020
SPIKE	107%	
<u>Biomaterial Adulto - Amostra AG 01</u>		
Análise	Resultado	Referência
Endotoxinas Bacterianas	3490 EU / dispositivo	United States Pharmacopeia 43, NF38 - 2020
SPIKE	148%	

Figura 30 - Resultado da análise de endotoxinas das amostras de osso adulto (AG 01) e fetal (FG 05).

Biomaterial Fetal - Amostra FG 11-18										
Coelho nº	Peso (g)	Volume injetado (mL)	Leituras de Temperatura (minutos)							Variação de temperatura
			Controle	30	60	90	120	150	180	
272	3090	30,9	38,9	39,3	39,8	40,0	39,7	39,7	39,7	1,1
273	4340	43,4	39,1	39,1	39,6	40,0	40,0	39,5	39,2	0,9
278	4190	41,9	39,8	40,2	40,7	41,0	40,9	41,1	41,5	1,7
Total de aumentos										3,7°C
Interpretação do Resultado:										
Satisfatório: Nenhum coelho apresenta aumento individual na temperatura maior que 0,5 °C.										
Retestar: Se um ou mais coelhos apresentarem aumento de temperatura individual maior que 0,5 °C, refazer o teste com inclusão de outros cinco coelhos.										
Insatisfatório: Se três ou mais coelhos apresentarem aumento individual de temperatura maior que 0,5 °C, e se a soma dos aumentos de temperatura individual exceder a 3,3 °C.										

Figura 31 - Resultado da análise do teste de pirogênio *in vivo* da amostra de biomaterial fetal (FG 11-18).

6.2.10 Proliferação Celular e Citotoxicidade

6.2.10.1 Teste Viabilidade Celular *In Vitro* (Células-Tronco Mesenquimais com características fibroblásticas)

Os resultados do teste de viabilidade celular com CTM's foram demonstrados nas Figuras 32 e 33. Para interpretação prévia dos dados, vale a pena lembrar que o maior desafio para recelularização em biomateriais descelularizados testados *in vitro*, geralmente, tem sido atribuído à alterações na arquitetura da matriz e à componentes residuais de detergentes, inerentes do processo de descelularização, que podem inibir o repovoamento dos arcabouços (GRATZER et al., 2006; CHENG et al., 2014).

De acordo com Zvarova et al. (2016), o limiar citotóxico de concentração de SDS residual pode diferir para cada cada tecido e tipo celular, no entanto, descreve para linhagens CTM's humanas um limiar de 0,002%. Em nossa análise, as amostras de biomaterial fetal (FD SDS 0,02%) que apresentavam concentração residual dez vezes acima do limite descrito por Zvarova et al. (2016), conforme esperado, sempre tiveram desempenho celular inferior ao grupo controle nos dois dias de

análise, portanto, comprovando que o efeito deletério do SDS a 0,02% é citotóxico para as células em nosso biomaterial testado.

Por outro lado, o biomaterial fetal (FD) que havia apresentado resultado de SDS residual inferior a 0,005%, conforme descrito no item 6.1.2, de maneira surpreendente, mesmo apresentando concentração residual superior à descrita por Zvarova et al. (2016), apresentou desempenho 2,7 e 2,6 vezes superior ao grupo controle com 24 e 48 horas de cultivo celular, demonstrando portanto, ausência de citotoxicidade inerente do SDS a 0,005%.

Nesse mesmo contexto, o biomaterial adulto (AD) que havia apresentado teor de SDS residual inferior a 0,008%, na presente análise teve desempenho superior ao grupo controle (0,88 vezes) nas primeiras 24 horas, porém, não divergiu estatisticamente após 48 horas de incubação.

Este resultado inferior de AD no segundo dia pode sugerir um possível efeito deletério relacionado a maior concentração residual de SDS nessas amostras, no entanto, carece maior investigação, pois também acreditamos que possa estar relacionado à possíveis particularidades arquitetônicas apresentadas pela matriz adulta após o processo de descelularização, que conforme descrevemos anteriormente, apresentou maior desmineralização, menor densidade e porosidade, o que claramente poderia também influenciar na capacidade de adesão e multiplicação celular.

A extensão do protocolo, por pelo menos 96 horas, também seria uma consideração adequada para a continuidade da análise. Acreditamos que durante um maior tempo de cultura, o desempenho celular dos extratos dos biomateriais enriquecidos com hidrogel seriam ainda mais evidentes e estatisticamente superiores.

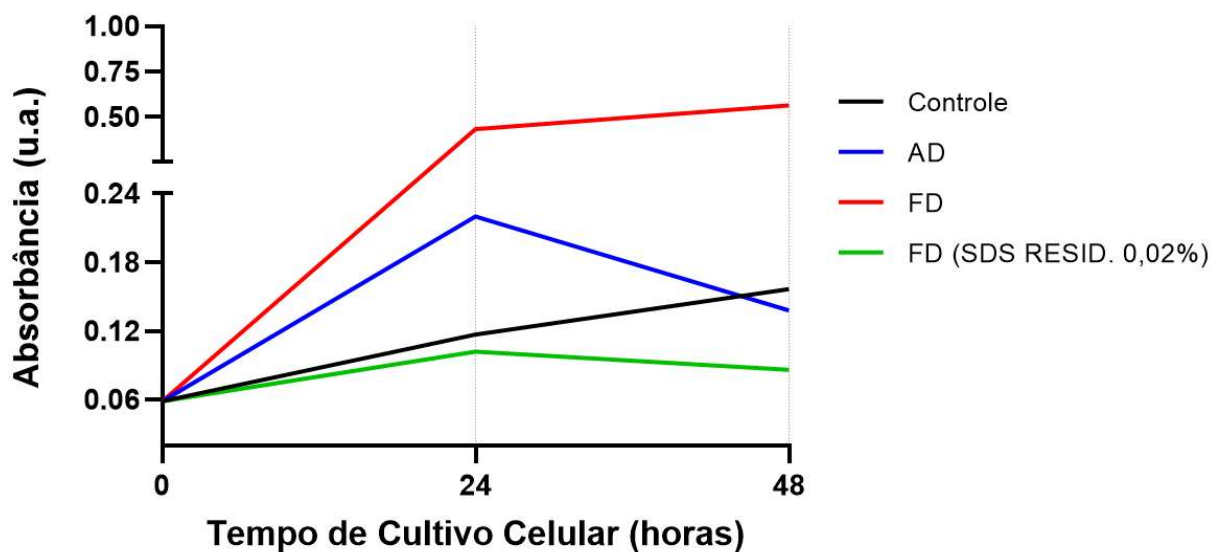


Figura 32 - Gráfico da análise do teste de viabilidade celular média *in vitro* de amostras de biomaterial fetal e adulto descelularizados revestidas com hidrogel de ECM-fb liofilizado (n=3).

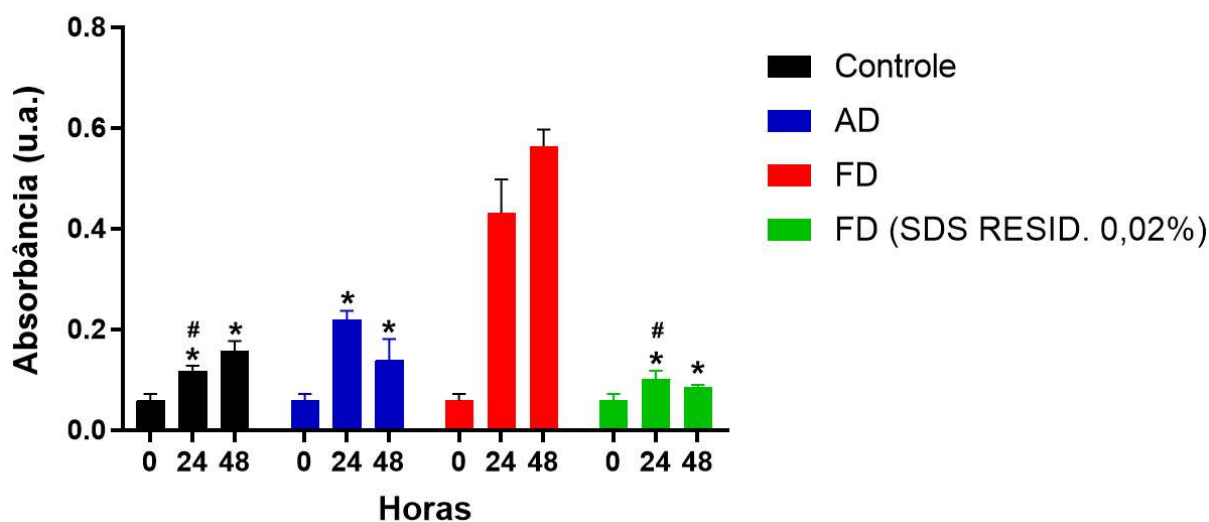


Figura 33 - Resultado da análise do teste de viabilidade celular média *in vitro* de amostras de biomaterial fetal e adulto descelularizados revestidas com hidrogel de ECM-fb liofilizado (n=3). Valores expressos em média ± EPM. (*p<0,05 FD vs Demais Grupos; #p<0,05 AD vs Demais Grupos; ANOVA de duas vias, *pos hoc* Tukey).

6.2.10.2 Teste de Citotoxicidade *In Vitro* (fibroblastos)

Os resultados do teste de citotoxicidade *in vitro* com linhagem de fibroblastos foram apresentados na Tabela 4: Para a presente análise são consideradas amostras em conformidade, aquelas que apresentam resultado de viabilidade celular superior a 70%.

A amostra avaliada do biomaterial fetal obteve resultado satisfatório, tendo obtido um valor médio de 95,9% ($\pm 5,8\%$) de viabilidade celular, portanto, sendo considerada não citotóxica, o que corrobora com os resultados anteriormente obtidos no Item 6.2.10.1, e reforçam a possível utilização do biomaterial fetal como um candidato para ensaio de implantação *in vivo*, desde que solucionada a inconformidade relacionada às endotoxinas.

Tabela 4 - Médias e desvio padrão dos valores de viabilidade celular de amostras de biomaterial fetal descelularizado revestido com hidrogel de ECM-fb liofilizado (FD, n=3)

Amostra	Viabilidade Celular (%)	Desvio Padrão	Resultado
Controle Negativo (Polietileno de Alta Densidade)	103,3	$\pm 5,3$	-
Controle Positivo (Látex)	10,1	$\pm 0,2$	-
Biomaterial Fetal (Amostra 5326-1/2023.0)	95,9	$\pm 5,8$	Não citotóxico

Nota: Os dados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão da média.

6.2.11 CARACTERIZAÇÃO COMPLEMENTAR

6.2.11.1 Titulação de pH

O padrão de titulação de pH de amostras estéreis de biomaterial fetal descelularizado revestido com hidrogel de ECM-fb liofilizado em diferentes veículos foi demonstrado na Figura 34. Conforme esperado, a faixa de tamponamento de pH de nosso biomaterial se manteve em padrões consideráveis fisiológicas entre 7,0-7,1, conforme padronização do protocolo de descelularização, demonstrando efetiva ação do tampão PBS na regulação de pH do arcabouço. Apesar de ter ocorrido o tamponamento esperado, observamos que o nosso biomaterial apresentou uma tendência de manutenção de pH próximo à região fisiológica de 7,0-7,1, com leve queda inicial de titulação durante o tempo de imersão.

Vale ressaltar que produtos similares de enxerto normalmente apresentam padrão de titulação de pH mais altos, próximos a 8,0. Este dado pode ter relação direta com o tipo de composição mineral e de processamento sofrido por esses biomateriais durante os tratamentos desproteinizantes com hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio (BI et al., 2013; GHANAATI et al, 2014.). Como não houve citotoxicidade detectada em nossa análise, acreditamos que o pH ligeiramente mais baixo de nossos biomateriais não comprometa a sua utilização. De todo modo, caso fosse necessário, reiteramos que um possível ajuste na escolha do tampão ou faixa de pH de trabalho das soluções de lavagem final no processo de descelularização provavelmente já poderão contribuir para a produção de biomateriais com pH mais altos (entre 7,2-7,6) para evitar a acidificação nos meios.

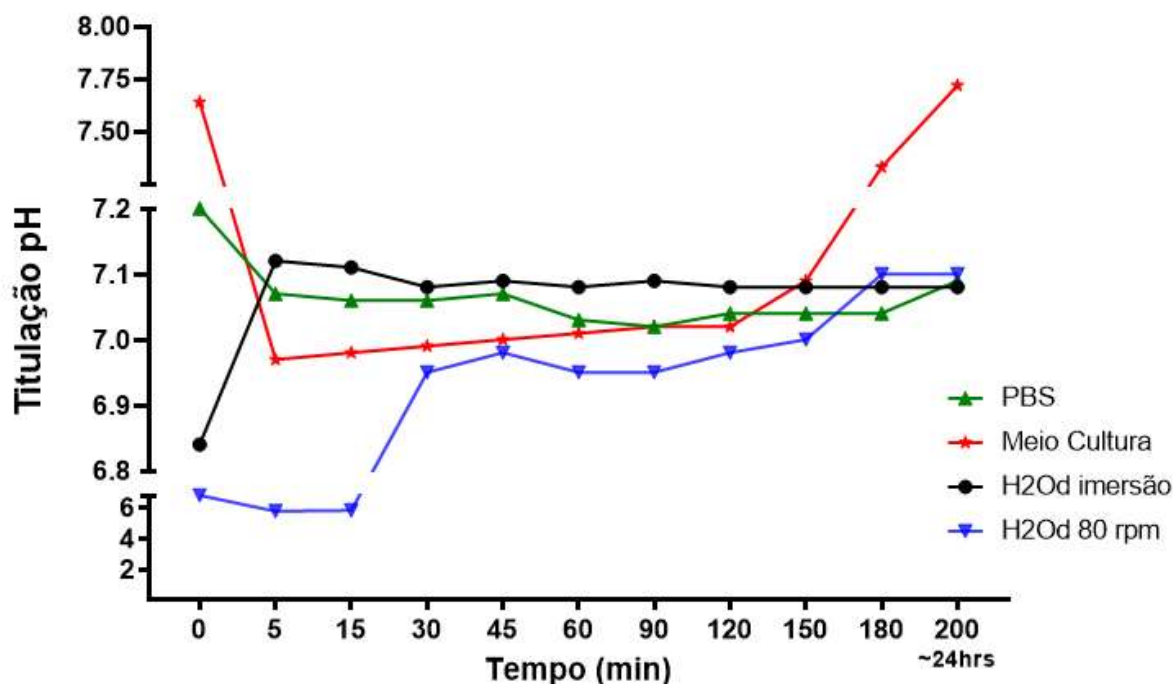


Figura 34. Gráfico do padrão da titulação de pH de amostras estéreis de biomaterial fetal descelularizado revestido com hidrogel de ECM-fb sob manutenção em diferentes veículos de diluição.

6.2.11.2 Metais Pesados

Os resultados da análise de metais pesados estão apresentados na Tabela 5, onde percebe-se que os resultados encontrados para concentração dos metais pesados arsênio, cádmio, chumbo e mercúrio estão dentro dos níveis de segurança estabelecidos na tabela de referência para produtos de uso oral e parenteral da Farmacopeia Brasileira - ANVISA (2019).

Para os metais cádmio, chumbo e mercúrio, vale ressaltar que os resultados obtidos em nosso trabalho foram inferiores ao limite de quantificação do teste, no entanto, encontram-se enquadrados dentro dos níveis de segurança estabelecidos pela literatura.

A titulação de arsênio ($0,97 \pm 0,11$) foi o único resultado que obtivemos acima do limite de quantificação do teste, apesar disso, ainda encontra-se enquadrado também dentro dos níveis de segurança recomendados.

Cabe pontuar aqui que os biomateriais de enxerto que utilizamos como controle nos ensaios anteriores, Bio-Oss Collagen®-Geistlich e Orthogen®-Baumer, devidamente registrados e amplamente comercializados, utilizam níveis de segurança bem inferiores para o controle de qualidade de impurezas como metais pesados. Consta na informação de bula desses produtos, níveis de garantia aceitáveis a partir de: As ≤ 3 ppm, Cd ≤ 5 ppm, Hg ≤ 3 ppm, e Pb ≤ 30 ppm. Com base nisso, podemos inferir que o biomaterial descelularizado fetal revestido com hidrogel de ECM-fb liofilizado apresenta resultados em conformidade com os limites de impurezas por metais pesados aceitáveis para fins de registro e comercialização que já são utilizados por outros produtos similares.

Tabela 5 - Média e desvio padrão (incerteza) da concentração de metais pesados nas amostras de osso bovino fetal descelularizado revestido com hidrogel de ECM-fb (n=3).

Análise Total de Elementos	Resultado (ppm - $\mu\text{g/g}$)	Desvio Padrão (Incerteza)	Limite Ref. (ppm - $\mu\text{g/g}$) *
Arsênio (As)	0,97	$\pm 0,11$	0,15 - 1,5
Cádmio (Cd)	< 0,1	-	0,05 - 0,5
Chumbo (Pb)	< 0,5	-	0,1 - 1,0
Mercúrio (Hg)	< 0,01	-	0,15 - 1,5

Nota: Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão da média (incerteza). (-) Índice não mensurável devido o valor do resultado ser inferior ao limite mínimo de detecção para a amostra. * Valores de referência estabelecidos para medicamentos de uso oral e parenteral pela Farmacopeia Brasileira - ANVISA, 6ª Ed. Vol. 1, 2019.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que os biomateriais adulto e fetal descelularizado revestidos com hidrogel de ECM-fb liofilizado preservam características estruturais similares às do tecido ósseo natural. Os biomateriais apresentaram valores residuais de DNA e SDS em quantidade aceitável para não promover rejeição ou citotoxicidade. Quanto à arquitetura e composição físico-química, mantiveram resultados condizentes com os padrões ósseos de densidade, suporte mecânico, porosidade, composição elementar e resistência térmica.

A preservação de importantes componentes orgânicos de matriz inseridos em um arcabouço estrutural poroso e resistente, capaz de estimular a orientação, adesão, diferenciação, migração e proliferação das células, sem promover rejeição ou citotoxicidade, resultam na produção de um modelo ideal de biomaterial para enxerto ósseo.

Os resultados descritos na presente pesquisa sugerem que os protocolos de descelularização propostos foram eficazes para produção de biomateriais descelularizados revestidos com hidrogel liofilizado a partir do osso bovino *in natura*. Concluimos que ambos os biomateriais, adulto e fetal, quando comparados a outros produtos comerciais de enxerto similares, apresentam resultados que demonstram desempenho similar ou melhor, demonstrando que podem ser explorados como soluções tecnológicas inovadoras para o suprimento da demanda mundial de enxertos ósseos com maior potencial de suporte mecânico e biológico.

8 REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT NBR 10422:2013. Etanol combustível: Determinação da concentração de sódio - método da fotometria de chama. Rio de Janeiro, 2013.

ADACHI, T. et al. In vivo regeneration of large bone defects by cross-linked porous hydrogel: a pilot study in mice combining micro tomography, histological analyses, raman spectroscopy and synchrotron infrared imaging. **Materials**, v. 13, n. 19, p. 4275, 2020.

ALOM, N. et al. Bone extracellular matrix hydrogel enhances osteogenic differentiation of C2C12 myoblasts and mouse primary calvarial cells. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 106, n. 2, p. 900-908, 2018.

ALSHAIKH, A. B. et al. Decellularization of the mouse ovary: Comparison of different scaffold generation protocols for future ovarian bioengineering. **Journal of Ovarian Research**, 12 (1), 58, 2019.

AMINI, A. R. et al. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. **Critical ReviewsTM in Biomedical Engineering**, v. 40, n. 5, p. 363–408, 2012.

AZEVEDO, A. D. D. et al. Análise Térmica de Materiais. São Paulo: Artliber, 2009.

BADYLAK, S. F. et al. Whole-organ tissue engineering: Decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 13, p 27–53, 2011.

BALDWIN, P. et al. Autograft, Allograft, and Bone Graft Substitutes: Clinical Evidence and Indications for Use in the Setting of Orthopaedic Trauma Surgery. **J Orthop**

Trauma, v. 33, n. 4, p. 203-213, 2019. doi: 10.1097/BOT.0000000000001420. PMID: 30633080.

BALSLEY, C.R., COTTER, A.T., WILLIAMS, L.A. et al. Effect of low dose and moderate dose gamma irradiation on the mechanical properties of bone and soft tissue allografts. **Cell Tissue Bank**, v. 9, p. 289–298, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10561-008-9069-0>

BARROS, R. J. S. **Desenvolvimento de biomaterial ósseo**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, 86 fl., 2018.

BATTAFARANO, G. et al. Strategies for Bone Regeneration: From Graft to Tissue Engineering. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, 2021. DOI:10.3390/ijms22031128

BENDERS, K. E. M. M. et al. Extracellular matrix scaffolds for cartilage and bone regeneration. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 169–176, 2013.

BERGHOLT, M. S.; SERIO, A.; ALBRO, M. B. Raman Spectroscopy: Guiding Light for the Extracellular Matrix. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, 2019. DOI:10.3389/fbioe.2019.00303

BHATTACHARJEE, P. et al. Silk scaffolds in bone tissue engineering: An overview. **Acta biomaterialia**, v. 63, p. 1-17, 2017.

BI, L. et al. Effects of sodium hydroxide, sodium hypochlorite, and gaseous hydrogen peroxide on the natural properties of cancellous bone. **Artificial Organs**, v. 37, n. 7, p. 629-636, 2013.

BUENO, T. L. N. et al. Avaliação do efeito de extratos vegetais na formação de ligações cruzadas em córneas de coelho por calorimetria exploratória diferencial. IX Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria, São Paulo, 2014.

CANEVAROLO, S. J. Técnicas de Caracterização de Polímeros. São Paulo: **Artliber**, São Paulo-SP, Brasil, 2003.

CASTIGLIA, M. T. et al. Effects of chemical processing and oxide ethylene sterilization on cortical and cancellous rat bone: a light and electron scanning microscopy study. **Rev. Bras. Ortop.**, v. 44, n. 6, p. 32-39, 2015. DOI: 10.1016/S2255-4971(15)30046-X. PMID: 26998450; PMCID: PMC4783594.

CASTRO-CESEÑA, A. B. et al. Kinetic characterization of the deproteinization of trabecular and cortical bovine femur bones. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 8, p. 4958–4964, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2013.08.022>>.

CEBOTARI, S. I. et al. Detergent Decellularization of Heart Valves for Tissue Engineering: Toxicological Effects of Residual Detergents on Human Endothelial Cells. **Artificial Organs**, v. 34, n. 3, p. 206–210, 2010.

CHARMAS, B. TG and DSC studies of bone tissue: Effects of osteoporosis. **Thermochimica Acta**, v. 573, p. 73-81, 2013. ISSN 0040-6031. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2013.08.032>.

CRAPO, P. M. et al. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. **Biomaterials**, 32(12), 3233–3243, 2011.

CRUZ, G. A. DA *et al.* Morphological and chemical analysis of bone substitutes by scanning electron microscopy and microanalysis by spectroscopy of dispersion energy. **Brazilian Dental Journal**, v. 18, n. 2, p. 129–133, 2007.

CHEN, P. et al. Minerals form a continuum phase in mature cancellous bone. **Calcif. Tissue Int.**, v. 88, p. 351-361, 2011.

CHENG, C. W. et al. Decellularized tissue and cell-derived extracellular matrices as scaffolds for orthopedic tissue engineering. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 2, p. 462–484, 2014. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.12.012

CODREA, C. I. et al. Advances in osteoporotic bone tissue engineering. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, p. 253, 2021. <https://doi.org/10.3390/jcm10020253>

CORADAZZI, L. F. Avaliação dos enxertos ósseos autógenos triturados manualmente ou coletados durante osteotomia. Análise histológica e histométrica em coelhos. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista - UNESP, 2003.

CRANE, N. J. et al. Raman spectroscopic analysis of combat-related heterotopic ossification development. **Bone**, v. 57, n. 2, p. 335–342, 2013. doi:10.1016/j.bone.2013.08.026

DA SILVA, D. R.; PEIXOTO, P. Análise crítica da segunda lei de Newton na forma $F_{res} = dp/dt$ com $p = mv$ e m variável. **Rev. Bras. Ensino Fís.** v. 38, n. 2, 2016. <https://doi.org/10.1590/1806-9126-RBEF-2015-0034>

DE ARAÚJO, J. C. R. et al. The Local Release of Teriparatide Incorporated in 45S5 Bioglass Promotes a Beneficial Effect on Osteogenic Cells and Bone Repair in Calvarial Defects in Ovariectomized Rats. **J. Funct. Biomater.** v. 14, n. 93, 2023.

DIN EN 15837:2010. Ethanol as a blending component for petrol - Determination of phosphorus, copper and sulfur content - Direct method by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). 2010.

DONG, S.-W. et al. Bone Regeneration Using an Acellular Extracellular Matrix and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Expressing Cbfa1. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 73, n. 10, p. 2226–2233, 2009. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1271/bbb.90329>>.

DOS ANJOS, L. M. et al. Enxertos ósseos em odontologia - uma revisão integrativa da literatura. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 12, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i12.20954. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/20954>. Acesso em: 5 ago. 2024.

EMAMI, A. et al. Comparative assessment of the efficiency of various decellularization agents for bone tissue engineering. **J Biomed Mater Res.** v. 109B, p. 19-32, 2021. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34677>

ELLINGHAM, S. T. D. et al. Thermogravimetric analysis of property changes and weight loss in incinerated bone. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 438, p. 239-244, 2015.

TEIXEIRA, P. C. et al. **Manual de Métodos de Análise de Solo**. Centro Nacional de Pesquisa de Solos, 3ª Ed. 2017. 3. ed. rev. e ampl., 574 p., Brasília-DF, Brasil, Embrapa, 2017. ISBN 978-85-7035-771-7

Farmacopeia Brasileira. 6ª Edição, Volume I. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília, 2019. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br>

FERNANDEZ-YAGUE, M. A. et al. Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physicommechanical strategies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 84, p. 1–29, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2014.09.005>>.

FONSECA, A. P. et al. Sistema de Saúde Pública Custos das internações hospitalares de idosos moradores de um município do oeste de Santa Catarina. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**. v. 11, n. 16, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i16.38456. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/38456>. Acesso em: 5 ago. 2024.

Fortune Business Insights. Bone Graft Substitutes Market Size, Share & Industry Analysis, By Type (Allograft, Demineralized Bone Matrix (DBM), Synthetic, and Xenograft), By Application (Spinal Fusion, Joint Reconstruction, Foot & Ankle, and Others), By End-user (Hospitals, Specialty Clinics, and Others), and Regional Forecast, 2024-2032. Relatório: FBI103106, de 22 de julho de 2024. Disponível em <https://www.fortunebusinessinsights.com/bone-graft-substitutes-market-103106> . Acesso em 05 de agosto de 2024.

FORTE, Y. S. O efeito de mediadores químicos e vesículas extracelulares secretados pelo tecido adiposo de pacientes obesos sobre a função e diferenciação de osteoblastos humanos. 2022. 141 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

FU, Yuehe et al. Decellularization of porcine skeletal muscle extracellular matrix for the formulation of a matrix hydrogel: a preliminary study. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 20, n. 4, p. 740-749, 2016.

GALIA, C. R. Enxertos ósseos liofilizados impactados humano e bovino em revisão de artroplastia total de quadril. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 35, n. 4, p. 1–126, 2004.

GALIA, C. R. et al. Osteointegração de enxertos liofilizados impactados. **Acta Ortop. Bras.**, v. 17, n. 2, p. 24-28, 2008.

GALIA, C. R. et al. In vitro and in vivo evaluation of lyophilized bovine bone biocompatibility. **Clinics**, v. 63, n. 6, p. 801–806, 2008. doi:10.1590/s1807-59322008000600016

GALIA, C. R. et al. Caracterização físico-química do enxerto de osso bovino liofilizado. **Rev. Bras. Ortop.**, v. 46, n. 4, p. 444-451, 2011.

GAO, C. et al. Bone biomaterials and interactions with stem cells. *Bone Research*, v. 5, n. 17059, 2017. <https://doi.org/10.1038/boneres.2017.59>

GHANAATI, S. et al. Induction of multinucleated giant cells in response to small sized bovine bone substitute (Bio-Oss TM) results in an enhanced early implantation bed vascularization. **Annals of Maxillofacial Surgery**, v. 4, n. 2, p. 150, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25593863>>.

GILBERT, T. W. et al. Decellularization of tissues and organs. **Biomaterials**, v. 27, p. 3675-3683, 2006.

GHORBANI, F. et al. Detection of the residual concentration of sodium dodecyl sulfate in the decellularized whole rabbit kidney extracellular matrix. **Cell Tissue Bank**. v. 23, n. 1, p. 119-128, 2022. DOI:10.1007/s10561-021-09921-z

GILPIN, A.; YANG, Y. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. **Biomed Res Int**, 2017. DOI:10.1155/2017/9831534

GOISSIS, A. P. A. Análise estrutural do colágeno do tipo I - correlação estrutura: atividade biológica. 2007. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) - Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007. doi:10.11606/D.82.2007.tde-13022008-115745. Acesso em: 2024-08-25.

GRATZER, P. F. et al. Matrix alteration and not residual sodium dodecyl sulfate cytotoxicity affects the cellular repopulation of a decellularized matrix. **Tissue engineering**, v. 12, n. 10, p. 2975-2983, 2006.

GRUSKIN, E. et al. Demineralized bone matrix in bone repair: History and use. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 12, p. 1063–1077, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X12002062>>.

GUTIERRES, M. et al. Substitutos Ósseos: Conceitos gerais e estado actual. **Arquivos de Medicina**, v. 19, n. 4, p. 153–162, 2006.

HANOTTE, O. et al. Multilocus DNA fingerprints in gallinaceous birds: general approach and problems. **Heredity**, v. 68, n. 6, p. 481-494, 1992.

HOLZAPFEL, B. M. et al. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 4, p. 581-603, 2013. ISSN 0169-409X, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.07.009>.

HOTALING, N. A. et al. DiameterJ: A validated open source nanofiber diameter measurement tool. **Biomaterials**, v. 61, p. 327-338, 2015. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.05.015

HUNG, B. P. et al. Three-Dimensional Printing of Bone Extracellular Matrix for Craniofacial Regeneration. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 2, n. 10, p. 1806-1816, 2016. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.6b00101

HUTMACHER, D. W. Regenerative medicine will impact, but not replace, the medical device industry. **Expert Review of Medical Devices**, v. 3, n. 4, p. 409–412, 9 jul. 2006. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/17434440.3.4.409>>.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Estimativas da população 2020. Rio de Janeiro: IBGE. 2020.

ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices - Part. 5: Tests for in vitro cytotoxicity. International Standard Organisation, 2009.

ISO 10993-12. Biological evaluation of medical devices - Part. 12: Sample preparation and reference materials. International Standard Organisation, 2012.

ISO 11137-2a, Sterilisation of health care products – radiation – part 2: establishing the sterilisation dose. International Standard Organisation, Geneva. Ed. 2006.

JONES, D. B. Factors for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of proteins. **US Department of Agriculture**, 1931.

KAJANTIE, E. et al. Markers of Type I and Type III Collagen Turnover, Insulin-Like Growth Factors, and Their Binding Proteins in Cord Plasma of Small Premature Infants: Relationships with Fetal Growth, Gestational Age, Preeclampsia, and Antenatal Glucocorticoid Treatment. **Pediatr Res**, v. 49, p. 481-489, 2001. <https://doi.org/10.1203/00006450-200104000-00008>

KARAGEORGIOU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomaterials**, v. 26, n. 24, p. 5474-5491, 2005.

KARGAR-ABARGHOUEI, E. et al. Characterization, recellularization, and transplantation of rat decellularized testis scaffold with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 9, n. 1, p. 324, 2018.

KEANE, T. J. et al. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. **Methods**, v. 84, p. 25-34, 2015.

LEAL RABELLO, T. Desenvolvimento de hidrogel derivado de matriz extracelular óssea bovina adulta e fetal. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Federal do Espírito Santo, 64 fl., 2023.

LEE, J. H. et al. Combined effects of porous hydroxyapatite and demineralized bone matrix on bone induction: In vitro and in vivo study using a nude rat model. **Biomedical Materials**, v. 6, n. 1, 2011.

LEI, P. et al. A new method for xenogeneic bone graft deproteinization: Comparative study of radius defects in a rabbit model. **PLoS One**, v. 10, n. 12, p. 1–17, 31 dez. 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146005>

Li, D. et al. Progress in Montmorillonite Functionalized Artificial Bone Scaffolds: Intercalation and Interlocking, Nanoenhancement, and Controlled Drug Release. **Journal of Nanomaterials**. p. 1-20, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/7900382>

LISBOA, A. P. et al. Fatores epidemiológicos e custos de hospitalização de idosos com fratura proximal de fêmur em Belém-PA. **Revista Brasileira de Desenvolvimento**, v. 2, 2021. DOI: 10.34117/bjdv7n2-622. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/25392>.

LOURENÇO, S. O. et al. Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for 19 tropical seaweeds. **Phycological Research**, v. 50, n. 3, p. 233-241, 2002.

LU, Y. et al. Investigation of the Microstructure and Bio-Corrosion Behaviour of Mg-Zn and Mg-Zn-Ca Alloys. **Materials Science Forum**, v. 765, p. 788–792, 2013.

MANSOUR, A. et al. Extracellular Matrices for Bone Regeneration: A Literature Review. **Tissue Engineering Part A**, v. 23, n. 23–24, p. 1436–1451, 2017. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.tea.2017.0026>>.

MANZINI, B. et al. Advances in Bone tissue engineering: A fundamental review. **Journal of Biosciences**, v. 46, 2021. DOI: 10.1007/s12038-020-00122-6.

MILES, C. A.; Avery, N.C. Thermal stabilization of collagen in skin and decalcified bone. **Phys. Biol.** V. 8, 2011. DOI:10.1088/1478-3975/8/2/026002

Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica - DBCA. Brasil, 2022. Disponível em:

<https://www.gov.br/mcti/pt-br/composicao/conselhos/concea/arquivos/arquivo/legislacao/resolucao-normativa-no-55-de-5-de-outubro-de-2022.pdf>

MIYAUCHI, Y. et al. Healing Patterns of Non-Collagenated Bovine and Collagenated Porcine Xenografts Used for Sinus Floor Elevation: A Histological Study in Rabbits. **J.Funct. Biomater.**, v. 13, p. 276, 2022. <https://doi.org/10.3390/jfb13040276>

MIZOBE, H. et al. Structures and Binary Mixing Characteristics of Enantiomers of 1-Oleoyl-2,3-dipalmitoyl-sn-glycerol (S-OPP) and 1,2-Dipalmitoyl-3-oleoyl-sn-glycerol (R-PPO). **J Am Oil Chem Soc**, v. 90, p. 1809–1817, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11746-013-2339-4>

MONTEIRO, E. et al. Caracterização de Polímeros: Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica. Rio de Janeiro: E-papers, 2001.

MOORE, S. T. et al. Osteoconductivity and Osteoinductivity of Puros® of DBM Putty. **Journal Of Biomaterials Applications**, v. 26, p. 151–171, 2011. Disponível em: <<http://jba.sagepub.com>>.

MORRIS, M. D.; MANDAIR, G. S. Raman assessment of bone quality. **Clin Orthop Relat Res**. v. 469, n. 8, p. 2160-2169, 2011. doi: 10.1007/s11999-010-1692-y. PMID: 21116756; PMCID: PMC3126952.

MULINARI-SANTOS, G. et al. Estrogen Deficiency Impairs Osseointegration in Hypertensive Rats Even Treated with Alendronate Coated on the Implant Surface. **Journal of Functional Biomaterials**. v. 14, n. 9, p. 471, 2023. <https://doi.org/10.3390/jfb14090471>

NAKANO, K. et al. High bone turnover of type I collagen depends on fetal growth. **Bone**. v. 38, n. 2, p. 249-256, 2006. DOI:10.1016/j.bone.2005.07.017

NAKAYAMA K.H. et al. Decellularized Rhesus Monkey Kidney as a Three-Dimensional Scaffold for Renal. **Tissue Engineering Parte A**, v. 16, n. 7, p. 2207–2216, 2010. DOI:10.1089/ten.tea.2009.0602

NEFJODOVS, V. et al. Wood as Possible Renewable Material for Bone Implants - Literature Review. **J. Funct. Biomater.** v. 14, p. 266, 2023. <https://doi.org/10.3390/jfb14050266>

NGUYEN, H. et al. Validation of 15 kGy as a radiation sterilization dose for bone allografts manufactured at the Queensland Bone Bank: application of the VDmax 15 method. **Cell Tissue Banking**, v. 9, p. 139–147, 2008. <https://doi.org/10.1007/s10561-008-9064-5>

NICK R. et al. The effect of sterilization on the dynamic mechanical properties of paired rabbit cortical bone. **Journal of Biomechanics**, v. 46, n. 10, p. 1670-1675, 2013. ISSN 0021-9290, <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2013.04.006>.

OREGON STATE EDUCATION - ANATOMY AND PHYSIOLOGY. Capítulo 6, módulo 6.4. A formação e desenvolvimento ósseo. Disponível em: <https://open.oregonstate.edu/aandp/chapter/6-4-bone-formation-and-development/>

OREGON STATE EDUCATION - ANATOMY AND PHYSIOLOGY. Capítulo 6, módulo 6.5. Fraturas: Reparo ósseo. Disponível em: <https://open.oregonstate.edu/aandp/chapter/6-5-fractures-bone-repair/>

PAPADIMITROPOULOS, A. et al. Engineered decellularized matrices to instruct bone regeneration processes. **Bone**, v. 70, p. 66–72, jan. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2014.09.007>.

PINTÉR, C. et al. DSC analysis of human fat tissue in alcohol-induced avascular necrosis of the femoral head. **J Therm Anal Calorim**, v. 95, p. 787–792, 2009. <https://doi.org/10.1007/s10973-008-9477-1>

PERDIKOURI, C. et al. Characterizing the Composition of Bone Formed During Fracture Healing Using Scanning Electron Microscopy Techniques. **Calcified Tissue International**, v. 96, n. 1, p. 11–17, 2015. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00223-014-9930-z>.

PETTINICCHIO, M. et al. Histologic and histomorphometric results of three bone graft substitutes after sinus augmentation in humans. **Clinical Oral Investigations**, v. 16, n. 1, p. 45–53, 2012.

RIBEIRO, M. V. Uso de carvão de osso bovino na defluoretação de água para uso em abastecimento público. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Minas), Faculdade de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, 75 fl, 2011.

RODRÍGUEZ-MERCHÁN, E. C. A Review of Recent Developments in the Molecular Mechanisms of Bone Healing. **Int J Mol Sci.**, v. 22, n. 2, p. 767, 2021. DOI:10.3390/ijms22020767. PMID: 33466612; PMCID: PMC7828700.

SABETKISH, S. et al. Whole-organ tissue engineering: Decellularization and recellularization of three- dimensional matrix liver scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research**, Part A, v. 103, n. 4, p. 1498–1508, 2015.

SAMPAIO, J. A.; SILVA, F. A. N. G. Tratamento de minérios: Práticas Laboratoriais - Determinação das densidades de sólidos e de polpa. 5 ed. Centro de Tecnologia Mineral - CETEM, Ministério da Ciência e Tecnologia - MCT. Rio de Janeiro-RJ, Brasil, 2010.

SANADA, J. T. Avaliação da resistência e módulo de elasticidade de osso mineralizado e desmineralizado pelos testes de microtração. Dissertação (Mestrado em Odontologia), Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo, 112 fl., 2007.

SANDHYA, S. et al. Preclinical safety and efficacy evaluation of 'BioCaS' bioactive calcium sulfate bone cement. **Biomed Mater.**, v. 12, n. 1, 2017. DOI:10.1088/1748-605X/aa5522

SARAFRAZI, N. et al. Osteoporosis or Low Bone Mass in Older Adults: United States, 2017-2018. National Center for Health Statistics, Hyattsville, MD: **NCHS Data**

Brief, n. 405, p. 1-8, 2021. DOI: <https://dx.doi.org/10.15620/cdc:103477> ícone externo.

SARAH BECK-CORMIER, C. C. Mouse bone samples grinding with FastPrep-24™ homogenizer and Lysing Matrix tubes. Disponível em: <https://www.mpbio.com/fastprep_technical_bones.php>. Acesso em: 17 fev. 2018.

SAWKINS, Michael J. et al. Hydrogels derived from demineralized and decellularized bone extracellular matrix. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 8, p. 7865-7873, 2013.

SCUDIERO, D. A. de et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines.. Pesquisa Veterinária Brasileira. **Cancer Research**, v. 48, n. 17, p. 4827-4833, 1988.

Sheen JR, Mabrouk A, Garla VV. Fracture Healing Overview. 2023 Apr 8. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan–. PMID: 31869142.

SHIHJYE, T. et al. The synergetic effect of hydrogel stiffness and growth factor on osteogenic differentiation. **Biomaterials**, v. 35, n. 20, p. 5294-5306, 2014. ISSN 0142-9612, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.02.040>.

SHRIVATS, A. R. et al. Bone tissue engineering: state of the union. **Drug Discov Today**. v. 19, n. 6, p. 781-786, 2014. DOI: 10.1016/j.drudis.2014.04.010. PMID: 24768619.

ŠROMOVÁ, V. et al. A Brief Review of Bone Cell Function and Importance. **Cells**. v. 12, n.21, p. 2576, 2023. DOI:10.3390/cells12212576. PMID: 37947654; PMCID: PMC10648520.

STEIJVERS, E.; et al. Manufacturing artificial bone allografts: a perspective. **Biomater Transl.**, v. 3, n. 1, p. 65-80, 2022. <http://doi.org/10.12336/biomatertransl.2022.01.007>

STUART, B. H. Infrared Spectroscopy of Biological Applications: An overview. In R. A. Meyers (Ed.). *Encyclopedia of analytical chemistry* Chichester: John Wiley & Sons. 2006. <http://dx.doi.org/10.1002/9780470027318.a0208>

TABRIZIAN, P. et al. Biomimetic Nacre-like Hydroxyapatite/Polymer Composites for Bone Implants. **J. Funct. Biomater.** v. 14, n. 393, 2023. <https://doi.org/10.3390/jfb14080393>

TALARI, A. C. S. et al. Raman Spectroscopy of Biological Tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 50, n. 1, p. 46-111, 2014. doi:10.1080/05704928.2014.923902

The United States. Pharmacopeia: USP 43; The National Formulary: NF 38; United States Pharmacopeial Convention: Rockville, MD, USA, 2020.

UNAL, M. et al. The Role of Matrix Composition in the Mechanical Behavior of Bone. **Curr Osteoporos Rep.** v. 16, n. 3, p. 205-215, 2018. DOI: 10.1007/s11914-018-0433-0. PMID: 29611037; PMCID: PMC5948175.

WALTHER, A. R. et al. In vivo non-invasive monitoring of tissue development in 3D printed subcutaneous bone scaffolds using fibre-optic Raman spectroscopy. **Biomaterials and Biosystems**, v. 7, n. 100059, 2022. ISSN 2666-5344. <https://doi.org/10.1016/j.bbiosy.2022.100059>.

WANG, S. et al. Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO₂. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 8, p. 2147-2151, 2011. ISSN 0887-2333, <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.07.007>.

WANG, Y. et al. Method for perfusion decellularization of porcine whole liver and kidney for use as a scaffold for clinical-scale bioengineering engrafts. **Xenotransplantation**, v. 22, n. 1, p. 48–61, 2015.

Xing, Q. et al. Decellularization of fibroblast cell sheets for natural extracellular matrix scaffold preparation. **Tissue Engineering, Part C: Methods**, 21(1), 77–87, 2014.

ZHANG, X. et al. Osteoconductive effectiveness of bone graft derived from antler cancellous bone: An experimental study in the rabbit mandible defect model. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 41, n. 11, p. 1330–1337, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijom.2012.05.014>>.

Zhao R, Yang R, Cooper PR, Khurshid Z, Shavandi A, Ratnayake J. Bone Grafts and Substitutes in Dentistry: A Review of Current Trends and Developments. *Molecules*. 2021 May 18;26(10):3007. doi: 10.3390/molecules26103007. PMID: 34070157; PMCID: PMC8158510.

ZUK, P. et al. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. **Tissue engineering**, v. 7, n. 2, p. 211–228, 2001.

ZVAROVA, B. et al. Residual Detergent Detection Method for Nondestructive Cytocompatibility Evaluation of Decellularized Whole Lung Scaffolds. **Tissue Engineering. Part C, Methods**, v. 22, n. 5, p. 418–28, 2016.

9 MATERIAL SUPLEMENTAR

A - LISTA DE REAGENTES

Tabela S1 - Lista de reagentes utilizados na pesquisa.

Reagente	Fórmula Química	Pureza (%)	Fabricante
Ácido Clorídrico	HCl	> 35	Neon
Tris Base, Tris Hidroximetil Aminometano	C ₄ H ₁₁ NO ₃	≥ 99,8	Sigma-Aldrich
Edetato Dissódico (EDTA) Ou EDTA Dissódico; Sal Dissódico Di-Hidratado Do Ácido(Etilenodinitrila) Acético	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ .2H ₂ O	≥ 97	Dinâmica
Dodecil Sulfato De Sódio (SDS) Ou Laurilsulfato De Sódio	C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S	≥ 85	Sigma-Aldrich
Álcool Metílico (Metanol)	CH ₄ O	> 99	Neon
Álcool Etílico (Etanol)	C ₂ H ₆ O	96	Neon
Álcool Etílico Absoluto (Álcool Anidro)	C ₂ H ₆ O	> 99,5	Neon
Clorofórmio (Triclorometano)	CHCl ₃	99,9	Neon
Fosfato de Potássio Monobásico (Bifosfato de potássio, di-hidrogenofosfato de potássio, fosfato ácido de potássio, fosfato monopotássico, fosfato potássico de Sorensen)	KH ₂ PO ₄	98	Neon
Fosfato de sódio dibásico di-hidratado	Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	> 99,5	Êxodo Científica
Fosfato De Sódio Dibásico (Fosfato Dissódico)	HNa ₂ O ₄ P	≥ 98,5	Vetec
Peróxido de	H ₂ O ₂	≥ 35	Neon

hidrogênio concentrado (Peridrol)		(130 partes por volume)	
Hidróxido De Sódio (Soda Cáustica)	NaOH	≥ 95	Neon
Proteinase K (Endopeptidase K, Proteinase K de Tritirachium album)	C ₂₉ H ₂₇ N ₂ O ₁₂ P	≥ 99,9	Sigma-Aldrich

B - CURVA PADRÃO DO ENSAIO DE QUANTIFICAÇÃO DE SDS RESIDUAL

A curva padrão utilizada para análise dos resultados de quantificação de SDS residual foi estabelecida a partir da leitura seriada de solução SDS com concentrações entre 0,0025% e 0,16% ($R=0,9947$), de acordo com a metodologia descrita por ZVAROVA *et al.* (2016) (Figura Suplementar S1).

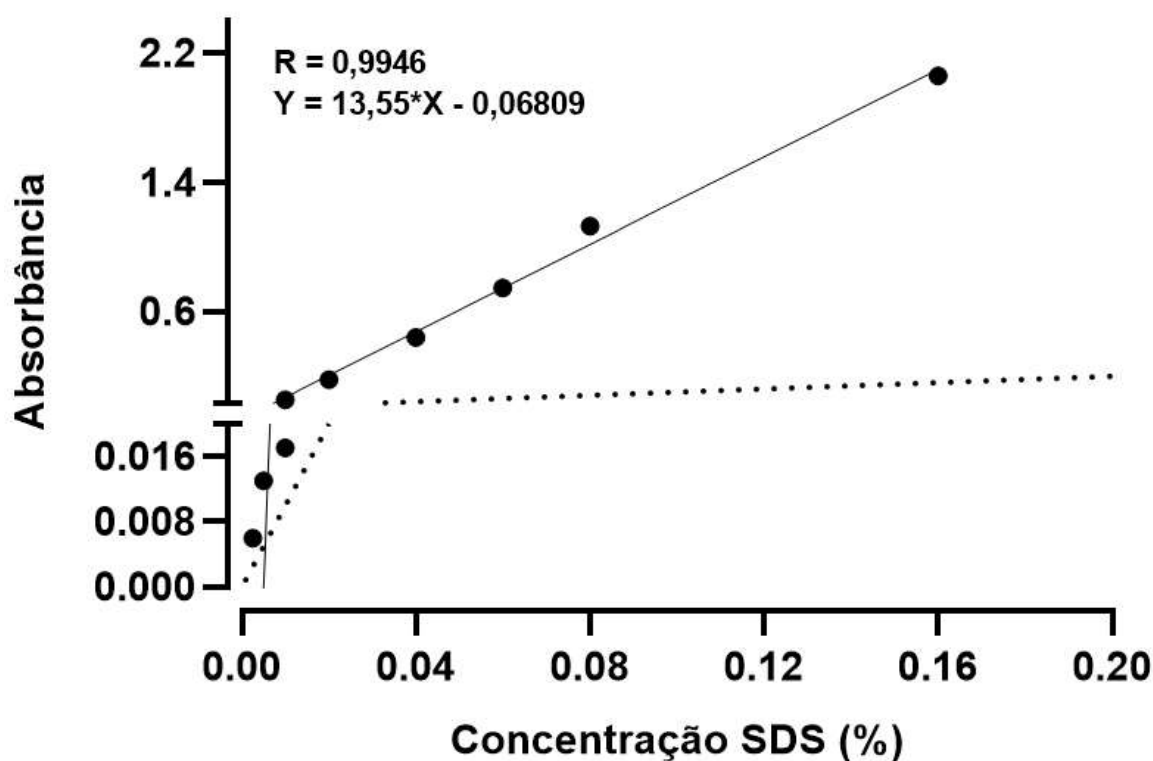


Figura S1 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de super resolução de fibras colágenas que formam a cobertura do hidrogel sobre o biomaterial ósseo fetal descelularizado. MEV-FEG, Equipamento Apreo 2 - ThermoFischer, magnificação 10.000 x e 20.000 x.

C - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE SUPER RESOLUÇÃO (MEV-FEG)

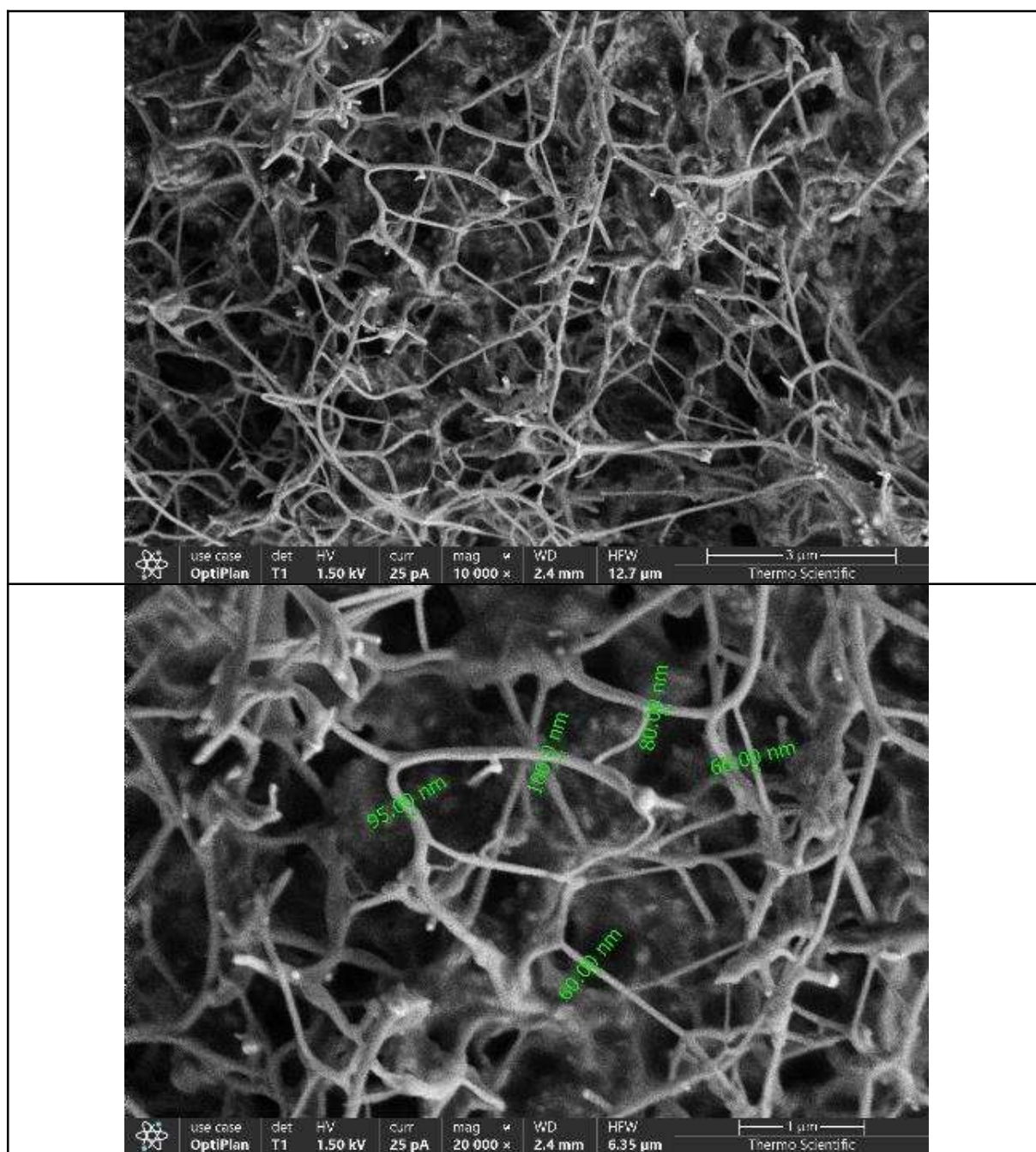


Figura S2 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de super resolução de fibras colágenas que formam a cobertura do hidrogel sobre o biomaterial ósseo fetal descélularizado. MEV-FEG, Equipamento Apreo 2 - ThermoFischer, magnificação 10.000 x e 20.000 x.

D - LISTA DE PEDIDOS E DEPÓSITOS DE PATENTE

- **Brasil**

Número de Registro: BR1020180037269 - 26/02/2018

Carta patente concedida - 11/04/2023.

- **Israel**

Número de Registro: 276956 - 26/02/2019

- **Suiça - WIPO**

Número de Registro: WO 2019/161465 A1 - 29/08/2019

- **México**

Número de Registro: MX/A/2020/008912 - 26/08/2020

- **Estados Unidos**

Número de Registro: US2020405912A1 - 26/08/2020

- **União Européia**

Número de Registro: EP 19756598.9 - 25/09/2020

- **Coréia do Sul**

Número de Registro: KR 10-2020-7028016 - 28/09/2020

- **China**

Número de Registro: CN112203702A - 26/10/2020

- **Japão**

Número de Registro: 2020-568008 JP - 15/12/2020

- **Hong Kong**

Número de Registro: 62021034619.8 - 08/01/2021

- **Canadá**

Número de Registro: K.13.003.PI-CA - 14/01/2021

E - ANÁLISE DE MERCADO NACIONAL (PESQUISA PILOTO)

De acordo com a pesquisa de mercado encomendada pela empresa Startup BIOBONE, BIOENGENHARIA TECIDUAL EM ENXERTOS OSSEOS LTDA, CNPJ: 37.727.835/0001-58, no Brasil em 2019, estimou-se a utilização de cerca de 901,843 mil gramas (g) de biomateriais de preenchimento em procedimentos de enxertos ósseos. No cenário dos produtos avaliados desta pesquisa, foi encontrado um preço médio de R\$ 353,61 por grama (g) de produto comercializado, o que resultou em um mercado nacional ativo avaliado em torno de 318 milhões de reais por ano, com previsão de crescimento de aproximadamente 14% até o ano de 2030. Neste mesmo cenário, projetou-se uma participação de mercado (market share) de cerca de 5% para operação inicial da Startup Biobone, que teria como principal estratégia a produção e comercialização de biomateriais de preenchimento com valores mais acessíveis, tendo em vista o baixo custo médio de produção projetado para os produtos da empresa (cerca de R\$ 4,56 por grama de produto produzido/comercializado), o que inicialmente, garantiria ainda uma boa margem operacional financeira para custeio e desenvolvimento de um projeto com plano de negócio focado na comercialização de enxertos para o mercado brasileiro.



Figura S3 – Identificação visual da marca da empresa Biobone, Bioengenharia Tecidual Em Enxertos Osseos LTDA, CNPJ: 37.727.835/0001-58.



Figura S4 – Pesquisa do Mercado Nacional (Brasil) de enxertos ósseos em 2019. Fonte: IQVIA™ Confidential - Market Sizing Kheiros (2019). Dados provenientes de pesquisa primária (n = 22 especialistas da área).

F - LISTA DE PUBLICAÇÕES

- Produção de biomaterial ósseo garante à Ufes sua 14ª patente. Site Oficial da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES. Publicado em 26/04/2023.

Disponível em: <https://www.ufes.br/conteudo/producao-de-biomaterial-osseo-garante-ufes-sua-14a-patente>

- Produção de biomaterial ósseo garante mais uma patente à UFES. Site tech4health t4h. Publicado em 01/05/2023.

Disponível em: <https://www.t4h.com.br/noticias/producao-de-biomaterial-osseo-garante-mais-uma-patente-a-ufes/>

- Produção de biomaterial ósseo garante à Ufes sua 14ª patente. Revista Universidade - Blog Ufes Oficial - Publicado em 01/05/2023.

Disponível em:

<https://blog.ufes.br/revistauniversidade/2023/05/02/producao-de-biomaterial-osseo-garante-a-ufes-sua-14a-patente/>

- Nova patente conquistada pela Ufes. Canal Youtube Record News ES. Publicado em 15/05/2023.

Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=qFMYcuyo22U>

- Ufes apresenta projetos de inovação este fim de semana, no ESX 2023. Publicado em 01/06/2023.

Disponível em: <https://www.ufes.br/conteudo/ufes-apresenta-projetos-de-inovacao-este-fim-de-semana-no-esx-2023>

- Invenções para facilitar a rotina em feira na Praça do Papa. Site Tribuna online. Publicado em 03/06/2023.

Disponível em: <https://tribunaonline.com.br/cidades/invencoes-para-facilitar-a-rotina-em-feira-na-praca-do-papa-141646?home=esp%C3%ADrito+santo>

- Biomaterial ósseo da Ufes vai baratear enxertos em procedimentos ortopédicos e odontológicos. Canal Youtube UFES Oficial. Publicado em 16/06/2023.

Disponível em: https://www.youtube.com/watch?v=ZyFfcpt_x7I

- Como invenção da Ufes pode ajudar pacientes que precisam de prótese. Site A Gazeta - Publicado em 01/07/2023.

Disponível em:

<https://www.agazeta.com.br/es/cotidiano/como-invencao-da-ufes-pode-ajudar-pacientes-que-precisam-de-protese-0723>

- Pesquisadores da Ufes criam enxerto para humanos a partir de ossos de boi. Site Globoplay – Bom Dia ES. Publicado em 14/07/2023.

Disponível em: <https://globoplay.globo.com/v/11780928/?s=0s>

- Pesquisadores da Ufes criam enxerto para ossos humanos a partir de ossos de boi. Site Globoplay – ESTV 2ª Edição. Publicado em 14/07/2023.

Disponível em: <https://globoplay.globo.com/v/11781562/>

- Pesquisadores da Ufes criam enxerto para humanos a partir de ossos de boi. Site A Gazeta News. Publicado em 15/07/2023.

Disponível em:

<https://agazetanews.com.br/noticia/saude/196835/pesquisadores-da-ufes-criam-enxerto-para-humanos-a-partir-de-ossos-de-boi>

- Pesquisadores da Ufes criam enxerto para humanos a partir de ossos de boi. Site G1 Espírito Santo TV Gazeta. Publicado em 15/07/2023.

Disponível em:

<https://g1.globo.com/es/espírito-santo/noticia/2023/07/15/pesquisadores-da-ufes-criam-enxerto-para-humanos-a-partir-de-ossos-de-boi.ghtml>

- Pesquisadores usam ossos de boi para criar enxerto para humanos; entenda inovação. Site Olhar Digital - Publicado em 15/07/2023.

Disponível em:

<https://olhardigital.com.br/2023/07/15/medicina-e-saude/pesquisadores-usam-ossos-de-boi-para-criar-enxerto-para-humanos-entenda-inovacao/>

- Pesquisadores brasileiros usam ossos de boi para criar enxerto para humanos. Site Oficial e Canal de transmissão ao Vivo CNN Brasil (577) - Publicado em 17/07/2023 e 18/07/2023.

Disponível em:

<https://www.cnnbrasil.com.br/nacional/pesquisadores-brasileiros-usam-ossos-de-boi-para-criar-enxerto-para-humanos/>

- Pesquisadores da Ufes criam enxerto para humanos a partir de ossos de boi. Site NewsLab - Publicado em 17/07/2023.

Disponível em: <https://newslab.com.br/pesquisadores-da-ufes-criam-enxerto-para-humanos-a-partir-de-ossos-de-boi/>

- Pesquisadores da Ufes criam enxerto para humanos a partir de ossos de bois. Site Prontmed - Publicado em 21/07/2023.

Disponível em: <https://www.prontmed.com/dose-certa/pesquisadores-da-ufes-criam-enxerto-para-humanos-a-partir-de-ossos-de-bois/>

- Hidrogel feito em pesquisa acelera a cicatrização de enxerto ósseo. Site Oficial da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES. Publicado em 16/08/2023.

Disponível em: <https://www.ufes.br/conteudo/hidrogel-feito-em-pesquisa-acelera-cicatrizacao-de-enxerto-osseo>

G - LISTA DE PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

- III Congresso Digital de Nanobiotecnologia e Bioengenharia. Evento *on line* Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Brasil. Data: 07 a 10 de junho de 2022.
- Semana do Conhecimento - Jornada Capixaba de Ciência e Inovação. Local: Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, Vitória=ES. Data: 21 a 26 de novembro de 2022.
- ESX 2023 - Espírito Santo Innovation Experience. Local: Praça do Papa, Vitória-ES. Data: 02 a 04 de junho de 2023.
- CONEXÃO CIÊNCIAES - Semana Estadual de Ciências Tecnologia e Inovação. Shopping Boulevard, Vila Velha-ES. 30 de outubro a 01 de novembro de 2023.
- 5ª Conferência Estadual de Inovação e Tecnologia e 2ª edição da InovaES – Feira para o Movimento de Cidades Inteligentes e Inovadoras. Local: Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, Vitória=ES. Data: 26 a 27 de março de 2024.
- ESX 2024 - Espírito Santo Innovation Experience. Local: Praça do Papa, Vitória-ES. Data: 14 a 16 de junho de 2024.