



Revista de Avanços em Medicina e Pesquisa Médica

Volume 37, Edição 1, Página 23-40, 2025; Artigo nº. JAMMR.128918

ISSN: 2456-8899, NLM ID: 101711724

(Nome anterior: British Journal of Medicine and Medical Research, ISSN anterior: 2231-0614, ID NLM: 101570965)

Carvão ativado como substituto ósseo: Melhorando a mecânica e Propriedades morfológicas em um Modelo de defeito da tíbia do rato

**Matheus Lopes Publicação,^a Gisele Aparecida Amaral-Labat ^b,
Patrícia Almeida Mattos ^{a,c}, Ayres Fernando Rodrigues ^a,
Marília Lucas Siena Del Bel ^a, Damião de Carvalho Pereira ^a,
Dominique Cavalcanti Mello ^a, Vanessa de Souza ^a,
Guilherme Frederico Lenz e Silva ^c, Vanessa Fierro ^d,
Alain Celzard ^{d,e} e Rodrigo Labat Marcos ^{a*}**

Pós- Graduação em Medicina – Biofotônica, Universidade Nove de Julho, 01525-000, São Paulo, Brasil.

b Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais – INPE, 12227-010, São José dos Campos, SP, Brasil.

*c Universidade de São Paulo, Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais PMT-USP,
05508-030, São Paulo, SP, Brasil.*

d Université de Lorraine, CNRS, F-88000 Epinal, França.

e Institut Universitaire de France (IUF), F-75231 Paris, França.

Contribuições dos autores

Este trabalho foi realizado em colaboração entre todos os autores. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

Informações do artigo

Português DOI: <https://doi.org/10.9734/jammr/2025/v37i15693>

Histórico de revisão por pares aberto:

Este periódico segue a política Advanced Open Peer Review. Identidade dos Revisores, Editor(es) e Revisores adicionais, comentários de revisão por pares, diferentes versões do manuscrito, comentários dos editores, etc. estão disponíveis aqui:

<https://www.sdiarticle5.com/review-history/128918>

Artigo de pesquisa original

Recebido: 28/10/2024

Aceito: 30/12/2024

Publicado: 01/08/2025

*Autor correspondente: E-mail: labatrm@gmail.com;

Citar como: Publio, Matheus Lopes, Gisele Aparecida Amaral-Labat, Patrícia Almeida Mattos, Ayres Fernando Rodrigues, Marília Lucas Siena Del Bel, Damião de Carvalho Pereira, Dominique Cavalcanti Mello, Vanessa de Souza, Guilherme Frederico Lenz e Silva, Vanessa Fierro, Alain Celzard e Rodrigo Labat Marcos. 2025. "Carvão ativado como substituto ósseo: Melhorando as propriedades mecânicas e morfológicas em um modelo de defeito na tíbia de rato". *Jornal de Avanços em Medicina e Pesquisa Médica* 37 (1):23-40. <https://doi.org/10.9734/jammr/2025/v37i15693>.

RESUMO

O carvão ativado (CA), um material altamente poroso e de baixo custo, foi testado como biosubstituto material para cicatrização de defeitos ósseos. O objetivo deste trabalho foi investigar o uso de 4 diferentes materiais de carvão ativado no processo de reparo tecidual, verificando aspectos morfológicos e biomecânicos do osso. Os experimentos foram realizados perfurando tíbias de ratos e preenchendo as cavidades ósseas resultantes com quatro tipos de ACs (AC1, 2, 3 e 4). Um grupo controle (CTL) e um grupo com lesão não tratada (NT) também foram incluídos. A eficiência do reparo foi avaliada após 30 dias. Não foi encontrada alteração da atividade hepática e renal, tanto pela avaliação histológica desses órgãos quanto pelos níveis de SGOT/SGTP e ureia. Um aumento nos níveis de ALP foi observado no grupo NT, enquanto todos os grupos com ACs mantiveram essa enzima próxima aos valores do grupo CTL. O estudo histológico do osso foi realizado para avaliar a organização do tecido ósseo formado, em comparação com a qualidade do reparo após o tratamento. As propriedades biomecânicas (Força Máxima = Fmax e Deformação Máxima = Dmax) do osso foram avaliadas por testes de flexão de três pontos. O grupo NT apresentou tecido ósseo imaturo e, embora os grupos AC1, AC2 e AC3 tenham apresentado tecido de granulação, indicando atraso na organização óssea, os valores de Fmax se mantiveram semelhantes ao grupo NT. O grupo AC4 apresentou propriedades mecânicas e organização tecidual semelhantes ao grupo CTL. Carvões ativados permitem crescimento tecidual em modelo de defeito ósseo tibial em ratos. Entretanto, as características estruturais específicas dos ACs são importantes e podem contribuir para uma melhor organização do tecido ósseo, uma vez que o AC4 apresentou melhores resultados histológicos e biomecânicos que os materiais AC1, AC2 e AC3. Concluindo, o carvão ativado AC4 (Norit ROX0.8) permitiu crescimento ósseo organizado com propriedades mecânicas semelhantes ao tecido normal CTL, em modelo de defeito ósseo tibial em ratos. O desempenho superior do AC4 pode estar relacionado às suas características estruturais.

Palavras-chave: Carvão ativado; propriedades biomecânicas; biosubstituto; cicatrização óssea.

1. INTRODUÇÃO

Doenças ósseas, como fraturas e defeitos ósseos, são problemas frequentes enfrentados pela população mundial. Fraturas podem resultar de traumas diretos ou indiretos, torções ou quedas (Hunter, et al., 2024), enquanto defeitos ósseos podem surgir de processos patológicos ou problemas ortopédicos, malformações congênitas, infecções, tumores e excisão cirúrgica (Calina et al., 2013; Burns et al., 2014). Essas alterações ósseas estruturais podem reduzir consideravelmente a qualidade de vida humana, afetando inicialmente a locomoção e posteriormente apresentando efeitos colaterais graves.

O osso é um material biocomposto complexo, morfológicamente constituído por células e fibras, e basicamente composto por uma matriz de colágeno, micro e nanocristais de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ com proporções Ca:P variando de 1,37-1,87), água e uma substância fundamental, como sais inorgânicos e proteínas (Planell & Navarro, 2009, Peppas, et al., 2007). Uma ruptura na continuidade do tecido ósseo produz um mecanismo de reparo.

A cicatrização óssea é um processo de reconstrução que envolve múltiplas etapas, essencialmente divididas em três fases distintas: inflamatória, reparadora

e remodelação (Srouji & Livne, 2005, Martino, et al., 2015). O funcionamento adequado dessas etapas tem grande relevância para um reparo ósseo eficaz. Na primeira fase, um hematoma é formado dentro da fratura, causado pela interrupção da função vascular normal e distorção da arquitetura óssea (Martino, et al., 2015, Schindeler, et al., 2008). A segunda fase é subdividida em dois estágios: primeiro, um calo fibrocartilaginoso é formado, cujo tamanho é diretamente proporcional ao movimento do paciente na zona da fratura, então uma formação de calo ósseo primário de formato irregular é estabelecida. Finalmente, o último estágio do reparo ósseo é marcado por uma remodelação gradual em direção ao formato original do osso. A remodelação é realizada por meio de uma conversão de matriz de tecido irregular em osso, um processo regulado pela reabsorção seguida pela formação óssea (Martino, et al., 2015, Schindeler, et al., 2008, Papadimitropoulos, et al., 2015). Essas alterações morfológicas causadas pela lesão são facilmente evidenciadas por estudos histológicos

(Dall'Oca, et al., 2014, Kamml, et al., 2024).

As terapias habitualmente realizadas no caso de fraturas baseiam-se em tratamentos conservadores como a imobilização completa do osso afetado ou a intervenção cirúrgica com recurso a implantes ou biomateriais, enquanto que os defeitos ósseos são corrigidos através de procedimentos de enxerto ósseo

(Dym & Pierse, 2011) ou por implantação de próteses biocompatíveis (Mehboob & Chang, 2014, Tan, et al., 2013, Tejero, et al., 2014).

Esses processos de correção atuais são caros, em parte devido ao tipo de cirurgia empregada, mas principalmente devido ao custo do material usado no reparo (Tejero, et al., 2014).

Para superar esses problemas, muitos estudos anteriores mostraram a potencial aplicação de biomateriais (Planell & Navarro, 2009, Venkatesan, et al., 2015, Wang, et al., 2014, Lee, et al., 2014, Yavari, et al., 2014, Khan, et al., 2014, Cabrejos-Azama, et al., 2014) ou terapias alternativas (Gabbai-Armelin, et al., 2019, Oliveira, et al., 2010, Fangel, et al., 2011).

na reconstrução óssea, com o objetivo de permitir uma cirurgia mais simples, rápida e barata.

No entanto, alguns materiais ainda são caros.

Além disso, a maioria dos biomateriais atualmente empregados também são baseados em nanopartículas, e vários trabalhos mostraram que materiais contendo nanopartículas ou estruturas de tamanho nanométrico, como hidroxiapatita, dióxido de titânio, ouro, sílica e prata (Chen et al., 2014, Gui et al., 2011, Nishimori et al., 2009, Sukirtha et al., 2012) podem induzir toxicidade.

O acúmulo de substâncias perigosas no fígado e nos rins causa grande preocupação, principalmente quando aparecem alterações morfológicas e fisiológicas internas (Chen, et al., 2014). Tanto o fígado quanto o rim são de fato órgãos extremamente importantes, atuando no metabolismo e na excreção desses agentes, respectivamente. O fígado metaboliza toxinas do corpo, enquanto os rins filtram a corrente sanguínea para eliminar substâncias tóxicas como elementos exógenos, a fim de manter o equilíbrio de eletrólitos no corpo. Assim, investigar as funções dos rins e do fígado por meio da avaliação de sua atividade ou de suas alterações morfológicas, ou mesmo do acúmulo de biomateriais nesses órgãos, é relevante para testar carvões ativados (ACs) como potenciais biosubstitutos ósseos.

Carvões ativados são sólidos altamente porosos, geralmente obtidos de precursores de baixo custo, como biomassa, resíduos de biomassa ou carvões minerais por ativação térmica em temperaturas tipicamente abaixo de 1000 °C (Boss, et al., 2024, Marsh, et al., 1997, Domga, et al., 2021). De acordo com os padrões ouro da engenharia de tecidos, um substituto ósseo ideal deve apresentar estrutura tridimensional altamente porosa para garantir a circulação de nutrientes e fatores de crescimento (Zhao, et al., 2023,

Shin, et al., 2024). Assim, o grande número de poros de diferentes diâmetros e a alta área de superfície dos ACs os tornam *a priori* adequados para interagir com vários produtos químicos e servem como facilitadores para a proliferação celular.

O objetivo do presente estudo foi testar carvões ativados no processo de reparo ósseo da tíbia de ratos e avaliar as funções renal e hepática após a cicatrização por meio da quantificação da transaminase glutâmico oxalacética sérica (SGOT), transaminase glutâmico-pirúvica sérica (SGTP) e ureia. Os níveis alcalinos de fosfatase foram avaliados e relacionados à formação óssea e as alterações morfológicas do osso, rins e fígado de ratos foram analisadas por estudos histológicos, enquanto o desempenho do biomaterial foi avaliado pelas propriedades biomecânicas do osso após o tratamento com ACs e comparação com o osso saudável e não tratado.

2. METODOLOGIA

2.1. Aspectos éticos

O procedimento do estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa local da Universidade Nove de Julho (Nº

8675271021). Todos os cuidados pós-cirúrgicos foram utilizados para garantir o bem-estar dos animais, com todos os ratos alojados individualmente e recebendo comida, água e enriquecimento ambiental. Os 3Rs (redução, refinamento e substituição) exigidos pelo comitê de ética foram respeitados, e 5 animais por grupo foram aprovados, totalizando 30 animais.

A cirurgia para induzir lesões ósseas foi realizada em ambas as tíbias, totalizando N=10 tíbias por grupo, distribuídas em análises histológicas ou de propriedades mecânicas.

2.2. Defeito ósseo

Os experimentos foram realizados com 30 ratos Wistar machos, pesando em torno de 200 g, com acesso ad libitum à comida e água. Os animais foram randomizados manualmente em seis boxes com cinco animais cada, processo realizado pelo técnico em animais responsável pelo biotério da instituição de pesquisa. Os animais foram anestesiados com cetamina/xilazina a 90/10 mg kg⁻¹, respectivamente, e então submetidos à cirurgia para confecção da cavidade óssea através de modelo experimental. Foi realizada incisão cirúrgica na pele raspada, na parte pósterolateral de ambas as tíbias, para exposição do osso tibial.

Em seguida, um defeito ósseo de 2,5 mm² perfurou o

camada cortical do osso com uma broca motorizada (1500 rpm; DRILLER®).

Uma vez obtida a lesão, os animais foram distribuídos aleatoriamente em 6 grupos (N=5), conforme demonstrado no protocolo experimental a seguir. O defeito ósseo dos animais dos grupos 3 a 6 foi preenchido com carvão ativado suficiente (~1,5 mg para cada rato) e então a pele foi suturada (Fig. 1A). Todos os carvões ativados, previamente esterilizados em autoclave, foram misturados com algumas gotas de uma solução isotônica estéril (NaCl 0,9%) até a formação de uma substância pastosa, a fim de facilitar a inserção do biomaterial no defeito ósseo. O tamanho das partículas dos carvões ativados variou de 45-180 μm .

A eutanásia foi realizada 30 dias após a indução, usando injeções intraperitoneais de cetamina (270mg/kg) e xilazina (30mg/kg).

Amostras de sangue e tíbia foram coletadas e armazenadas em tubos plásticos numerados. As análises bioquímicas, histológicas e biomecânicas foram realizadas por 2 pessoas participantes da pesquisa, sem conhecimento da amostra ou identificação do grupo experimental (Fig. 1B).

2.3. Grupos Experimentais

Cada grupo experimental foi composto por 5 animais e divididos em diferentes conjuntos da seguinte forma: 1- Grupo controle (CTL) – animais saudáveis, sem nenhum procedimento cirúrgico (denominado C a seguir); 2- Grupo não tratado (NT) – animais com lesão, ou seja, após a incisão cirúrgica por apresentar cavidade óssea sem nenhum tratamento (denominado NT); e 3-6 grupos tratados – animais com lesão e tratados com vários carvões ativados (AC1, AC2, AC3 e AC4 – Fig. 1A).

2.4. Biomateriais

Quatro tipos diferentes de carvões ativados (ACs) foram usados para testá-los como biomateriais em reparo ósseo: três eram produtos comerciais gentilmente fornecidos pela Norit, e um foi produzido em laboratório por ativação de KOH de antracito chinês a 750°C. Norit PK 1-3, Norit GCN 830

e Norit ROX 0,8 são ACs produzidos pela ativação de vapor de vários precursores, NORIT ROX 0,8 tendo sido lavado com ácido para obter um AC de alta pureza. Esses materiais são usados em uma ampla gama de aplicações de purificação nas indústrias farmacêutica, química, de alimentos e bebidas e de água. O antracito ativado feito em laboratório foi lavado com extremo cuidado, primeiro com HCl 1M e depois com água destilada até que o pH do enxágue permanecesse constante e próximo de 6. Após a secagem em um forno durante 24h, um material AC muito puro foi obtido (Zhao, et al., 2012). Os detalhes dos carvões ativados podem ser encontrados na Fig. 1a, recapitula o rótulo, a origem, o precursor e o processo de ativação dos ACs usados neste estudo.

2.5. Parâmetros bioquímicos

Antes da eutanásia, o sangue foi coletado de cada animal e estocado. Após 10 minutos, a amostra de sangue (N=5 por grupo) foi centrifugada a 5 000 rpm durante 3 minutos para separação do soro e então armazenada a -80°C para exame. O nível de fosfatase alcalina no soro foi medido com os kits ELISA comerciais (WIENER®).

As funções renal e hepática foram analisadas por estudos bioquímicos. Os níveis de ureia, SGOT e SGPT também foram determinados usando kits ELISA comerciais (WIENER®).

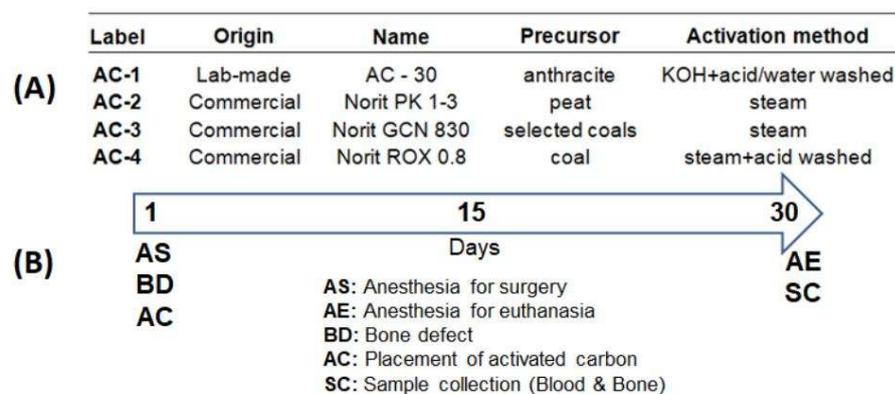


Fig. 1. Protocolo experimental. Em (a) características dos materiais de carvão ativado. Em (b) Evolução experimental do protocolo de defeito ósseo (BD), tratamentos (AC), anestesia (AS), eutanásia (AE) e coleta de materiais para análise (SC)

2.6. Estudos histológicos

Após o sacrifício dos animais, as amostras (rins, fígado e tibia) foram retiradas dos ratos para avaliação de suas alterações morfológicas. Os tecidos biológicos (N=5) foram fixados em formalina e preparados conforme os procedimentos histológicos para inclusão em parafina (Junqueira & Carneiro, 2003). Cortes de 5 microns de espessura de cada tecido foram obtidos por um equipamento de micrótomo (LEICA RM 2125 RT) e corados com hematoxilina-eosina para posterior análise em microscópio óptico e fotografados através de um Sistema de Microscópio Olympus (Modelo CX System 41 – Olympus PM10SP Automatic Photomicrographic System).

2.7. Propriedades mecânicas do osso

Para análise biomecânica, o osso (N=5) foi testado imediatamente após a remoção para evitar qualquer alteração em suas propriedades mecânicas.

O comprimento e o diâmetro do osso foram medidos antes do teste mecânico e esses valores foram usados para a padronização dos resultados. Os ossos foram analisados por testes de flexão de três pontos, usando uma máquina de teste Intermetric200®. Os testes de carga foram realizados a uma taxa de carga de 6 mm/min até a ruptura do osso. Todos os dados de força e deslocamento foram registrados contínua e simultaneamente. A tensão máxima antes da ruptura foi calculada e comparada entre os grupos. A Força Máxima (Fmax) e a Deformação Máxima (Dmax) no momento da ruptura foram determinadas pela máquina de teste mecânico, após os testes de carga e descarga.

2.8. Análise Estatística

Os dados foram tabulados em um arquivo do Microsoft Excel 2010®, e o teste de normalidade de Shapiro-Wilk foi realizado. Como uma distribuição normal foi observada, os dados foram avaliados estatisticamente por análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida por post-hoc Tukey-Kramer (GraphPad Prism 5 -

GraphPad Software, San Diego Califórnia EUA).

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão para todos os grupos, e os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados foram organizados em duas seções. Na primeira seção, apresentamos achados relacionados à função renal e hepática. Isso inclui níveis de SGOT e SGPT, indicativos de atividade hepática,

seguido pelos níveis de ureia, que refletem a atividade renal. Em seguida, apresentamos imagens histológicas do fígado e do rim, destacando qualitativamente as estruturas desses órgãos. Na segunda seção, apresentamos os níveis de Fosfatase Alcalina e os correlacionamos com certas propriedades mecânicas da tibia, como Força Máxima (Fmax) e Deformação Máxima (Dmax) no momento da ruptura óssea durante o teste mecânico de flexão em três pontos.

3.1. Avaliação das funções renal e hepática

Níveis de SGOT/SGPT e ureia: Parâmetros bioquímicos são amplamente utilizados para avaliar a atividade funcional biológica do fígado e dos rins porque alterações nos níveis de SGOT/SGPT e ureia no sangue são indicadores importantes de danos ao fígado e aos rins, respectivamente (Gui, et al., 2011, Boss, et al., 2024, Khalil & Eid, 2013).

Portanto, para avaliar as funções renal e hepática após o uso de ACs como biomateriais, testes quantitativos no sangue foram realizados para todos os ratos e analisados por teste estatístico, conforme mostrado na Fig. 2 e Tabela A1, A2 e A3. A partir de tais testes estatísticos, nenhuma alteração significativa na atividade da enzima hepática SGOT/SGPT (Fig. 2a, 2b e Tabela A1, Níveis de A2) ou ureia (Fig. 2c e Tabela A3) foram encontrados em grupos tratados com carvão ativado (AC1-AC4), em comparação ao grupo controle CTL.

Análise histológica do fígado e rim: Para uma melhor avaliação dos resultados bioquímicos, estudos histológicos do fígado e rim também foram realizados para o grupo CTL e para todos os grupos tratados (AC1, AC2, AC3 e AC4). As imagens permitiram observar a integridade desses órgãos por meio de comparações morfológicas. A deposição de carvão ativado nesses órgãos também foi avaliada, pois a presença de partículas exógenas no tecido biológico pode causar uma resposta inflamatória (Gui, et al., 2011). As imagens histológicas do fígado para todos os grupos tratados (AC1-AC4), vistas na Fig. 3(c,e,g,i), mostraram vasos sanguíneos hepáticos com arranjo normal. Além disso, as células dos hepatócitos estavam distribuídas homoganeamente em tal tecido, permanecendo preservadas como no grupo CTL (Fig. 3a).

Da mesma forma, a integridade funcional dos rins era semelhante ao tecido saudável (Fig. 3b), enquanto o glomérulo e a cápsula de Bowman apresentavam formato normal nos grupos tratados (Fig. 3d,f,h,j). Em casos de processos inflamatórios, o espaço ao redor do glomérulo é de fato congestionado por células sanguíneas e os níveis de ureia podem aumentar significativamente (Khalil & Eid, 2013).

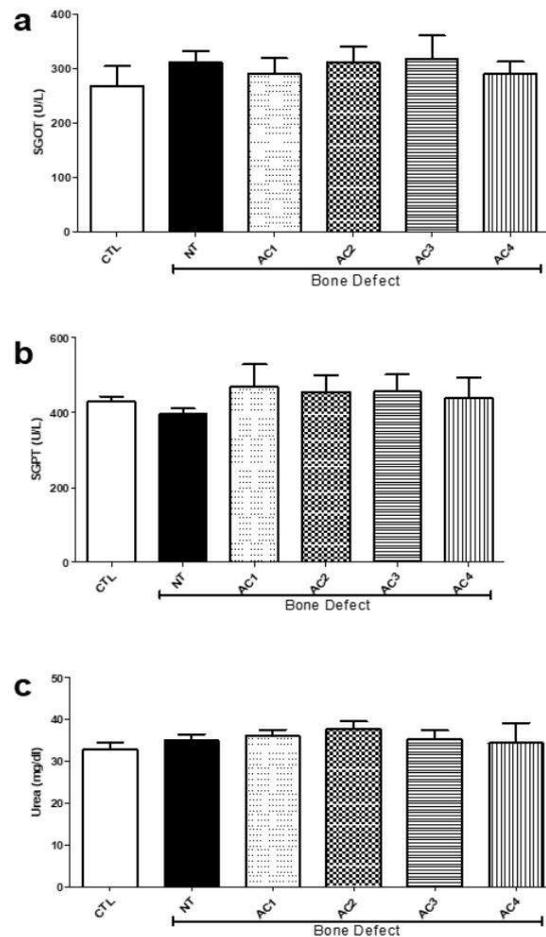


Fig. 2. Análise bioquímica da atividade hepática e renal. Em (a) Glutamato Piruvato Transaminase Sérica - SGOT. Em (b) Glutamato Piruvato Transaminase Sérica - SGPT. Em (c) Níveis de Uréia. Grupos Experimentais: CTL: Controle sem defeito ósseo; NT com defeito ósseo sem tratamento ou tratado com materiais de carbono (AC1, AC2, AC3 e AC4). O teste estatístico não demonstrou diferenças significativas entre os grupos experimentais

Os níveis de enzimas hepáticas e ureia estavam dentro dos limites normais, sugerindo que tanto a atividade renal quanto a hepática permaneceram normais para todos os grupos tratados. Em outras palavras, os diferentes carvões ativados não pareceram induzir nenhuma toxicidade nesses órgãos. Da mesma forma, nenhuma alteração morfológica, como presença de células inflamatórias, edema ou fibrose, foi observada no fígado ou rins pela análise histológica desses órgãos.

No fígado, por exemplo, o aumento do número de células de Kúppfer pode indicar uma inflamação hepática. Tal processo inflamatório pode progredir através de um aumento na síntese de colágeno e, eventualmente, levar a uma fibrose hepática e função hepática prejudicada (Gui, et al., 2011, Khalil & Eid, 2013). Além disso, nenhuma deposição de carvão ativado foi encontrada nesses dois tecidos.

Todos esses resultados sugerem que o uso do carvão ativado como material biosubstituto ósseo não induz nenhuma toxicidade nas funções hepática ou renal.

3.2. Osteocondutividade

Nível de fosfatase alcalina: A fosfatase alcalina (ALP) é uma enzima encontrada em muitos tecidos do corpo, incluindo fígado, ossos, rins, intestinos e placenta. No entanto, as maiores concentrações estão no fígado ou nos ossos.

Durante o processo de cicatrização óssea, o nível de fosfatase alcalina é um indicador importante da formação óssea, devido à sua correlação direta com a deposição gradual de hidroxapatita na matriz extracelular do osso (Christenson, 1997, Ajai, et al., 2013). A função da fosfatase alcalina

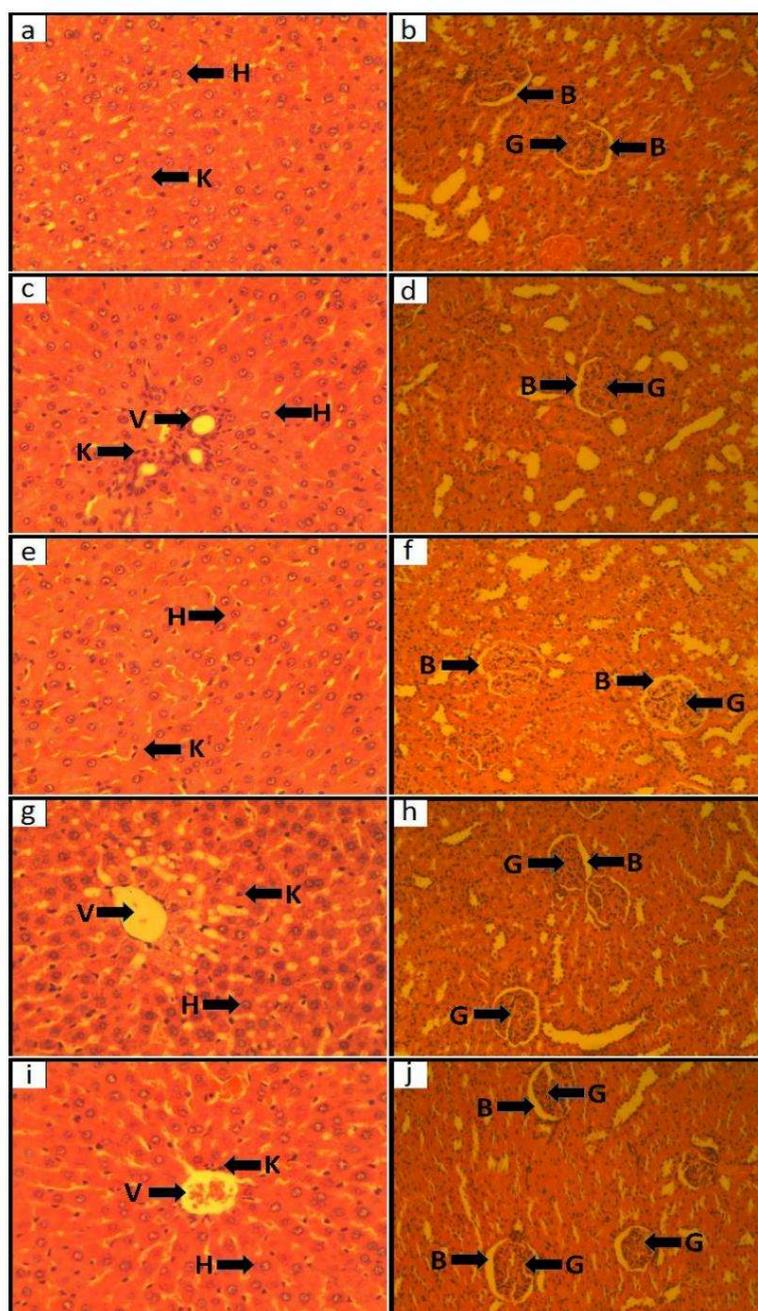


Fig.3. Imagens histológicas representativas (100X) dos tecidos do fígado (esquerda) e do rim (direita), respectivamente. Grupos: CTL (a,b); AC1 (c,d); AC2 (e,f); AC3 (g,h) e AC4 (i,j). Legenda: K - Células de Küpfer; H - célula do hepatócito; V - vaso sanguíneo; B - cápsula de Bowman; G - glomérulo

A fosfatase no processo de cicatrização óssea é baseada na hidrólise do pirofosfato, fornecendo fosfato inorgânico e contribuindo para a mineralização (Orimo, 2010). Conseqüentemente, a deposição de hidroxiapatita afeta a atividade dos osteócitos, bem como as fases de deposição e reabsorção óssea. Normalmente, o processo lesivo é caracterizado por um aumento gradual dos níveis de fosfatase alcalina, atingindo o

pico máximo no final da segunda semana. Em seguida, a atividade da ALP é gradualmente reduzida e seguida pela fase de remodelação do osso, que é caracterizada pela transição de osso imaturo para maduro (Oliveira, et al., 2010).

A atividade da fosfatase alcalina óssea foi medida e comparada entre os grupos. Os níveis de fosfatase alcalina são apresentados em 4

para todos os grupos tratados (AC1, AC2, AC3, AC4), e estatisticamente nenhuma alteração significativa foi encontrada em comparação ao grupo CTL. No entanto, esses grupos apresentaram níveis mais baixos de fosfatase alcalina em comparação ao grupo NT. Níveis aumentados de ALP no grupo NT sugerem um aumento na atividade de formação óssea (Du, et al., 2013). O mesmo não foi observado nos grupos AC, o que pode indicar que os quatro grupos com materiais estavam em uma fase mais avançada de reparo ósseo.

Estudos histológicos ósseos: As imagens histológicas do osso evidenciaram características distintas para cada grupo. Como esperado, o grupo controle CTL (Fig. 5a) apresentou camadas corticais e medulares completadas com osteócitos bem distribuídos (células ósseas maduras), além de endóstio e canais vasculares típicos.

Os grupos com defeito ósseo, tratados e não tratados, apresentaram áreas de transição de formação óssea em diferentes graus. Em geral, NT, AC1, AC2, AC3 e AC4 apresentaram regiões medulares e corticais bem definidas, delimitadas por células do endóstio. Além disso, foi claramente observada uma distribuição homogênea de osteócitos na região de formação óssea nos grupos NT, AC1 e AC4, representando a organização do tecido ósseo. Por outro lado, o grupo AC4 apresentou estruturas mais complexas, como canais vasculares, também observados no tecido saudável do grupo CTL, enquanto as imagens dos grupos NT e AC1, (Fig. 5b, 5c) sugeriram que essas estruturas estavam em formação.

A presença e organização dos canais vasculares são normalmente formadas em estágios mais avançados do reparo, e sua função é fornecer

nutrição do tecido ósseo e remoção de células mortas. A ausência de canais vasculares pode induzir a morte celular e afetar o crescimento do tecido ósseo (Boontheekul & Mooney, 2003). Portanto, a presença de canais vasculares na zona da lesão também é um indicador de melhora do reparo ósseo no grupo AC4. A presença de alguns osteoclastos foi detectada nos grupos NT, AC1, AC2 e AC4. Essas células são importantes em várias fases do reparo, especialmente na remodelação óssea, porque reabsorvem o calo duro formado durante a fase reparadora do processo de cicatrização óssea

(Martino, et al., 2015).

O grupo AC4 também apresentou a menor área de transição e foi o único grupo a apresentar osso maduro, indicando progresso no reparo ósseo em comparação aos outros grupos.

Gradualmente, extensas áreas de transição foram observadas no AC1, seguido pelos grupos AC2 e AC3. Além disso, os dois últimos grupos também exibiram uma quantidade importante de carvão ativado depositado entre as áreas de transição. As áreas de transição são normais durante a cicatrização óssea e indicam a progressão do reparo de acordo com o caráter da organização: a presença de osso maduro indica o estágio avançado da fase de remodelação, enquanto o tecido de granulação é normalmente encontrado antes da fase de remodelação (Martino, et al., 2015, Niinomi, et al., 2015). As informações histológicas ósseas obtidas no presente estudo mostraram que o biomaterial utilizado nos grupos AC1 e AC4 promoveu aspectos mais regulares nas células e estruturas, apresentando um progresso no reparo ósseo pela presença de um tecido ósseo mais organizado, enquanto a resposta para AC2 e AC3 foi diferente porque o processo de cicatrização foi mais lento.

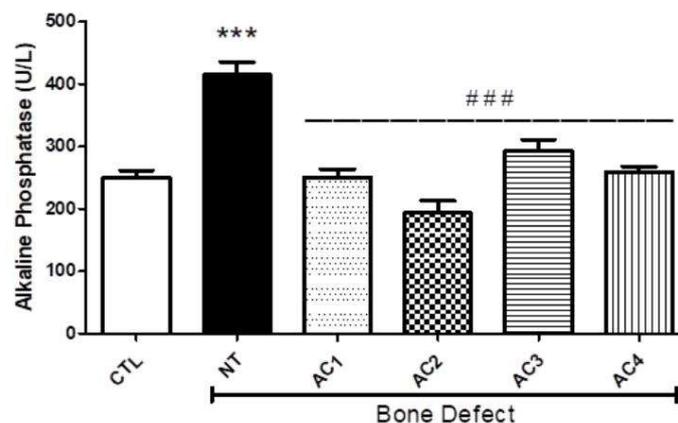


Fig. 4. Nível de fosfatase alcalina - ALP. Grupos experimentais: CTL: Controle sem defeito ósseo; NT com defeito sem tratamento ou tratado com materiais de carbono (AC1, AC2, AC3 e AC4). *** $p < 0,001$ Vs CTL e ### $p < 0,001$ Vs NT

Propriedades biomecânicas: Um fator importante para o uso de um biomaterial como substituto ósseo é a qualidade do osso formado durante o processo de cicatrização. Quando se consideram as propriedades mecânicas do osso recém-formado, o rearranjo, a massa óssea e a espessura da região cortical têm um impacto direto na resistência óssea (Fangel, et al., 2011, Olivera, et al., 2008, Henkel, et al., 2013). Assim, a avaliação das propriedades mecânicas desses tecidos biológicos seria uma ferramenta importante para a compreensão desse processo de reparo (Meyer, et al., 2001, Marcos, et al., 2014).

Os desempenhos de todos os biomateriais utilizados neste trabalho foram avaliados por propriedades mecânicas usando os testes de flexão de três pontos do osso após 30 dias de cicatrização. Os dados de Fmax relacionados ao estresse e Dmax com deformação foram obtidos e analisados juntamente com os dados bioquímicos e histológicos

A Fig. 6(a) e a Tabela A5 ilustram os valores de Fmax do osso calculados a partir da força máxima de ruptura para todos os grupos estudados. O grupo não tratado NT apresentou o menor valor de Fmax, em comparação com o grupo CTL. Esses resultados de propriedades mecânicas somados às análises bioquímicas e histológicas criam um perfil do grupo NT, que apresentou valores elevados de ALP (Fig. 4 e Tabela A4), menor organização histológica e propriedades mecânicas reduzidas (Fig. 6 e Tabela A6, A5).

Normalmente, durante o processo de cicatrização óssea, o tecido lesionado é lentamente regenerado e a maioria de suas propriedades são restauradas (Gauthier, et al., 2005). No entanto, eventuais alterações na microarquitetura óssea e uma diminuição da densidade mineral óssea podem acontecer e, conseqüentemente, podem induzir estruturas mais frágeis (Chen, et al., 2014, Christiansen & Riis, 1991).

Os grupos de ratos tratados com carvão ativado (AC1, AC2 e AC3) não apresentaram diferença nas propriedades mecânicas quando comparados ao grupo NT, além de apresentarem níveis de ALP semelhantes ao grupo CTL. Considerando que o grupo NT simula o crescimento ósseo normal após a lesão, valores semelhantes a este grupo podem ser considerados positivos, levando-nos a considerar que os materiais de carbono AC1, 2 e 3 também apresentaram resultados importantes para o reparo ósseo, uma vez que não prejudicaram o crescimento ósseo normal. Entretanto, ao analisar apenas a organização histológica dos tecidos, observou-se que o grupo AC3 apresentou um tecido mais desorganizado, com presença de tecido de granulação, sugerindo uma

atraso na consolidação óssea, quando comparado aos demais grupos experimentais.

Em contrapartida, o grupo AC4 apresentou aumento dos valores de Fmax em relação aos grupos NT, AC1, AC2 e AC3, com valores semelhantes ao grupo CTL. O grupo de ratos tratados com esses carvões ativados (AC4) apresentou melhora do reparo ósseo, observado por uma série de dados: níveis normais de ALP (ver Fig. 4 e Tabela A4), melhor organização histológica em comparação aos grupos NT e AC1, 2 e 3 (Fig. 5) na região de cicatrização óssea, e boas propriedades biomecânicas em comparação ao grupo NT (ver Fig. 6 e Tabela A6, A5), apresentando reparo ósseo semelhante ao grupo CTL, no qual não houve indução de lesão óssea. Esse achado foi corroborado pela presença de canais vasculares e tecido ósseo maduro, observados por meio da avaliação histológica da zona lesada (Fig.

5), e estavam de acordo com as boas propriedades mecânicas do grupo AC4, uma vez que essas estruturas indicam uma boa evolução do reparo ósseo (Matsumoto, et al., 2012).

A Fig. 6(b) e a Tabela A6 mostram a relação entre Fmax e Dmax, também considerados como valores de tensão X deformação para os diferentes grupos. Não foram observadas diferenças na capacidade de deformação óssea ao comparar todos os grupos.

Em geral, os materiais de carvão ativado utilizados neste estudo apresentaram resultados promissores no processo de reparo ósseo. Enquanto os materiais AC1, 2 e 3 apresentaram reparo semelhante ao grupo NT, o material AC4 se mostrou ainda melhor, com processo de reparo semelhante ao grupo CTL. Pequenas diferenças na resposta entre os materiais utilizados neste estudo, quanto à organização do tecido ou às propriedades mecânicas do osso formado, poderiam ser objeto de pesquisa em estudos futuros, comparando seu uso em diferentes tecidos ósseos, onde a proporção entre as camadas cortical e medular seria diferente.

Os carvões ativados utilizados no presente estudo apresentaram boas respostas como materiais biosubstitutos na cicatrização óssea. Primeiro, nenhuma alteração da atividade hepática e renal foi encontrada através da observação de três parâmetros: (1) as células e estruturas histológicas do fígado e dos rins permaneceram completamente preservadas, (2) nenhuma deposição de ACs em tais órgãos foi encontrada, e (3) os níveis de SGOT/SGTP e ureia estavam dentro dos limites normais. Segundo, todos os ACs estudados apresentaram boas propriedades de osteocondutividade, uma vez que a formação de um tecido ósseo foi sempre observada, seguida por níveis normais de

ALP no sangue dos grupos tratados.

Além disso, todos os grupos de ratos tratados com ACs apresentaram organização histológica similar ou superior na região de cicatrização óssea e boas propriedades biomecânicas em comparação ao grupo NT. Todos os dados fornecidos aqui evidenciaram que o biomaterial AC4 parece apresentar as características necessárias para promover um reparo eficiente para o tipo de osso investigado neste trabalho.

Embora os níveis de ALP estejam relacionados à formação óssea, existem outros marcadores que poderiam fortalecer essa hipótese quanto às diferenças nas fases de reparo entre o grupo NT e os grupos com materiais de carbono. Seria interessante avaliar os níveis de Fosfatase Ácida, bem como verificar a expressão da Interleucina 6 e sua relação

com Hank-L e proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) associadas à atividade osteoclástica no processo de remodelação óssea (Campana, et al., 2014). Tanto as informações sobre a organização do tecido, obtidas a partir de análises histológicas, quanto a resistência óssea, obtida a partir de resultados biomecânicos, são dados complementares que fazem sentido quando observados em conjunto. No entanto, seria importante investigar o comportamento dos materiais de carbono utilizados neste estudo sobre o processo de reparo ósseo em diferentes ossos, onde a proporção entre as camadas cortical e medular difere, alterando significativamente as propriedades mecânicas desses tecidos. Igualmente importante seria o estudo do efeito desses materiais de carbono ativado durante o processo de cicatrização em diferentes momentos, considerando as fases aguda e crônica do reparo ósseo.

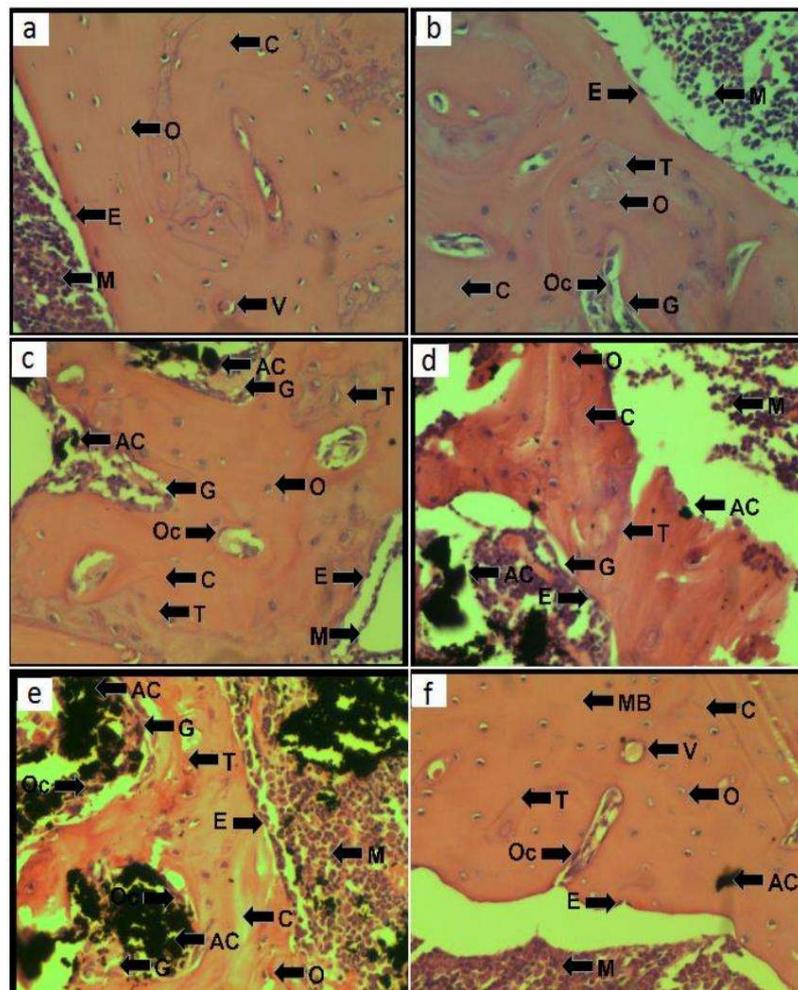


Fig. 5. Imagens histológicas representativas (100X) da região cicatrizada da tíbia de rato. Grupos: CTL (a); NT (b); AC1 (c); AC2 (d); AC3 (e) e AC4 (f). Região Cortical (C); Região Medular (M); Osteócitos (O); Canais Vasculares (V); Osteoclastos (Oc); Carvão Ativado (AC); Endóstio (E); Área de Transição (T), Tecido de Granulação (G), Osso Maduro (MB)

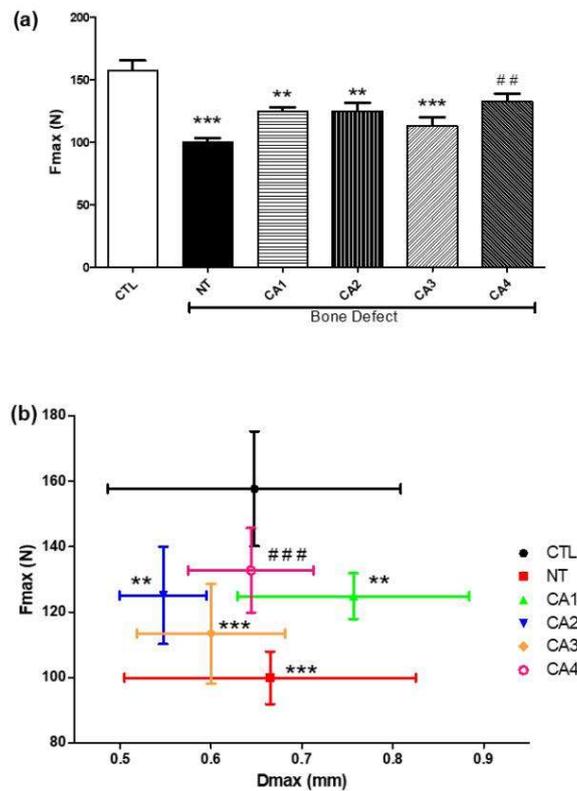


Fig. 6. Propriedades biomecânicas de ensaios de flexão de três pontos. (a) Fmax (Força Máxima de Ruptura). (b) Relação entre Fmax e Dmax (Deformação Máxima de Ruptura).

Grupos Experimentais: CTL: Controle sem defeito ósseo; NT com defeito ósseo sem $p < 0,001$ tratamento ou tratados com materiais de carbono (AC1, AC2, AC3 e AC4). ** $p < 0,01$ e Vs CTL; ### $p < 0,05$ Vs NT

4. CONCLUSÃO

O uso do material de carvão ativado como substituto ósseo parece ser vantajoso e seguro, não havendo sinais de alteração renal ou hepática após 1 mês de aplicação na tíbia de ratos. O material de carbono AC4 promoveu melhor reparo ósseo demonstrado pela formação de tecido com características morfológicas e biomecânicas semelhantes ao osso intacto.

O uso de ACs como biosubstituto ósseo é vantajoso porque tais biomateriais são geralmente derivados de recursos sustentáveis com características importantes como a conectividade entre seus poros e baixo custo. Além disso, ACs podem ser facilmente produzidos a partir de vários resíduos de biomassa em larga escala.

Estudos adicionais com culturas de células ósseas são importantes para avaliar o crescimento e a viabilidade celular, bem como avaliar as características das células.

o próprio material de carbono, particularmente o tamanho e a proporção dos poros e as propriedades da superfície desses materiais, o que poderia dar suporte ao seu uso em diferentes tecidos biológicos.

CONSENTIMENTO

Não é aplicável.

APROVAÇÃO ÉTICA

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais de Laboratório sob o protocolo nº 8675271021. O estudo envolve o uso de 30 ratos Wistar machos e inclui cirurgia óssea para aplicação dos biomateriais sob investigação. Todos os cuidados cirúrgicos e pós-cirúrgicos aderiram às diretrizes da CEUA.

As doses de anestésicos e analgésicos utilizadas no estudo, bem como as medidas para garantir o bem-estar dos animais, foram cuidadosamente seguidas. Todo o experimento foi supervisionado por um

veterinário responsável pelo centro de animais da universidade.

Todos os autores declaram que "Princípios de cuidados com animais de laboratório" (publicação NIH nº 85-23, revisado em 1985) foram seguidos, bem como leis nacionais específicas, quando aplicáveis. Todos os experimentos foram examinados e aprovados pelo comitê de ética apropriado"

AVISO LEGAL (INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL)

Os autores declaram que NENHUMA tecnologia de IA generativa, como Large Language Models (ChatGPT, COPILOT, etc.) e geradores de texto para imagem, foi usada durante a escrita ou edição deste manuscrito.

INTERESSES CONCORRENTES

Os autores declararam que não há conflitos de interesses.

REFERÊNCIAS

- Ajai, S., Sabir, A., Mahdi, AA e Srivastava, R. N. (2013). Avaliação da fosfatase alcalina sérica como biomarcador da progressão do processo de cicatrização de fraturas diafisárias simples em pacientes adultos. *International Research Journal of Biological Sciences*, 2, 40–43.
- Português Boontheekul, T., & Mooney, DJ (2003). Sistemas de sinalização baseados em proteínas na engenharia de tecidos. *Opinião atual em biotecnologia*, 14, 559–565.
- Boss, AF, Munhoz, CG, Amaral-Labat, G., Lima, RGA, Medeiros, LI, Medeiros, NCFL, Fonseca, BCS, Braghiroli, FL, & Lenz e Silva, GFB (2024). Por que o carbono poroso sustentável deve ser mais explorado como material absorvedor de radar? Um estudo comparativo com diferentes carbonos nanoestruturados. *Journal of Renewable Materials*, 12(10), 1639–1659.
- Cabrejos-Azama, J., Alkhraisat, MH, Rueda, C., Torres, J., Blanco, L., & López-Cabarcos, (2014). Substituição de magnésio em cimentos de brushite para melhor regeneração do tecido ósseo. *Ciência e Engenharia de Materiais C*, 43, 403–410.
- Campana, V., Milano, G., Pagano, E., Barba, M., Cicione, C., Salonna, G., Lattanzi, W., & Logroscino, G. (2014, outubro). Substitutos ósseos em cirurgia ortopédica: de ciência básica para a prática clínica. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 25(10), 2445–2461. <https://doi.org/10.1007/s10856-014-5240-2>
- Chen, Q., Xue, Y. e Sun, J. (2014). Hepatotoxicidade e lesão hepática induzida por nanopartículas de hidroxiapatita. *Journal of Applied Toxicology*, 34, 1256–1264.
- Christenson, RH (1997). Marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo: Uma visão geral. *Bioquímica Clínica*, 30, 573–593.
- Christiansen, C., & Riis, P. (1991). Consensus development conference. Profilaxia e tratamento da osteoporose. *Nordisk Medicin*, 106, 145–147.
- Dall'Oca, C., Maluta, T., Cavani, F., Morbioli, G. P., Bernardi, P., Sbarbati, A., Degl'Innocenti, D., & Magnan, B. (2014). A biocompatibilidade de cimentos ósseos porosos vs não porosos: Uma nova abordagem metodológica. *European Journal of Histochemistry*, 58, 2255.
- Domga, R., Abia, D., Mouthe, AGA, Musongo, B., Wangmene, B., & Tchatchueng, JB (2021). Otimização da adsorção de azul de metileno em carvão ativado de ossos de *Bos indicus* gudali usando um projeto experimental Box Behnken. *American Journal of Chemistry*, 12(1), 1–9. <https://doi.org/10.5923/j.chemistry.20221201.01>
- Du, Z., Chen, J., Yan, F., Doan, N., Ivanovski, S., & Xiao, Y. (2013). Correlação do marcador de formação óssea sérica com a osseointegração melhorada em ratos osteoporóticos tratados com sinvastatina. *Clinical Oral Implants Research*, 24, 422–427.
- Dym, H., & Pierse, J. (2011). Técnicas avançadas em procedimentos de enxerto ósseo. *Clínicas odontológicas da América do Norte*, 55, 453–460.
- Fangel, R., Bossini, PS, Renno, AC, Ribeiro, DA, Wang, CC, Toma, RL, Nonaka, KO, Driusso, P., Parizotto, NA, & Oishi, J. (2011). Laserterapia de baixa potência, 60 J/cm² associada ao aumento do Biosilicato® na deposição óssea e nas propriedades biomecânicas de indentação de calos em ratos osteopênicos. *Jornal de Óptica Biomédica*, 16, 078001.
- Gabbai-Armelin, PR, Wilian Kido, H., Fernandes, KR, Fortulan, CA, & Muniz Renno, AC (2019, agosto). Efeitos de compósitos bioinspirados de biovidro/colágeno/magnésio no reparo ósseo. *Journal of Biomaterials Applications*, 34(2), 261–272.

- Gan, AWT, Puhaindran, ME e Pho, RW
H. (2013). A reconstrução de grandes defeitos ósseos no membro superior. *Lesão, International Journal of the Care of Injured*, 44, 313–317.
- Gauthier, O., Muller, R., von Stechow, D., Lamy, B., Weiss, P., Bouler, JM, Aguado, E., & Daculsi, G. (2005). Regeneração óssea in vivo com biomaterial de fosfato de cálcio injetável: Um estudo tridimensional de tomografia computadorizada micro, biomecânica e SEM. *Biomateriais*, 26, 5444–5453.
- Gui, SX, Zhang, ZL, Zheng, L., Sun, QQ, Sang, XZ, Liu, XR, Gao, GD, Cui, Y. L., Cheng, Z., Cheng, J., Tang, M., & Hong, FS (2011). O mecanismo molecular de lesão renal de camundongos causada pela exposição a nanopartículas de dióxido de titânio. *Journal of Hazardous Materials*, 195, 365–370.
- Português Henkel, J., Woodruff, MA, Epari, DR, Steck, R., Glatt, V., Dickinson, IC, Choong, P. FM, Schuetz, MA e Huttmacher, DW (2013). Regeneração óssea baseada em concepções de engenharia de tecidos — uma perspectiva do século XXI. *Bone Research*, 1, 216–248.
- Hunter, S., Alexander, Z., Crawford, H., Te Ao, B., Selak, V., Mutu-Grigg, J., Lorgelly, P., & Grant, C. (2024, 27 de outubro). Custo de hospitalização para osteomielite pediátrica e artrite séptica na Nova Zelândia. *Journal of Paediatrics and Child Health*. <https://doi.org/10.1111/jpc.16711>
- Junqueira, LC, & Carneiro, J. (2003). *Histologia básica* (10ª ed.). Lange Medical Books McGraw-Hill. ISBN: 0-07-121565-4
- Kamml, J., Acevedo, C., & Kammer, DS (2024, novembro). Mineral e reticulação em fibrilas de colágeno: O comportamento mecânico do tecido ósseo na nanoescala. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 159, 106697. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2024.1066>
- 97
- Khalil, W., & Eid, N. (2013). Biocompatibilidade de BioAggregate e agregado de trióxido mineral no fígado e rim. *Revista Endodôntica Internacional*, 46, 730–737.
- Khan, AF, Saleem, M., Afzal, A., Ali, A., Khan, A., & Khan, AR (2014). Comportamento bioativo de biocerâmicas à base de fosfato de cálcio substituído por silício para regeneração óssea. *Ciência e Engenharia de Materiais C*, 35, 245–252.
- Lee, JS, Baek, SD, Venkatesan, J., Bhatnagar, I., Chang, HK, Kim, HT, & Kim, SK (2014). Estudo in vivo de scaffolds de quitosana-nano hidróxiapatita natural para regeneração de tecido ósseo. *Revista Internacional de Macromoléculas Biológicas*, 67, 360–366.
- Marcos, RL, Arnold, G., Magnenet, V., Rahouadj, R., Magdalou, J., & Lopes-Martins, RAB (2014). Efeito protetor biomecânico e bioquímico da terapia a laser de baixa intensidade para tendinite do calcâneo. *Revista do comportamento mecânico de materiais biomédicos*, 29, 272–285.
- Marsh, H., Heintz, EA e Rodriguez-Reinoso, F. (1997). *Introdução às tecnologias de carbono*. Universidade de Alicante, Secretariado de Publicações.
- Martino, MM, Briquez, PS, Maruyama, K., & Hubbell, JA (2015). Sistemas de entrega de fator de crescimento inspirados em matriz extracelular para regeneração óssea. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 94, 41–52.
- Matsumoto, MA, Caviqioli, G., Bigueti, CC, Holgado, L. de A., Saraiva, PP, Renno, AC, & Kawakami, RY (2012). Uma nova vitrocerâmica bioativa apresenta respostas biológicas semelhantes às dos enxertos ósseos autógenos. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23, 1447–1456.
- Mehboob, H., & Chang, SH (2014). Aplicação de compósitos em próteses ortopédicas para cura óssea eficaz: Uma revisão. *Estruturas compostas*, 118, 328–341.
- Meyer, RA, Tsahakis, PJ, Martin, DF, Banks, DM, Harrow, ME, e Kiebzak, G. M. (2001). A idade e a ovariectomia prejudicam tanto a normalização da função mecânica propriedades e a acreção de mineral pelo calo de fratura em ratos. *Journal of Orthopaedic Research*, 19, 428–435.
- Niinomi, M., Narushima, T. e Nakai, M. (2015). *Avanços em biomateriais metálicos: Processamento e aplicações*. Springer.
- Nishimori, H., Kondoh, M., Isoda, K., Tsunoda, S., Tsutsumi, Y., & Yagi, K. (2009). Nanopartículas de sílica hepatotóxicas. como *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72, 496–501.
- Oliveira, P., Ribeiro, DA, Pipi, EF, Driusso, P., Parizotto, NA, & Renno, AC (2010). A terapia a laser de baixa intensidade não modula os resultados de uma vitrocerâmica altamente bioativa (Biosilicato) na consolidação óssea em ratos. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21, 1379–1384.

- Olivera, M., Martínez, MP, Conti, MI, Bozzini, C., Bozzini, CE, & Alippi, RM (2008). Redução permanente do tamanho mandibular e da rigidez óssea induzida em ratos pós-desmame pela ciclofosfamida. *Arquivos de Biologia Oral*, 54, 6–11.
- Orimo, H. (2010). O mecanismo de mineralização e o papel da fosfatase alcalina na saúde e na doença. *Revista da Escola Médica Nippon*, 77, 4–12.
- Papadimitropoulos, A., Scotti, C., Bourguine, P., Scherberich, A., & Martin, I. (2015). Matrizes descellularizadas projetadas para instruir processos de regeneração óssea. *Ossos*, 70, 66–72.
- Peppas, NA, Hilt, JZ e Thomas, JB (2007). *Nanotecnologia em terapêutica: Tecnologia atual e aplicações*. Horizon Scientific Press.
- Planell, JA e Navarro, M. (2009). Desafios da reparação óssea. Em JA Planell, SM Best, D. Lacroix e A. Merolli (Eds.), *Biomateriais de reparo ósseo* (pp. xx–xx). Imprensa CRC.
- Schindeler, A., McDonald, MM, Bokko, P., & Little, DG (2008). Remodelação óssea durante reparo de fratura: O quadro celular. *Seminários em Biologia Celular e do Desenvolvimento*, 19, 459–466.
- Shin, M., Lim, J., Park, Y., Lee, JY, Yoon, J., & Choi, JW (2024, 28 de fevereiro). Nanocompósitos à base de carbono para aplicações biomédicas. *RSC Advances*, 14(10), 7142–7156. <https://doi.org/10.1039/d3ra08946k>
- Shrivats, AR, McDermott, MC e Hollinger, J. O. (2014). Engenharia de tecido ósseo: Estado da união. *Drug Discovery Today*, 19, 781–786.
- Srouji, S., & Livne, E. (2005). Células-tronco da medula óssea e andaime biológico para reparo ósseo no envelhecimento e na doença. *Mecanismos de Envelhecimento e Desenvolvimento*, 126, 281–287.
- Sukirtha, R., Priyanka, K., Antony, JJ, Kamalakkannan, S., Thangam, R., Gunasekaran, P., Krishnan, M., & Achiraman, S. (2012). Efeito citotóxico de nanopartículas de prata sintetizadas verdes usando *Melia azedarach* contra linhas de células HeLa in vitro e modelo de camundongos com linfoma. *Bioquímica de Processos*, 47, 273–279.
- Tan, L., Yu, X., Wan, P. e Yang, K. (2013). Materiais biodegradáveis para reparos ósseos: Uma revisão. *Journal of Materials Science & Technology*, 29, 503–513.
- Tejero, R., Anitua, E., & Orive, G. (2014). Rumo à superfície biomimética do implante: Biopolímeros em implantes à base de titânio para regeneração óssea. *Progress in Polymer Science*, 39, 1406–1447.
- Venkatesan, J., Bhatnagar, I., Manivasagan, P., Kang, KH, & Kim, SK (2015). Compósitos de alginato para engenharia de tecido ósseo: Uma revisão. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 269–281.
- Wang, S., Wang, X., Draenert, FG, Albert, O., Schröder, HC, Mailänder, V., Mitov, G., & Müller, WEG (2014). Biomaterial de sílica bioativo e biodegradável para regeneração óssea. *Ossos*, 67, 292–304.
- Yavari, SA, van der Stok, J., Chai, YC, Wauthle, R., Tahmasebi Birgani, Z., Habibovic, P., Mulier, M., Schrooten, J., Weinans, H., & Zadpoor, AA (2014). Desempenho de regeneração óssea de titânio poroso tratado na superfície. *Biomaterials*, 35, 6172–6181.
- Zhao, J., Zhang, W., Shen, D., et al. (2023). Preparação de materiais de carbono porosos a partir de lignina de licor negro e sua utilização como adsorventes de CO₂. *Journal of the Energy Institute*, 107, 101179. <https://doi.org/10.1016/j.joei.2023.101179>
- Zhao, W., Fierro, V., Fernández-Huerta, N., Izquierdo, MT, & Celzard, A. (2012). Impacto das condições de síntese de carvões ativadas de KOH em suas capacidades de armazenamento de hidrogênio. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 14278–14284.

APÊNDICE

Tabela A1. Tela de impressão da análise estatística do SGOT (Ver Fig. 2A)

| 1way ANOVA | | | | | | |
|------------|--|------------|----------|------------------------|---------|-----------------|
| 7 | Number of groups | 6 | | | | |
| 8 | F | 1.757 | | | | |
| 9 | R squared | 0.2680 | | | | |
| 10 | | | | | | |
| 11 | Bartlett's test for equal variances | | | | | |
| 12 | Bartlett's statistic (corrected) | 11.43 | | | | |
| 13 | P value | 0.0435 | | | | |
| 14 | P value summary | * | | | | |
| 15 | Do the variances differ signif. (P < 0.05) | Yes | | | | |
| 16 | | | | | | |
| 17 | ANOVA Table | SS | df | MS | | |
| 18 | Treatment (between columns) | 16650 | 5 | 3330 | | |
| 19 | Residual (within columns) | 45490 | 24 | 1895 | | |
| 20 | Total | 62140 | 29 | | | |
| 21 | | | | | | |
| 22 | Tukey's Multiple Comparison Test | Mean Diff. | q | Significant? P < 0.05? | Summary | 95% CI of diff |
| 23 | C vs NT | 34.30 | 1.762 | No | ns | -50.83 to 119.4 |
| 24 | C vs AC1 | -37.87 | 1.945 | No | ns | -123.0 to 47.27 |
| 25 | C vs AC2 | -25.49 | 1.309 | No | ns | -110.6 to 59.65 |
| 26 | C vs AC3 | -25.61 | 1.315 | No | ns | -110.7 to 59.53 |
| 27 | C vs AC4 | -7.207 | 0.3702 | No | ns | -92.35 to 77.93 |
| 28 | NT vs AC1 | -72.18 | 3.707 | No | ns | -157.3 to 12.96 |
| 29 | NT vs AC2 | -59.79 | 3.071 | No | ns | -144.9 to 25.35 |
| 30 | NT vs AC3 | -59.91 | 3.077 | No | ns | -145.0 to 25.23 |
| 31 | NT vs AC4 | -41.51 | 2.132 | No | ns | -126.6 to 43.63 |
| 32 | AC1 vs AC2 | 12.39 | 0.6362 | No | ns | -72.75 to 97.52 |
| 33 | AC1 vs AC3 | 12.27 | 0.6300 | No | ns | -72.87 to 97.40 |
| 34 | AC1 vs AC4 | 30.66 | 1.575 | No | ns | -54.47 to 115.8 |
| 35 | AC2 vs AC3 | -0.1200 | 0.006165 | No | ns | -85.26 to 85.02 |
| 36 | AC2 vs AC4 | 18.28 | 0.9388 | No | ns | -66.86 to 103.4 |
| 37 | AC3 vs AC4 | 18.40 | 0.9450 | No | ns | -66.74 to 103.5 |

Tabela A2. Tela de impressão da análise estatística do SGPT (Ver Fig. 2B)

| 1way ANOVA | | | | | | |
|------------|--|------------|---------|------------------------|---------|-----------------|
| 7 | Number of groups | 6 | | | | |
| 8 | F | 1.790 | | | | |
| 9 | R squared | 0.2717 | | | | |
| 10 | | | | | | |
| 11 | Bartlett's test for equal variances | | | | | |
| 12 | Bartlett's statistic (corrected) | 3.201 | | | | |
| 13 | P value | 0.6691 | | | | |
| 14 | P value summary | ns | | | | |
| 15 | Do the variances differ signif. (P < 0.05) | No | | | | |
| 16 | | | | | | |
| 17 | ANOVA Table | SS | df | MS | | |
| 18 | Treatment (between columns) | 8532 | 5 | 1706 | | |
| 19 | Residual (within columns) | 22870 | 24 | 953.1 | | |
| 20 | Total | 31410 | 29 | | | |
| 21 | | | | | | |
| 22 | Tukey's Multiple Comparison Test | Mean Diff. | q | Significant? P < 0.05? | Summary | 95% CI of diff |
| 23 | C vs NT | -43.18 | 3.128 | No | ns | -103.6 to 17.19 |
| 24 | C vs AC1 | -22.06 | 1.598 | No | ns | -82.43 to 38.32 |
| 25 | C vs AC2 | -42.32 | 3.065 | No | ns | -102.7 to 18.06 |
| 26 | C vs AC3 | -49.20 | 3.564 | No | ns | -109.6 to 11.17 |
| 27 | C vs AC4 | -22.98 | 1.664 | No | ns | -83.35 to 37.40 |
| 28 | NT vs AC1 | 21.12 | 1.530 | No | ns | -39.25 to 81.50 |
| 29 | NT vs AC2 | 0.8665 | 0.06276 | No | ns | -59.51 to 61.24 |
| 30 | NT vs AC3 | -6.019 | 0.4360 | No | ns | -66.39 to 54.36 |
| 31 | NT vs AC4 | 20.20 | 1.463 | No | ns | -40.17 to 80.58 |
| 32 | AC1 vs AC2 | -20.26 | 1.467 | No | ns | -80.63 to 40.12 |
| 33 | AC1 vs AC3 | -27.14 | 1.966 | No | ns | -87.52 to 33.23 |
| 34 | AC1 vs AC4 | -0.9203 | 0.06666 | No | ns | -61.30 to 59.45 |
| 35 | AC2 vs AC3 | -6.886 | 0.4987 | No | ns | -67.26 to 53.49 |
| 36 | AC2 vs AC4 | 19.34 | 1.401 | No | ns | -41.04 to 79.71 |
| 37 | AC3 vs AC4 | 26.22 | 1.899 | No | ns | -34.15 to 86.60 |
| 38 | | | | | | |

Tabela A3. Tela de impressão da análise estatística da Ureia (Ver Fig. 2C)

| 1way ANOVA | | | | | | |
|------------|--|------------|--------|------------------------|---------|-------------------|
| 7 | Number of groups | 6 | | | | |
| 8 | F | 2.134 | | | | |
| 9 | R squared | 0.3078 | | | | |
| 10 | | | | | | |
| 11 | Bartlett's test for equal variances | | | | | |
| 12 | Bartlett's statistic (corrected) | 9.464 | | | | |
| 13 | P value | 0.0919 | | | | |
| 14 | P value summary | ns | | | | |
| 15 | Do the variances differ signif. (P < 0.05) | No | | | | |
| 16 | | | | | | |
| 17 | ANOVA Table | SS | df | MS | | |
| 18 | Treatment (between columns) | 68.72 | 5 | 13.74 | | |
| 19 | Residual (within columns) | 154.5 | 24 | 6.439 | | |
| 20 | Total | 223.3 | 29 | | | |
| 21 | | | | | | |
| 22 | Tukey's Multiple Comparison Test | Mean Diff. | q | Significant? P < 0.05? | Summary | 95% CI of diff |
| 23 | C vs NT | -2.192 | 1.932 | No | ns | -7.155 to 2.770 |
| 24 | C vs AC1 | -3.325 | 2.930 | No | ns | -8.288 to 1.637 |
| 25 | C vs AC2 | -4.936 | 4.350 | No | ns | -9.899 to 0.02647 |
| 26 | C vs AC3 | -2.408 | 2.122 | No | ns | -7.371 to 2.555 |
| 27 | C vs AC4 | -1.592 | 1.403 | No | ns | -6.555 to 3.370 |
| 28 | NT vs AC1 | -1.133 | 0.9984 | No | ns | -6.096 to 3.830 |
| 29 | NT vs AC2 | -2.744 | 2.418 | No | ns | -7.706 to 2.219 |
| 30 | NT vs AC3 | -0.2156 | 0.1900 | No | ns | -5.178 to 4.747 |
| 31 | NT vs AC4 | 0.6000 | 0.5287 | No | ns | -4.363 to 5.563 |
| 32 | AC1 vs AC2 | -1.611 | 1.419 | No | ns | -6.573 to 3.352 |
| 33 | AC1 vs AC3 | 0.9174 | 0.8084 | No | ns | -4.045 to 5.880 |
| 34 | AC1 vs AC4 | 1.733 | 1.527 | No | ns | -3.230 to 6.696 |
| 35 | AC2 vs AC3 | 2.528 | 2.228 | No | ns | -2.434 to 7.491 |
| 36 | AC2 vs AC4 | 3.344 | 2.947 | No | ns | -1.619 to 8.306 |
| 37 | AC3 vs AC4 | 0.8156 | 0.7187 | No | ns | -4.147 to 5.778 |
| 38 | | | | | | |

Tabela A4. Tela de impressão da análise estatística da Fosfatase Alcalina (Ver Fig.4)

| 1way ANOVA | | | | | | |
|------------|--|------------|---------|------------------------|---------|------------------|
| 7 | Number of groups | 6 | | | | |
| 8 | F | 21.06 | | | | |
| 9 | R squared | 0.8144 | | | | |
| 10 | | | | | | |
| 11 | Bartlett's test for equal variances | | | | | |
| 12 | Bartlett's statistic (corrected) | 3.710 | | | | |
| 13 | P value | 0.5918 | | | | |
| 14 | P value summary | ns | | | | |
| 15 | Do the variances differ signif. (P < 0.05) | No | | | | |
| 16 | | | | | | |
| 17 | ANOVA Table | SS | df | MS | | |
| 18 | Treatment (between columns) | 139700 | 5 | 27940 | | |
| 19 | Residual (within columns) | 31830 | 24 | 1326 | | |
| 20 | Total | 171500 | 29 | | | |
| 21 | | | | | | |
| 22 | Tukey's Multiple Comparison Test | Mean Diff. | q | Significant? P < 0.05? | Summary | 95% CI of diff |
| 23 | CTL vs NT | -165.4 | 10.15 | Yes | *** | -236.6 to -94.13 |
| 24 | CTL vs AC1 | -1.571 | 0.09646 | No | ns | -72.80 to 69.65 |
| 25 | CTL vs AC2 | 56.03 | 3.440 | No | ns | -15.20 to 127.3 |
| 26 | CTL vs AC3 | -42.66 | 2.619 | No | ns | -113.9 to 28.57 |
| 27 | CTL vs AC4 | -10.24 | 0.6284 | No | ns | -81.46 to 60.99 |
| 28 | NT vs AC1 | 163.8 | 10.06 | Yes | *** | 92.56 to 235.0 |
| 29 | NT vs AC2 | 221.4 | 13.59 | Yes | *** | 150.2 to 292.6 |
| 30 | NT vs AC3 | 122.7 | 7.533 | Yes | *** | 51.47 to 193.9 |
| 31 | NT vs AC4 | 155.1 | 9.524 | Yes | *** | 83.89 to 226.3 |
| 32 | AC1 vs AC2 | 57.60 | 3.537 | No | ns | -13.62 to 128.8 |
| 33 | AC1 vs AC3 | -41.09 | 2.523 | No | ns | -112.3 to 30.14 |
| 34 | AC1 vs AC4 | -8.664 | 0.5319 | No | ns | -79.89 to 62.56 |
| 35 | AC2 vs AC3 | -98.69 | 6.059 | Yes | ** | -169.9 to -27.47 |
| 36 | AC2 vs AC4 | -66.27 | 4.068 | No | ns | -137.5 to 4.960 |
| 37 | AC3 vs AC4 | 32.43 | 1.991 | No | ns | -38.80 to 103.7 |
| 38 | | | | | | |

Tabela A5. Tela de impressão da análise estatística de Fmax (Ver Fig. 6A)

| 1way ANOVA | | | | | | |
|------------|--|------------|---------|------------------------|---------|------------------|
| 1 | Table Analyzed | Fmax (N) | | | | |
| 2 | | | | | | |
| 3 | One-way analysis of variance | | | | | |
| 4 | P value | < 0.0001 | | | | |
| 5 | P value summary | *** | | | | |
| 6 | Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes | | | | |
| 7 | Number of groups | 6 | | | | |
| 8 | F | 10.87 | | | | |
| 9 | R squared | 0.6937 | | | | |
| 10 | | | | | | |
| 11 | Bartlett's test for equal variances | | | | | |
| 12 | Bartlett's statistic (corrected) | 4.351 | | | | |
| 13 | P value | 0.5001 | | | | |
| 14 | P value summary | ns | | | | |
| 15 | Do the variances differ signif. (P < 0.05) | No | | | | |
| 16 | | | | | | |
| 17 | ANOVA Table | SS | df | MS | | |
| 18 | Treatment (between columns) | 9483 | 5 | 1893 | | |
| 19 | Residual (within columns) | 4179 | 24 | 174.1 | | |
| 20 | Total | 13640 | 29 | | | |
| 21 | | | | | | |
| 22 | Tukey's Multiple Comparison Test | Mean Diff. | q | Significant? P < 0.05? | Summary | 95% CI of diff |
| 23 | CTL vs NT | 57.83 | 9.799 | Yes | *** | 32.02 to 83.63 |
| 24 | CTL vs CA1 | 32.86 | 5.568 | Yes | ** | 7.053 to 58.67 |
| 25 | CTL vs CA2 | 32.65 | 5.532 | Yes | ** | 6.839 to 58.45 |
| 26 | CTL vs CA3 | 44.29 | 7.505 | Yes | *** | 18.48 to 70.10 |
| 27 | CTL vs CA4 | 24.97 | 4.231 | No | ns | -0.8373 to 50.78 |
| 28 | NT vs CA1 | -24.97 | 4.231 | No | ns | -50.77 to 0.8381 |
| 29 | NT vs CA2 | -25.18 | 4.267 | No | ns | -50.99 to 0.6239 |
| 30 | NT vs CA3 | -13.54 | 2.294 | No | ns | -39.34 to 12.27 |
| 31 | NT vs CA4 | -32.86 | 5.568 | Yes | ** | -58.67 to -7.053 |
| 32 | CA1 vs CA2 | -0.2142 | 0.03630 | No | ns | -28.02 to 25.59 |
| 33 | CA1 vs CA3 | 11.43 | 1.937 | No | ns | -14.38 to 37.24 |
| 34 | CA1 vs CA4 | -7.891 | 1.337 | No | ns | -33.70 to 17.92 |
| 35 | CA2 vs CA3 | 11.64 | 1.973 | No | ns | -14.16 to 37.45 |
| 36 | CA2 vs CA4 | -7.677 | 1.301 | No | ns | -33.48 to 18.13 |
| 37 | CA3 vs CA4 | -19.32 | 3.274 | No | ns | -45.13 to 6.486 |
| 38 | | | | | | |

Tabela A6. Tela de impressão da análise estatística de Fmax X Dmax (Ver Fig. 6B)

| | | | | | | |
|----|--|------------|---------|------------------------|---------|--------------------|
| 1 | Table Analyzed | Dmax (mm) | | | | |
| 2 | | | | | | |
| 3 | One-way analysis of variance | | | | | |
| 4 | P value | 0.1522 | | | | |
| 5 | P value summary | ns | | | | |
| 6 | Are means signif. different? (P < 0.05) | No | | | | |
| 7 | Number of groups | 6 | | | | |
| 8 | F | 1.794 | | | | |
| 9 | R squared | 0.2721 | | | | |
| 10 | | | | | | |
| 11 | Bartlett's test for equal variances | | | | | |
| 12 | Bartlett's statistic (corrected) | 7.635 | | | | |
| 13 | P value | 0.1776 | | | | |
| 14 | P value summary | ns | | | | |
| 15 | Do the variances differ signif. (P < 0.05) | No | | | | |
| 16 | | | | | | |
| 17 | ANOVA Table | SS | df | MS | | |
| 18 | Treatment (between columns) | 0.1220 | 5 | 0.02440 | | |
| 19 | Residual (within columns) | 0.3263 | 24 | 0.01360 | | |
| 20 | Total | 0.4483 | 29 | | | |
| 21 | | | | | | |
| 22 | Tukey's Multiple Comparison Test | Mean Diff. | q | Significant? P < 0.05? | Summary | 95% CI of diff |
| 23 | CTL vs NT | -0.01731 | 0.3319 | No | ns | -0.2454 to 0.2107 |
| 24 | CTL vs CA1 | -0.1090 | 2.090 | No | ns | -0.3370 to 0.1191 |
| 25 | CTL vs CA2 | 0.1002 | 1.921 | No | ns | -0.1279 to 0.3282 |
| 26 | CTL vs CA3 | 0.04769 | 0.9145 | No | ns | -0.1804 to 0.2757 |
| 27 | CTL vs CA4 | 0.003692 | 0.07080 | No | ns | -0.2244 to 0.2317 |
| 28 | NT vs CA1 | -0.09167 | 1.758 | No | ns | -0.3197 to 0.1364 |
| 29 | NT vs CA2 | 0.1175 | 2.253 | No | ns | -0.1105 to 0.3455 |
| 30 | NT vs CA3 | 0.0650 | 1.246 | No | ns | -0.1630 to 0.2930 |
| 31 | NT vs CA4 | 0.02100 | 0.4027 | No | ns | -0.2070 to 0.2490 |
| 32 | CA1 vs CA2 | 0.2092 | 4.011 | No | ns | -0.01888 to 0.4372 |
| 33 | CA1 vs CA3 | 0.1567 | 3.004 | No | ns | -0.07138 to 0.3847 |
| 34 | CA1 vs CA4 | 0.1127 | 2.160 | No | ns | -0.1154 to 0.3407 |
| 35 | CA2 vs CA3 | -0.05250 | 1.007 | No | ns | -0.2805 to 0.1755 |
| 36 | CA2 vs CA4 | -0.09650 | 1.850 | No | ns | -0.3245 to 0.1315 |
| 37 | CA3 vs CA4 | -0.04400 | 0.8437 | No | ns | -0.2720 to 0.1840 |
| 38 | | | | | | |

Aviso Legal/Nota do Editor: As declarações, opiniões e dados contidos em todas as publicações são exclusivamente dos autores e colaboradores individuais e não do editor e/ou do(s) editor(es). Este editor e/ou o(s) editor(es) isentam-se de responsabilidade por qualquer dano a pessoas ou propriedade resultante de quaisquer ideias, métodos, instruções ou produtos mencionados no conteúdo.

© Copyright (2025): Autor(es). O licenciado é o editor do periódico. Este é um artigo de acesso aberto distribuído sob os termos da Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), que permite uso irrestrito, distribuição e reprodução em qualquer meio, desde que o trabalho original seja devidamente citado.

Histórico de revisão por pares:

O histórico de revisão por pares deste artigo pode ser acessado aqui:

<https://www.sdiarticle5.com/review-history/128918>