

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E AVALIAÇÃO *IN VIVO* DE UM SCAFFOLD DE
HIDROXIAPATITA/NÍOBIO**

SALOMÉ RIBEIRO DA SILVA

**NATAL
2024**

SALOMÉ RIBEIRO DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E AVALIAÇÃO *IN VIVO* DE UM SCAFFOLD DE
HIDROXIAPATITA/NÍÓBIO

Trabalho apresentado à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, como requisito do curso de Mestrado em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profª Drª Aurigena Antunes

NATAL
2024

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial do Centro Ciências da Saúde - CCS

Silva, Salomé Ribeiro da.

Caracterização física e avaliação in vivo de um scaffold de hidroxiapatita/nióbio / Salomé Ribeiro da Silva. - 2025.
46f.: il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Natal, RN, 2025.
Orientação: Aurigena Antunes.

1. Nióbio - Dissertação. 2. Hidroxiapatita - Dissertação. 3. Biocerâmica - Dissertação. I. Antunes, Aurigena. II. Título.

RN/UF/BS-CCS

CDU 546.882

**Caracterização física e avaliação *in vivo* de um scaffold de
Hidroxiapatita/Nióbio.**

Defesa apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

APROVADA EM: 27/12/2024

BANCA EXAMINADORA

Dra. AURIGENA ANTUNES DE ARAUJO,
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN
Presidente da Banca

Dra. HELLÍADA VASCONCELOS CHAVES
Universidade Federal do Ceará – UFC
Externa à Instituição

Dra. NAISANDRA BEZERRA DA SILVA FARIAS
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN
Externa ao Programa

NATAL

2024

RESUMO

A hidroxiapatita (Hap) é um composto muito estudado e utilizado para uso clínico, devido se tratar de um componente mineral presente na formação dos ossos, sua utilização fornece condições para o crescimento ósseo, permitindo assim, a fixação biológica de enxertos que são amplamente utilizados para reconstruções de tecidos orgânicos, muito pouco se avançou com relação a materiais capazes de cumprirem com excelência a função de um material que fosse capaz de ter a característica de osseointegração, nesse sentido a busca por novos elementos constituintes das peças enxertadas surge como motivação de estudos, uma vez que fornece ao paciente uma opção de escolha para seus tratamentos. Nesse sentido pensou-se em um compósito de Hidroxiapatita/Nióbio como material biocerâmico, o mesmo foi caracterizado quanto a sua morfologia [Difração de raios-X (XRD)], tensão, trinca e tenacidade e feito análise *in vivo* em modelo de calota craniana com defeito crítico de 8 mm realizado em ratos wistar, sendo 3 grupos experimentais: Controle (GC) - (controle positivo); Hap (padrão de hidroxiapatita) e (CNb/CPO - Hidroxiapatita/Niobio). Após 90 dias os animais foram eutanasiados e as amostras avaliadas através de Micro CT, HE e imunohistoquímica. Os dados obtidos foram avaliados estatisticamente através do teste de ANOVA e como resultados tivemos: Nos resultados mecânicos de DRX observou-se na amostra pura a presença de Hap cristalina hexagonal e um grupo espacial P63/m, já no grupo com Nb observou-se a presença de fosfato β -tricálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) e Fersmita (CaNb_2O_6), podendo está relacionado com a decomposição da Hap na presença do Nb. Na análise do FRX foi obtido resultados próximos ao da moagem, comprovando que a técnica utilizada foi eficiente. Quanto a presença de indentições e trincas, houve um pequeno aumento na tenacidade à fratura da Hap (0,78 MPa.m^{1/2}) para Hap/Nb (0,82 MPa.m^{1/2}).

Como resultados in vivo: a micro-CT mostrou aumento do número trabecular ($p < 0,001$), diminuição das porosidades (%) ($p < 0,001$) e diminuição da separação trabecular (mm) ($p < 0,001$) no grupo CNb/CPO em comparação ao grupo GC. No grupo CNb/CPO apresentou presença de osso novo no qual o tecido conjuntivo se diferencia para formar ou indicar um escore de matriz óssea 3 (3-3,75, $p < 0,05$) e forte imunexpressão de osteopontina ($p < 0,05$). Os resultados indicam que CNb/CPO apresentou resistência à propagação de fissuras e estimulou a formação óssea em defeitos de calvária em ratos.

Palavras-chave: Hidroxiapatita, Nióbio, biocerâmica.

ABSTRACT

Hydroxyapatite (Hap) is a highly trained compound used for clinical use, due to the treatment of a mineral component present in the formation of bones, its use provides conditions for bone growth, thus allowing the biological fixation of grafts that are widely used for reconstructions of organic tissues, very little progress has been made in relation to materials capable of fulfilling with excellence the function of a material that is capable of having an osseointegration characteristic, in this sense the search for new constituent elements of the grafted pieces appears as a motivation of studies, as it provides the patient with an option to choose their treatments. In this sense, a Hydroxyapatite/Niobium compound was considered as a bioceramic material, it was characterized in terms of its morphology [X-ray diffraction (XRD), tension, cracking and tenacity and analyzed in vivo in a skullcap model with 8 mm critical defect performed in Wistar rats, with 3 experimental groups: Control (GC) - (positive control); Hap (hydroxyapatite standard) and (CNb/CPO - Hydroxyapatite/Niobio). After 90 days, the animals were euthanized and the samples were evaluated using Micro CT, HE and immunohistochemistry. The data obtained were statistically evaluated using the ANOVA test and the results were: In the mechanical results of XRD, the presence of hexagonal crystalline Hap and a P63/m space group was observed in the pure sample, while in the group with Nb, the presence of β -tricalcium phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) and Fersmite (CaNb_2O_6), which may be related to the decomposition of Hap in the presence of Nb. In the XRF analysis, results close to those of grinding were obtained, proving that the technique used was efficient. Regarding the presence of indentations and cracks, there was a small increase in fracture toughness from Hap ($0.78 \text{ MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$) to Hap/Nb ($0.82 \text{ MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$). As in vivo results: micro-CT showed an increase in trabecular number

($p < 0.001$), a decrease in porosities (%) ($p < 0.001$) and a decrease in trabecular separation (mm) ($p < 0.001$) in the CNb/CPO group in comparison to the CG group. In the CNb/CPO group, there was the presence of new bone in which the connective tissue differentiates to form or indicate a bone matrix score of 3 (3-3.75, $p < 0.05$) and strong immunoeexpression of osteopontin ($p < 0, 05$). The results indicate that CNb/CPO showed resistance to crack propagation and stimulated bone formation in calvarial defects in rats.

Keywords: Hydroxyapatite, Niobium, bioceramics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – DRX das amostras sintetizadas e fases presentes: Hap (a) e Hap-Nb (b).....	26
Figura 2 – MEV da endentação e trincas da Hap.....	27
Figura 3 – Análise de Micro-CT.....	28
Figura 4 – Coloração de HE.....	29
Figura 5 – Coloração Tricromo de Massoni.....	31
Figura 6 – Fotomicrografia demonstrando imreatividade para osteocalcinina e osteopontina.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados da análise química por FRX das amostras.....	26
Tabela 2 – Frequência absoluta e relativa (%) das células ósseas segundo grupo estudado.....	30

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

Ca(OH)₂ – Hidróxido de cálcio

DMO – Densidade Mineral Óssea

DRX- Difração de Raio - x

FRX – Fluorescência de Raio - x

H₃PO₄ – Ácido Fosfórico

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

NbO₅ – Pentóxido de Níbio

NH₄OH – Hidróxido de Amônio

OCN - Osteocalcina

OPN - Osteopontina

PBS – Phosphate Buffered Saline (Salina Tamponada com Fosfato)

UFRN – Universidade Federal do Rio Grande do Norte

VO – Volume Ósseo

VT – Volume de Tecido

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS.....	15
2.2	Objetivo Geral.....	15
2.2	Objetivos específicos	15
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
3.1	TECIDO ÓSSEO	15
3.2	MATERIAIS OSSEOINTEGRADOS.....	16
4	MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	19
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
6	RESULTADOS.....	25
7	DISCUSSÃO.....	32
8	CONCLUSÃO.....	36
	REFERÊNCIAS	37
	APÊNDICES.....	46

1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo possui, dentre outras características, uma capacidade de autorreparo e regeneração complexa e eficaz no organismo, graças aos mecanismos de regulação de mineralização caracterizados pelas células osteoclasticas e osteoblasticas. Todavia, esse reparo não se mostra eficaz frente a defeitos de maior escala, resultando na formação de pseudartro (não união da fratura) e uma conseqüente perda de função. Nesse contexto, os implantes osteointegrados são uma importante ferramenta da medicina e da odontologia na tentativa de promover uma melhora clínica nesses quadros (Burd; Pereira, 2021).

Os implantes, de maneira geral, são amplamente utilizados para reconstruções de tecidos orgânicos e muitos avanços já foram observados na área. Na odontologia os implantes ósseo-integrados são necessários para a reabilitação de pacientes e sua utilização cresceu significativamente nos últimos anos (Vidilli; Bolfarini; Campanelli, 2019), entretanto, muito pouco se avançou com relação a materiais capazes de cumprirem com excelência a função de um implante osteointegrado, nesse sentido a busca por novos elementos constituintes das peças implantadas surge como motivação de estudos, uma vez que fornece ao paciente uma opção de escolha para seus tratamentos.

Na perspectiva dos materiais utilizados em implantes, o titânio sempre foi referência na literatura e se manteve durante muito tempo como uma das únicas alternativas para a área da implantodontia por conta de sua leveza, alta resistência e ser inerte no organismo, causando assim mínima atividade de rejeição tecidual (Bispo, 2019). Porém, com o avanço da tecnologia nas áreas da saúde, os materiais cerâmicos passaram a se mostrar viáveis como substitutos do titânio, uma

vez que não apresentam a problemática de cor nem de condutibilidade elétrica, além de, em alguns casos, auxiliar no processo de integração óssea e não somente estabilizar um defeito (Sivaraman et al., 2017).

Na vertente dos materiais cerâmicos pode-se destacar a hidroxiapatita (Hap), com uma composição muito semelhante a encontrada nos tecidos ósseos do corpo humano, tal composto representa compatibilidade e osteocondutividade, representando assim uma característica única, uma vez que pode se integrar ao tecido e auxiliar no processo de remodelamento ósseo, entretanto, tal material tem como principal desvantagem sua baixa resistência, sendo incompatível com grandes áreas de defeito ou regiões de impacto (Ramesh; Moratti; Dias, 2017). Devido suas desvantagens pensamos em uma combinação de materiais, como alternativa para superar as limitações em diferentes propriedades (mecânicas, físicas e biológicas), nessa perspectiva o nióbio pode ser mencionado dada a sua capacidade química estrutural de, em conjunto com metais e cerâmicas, aferir uma maior resistência mecânica nas estruturas cristalinas do material. Além disso, pouca carga de nióbio representa aumento significativo de resistência aos componentes mistos que ele se conecta, possibilitando assim uma alta carga de potencial biológico ser utilizada com maior segurança (Safavi et al., 2022).

Pensando nesses fatores, o presente trabalho busca propor uma união das excelentes propriedades do nióbio e da hidroxiapatita como alternativas para a área de biomaterial ósseo, buscando verificar uma proporção de trabalho que garanta resistência, biocompatibilidade e osteocondutividade por meio da averiguação *in vivo*, utilizando pastilhas de Nióbio e Nióbio/Hidroxiapatita utilizando ratos Wistar machos, sendo: 08 para cada grupo de estudo.

2 OBJETIVOS

2.2 Objetivo Geral

Estudar a associação de hidroxiapatita / nióbio, e avaliar seu desempenho através de uma avaliação *in vivo*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar *in vivo* em modelo de calota craniana com defeito crítico em ratos a microarquitetura óssea pelo micro CT.
- Avaliar *in vivo* em modelo de calota craniana com defeito crítico em ratos as características morfológicas por HE e proteínas por imunohistoquímica.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 TECIDO ÓSSEO

O osso é um órgão formado por tecido conjuntivo altamente dinâmico constituído de uma rede complexa de células incorporadas em uma estrutura 3D de nanocompósito orgânico-inorgânico, que confere desempenho mecânico notável, incluindo alta resistência e tenacidade à fratura (Vitale et al., 2022), tal tecido é essencial à vida devido às suas várias funções, como locomoção, sustentação, proteção de órgãos vitais, notavelmente o sistema nervoso central, e no alojamento de células-tronco hematopoiéticas na medula óssea, participando na formação do sangue. Tem papel fundamental na homeostase do fosfo-cálcio, permitindo o armazenamento de minerais, tais como, cálcio e fósforo e a síntese de moléculas que interagem com outros órgãos através da circulação (Jannin ; Kerlan; Desailoud, 2022). É um dos poucos tecidos com capacidade de regeneração recriando sua composição celular natural, orientação e resistência mecânica (Wildemann et al., 2021) e para manter o equilíbrio dinâmico, o osso, precisa de mecanismos de renovação celular conhecidos como

osteoclastogênese, por meio de osteoclastos reabsorventes de osso e osteoblastogênese por meio de osteoblastos formadores de osso (Vitale et al., 2022).

Para que esse equilíbrio na dinâmica óssea aconteça é necessário a expressão e envolvimento de marcadores específicos, dentre eles, Osteopontina e Osteocalcina. A osteocalcina (OCN) é uma proteína não colágena sintetizada por células osteoblásticas que é encontrada na matriz óssea, é um ligante de íons Ca^{2+} , hidroxiapatita e colágeno que desempenha um papel na deposição de hidroxiapatita sendo expressa nas fases intermediária e tardia da maturação dos osteoblastos (Utomo et al., 2023). Outro marcador importante é a Osteopontina (OPN) uma proteína da matriz extracelular identificada como uma proteína da matriz orgânica óssea não colagenosa. A OPN tem um potencial de ação tanto anti-inflamatórios quanto pró-inflamatórios, agindo no acionamento e diferenciação de macrófagos e modulando a expressão da MMP-2 e citocinas através da inibição de óxido nítrico (Meenakshisundaram, 2009).

3.2 MATERIAIS OSSEOINTEGRADOS

As interações de um biomaterial com tecidos devem ser determinadas para que o material seja totalmente compatível com o corpo por um longo tempo. O tecido e o ambiente onde o material é implantado são altamente afetados por seu conteúdo (Ayse, 2023). A hidroxiapatita (Hap) é um dos compostos mais estudados e utilizados para finalidades clínicas, sobretudo pelo fato de se tratar de um componente mineral com maior destaque na formação de ossos e dentes, sua utilização fornece condições para o crescimento ósseo, permitindo assim, a fixação biológica de implantes (Asgharzadeh; Ayatollahi; Asnafi, 2017; Farias et al., 2020). No entanto a fragilidade da hidroxiapatita tem levado pesquisadores a pensar em materiais que consigam unir as propriedades excelentes da

hidroxiapatita e propiciar maior resistência para esse material, diante dessa necessidade à indústria vem estudando materiais que possam exercer essa função e o Nióbio vem ganhando foco no debate científico brasileiro, com suas propriedades que contemplam uma ampla gama de usos na indústria. Esse metal de transição é utilizado para aprimorar ligas metálicas em diferentes áreas; sua presença em solo brasileiro é bem marcante e coloca o país como o maior produtor do metal, com cerca de 89% em representabilidade no mercado global. Estimativas do Ministério de Minas e Energia é que em 2050 o Brasil tenha uma produção de 171,7 mil toneladas de nióbio em 2050, alavancando ainda mais a economia nacional (MME, 2023). O nióbio é um metal refratário, possui alta estabilidade térmica, propriedades resistentes à erosão, baixa pressão de vapor, boa estabilidade química em uma variedade de ambientes hostis, excelente resistência à corrosão, alta resistência ao desgaste, excelente ductilidade à temperatura ambiente, biocompatibilidade favorável e baixa expansão térmica; essas propriedades o torna um metal essencial por garantir estabilidade química em ambiente fisiológico (Safavi et al., 2022).

Em seu trabalho Ayse (2023) usou uma liga metálica de Titânio-6Alumínio-7Nióbio utilizando uma linhagem de células de fibroblastos de camundongo L929 (ATCC CCL-1) e constatou que a liga contendo nióbio aumentou a proliferação celular e a mineralização de cálcio quando comparada com outra liga utilizada em seu estudo ($p < 0,05$), no entanto as ligas utilizadas não foram capazes de causar alterações na expressão de colágeno tipo 1 ou fibronectina nas células (Ayse, 2023). Devido suas características a indústria de materiais cerâmicos vem estudando o Nb e comprovando seu potencial em agregar resistência, também a materiais cerâmicos (Abdi; Oswald et al., 2016).

Rocha (2012) testou em seu trabalho a Hidroxiapatita com pentóxido de Nióbio tentando melhorar parâmetros de síntese e impacto funcional mostrando melhora na resistência do material quanto a seu uso como material a ser implantado, no entanto, não foi testado atividade biológica *in vivo* ou *in vitro* que demonstrasse seu papel como material biocerâmico, já Simomukay (2016) trabalhou com a associação de Hap dopada com Nb comprovando sua capacidade em aumentar resistência a hidroxiapatita, mas também, não testou sua atividade biológica. Uma associação com Hidroxiapatita, β Fosfato Tricálcico e Pentóxido de Nióbio foi avaliada e testada quanto as características físicas e seu potencial osteogênico utilizando calvárias de ratos Wistar e foi comprovado que o material usado foi capaz em 30 dias de apresentar cemento, substância produzida pelas células osteogênicas em diferenciação composta de duas proteínas não colagenosas, a osteopontina e a sialoproteína óssea, que fornecem locais específicos para deposição de fosfato de cálcio e em 45 dias já ser possível ver a capacidade osteogênica, demonstrando sua capacidade em formar tecido ósseo (Kiyochi Jr et al., 2020).

Essa excelência na associação do nióbio à hidroxiapatita se deve a capacidade do nióbio estabilizar-se com cristais de hidroxiapatita principalmente por sua estrutura molecular semelhante com a de íons fosfato. Sua adição em pequenas proporções causa um refinamento no tamanho das partículas bem como uma maior densificação da biocerâmica. Estudos *in vitro* em células humanas não demonstram citotoxicidade da associação do Fosfato de Cálcio modificado com Nióbio, caracterizando tal elemento como sendo de alto potencial a ser implantado (Capanema et al., 2015) e funciona com excelente potencial para promover a adesão e proliferação celular enquanto exhibe propriedades bioativas (Marins et al.,

2019).

Kiyochi Jr et al., (2019) procurou avaliar o aspecto estrutural, físico, propriedades mecânicas e biológicas de um nanocompósito formado a partir da sinterização de uma mistura de fosfato bifásico de cálcio extraído de espinhas de peixe e pentóxido de Nióbio e obteve resultados satisfatórios nas propriedades biocompatíveis, bioativas e osteocondutoras, da associação do material, além de não induzir fibrose demonstrando seu uso como excelente material bioinerte.

No entanto existem poucos trabalhos versando sobre o uso do Nióbio associado com a hidroxiapatita como material biocerâmico, dentre eles não foi visto a capacidade biológica do material, ou seja, não foram feitos experimentos que comprovem sua biocompatibilidade, osteocondutibilidade e osteogenicidade *in vivo*, mesmo com bons resultados em associar o Nb a Hap precisamos comprovar sua capacidade biológica para assim ser possível sua utilização como material biocerâmico, o que este trabalho se propõe, demonstrar um potencial material para a indústria biomédica com uma alta valorização de produto extraído da mineração nacional.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1.1 Materiais

Hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$, Synth, 98% de pureza), ácido fosfórico (H_3PO_4 , Vetec, 85% de pureza), Hidróxido de amônio (NH_4OH , Synth, 29% de pureza), Pentóxido de nióbio (Nb_2O_5 , doado pela Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração), Álcool Isopropílico (Synth) e água destilada foram os reagentes utilizados.

4.1.2 Síntese Hidroxiapatita

A Hap foi preparada no laboratório de engenharia de materiais da UFRN a

partir de soluções de hidróxido de cálcio e ácido fosfórico de acordo com a razão molar Ca/P = 1,67. A partir da preparação da solução de Ca (OH)₂, a solução de H₃PO₄ foi gotejada sobre ela. O pH da solução foi ajustado para 10 com solução de hidróxido de amônio. Finalmente, a solução resultante foi envelhecida a 80°C sob refluxo por 23 h. Após o envelhecimento, a solução foi centrifugada com água destilada para remover possíveis impurezas. Por fim, o pó foi seco a 100 °C em estufa por 24 h.

4.1.3 Síntese CNb/CPO

Os compósitos foram obtidos no laboratório de engenharia de materiais da UFRN a partir de moagem a úmido da Hap pura e pentóxido de nióbio sob razão mássica de 3:1. O tempo de processo foi de 4 horas e o solvente utilizado na moagem foi o álcool isopropílico. Após a moagem, o solvente foi evaporado numa chapa aquecedora e o pó foi seco em estufa a 100°C por 24 horas.

4.1.4 Preparação das Amostras Cilíndricas

Corpos de prova cilíndricos medindo 1mmx13mm foram obtidos em prensa hidráulica (Bovenau, P15200), com pressão de compactação de 74 MPa. Vinte amostras foram feitas para cada formulação. A sinterização dos corpos de prova foi sinterizada a 1200 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ por 4 horas.

4.1.5 Caracterizações

As fases cristalinas foram analisadas por Difração de Raios X (DRX, Shimadzu, XRD-7000), com radiação CuK α (1,5404 Å), varredura de 10° - 55° e passo de 0,02°.s⁻¹. A análise química foi realizada por Fluorescência de Raios-X (FRX, SHIMADZU, EDX-720) com tubo de ródio e cristais analisadores de prata. Para tenacidade à fratura, microdureza Vickers (microdurômetro Pantec, HVS-1000) foi realizada e imagens das indentações e trincas das amostras foram feitas num Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV, HITACHI, TM3000). Por fim, a

tenacidade à fratura foi estimada de acordo com a expressão de Anstis *et al.* (1981) com base no tamanho da trinca, carga aplicada e valor da dureza.

4.1.6 Processo de esterilização

Um pré tratamento das pastilhas se fez necessário através de um processo de esterilização em calor úmido. Foram dispostos em envelopes individualmente e nomeados em grupo controle (CG) HAp e Grupo CNb/CPO, posteriormente foram submetidos ao processo de esterilização à 121 °C por 30 minutos.

4.1.7 Modelo Experimental *in vivo*

Os experimentos foram realizadas em ratos Wistar machos (180-220 g) alojados em condições-padrão (12 horas de claro / escuro, 22 ± 2 °C), com acesso *ad libitum* a comida e água. Todo protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Brasil, sob o número de protocolo 230.019/2020. Os murinos foram obtidos do biotério do Departamento de Biofísica e Farmacologia. Durante todos os dias do experimento, todos os animais foram pesados para acompanhamento de perda/ganho de peso ou morte.

4.1.8 Grupo Controle e Experimental e tamanho da Amostra

Foram utilizados um total de 31 animais, no entanto somente 24 deles sobreviveram até o final dos experimentos. Tivemos perdas no procedimento cirúrgico, sendo na anestesia ou intraoperatório, mesmo seguindo todo o protocolo. Dividimos os grupos em: Grupo Controle (GC), Grupo Hap (Hap) e Grupo CNb/CPO. Em todos eles foram feitos defeitos cranianos induzidos com a idade de 90 dias. A incisão cirúrgica foi sintetizada com fio de sutura de mononylon 4-0. No GC foi feito o defeito crítico sem a adição da pastilha, no grupo Hap foi feito o defeito crítico e adicionado a pastilha de Hidroxiapatita, já o grupo

CNb/CPO foi feito o defeito e adicionado a pastilha de hidroxiapatita/nióbio. No final do experimento tivemos 8 ratos em cada grupo.

4.1.9 Criação de Defeito Crítico

Os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de Ketamina (10%, Vetnil, São Paulo, Brasil), na dose de 70 mg/kg, e Xilazina (2%, São Paulo, Brasil) na dose de 10 mg/kg e, previamente ao ato cirúrgico, será aplicado na pata direita uma dose de fentanil de 10mg/kg. Uma incisão foi feita na pele a partir da área do nariz frontal na protuberância do osso occipital externo, expondo a extensão da calvária. Um defeito craniano simétrico de espessura total de 8 mm foi realizado no centro do crânio do osso parietal, com uma broca de trefina acionada por um micromotor elétrico de 30.000 rpm (NSK®), sob irrigação constante de solução fisiológica estéril para evitar superaquecimento do osso. Foram implantados os compósitos nos grupos experimentais, e após foram suturados com fio para sutura cirúrgico 4-0. Para cuidado pós-operatório foi utilizado Tramadol 5mg/kg no pós-operatória via intraperitoneal, durante 05 dias de 12/12 horas adicionado uma dose de tramadol na concentração de 0,1mg/ml na água de consumo desses animais durante 05 dias (Jirkof et al., 2019). Os animais foram eutanasiados após 90 dias decorridos do defeito craniano, com uso do tiopental 0,5% (Cristália, São Paulo, Brasil) dose 90 mg/kg associada a lidocaina a 2% na dose de 30 mg/kg por via intraperitoneal. Após eutanásia os animais foram acondicionados em freezer -20 °C e coletados por empresa contratada pela UFRN. A calota craniana foi coletada e destinada às análises por micro CT (04 amostras/grupo), HE/imunohistoquímica (04 amostras/grupo) e Citocinas (04 amostras/grupo).

4.1.10 Análise Histológica

Para a histologia, os exemplares cranianos foram fixados em formol 10%,

desidratada em solução de etanol. Após esse processo ocorreu a descalcificação com ácido nítrico 5% durante 10 dias. Em seguida, os espécimes foram incluídos em blocos de parafina e cortes histológicos de 5 µm de espessura foram preparados e corados com Hematoxilina e Eosina e Tricrômico de Masson para avaliar toda a região do defeito, incluindo o centro do defeito e a interface entre o osso original e a área do defeito. A avaliação Hematoxilina e Eosina foi realizada sob microscopia óptica, para analisar os seguintes parâmetros histomorfológicos (Pretel et al., 2007; Carvalho et al., 2020):

(A) Inflamação - ausência de células inflamatórias (score 0), fraca presença de células inflamatórias (score 1); presença moderada de células inflamatórias (score 2), presença intensa de células inflamatórias (score 3).

(B) Tipos de células ósseas (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos) – ausência ou presença do tipo celular.

(C) Formação óssea - formação de tecido conjuntivo preenchendo o defeito com capilares sanguíneos, fibroblastos, macrófagos e fibras colágenas recém-formadas (score 1); tecido conjuntivo denso, sugerindo diferenciação de tecido ósseo com grande número de células osteogênicas e osteoprogenitoras com organização fibrosa (score 2); presença de osso novo em que o tecido conjuntivo se diferencia para formar ou indicar matriz óssea (score 3); formação de tecido ósseo maduro (pontuação 4).

Na coloração tricoma de Masson, a coloração vermelha indicou a matriz óssea madura e a coloração azul indicou nova matriz óssea imatura.

4.1.11 Análise Micro – CT

Para análise em Micro-CT as calotas cranianas foram dissecadas e fixadas com paraformaldeído a 4% em solução salina tamponada com fosfato 0,1 mol/litro por 24 horas. As amostras foram digitalizadas usando um micro-CT de

alta resolução (SkyScan 1172, Sky-Scan N.V., Bélgica) a uma resolução de imagem de 15 μm , com fonte de raios-x de 70 kV e 148 μA e filtro de alumínio de 0,5 mm. Em seguida, os conjuntos de dados de imagem tridimensionais (3D) foram reconstruídos a partir de imagens de raio-x bidimensionais usando o software NRecon (SkyScan N.V), com processos que incluíram etapas apropriadas de correção de imagem, incluindo correção de artefato em anel, correção de endurecimento de feixe e ajuste fino. Após a aquisição dos conjuntos de dados, as imagens das amostras foram visualizadas e reorientadas em cada plano 3D com o software Data Viewer (SkyScan N.V.) para alinhar os defeitos palatais paralelos ao plano transaxial para minimizar os erros de análise.

Uma análise volumétrica 3D foi realizada usando o software CTAn (SkyScan N.V.). As imagens foram realizadas com o software DOLPHIN (Navantis, Toronto, CAN). Todas as análises foram repetidas em um momento separado por um único avaliador para garantir a consistência dos resultados. A região de interesse será delineada com seções transaxiais para criar um volume de interesse uniforme e de forma cilíndrica, que envolve toda a área do defeito. Os limiares de cinza serão determinados aproximando as imagens à sua verdadeira morfologia. O volume ósseo (VO) e o volume de tecido (VT) serão medidos para calcular a porcentagem de volume ósseo (VO / VT) de cada local do enxerto, e também a densidade mineral óssea (DMO).

4.1.12 Imunohistoquímica

Foram feitos três cortes histológicos de espessura de 3 μm montados em lâminas de vidro previamente preparadas com adesivos à base de 3-aminopropiltriétoxi silano (Sigma Chemical CO, ST. Louis, MO, EUA), posteriormente foram submetidos ao método de imunoperoxidase de estreptavidina-biotina marcada usando o anti- osteopontina (OPN; Santa Cruz

Biothecnology, Miami, EUA; clone: sc-21742; diluição 1:400; durante a noite) e anticorpos primários anti-osteocalcina (OCN; Santa Cruz Biothecnology, Miami, EUA; clone: sc-30044; diluição 1:400; durante a noite). A imunorreatividade foi analisada por escores atribuídos de acordo com o percentual de marcação celular (Vasconcelos et al., 2020): Escore 0, ausência de imunorreação; Pontuação 1, marcação fraca (<25% de células positivas); Pontuação 2, marcação moderada (25% a 50% de células positivas) e; Pontuação 3, imunocoloração intensa (> 50% de células positivas).

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o software SPSS 22.0 (Chicago, IL, EUA). A distribuição das variáveis contínuas foram analisadas utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis contínuas com distribuição normal foram apresentadas com média e desvio padrão comparadas por teste t ou ANOVA. As variáveis que não apresentarem distribuição normal foram apresentadas com mediana e intervalo interquartil e comparadas por teste Mann-Whitney ou ANOVA one ranks.

6 RESULTADOS

6.1 RESULTADOS MECÂNICOS

A Figura 1 mostra os resultados da análise de DRX das amostras sinterizadas HAp e CNb/CPO. Na amostra pura (Fig. 1a) observou-se a formação de hidroxiapatita com estrutura cristalina hexagonal e grupo espacial P63/m, de acordo com a ficha ICDD 09-0432, e sem a presença de fases secundárias (EL-RASHIDY *et al.*, 2017). No compósito (Fig. 1b), observou-se a formação de HAp pura e outras duas fases: fosfato β -tricálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) de ficha ICDD 09-0169 e

fermita (CaNb_2O_6) de ficha ICDD 39-1392. Isso ocorreu devido à decomposição da HAp pura, causada pela presença de Nb no compósito (Prado et al., 2021)

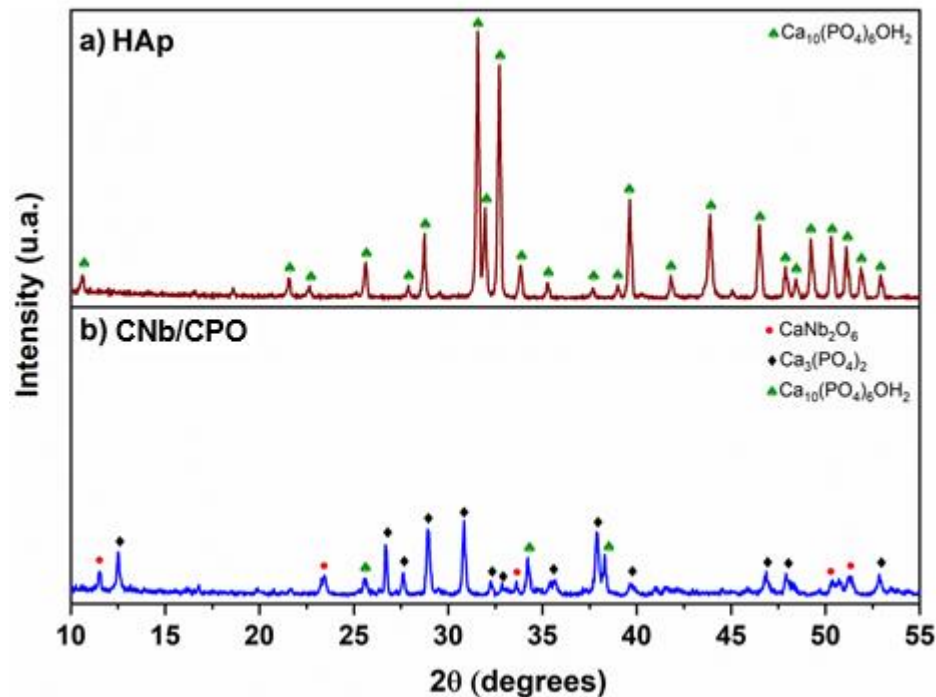


Figura 1. DRX das amostras sinterizadas e fases presentes: Hap (a) e CNb/CPO (b).

Tradução: intensity (intensidade), degrees (graus)

Fonte: Silva et al., 2024

A Tabela 1 apresenta os resultados da análise química elementar por DRX das amostras. Verificou-se que a porcentagem de Nb no compósito está próxima da quantidade adicionada na etapa de moagem, confirmando que o método de obtenção foi eficiente na preparação de CNb/CPO

Tabela 1. Resultados da análise química por DRX das amostras.

Amostra	% Ca	% P	% Nb
Hap	81.45	18.55	-
CNb/CPO	52.11	21.67	26.22

Fonte: Silva et al., 2024

A Figura 2 mostra as indentações e trincas das amostras. Houve um pequeno aumento na tenacidade à fratura da Hap (0,78 MPa.m^{1/2}) para Hap-Nb (0,82 MPa.m^{1/2}). Isso ocorreu porque a hidroxiapatita é mais frágil que o fosfato β-

tricálcio, e devido ao reforço de partículas de Nb que ajudam na deflexão das trincas. Além disso, ambas as amostras tem valores de tenacidade à fratura semelhantes aos relatados na literatura (0,5-1,0 MPa.m^{1/2} para Hap pura).

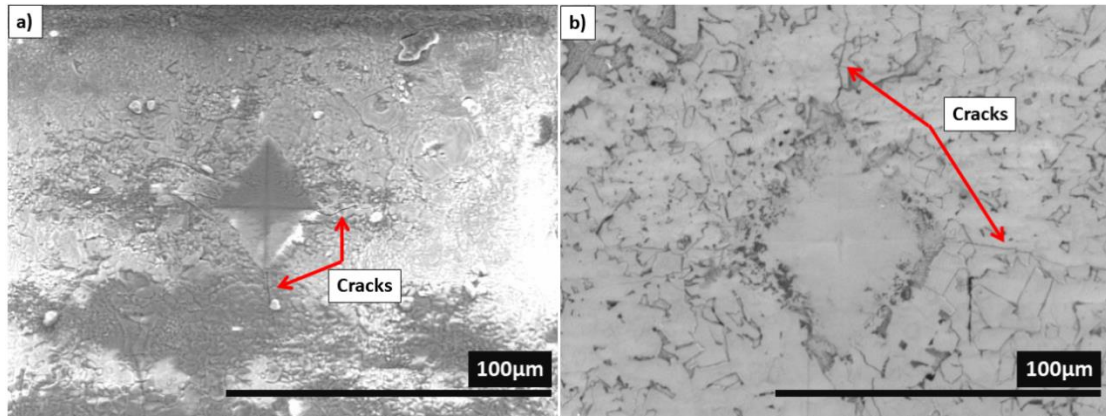


Figura 2. MEV da indentação e trincas da Hap (Figura 2a) e Hap-Nb (Figura 2b).

Tradução: cracks (trinca)

Fonte: Silva et al., 2024

6.2 Micro CT

A micro-TC de raios X mostrou aumento do número trabecular ($p < 0,001$), diminuição das porosidades (%) ($p < 0,001$) e diminuição da separação trabecular (mm) ($p < 0,001$) nos grupos CNb/CPO e HAp em comparação ao GC (Figura 3).

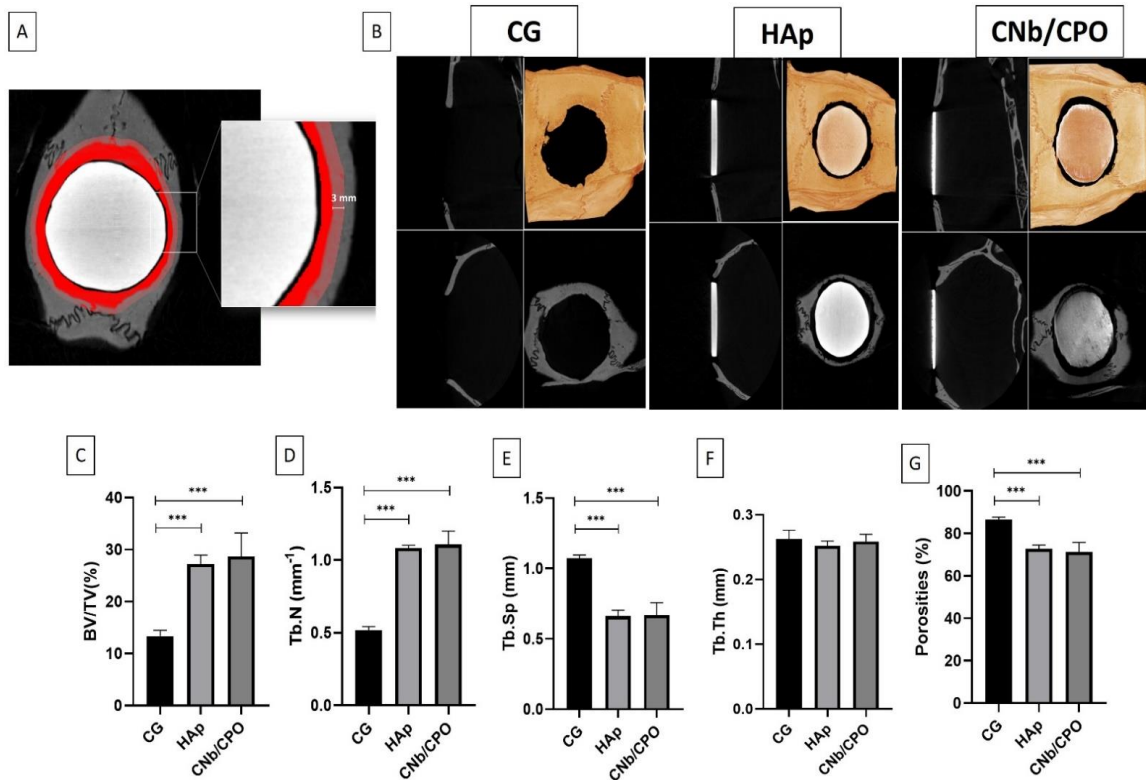


Figura 3. Análise Micro-CT. (A) Região de interesse por visão transaxial, (B) Reconstruções representativas 2D e 3D das seções microtomográficas para grupos: CG (controle), HAp (hidroxiapatita) e CNb/CPO (CaNb₂O₆/Ca₃(PO₄)₂). Os gráficos representam as médias de (C) fração de volume ósseo (VO/VT), (D) número trabecular (Tb.N), (E) separação trabecular (Tb.Sp), (F) espessura trabecular (Tb.Th), e (G) Porosidades. ***p<0,001 (ANOVA com teste de Tukey).

Tradução: Porosities (porosidade)

Fonte: Silva et al., 2024

6.3 Análise histológica

Para o GC (Figura 4A-B), a presença de discretas projeções de osso neoformado com osteócitos em seu interior e áreas focais mostra a discreta presença de osteoblastos na periferia. Observou-se tecido conjuntivo fibroso preenchendo a área central do defeito, evidenciando escassas células inflamatórias mononucleares. No grupo HAp (Figura 4C-D), o defeito foi preenchido internamente com pouco osso recém-formado mostrando osteócitos e áreas de rebordo osteoblástico. Além disso, foram visualizadas áreas focais com poucos osteoclastos, demonstrando reabsorção óssea. No grupo composto CNb/CPO (Figura 4E-F), na

margem do defeito, foi observada nova formação óssea contendo osteócitos e circundada por osteoblastos. Trabéculas ósseas reabsorvidas por osteoclastos foram verificadas em algumas áreas. Osteoblastos foram verificados em todos os espécimes da presente pesquisa, e não foi verificada associação estatisticamente significativa entre a presença de osteócitos osteoblastos, ou osteoclastos, e os grupos estudados ($p > 0,05$; Tabela 2). Em relação à análise da formação e qualidade óssea, foram observadas diferenças entre os grupos ($p < 0,01$), sendo que as comparações múltiplas mostraram os grupos HAp e composto com escores significativamente maiores quando comparados ao grupo controle (Figura 4G). Em geral, nenhuma resposta inflamatória notável foi evidenciada, de modo que todos os espécimes apresentaram ausência de inflamação ou apenas um infiltrado inflamatório focal fraco ($p > 0,05$; Figura 4H).

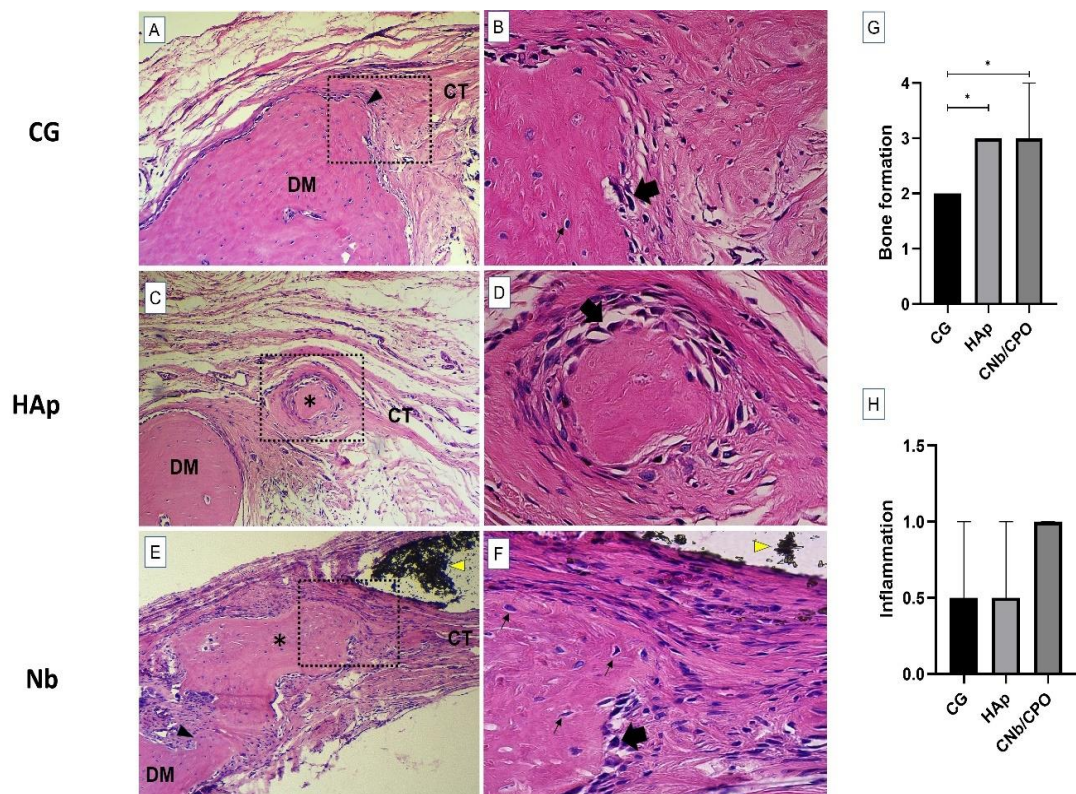


Figura 4. A coloração HE mostrando as margens do defeito original é mostrada para o grupo controle (AB) (CG), (CD) hidroxiapatita (HAp) e grupo composto (EF) CNb/CPO. Margem de defeito (DM).

Tecido conjuntivo fibroso colagenizado (TC). Osso recém-formado (asteriscos). Borda do defeito exibindo formação óssea semelhante a uma projeção (pontas de seta pretas). Presença de biomaterial remanescente (pontas de setas amarelas). Osteócitos (setas pretas finas). Osteoblastos (grandes setas pretas). 100x e 400x. Os gráficos de barras indicam a mediana e a variação dos escores de (G) formação óssea e (H) de inflamação de acordo com o grupo estudado. * $p < 0,05$ (Kruskall-Walis com teste de Dunn).

Tradução: (G) Bone formation (formação óssea), (H) flammation (inflamação)

Fonte: Silva et al., 2024

Tabela 2. Frequência absoluta e relativa (%) das células ósseas segundo grupo estudado. Pontuação: Formação óssea: mediana (25% e 75%) 1: CG vs. Hap: $p = 0.0417$; 2: CG vs. CNb/CPO: $p = 0.011$

Célula ossea	Grupo			P
	CG n (%)	HAp n (%)	CNb/CPO n (%)	
Osteócito				
Ausência	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0.273
Presença	2 (30)	4 (40)	4 (40)	
Osteoblasto				
Ausência	4 (50)	2 (25)	2 (25)	0.418
Presença	0 (0)	2 (50)	2 (50)	
Formação óssea	2 (2-2)	3(3-3) ¹	3 (3-3.75) ²	

Fonte: Silva et al., 2024

A coloração tricrômica de Masson ilustrou ainda que a área do defeito estava ocupada principalmente por fibras colágenas coradas de azul nos três grupos (Figura 5). GC mostrou mínima formação óssea nova na margem do osso nativo, com uma fina camada de tecido conjuntivo denso azul marinho preenchendo a região do defeito. O HAp apresentou osso neoformado proeminente (azul escuro), rico em colágeno, na área marginal do osso nativo. CNb/CPO também demonstrou uma formação predominante de uma nova matriz óssea imatura corada em azul (azul claro).

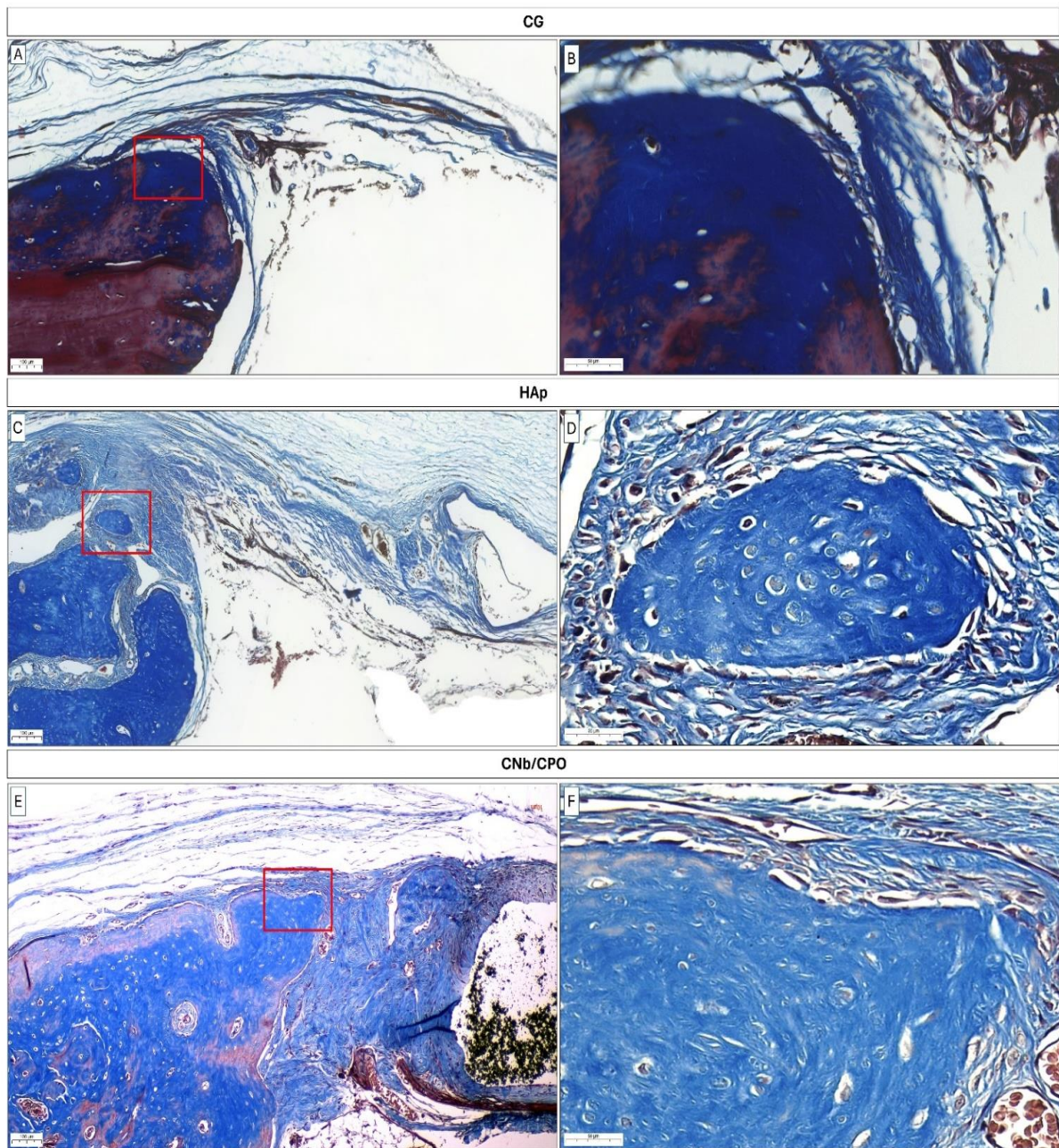


Figura 5. Coloração Tricromo de Masson mostrando as margens do defeito original para (A, B) grupo controle (CG), (C, D) hidroxiapatita (HAp) e (E, F) grupo composto CNb/CPO. As imagens à direita (escala: 50 μm) fornecem uma ampliação maior das regiões destacadas dentro dos retângulos mostrados nas imagens à esquerda (escala: 100 μm).

Fonte: Silva et al., 2024

6.4 Análise Imunohistoquímica

Verificamos uma forte imunomarcagem para OPN no grupo CNb/CPO, quando comparado ao grupo GC ($p < 0,05$; Figura 6). A imunocoloração para OCN não mostrou diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$; Figura 6).

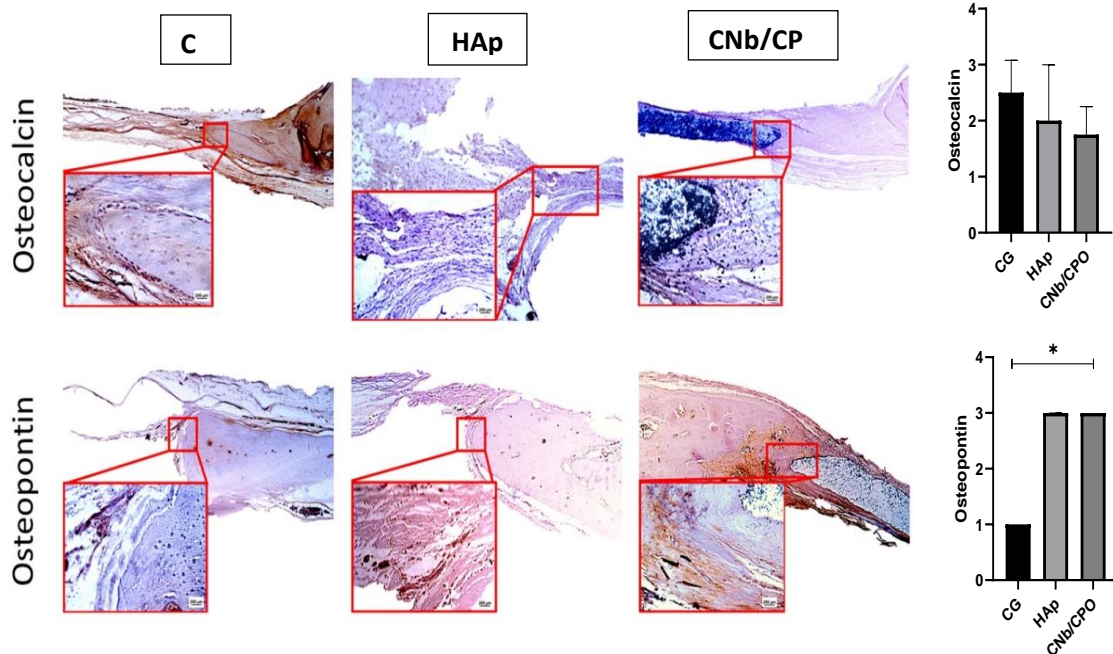


Figura 6. Fotomicrografias demonstrando imunorreatividade para osteocalcina e osteopontina. Grupo Controle (GC): defeito crítico sem tratamento. Grupo Hidroxiapatita (HAp): defeito crítico com tratamento com HAp. Grupo composto $\text{CaNb}_2\text{O}_6/\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (CNb/CPO): defeito crítico com tratamento com composto CNb/CPO. Ampliação: 40x e 400x (inserções). Gráficos representando a mediana de cada grupo. * $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis com teste de Dunn).

Tradução: Osteocalcin (osteocalcina), Osteopontin (osteopontina)

Fonte: Silva et al., 2024

7 DISCUSSÃO

O biomaterial Nióbio/Hidroxiapatita apresentou resistência à formação de fissuras, com capacidade de diferenciar células ósseas e formar novo tecido ósseo entre a borda do material e a periferia do osso original. Essa excelência na associação do nióbio à hidroxiapatita se deve à capacidade do nióbio de se estabilizar com os cristais de hidroxiapatita, principalmente devido à sua estrutura

molecular semelhante à dos íons fosfato. Estudos *in vitro* em células humanas não demonstram citotoxicidade na associação do Fosfato de Cálcio modificado com Nióbio, caracterizando este último com alto potencial para ser implantado (Capanema et al., 2015) e promover adesão e proliferação celular ao mesmo tempo em que apresenta propriedades bioativas (Marins et al., 2019).

Esse estudo confirmou a formação do compósito Hap e $\text{CaNb}_2\text{O}_6/\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ quando Nb_2O_5 foi adicionado ao HAp na proporção molar (3:1). O compósito é composto por duas fases: β -fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) do padrão ICDD 09-0169 e fersmite (CaNb_2O_6) do padrão ICDD 39-1392. Houve um pequeno aumento na tenacidade à fratura de HAp (0,78 $\text{MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$) para HAp-Nb (0,82 $\text{MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$). Isso ocorreu porque a hidroxiapatita é mais frágil que o β -fosfato tricálcico e devido ao reforço de partículas de Nb que auxiliam nas fissuras (Akao et al., 1984; Wei et al., 2019). Além disso, ambas as amostras apresentam valores de tenacidade à fratura semelhantes aos relatados na literatura (0,5-1,0 $\text{MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$ para Hap puro) (Dorozhkin et al., 2007).

O preenchimento de defeitos ósseos resultantes de trauma, tumor ou folgas de implantes constitui um problema, pois pode haver formação de pseudartrose. O material de substituição óssea ideal apresentaria as seguintes características: adaptabilidade situacional das propriedades mecânicas, osteocondução em virtude de sua estrutura, osteoindução por fatores de crescimento ósseo, nenhuma reação imunológica levando à rejeição, nenhuma barreira à revisão, boa disponibilidade e esterilidade (Mayr et al., 2015).

Devido às características do Nióbio, a indústria de materiais cerâmicos vem investigando este material e comprovando seu potencial para agregar resistência (Abdi et al., 2016). Demirkol et al. (2013) investigaram as propriedades mecânicas e

microestruturais de materiais compósitos feitos de hidroxiapatita, obtidos tanto de osso natural de ovelha quanto de hidroxiapatita sintética comercial com adição de óxido de nióbio (5 e 10% em peso). Em todos os compósitos, os valores de densidade e propriedades mecânicas aumentaram com o aumento da temperatura de sintetização. O aumento do teor de óxido de nióbio em todos os compósitos apresentaram melhores propriedades mecânicas. A hidroxiapatita de ovelha e a hidroxiapatita sintética comercial com temperatura de sinterização de 1300°C apresentam aproximadamente o mesmo valor de resistência à compressão (Demirkol; Oktar; Kayali, 2013).

A análise micro-CT de amostras de calvária, contendo a área óssea do defeito, revelou que a associação do nióbio à hidroxiapatita manteve a capacidade da cerâmica de aumentar o número trabecular e de diminuir as porosidades e a separação trabecular. Além disso, conforme descrito na avaliação histológica, o nióbio manteve a sua capacidade de promover a formação de novo tecido ósseo ao longo das margens do defeito, apesar de apresentar integração limitada com o osso circundante. Esses achados, por sua vez, demonstram que o nióbio proporcionou, em nível microscópico, maior tendência à formação óssea, tendo o tecido formado características ósseas semelhantes às da hidroxiapatita. Em um estudo que investigou a adesão, crescimento e diferenciação de células MG-63 e Saos-2 semelhantes a osteoblastos em suportes de titânio (Ti) e Nióbio (Nb) em liga de TiNb, com superfícies oxidadas a 165°C sob condições hidrotérmicas e a 600° C em uma corrente de ar, Vandrovcova et al., (2016) sugeriram que a associação de Nb ao Ti deveria ser preferida em situações em que a proliferação de células ósseas é desejável. Apesar disso, a nível macroscópico, a análise micro-CT mostrou uma fraca integração de ambos os biomateriais no osso nativo. Isto pode resultar do

processo de preparação do biomaterial, pois não envolveu a criação de estruturas porosas ou de andaimes que pudessem interromper o encapsulamento fibroso, melhorar a proliferação celular e aumentar a vascularização do tecido ao redor do enxerto, impactando assim no crescimento interno do tecido ósseo (Koschwanez; Reichert, 2013). Porém, este aspecto pode ser superado em situações clínicas onde a estabilidade primária do material é alcançada, como nos casos de implantes dentários (Olmedo-Gaya et al., 2023).

Quanto à avaliação das proteínas ósseas, foi avaliada e testada uma associação com Hidroxiapatita, β Fosfato Tricálcico e Pentóxido de Níobio quanto às características físicas e seu potencial osteogênico utilizando calvária de ratos Wistar (Kiyochi Jr et al., 2020). Foi comprovado que o material utilizado conseguiu produzir osteopontina e sialoproteína óssea em 30 dias, em locais específicos para deposição de fosfato de cálcio pelas células osteogênicas em diferenciação e em 45 dias já é possível observar a capacidade osteogênica, demonstrando sua capacidade de formar tecido ósseo (Kiyochi jr et al., 2020). A osteopontina é uma proteína não colágena envolvida na biomineralização do tecido ósseo. Além do seu papel na biomineralização, essa osteopontina é essencial para a qualidade das fibrilas de colágeno no osso, desempenhando um papel crucial na formação da matriz orgânica e na integridade estrutural. Nos níveis celulares, o OPN participa das atividades biológicas dos osteoclastos e osteoblastos para regular o metabolismo ósseo (Depalle et al., 2021). Os achados apontaram para um aumento na imunomarcação da osteopontina, sugerindo que o níobio poderia aumentar a biomineralização do tecido ósseo. Embora o OPN seja um biomarcador precoce da mineralização, a osteocalcina está envolvida em estágios posteriores da formação óssea (Boskey; Robey, 2013). Nesse sentido, a ausência de diferenças significativas

na imunomarcção de OCN pode indicar que os biomateriais demonstraram potencial limitado em promover remodelação e maturação do tecido ósseo (Al Qabbani et al., 2023).

8 CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que o compósito $\text{CaNb}_2\text{O}_6/\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ apresenta resistência a trincas e tem potencial para estimular a osteogênese (formação óssea) em defeitos de calvária em ratos. É necessário mais pesquisas para explorar a aplicabilidade deste compósito para regeneração óssea e assim conseguir robustez para garantir um biomaterial seguro para a prática clínica.

REFERÊNCIAS

ABDI, S., OSWALD, S., GOSTIN, P. F., et al. "Designing new biocompatible glass-forming Ti75-x Zr10 Nbx Si15 (x = 0, 15) alloys: corrosion, passivity, and apatite formation.", *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, v. 104, n. 1, p. 27–38, jan. 2016. DOI: 10.1002/jbm.b.33332.

AK A. Fibroblast Cell Responses to Vanadium and Niobium Titanium Alloys: A Biocompatibility Study. *ACS Omega*. 2023 Sep 8;8(37):33802-33808. doi: 10.1021/acsomega.3c04252. PMID: 37744787; PMCID: PMC10515373.

AKAO M, Miura N, Aoki H. Fracture toughness of sintered hydroxyapatite and Beta.-tricalcium phosphate. *J Ceram Soc Japan* 1984;92(1071):672-4.

AL QABBANI A, Rani KGA, AlKawas S, et al. Evaluation of the osteogenic potential of demineralized and decellularized bovine bone granules following implantation in rat calvaria critical-size defect model. *PLoS One*. 2023;18(12):e0294291.

ANSTIS GR, CHANTIKUL P, LAWN BR, MARSHALL DB. A Critical Evaluation of Indentation Techniques for Measuring Fracture Toughness: I, Direct Crack Measurements. *J Am Ceram Soc*. 1981;64(9):533-8.

ASGHARZADEH, S. H.; AYATOLLAHI MR; ASNAFI A. Para reduzir o estresse máximo e o efeito de proteção contra estresse em torno de uma interface implante dentário-osso usando biomateriais radiais com graduação funcional. *Métodos computacionais em biomecânica e engenharia biomédica* . 2017; 20 (7): 750–759. doi: 10.1080 / 10255842.2017.1299142.

BISPO LB. A influência do tratamento de superfície das fixações na osseointegração. *Rev. Odontol. Univ. Cid. São Paulo* 2019 set-dez; 31(3): 61-

BRUZIQUESI, C. G.O et al. Niobium: A Strategic Chemical Element for Brazil. *Quím. Nova* 42, v. 10, Out 2019. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170442>

BIOMATER J Biomed Mater Res B Appl, 106 (5): 2046-2057, Julho 2018. Doi: 10.1002/jbm.b.33950

BOSKEY, A.L.;Robey, P.G. The Regulatory Role of Matrix Proteins in Mineralization of Bone in Osteoporosis. Fourth edition. San Diego: Academic Press; 2013. pp. 235-255.

BURD, J. S.; PEREIRA, J. D. P. Princípios da Osteointegração – Uma Revisão de Literatura. *Brazilian Journal of Development*, Curitiba, 2021, v.7, n. 8, p. (79024 – 79046), Agosto, 2021. DOI:10.34117/bjdv7n8222.

CARVALHO VASCONCELOS R, FERREIRA C, DE ARAÚJO EM, ET AL. Zirconia/hydroxyapatite (80/20) scaffold repair in critical size calvarial defect increased FGF-2, osteocalcin and OPG immunostaining and IL-10 levels. *Am J Transl Res*. 2020;12(6):2439-50.

CHEN, YONGJUAN ET AL. Zirconium Ions Up-Regulate the BMP/SMAD Signaling Pathway and Promote the Proliferation and Differentiation of Human Osteoblasts. *Plos One*, [s.l.], v. 10, n. 1, p.1-17, 20 jan. 2015. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0113426>.

CAPANEMA, NÁDIA S.V ET AL. Biocerâmicas de hidroxiapatita dopada com nióbio: síntese, caracterização e citocompatibilidade in vitro. *Materials*, v. 8 n. 7, p4191- 4209, 9 de julho de 2015. <https://doi.org/10.3390/ma8074191>

CHO, Y. et al. Osteogenic Responses to Zirconia with Hydroxyapatite Coating by Aerosol Deposition. *Journal Of Dental Research*, [s.l.], v. 94, n. 3, p.491-

499, 13 jan. 2015. SAGE Publications.

<http://dx.doi.org/10.1177/0022034514566432>.

CONZ, MARCIO BALTAZAR ET AL. Hydroxyapatite crystallinity does not affect the repair of critical size bone defects. *Journal Of Applied Oral Science*, [s.l.], v. 19, n. 4, p.337-342, 3 jun. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1678-77572011005000007>.

DEMIRKOL N, OKTAR F, KAYALI E. Influence of Niobium Oxide on the Mechanical Properties of Hydroxyapatite. *Key Eng Mat.* 2013;529-530:29-33.

DEPALLE B, McGilvery CM, Nobakhti S, Aldegaiter N, Shefelbine SJ, Porter AE. Osteopontin regulates type I collagen fibril formation in bone tissue. *Acta Biomater.* 2021;120:194-202.

DOROZHKIN SV. Bioceramics based on calcium orthophosphates (Review). *Glass and Ceramics.* 2007;64(11):442-7.

GAPSKI, RICARDO; MARTINEZ, ELIZABETH FERREIRA. Behavior of MC3T3-E1 Osteoblastic Cells Cultured on Titanium and Zirconia Surfaces. *Implant Dentistry*, [s.l.], v. 26, n. 3, p.373-377, jun. 2017. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/id.0000000000000543>.

GHOSH, SUJITA; SHARMA, ARCHANA; TALUKDER, GEETA. Zirconium. *Biological Trace Element Research*, [s.l.], v. 35, n. 3, p.247-271, dez. 1992. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02783770>.

HADJICHARALAMBOUS, CHRYSTALLEN ET AL. Effect of Porosity of Alumina and Zirconia Ceramics toward Pre-Osteoblast Response. *Frontiers In Bioengineering And Biotechnology*, [s.l.], v. 3, 28 out. 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2015.00175>.

HEFTI, THOMAS ET AL. A comparison of osteoclast resorption pits on bone with titanium and zirconia surfaces. *Biomaterials*, [s.l.], v. 31, n. 28, p.7321-7331, out. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.06.009>.

JACOME-GALARZA CE, PERCIN GI, MULLER JT, MASS E, LAZAROV T, EITLER J, RAUNER M, YADAV VK, CROZET L, BOHM M, LOYHER PL, KARSENTY G, WASKOW C, GEISSMANN F. Developmental origin, functional maintenance and genetic rescue of osteoclasts. *Nature*. 2019 Apr;568(7753):541-545. doi: 10.1038/s41586-019-1105-7. Epub 2019 Apr 10. PMID: 30971820; PMCID: PMC6910203.

JIRKOF, P. ET AL. Administration of Tramadol or Buprenorphine via the drinking water for post-operative analgesia in a mouse-osteotomy model. *Sci Rep* 9, 10749 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47186-5>.

KIM, HONG-KYUN ET AL. Comparison of peri-implant bone formation around injection-molded and machined surface zirconia implants in rabbit tibiae. *Dental Materials Journal*, [s.l.], v. 34, n. 4, p.508-515, 2015. Japanese Society for Dental Materials and Devices. <http://dx.doi.org/10.4012/dmj.2015-024>.

KIM JM, LIN C, STAVRE Z, GREENBLATT MB, SHIM JH. Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. *Cells*. 2020 Sep 10;9(9):2073. doi: 10.3390/cells9092073. PMID: 32927921; PMCID: PMC7564526.

KIYOCHI JUNIOR HJ, CANDIDO AG, BONADIO TGM, ET AL. In vivo evaluation of interactions between biphasic calcium phosphate (BCP)-niobium

pentoxide (Nb₂O₅) nanocomposite and tissues using a rat critical-size calvarial defect model. *J Mater Sci Mater Med*. 2020;31(8):71.

KOCH, F. P. ET AL. Osseointegration of one-piece zirconia implants compared with a titanium implant of identical design: a histomorphometric study in the dog. *Clinical Oral Implants Research*, [s.l.], v. 21, n. 3, p.350-356, mar. 2010. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0501.2009.01832.x>.

LEGEROS, R. Z. ET AL. Significance of the Porosity and Physical Chemistry of Calcium Phosphate Ceramics Biodegradation-Bioresorption. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, [s.l.], v. 523, n. 1, p.268-271, jun. 1988. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.1988.tb38519.x>.

LIAO, LAN ET AL. Osteogenic Properties of PBLG-g-HA/PLLA Nanocomposites. *Plos One*, [s.l.], v. 9, n. 9, p.1-9, 3 set. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0105876>.

LABTEST. Citações e referências a documentos eletrônicos / online / Disponível LABTEST. <http://www.labtest.com.br>. Acesso em 10 de agosto de 2021.

LIMA, FLÁVIA MARTINS; OLIVEIRA CINTIA RODRIGUES. Imagens do Necrocapitalismo no Brasil: A Indústria Mineradora de Nióbio. *Revista Brasileira de Estudos Organizacionais*, v. 7, n. 2, p. 461-477, Maio-Agosto/2020. DOI: 10.21583/2447-4851.rbeo.2020.v7n2.387

LINDEN, MARIA SALETE SANDINI ET AL. Biocompatibilidade entre implantes de titânio com e sem cobertura de hidroxiapatita. *Revista da Faculdade de Odontologia Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo*, v. 1, n. 1, p.24-30, jan. 1996. Semestral.

MARINS, N. H. ET AL.. Niobium Pentoxide and Hydroxyapatite Particle Loaded Electrospun Polycaprolactone/gelatin Membranes for Bone Tissue Engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v 182, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110386>.

MARTINS, R. Implantes de zircônia reforçados com ítria (Y-TPZ): Avaliação histomorfométrica. 2013. 159 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Odontológicas Aplicadas, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2013.

MAZZONETO, R. Reconstruções em Implantodontia: protocolos clínicos para o sucesso e previsibilidade. Nova Odessa: Napoleão Editora, 2009. 368 p.

MAYR HO, Suedkamp NP, Hammer T, et al. β -Tricalcium phosphate for bone replacement: stability and integration in sheep. *J Biomech*. 2015;48(6):1023-31.

Ministério de Minas e Energias – MME. Disponível em <<https://www.gov.br/mme/pt-br/assuntos/noticias/brasil-e-o-principal-agente-no-mercado-mundial-de-niobio>>. Acesso em: 20 de jan. 2025.

MUSHAHARY, D. ET AL. Strontium content and collagen-I coating of Magnesium-Zirconia-Strontium implants influence osteogenesis and bone resorption. *Clinical Oral Implants Research*, [s.l.], v. 27, n. 2, p.15-24, 31 out. 2014. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/clr.12511>.

NANDI, S. K. ET AL. Efficacy of nano-hydroxyapatite prepared by an aqueous solution combustion technique in healing bone defects of goat. *Journal Of Veterinary Science*, [s.l.], v. 9, n. 2, p.183-191, 2008. The Korean Society of Veterinary Science (KAMJE). <http://dx.doi.org/10.4142/jvs.2008.9.2.183>.

OLMEDO-GAYA MV, ROMERO-OLID MN, OCAÑA-PEINADO FM, VALLECILLO-RIVAS M, VALLECILLO C, REYES-BOTELLA C. Influence of different surgical techniques on primary implant stability in the posterior maxilla: a randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Investig.* 2023;27(7):3499-3508.

PARK, Y; C.; SHON, W. Peri-implant bone formation and surface characteristics of rough surface zirconia implants manufactured by powder injection molding technique in rabbit tibiae. *Clinical Oral Implants Research*, [s.l.], v. 24, n. 5, p.586-591, 4 abr. 2012. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0501.2012.02468.x>.

PASOLD, J ET AL. Direct influence of titanium and zirconia particles on the morphology and functionality of mature human osteoclasts. *Journal Of Biomedical Materials Research Part A*, [s.l.], v. 105, n. 9, p.2608-2615, 21 jun. 2017. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.36114>.

PRETEL H, LIZARELLI RF, RAMALHO LT. Effect of low-level laser therapy on bone repair: histological study in rats. *Lasers Surg Med.* 2007;39(10):788-96.

PICONI, C.; MACCAURO, G.. Zirconia as a ceramic biomaterial. *Biomaterials*, [s.l.], v. 20, n. 1, p.1-25, jan. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0142-9612\(98\)00010-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0142-9612(98)00010-6).

PINHEIRO, T. C. et al. Implantes de hidroxiapatita em falhas ósseas produzidas no fêmur de ratos submetidos ao tabagismo passivo. *Revista Brasileira de Ortopedia*, [s.l.], v. 43, n. 10, p.433-441, out. 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-36162008001000003>.

POPP, J. R. ET AL. In vitro evaluation of osteoblastic differentiation on amorphous calcium phosphate-decorated poly(lactic-co-glycolic acid)

scaffolds. *Journal Of Tissue Engineering And Regenerative Medicine*, [s.l.], v. 5, n. 10, p.780-789, 29 dez. 2010. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/term.376>.

PRADO GDC, WEINAND WR, VOLNISTEM EA, ET AL. Physicochemical and bone regeneration studies using scaffoldings of pure natural hydroxyapatite or associated with Nb₂O₅. *Mater Chem Phys*. 2021;272:124922.

RAMESH, N; MORATTI, S. C.; DIAS, G. J. Biocompósitos de polímero de hidroxiapatita para regeneração óssea: uma revisão das tendências atuais.

SAFAVI MS, WALSH FC, VISAI L, KHALIL-ALLAFI J. Progress in Niobium Oxide-Containing Coatings for Biomedical Applications: A Critical Review. *ACS Omega*. 2022 Mar 11;7(11):9088-9107. doi: 10.1021/acsomega.2c00440. PMID: 35356687; PMCID: PMC8944537.

SCARANO, A. ET AL. Bacterial Adhesion on Commercially Pure Titanium and Zirconium Oxide Disks: An In Vivo Human Study. *Journal Of Periodontology*, [s.l.], v. 75, n. 2, p.292-296, fev. 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1902/jop.2004.75.2.292>.

SILVA R.S., ET AL. Niobium/Hydroxyapatite Composite as a Potential Stimulator of Bone Formation in Critical Size Calvarial Defects in Rats. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.67: e24240152, 2024. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2024240152>

SIVARAMAN, K.; CHOPRA, A. .NARAYAN A. I. BALAKRISHNAN D.. Is zirconia a viable alternative to titanium for oral implant? A critical review. *Journal of Prosthodontic Research*, v. 62, n. 2, p 121-133, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jpjor.2017.07.003>

SHIRANE, H. Y. ET AL. Implantes de biomateriais em falha óssea produzida na fíbula de ratos. *Revista Brasileira de Ortopedia*, [s.l.], v. 45, n. 5, p.478-482, 2010. FapUNIFESP (SCIELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-36162010000500017>.

VANDROVCOVA M. ET AL. Interaction of human osteoblast-like Saos-2 and MG-63 cells with thermally oxidized surfaces of a titanium-niobium alloy. *PLoS One*. 2014;9(6):e100475.

VIDILLI, A. L; BOLFARINI, C.; CAMPANELLI, L. C.. Viabilidade da substituição do material de implantes odontológicos por titânio comercialmente puro processado por ECAP. *Engenharia no Século XXI* . Belo Horizonte: Paison, 2019.p. (23) – (30). DOI: 10.36229/978-85-7042-163-0.CAP.03

WEI P, FANG J, FANG L, WANG K, LU X, REN F. Novel niobium and silver toughened hydroxyapatite nanocomposites with enhanced mechanical and biological properties for load-bearing bone implants. *Appl Mater Today*. 2019;15:531-42.

WILDEMANN Bb.. Non-union bone fractures. *Nat Rev Dis Primers*. 2021 Aug 5;7(1):57. doi: 10.1038/s41572-021-00289-8. PMID: 34354083.

APÊNDICES

ARTIGO PUBLICADO

Vol.67: e24240152, 2024
<https://doi.org/10.1590/1678-4324-2024240152>
ISSN 1678-4324 Online Edition



Article - Human and Animal Health

Niobium/Hydroxyapatite Composite as a Potential Stimulator of Bone Formation in Critical Size Calvarial Defects in Rats

Salomé Ribeiro da Silva¹
<https://orcid.org/0000-0002-5292-1093>

José Sandro Pereira da Silva²
<https://orcid.org/0000-0001-9774-7175>

SILVA R.S., ET AL. Niobium/Hydroxyapatite Composite as a Potential Stimulator of Bone Formation in Critical Size Calvarial Defects in Rats. Brazilian Archives of Biology and Technology, v.67: e24240152, 2024. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2024240152>