



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Síntese, caracterização e estudo *in vitro* do potencial de mineralização do composto Quercetina-Sr²⁺

Israel Francisco Bernardo Pimenta

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, **Área: Química**

Ribeirão Preto

2023

VERSÃO CORRIGIDA

Síntese, caracterização e estudo *in vitro* do potencial de mineralização do composto Quercetina-Sr²⁺

Israel Francisco Bernardo Pimenta

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Ramos

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, **Área: Química**

Ribeirão Preto

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

Pimenta, Israel Francisco Bernardo

Síntese, caracterização e estudo *in vitro* do composto
Quercetina-Sr²⁺. Ribeirão Preto, 2023.

p. 79: il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia
Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração:
Química.

Orientadora: Ramos, Ana Paula.

1. Flavonóides
2. Estrôncio
3. Osteoblastos
4. Biomateriais
5. PMMA

“Tudo o que temos de decidir é o
que fazer com o tempo que nos é
dado.”

(J.R.R. Tolkien)

*Aos meus irmãos, minha mãe, meu pai e todos
aqueles que me ensinam sobre a vida.*

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus por abençoar todo o meu trajeto até aqui e a São Judas Tadeu por rogar por mim nos momentos de aflição.

Agradeço minha família, especialmente meus pais, Gladys e José, por terem me dado o suporte necessário para atingir meus objetivos. Espero que se orgulhem.

Aos meus irmãos: Talitha, João, José, Maria, Ana Clara, Ester, Emanuel, Stella e Ângelo.

À minha afilhada Elisa. Padrinho te ama!

À professora Dra. Ana Paula Ramos, por ter me acolhido em seu laboratório e por ter tido toda paciência do mundo para orientar e me ajudar a crescer profissionalmente. Obrigado pela confiança!

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Físico-Química de Colóides e Superfícies. Não tenho como descrever tudo o que fizeram por mim. Sou grato pelas parcerias e brincadeiras. Obrigado, Marcos e Lucas, por me ensinarem tanto. Maryanne e Bianca, a positividade de vocês tornam os dias mais leves. Diane e Pedro, nunca esquecerei das risadas que demos juntos. Jeferson, Débora e Larwsk, obrigado pelo companheirismo e auxílio.

À minha amiga Viviane. Grato por todos os cafés com fofoca que tomamos juntos.

Aos amigos que fiz nesses últimos três anos. Maria Izabel e Dayo, vocês foram essenciais nessa jornada. As disciplinas não seriam a mesma coisa sem vocês.

Aos meus irmãos de coração: Ângela, Lívia, Tiagão, Bi, Dani, Fabão, Ângelo, Gah, Diogo, Capitão, Vini, Vidal, Marcos, Rod, Tigs, Lefão, Lucas, Bia e Pedrão. Sem vocês, não haveria forças para continuar. Obrigado por tudo!

A todos que de alguma forma estiveram comigo e que deixaram marcas que nunca esquecerei.

À FAPESP (processo 2019/25054-2) pelo apoio financeiro concedido a este projeto e Capes pela bolsa de mestrado.

Sumário

Resumo.....	24
Abstract	25
Índice de figuras	26
Índice de Tabelas.....	28
Siglas e Abreviaturas.....	29
<i>Introdução</i>	30
1. Descrição histológica do tecido ósseo	16
1.1 Composição.....	16
1.2 Estruturas celulares: formação, manutenção e reabsorção do tecido.....	17
1.3 Interação Osteoblasto-Osteoclasto	19
1.3.1 Substituintes ósseos – Os Biomateriais	20
1.3.2 Biomateriais: primeira, segunda e terceira geração.....	23
1.3.3 Cimento ósseo poroso da base de polimetacrilato (PMMA): da segunda para a terceira geração	24
1.4 Moléculas ativas na regeneração óssea	26
1.4.1 Ranelato de Estrôncio: um terapêutico descontinuado.....	26
1.4.2 Flavonoides: uma revisão do seu potencial medicinal	27
1.4.3 Antocianinas.....	30
<i>Objetivo</i>	32
2.1 Objetivos Gerais.....	33
2.2 Objetivos Específicos	33
<i>Metodologia</i>	34
3.1 Síntese de flavonóides contendo estrôncio – <i>Morina, quercetina e o Sr²⁺</i>	35
3.1.1 Síntese em solução metanólica.....	35
3.1.2 Isolamento dos compostos flavonóides-Sr ²⁺ na forma de pó.....	35
3.2 Caracterização Química - Elucidação da estrutura do novo composto a base de quercetina e estrôncio.....	35
3.2.1 Espectroscopia UV-vis	35
3.2.2 Espectroscopia de infravermelho (FTIR)	36
3.2.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética (RMN).....	36
3.2.4 Análise Elementar	36
3.2 Análise dos efeitos dos compostos flavonóides em cultura de osteoblastos <i>in vitro</i>	36
3.3 Preparação do cimento ósseo	37
3.4 Análise e Caracterização dos cimentos	38
3.4.1 Usinagem dos corpos de prova.....	38
3.4.2 Análise de liberação por HPLC.....	38

3.4.3 ATR-FTIR.....	39
3.4.3 Teste de absorção (<i>Swelling</i>) ou Intumescimento	39
<i>Resultados e Discussão</i>	40
4.1 Caracterização do composto morina-Sr ²⁺ (SrM) e do novo composto quercetina-Sr ²⁺ (SrQ) por espectroscopia UV-Vis	41
4.2 Isolamento do novo flavonóide Quercetina-Sr ²⁺ (SrQ).....	45
4.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) do flavonóide SrQ	46
4.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	47
4.5 Análise Elementar	49
4.6 Análise dos efeitos das moléculas bioativas na regeneração óssea em meio de cultura de Osteoblastos <i>in vitro</i>	50
4.7 Síntese óssea a base de PMMA incorporados com SrM e SrQ	53
4.8 Teste de absorção (<i>Swelling</i>) ou Intumescimento	56
<i>Conclusões</i>	59
<i>Referências</i>	61
Apêndice A – testes iniciais da antocianina Calistefina <i>in vitro</i>	69
Apêndice B – Teste inicial de mineralização em culturas de osteoblastos com a Quercetina- Sr ²⁺	73
Apêndice C – testes de liberação por HPLC	75

Resumo

PIMENTA, I. F. B. **Síntese, caracterização e estudo *in vitro* do composto Quercetina-Sr²⁺**. 2023. Dissertação (Mestrado em Química) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

O tecido ósseo é dinâmico e conta com vários tipos de células atuantes na sua renovação e manutenção de integridade. De forma resumida, osteoblastos tem a função de sintetizar a parte mineral e orgânica, enquanto osteoclastos irão cuidar da reabsorção do tecido. Muitos defeitos ósseos são decorrentes de um desequilíbrio entre osteoblastos e osteoclastos, podendo ser originários de vários fatores, dentre eles patologias, microrganismos e disfunções hormonais. Algumas substâncias podem ser utilizadas para restabelecer este equilíbrio, dentre estas ranelato de estrôncio, que teve seu uso descontinuado recentemente devido a efeitos colaterais, como mineralização ectópica. Muitos esforços têm sido feitos para buscar novas drogas capazes de auxiliar o tecido ósseo a recuperar sua dinâmica. O presente trabalho teve como objetivo sintetizar, caracterizar e estudar *in vitro* um composto inédito partindo do flavonóide quercetina e Sr²⁺. Mais do que isso, o estudo deu início aos primeiros ensaios de incorporação desse composto a um o cimento ósseo a base de PMMA. Através de análises espectroscópicas e análise elementar foi possível constatar o sucesso na ligação de dois íons Sr²⁺ com uma molécula de quercetina. Além disso, estudos *in vitro* com células MC3T3-E1 apontaram que esse novo composto (SrQ) se mostrou não-citotóxico nas concentrações de 10 e 80 µM. No 14º dia de cultura o composto apresentou capacidade de promover aumento da atividade de fosfatase alcalina superior ao ranelato de estrôncio e à quercetina não ligada, e ainda foi possível identificar a formação de nódulos mineralizados. Análises de ATR-FTIR evidenciam a incorporação do composto ao cimento ósseo de PMMA. Testes de entumescimento apontaram que a incorporação do composto ao cimento ósseo aumenta sua capacidade de absorção de água. Por fim, os presentes dados mostram o potencial de uma nova droga, indicando sua atuação em relação a osteoblastos. Além disso, traz os primeiros empreendimentos em relação à incorporação de biomoléculas no cimento poroso, contudo, está última etapa ainda exige novos estudos para a obtenção de dados mais sólidos.

Abstract

PIMENTA, I. F. B. **Synthesis, characterization and in vitro study of the compound Quercetin-Sr²⁺**. 2023. Dissertação (Mestrado em Química) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Bone tissue is dynamic and has several types of cells that act in its renewal and maintenance of integrity. In summary, osteoblasts have the function of synthesizing the mineral and organic part, while osteoclasts will take care of tissue reabsorption. Many bone defects result from an imbalance between osteoblasts and osteoclasts, and may originate from several factors, including pathologies, microorganisms and hormonal dysfunctions. Some substances can be used to restore this balance, among them strontium ranelate, which had its use recently discontinued due to side effects, such as ectopic mineralization. Many efforts have been made to search for new drugs capable of helping the bone tissue to recover its dynamics. The present work aimed to synthesize, characterize and study in vitro an unpublished compound starting from the flavonoid quercetin and Sr²⁺. More than that, the study initiated the first trials of incorporation of this compound into a PMMA-based bone cement. Through spectroscopic analysis and elemental analysis, it was possible to verify the success in binding two Sr²⁺ ions with a quercetin molecule. Furthermore, in vitro studies with MC3T3-E1 cells showed that this new compound (SrQ) was non-cytotoxic at concentrations of 10 and 80 µM. On the 14th day of culture, the compound showed the ability to promote an increase in alkaline phosphatase activity greater than strontium ranelate and unbound quercetin, and it was still possible to identify the formation of mineralized nodules. ATR-FTIR analyzes show the incorporation of the compound to the PMMA bone cement. Swelling tests showed that the incorporation of the compound to the bone cement increases its water absorption capacity. Finally, the present data show the potential of a new drug, indicating its performance in relation to osteoblasts. In addition, it brings the first ventures in relation to the incorporation of biomolecules in porous cement, however, this last stage still requires further studies to obtain more solid data.

Índice de figuras

Figura 1: Representação esquemática do processo da variação de energia livre de Gibbs (ΔG) durante o processo de deposição mineral ²	16
Figura 2: Tipos celulares presentes no processo de remodelação óssea. Imagem adaptada da referência ¹	17
Figura 3 Representação da interação osteoclasto-osteoblasto – Transdução de sinal bidirecional. Imagem adaptada da referência ¹¹	20
Figura 4: Representação da interface implante-tecido. Caso a interface não leve a formação de um tecido robusto, pode ocorrer um afrouxamento e necessidade de novos procedimentos cirúrgicos. Imagem adaptada da referência ²⁴	22
Figura 5: Representação da interação das proteínas da matriz extracelular com a célula via proteínas transmembrana. Imagem adaptada da referência ²⁴	23
Figura 6: microtomografia computadorizada (micro-CT) comparando o processo de osteointegração fratura com cimento poroso (CI e DI), cimento compacto (CII e DII) e fratura sem cimento (CIII e DIII) após três e seis meses. Imagem adaptada da referência ³³	25
Figura 7: estrutura molecular do SrR.....	26
Figura 8: Estrutura base dos flavonoides.	28
Figura 9: Representação das estruturas de Qt ligadas a metais. Estruturas adaptadas das referências 64–67	30
Figura 10: a) representação esquemática dos subtipos de flavonóides existentes (Imagens adaptada da referência 32) b) estrutura base das antocianinas.	31
Figura 11: Espectro UV-Vis de solução 100 μ M de morina (linha preta) e do composto SrM (linha vermelha) em metanol. Inserção: estrutura da morina (preto) e SrM (vermelho)	41
Figura 12: Espectros UV-vis de solução de Qt em metanol (linha preta) e em metanol meio básico (pH \cong 9,05) (linha amarela). Inserção: estrutura da Qt com os grupos OH protonados (preto) e estrutura da Qt com os grupos 3'OH, 4'OH e 7OH desprotonados (amarelo)	43
Figura 13: Espectros UV-Vis do composto SrQ. a) comparativo entre os espectros da Qt (linha preta) e do composto SrQ (linha verde) b) solução metanólica de Qt (100 μ M) com diferentes concentrações de SrCl ₂	44
Figura 14: Formação do composto quercetina-Sr ²⁺ . Fotografias da a) solução metanólica de quercetina pré adição de SrCl ₂ e b) solução metanólica de quercetina pós adição de SrCl ₂ e c) Espectros UV-vis comparativo do composto SrQ (linha verde) e da Qt (linha preta)	46
Figura 15: Comparação de espectros infravermelho da Qt (linha preta) do SrQ (linha verde). 46	
Figura 16: Espectros RMN do flavonóide Qt (a) e do composto SrQ (b).....	48
Figura 17: Flavonóide Qt ligada a dois átomos de estrôncio (Sr).....	49
Figura 18: Viabilidade de osteoblastos em presença de quercetina (Qt), quercetina-Sr ²⁺ (SrQ) e ranelato de estrôncio (SrR). após 24, 48 e 72h de cultura. A linha pontilhada indica o valor de 80% que é utilizado para demarcar o limite de não-citotoxicidade. O controle (Ct) consistiu em células cultivadas na ausência dos compostos. Os dados apresentados contam com *p =0,0398 **p <0,0085 e ****p < 0,0001.....	50
Figura 19: a) Efeito sobre mineralização. Atividade Específica da TNAP após 7 e 14 dias de cultura. b) Western blot das proteínas Runx-2 e TNAP após 7 dias de cultura. c) Ensaio de mineralização utilizando vermelho de alizarina para marcar nódulos de mineralização formados em cultura de células após 21 dias. O controle (Ct) consistiu em células cultivadas na ausência dos compostos. Os dados apresentados contam com *p =0,0398 **p <0,0085 e ****p < 0,0001.	52
Figura 20: a) Cimento Ósseo a base de PMMA incorporado com SrM b) Corpos de prova usinados.....	53

Figura 21: Análises por ATR-FTIR dos cimentos contendo flavonóides. a) comparação entre o cimento ósseo a base de PMMA puro, cimento ósseo a base de PMMA incorporado com SrM e composto SrM. b) comparação entre o cimento ósseo a base de PMMA puro, cimento ósseo a base de PMMA incorporado com SrQ e composto SrQ.....	55
Figura 22: Taxa de absorção de água pelo cimento ósseo a base de PMMA incorporado com compostos flavonóides imersos em a) água milli-q b) tampão fosfato-salino.....	57
Figura 23: a) Solução 96 µmol/L de calistefina solubilizado em metanol. b) Estrutura da calistefina (86).....	69
Figura 24: Ensaios de mineralização com calistefina utilizando-se cultura de células MC3T3. a) Atividade Específica da TNAP após 7 (barra preta) e 14 dias (barra cinza) de cultura e b) ensaios de mineralização utilizando-se vermelho de alizarina para marcar nódulos de mineralização formados em cultura de células após 14 (barra preta) e 21 (barra cinza) dias de mineralização. O controle (Ct) consistiu em células cultivadas na ausência dos compostos. Os dados apresentados contam com *p =0,0172 e ****p < 0,0001.	71
Figura 25: Ensaios de mineralização com quercetina-Sr²⁺ em cultura de células MC3T3: Ensaios de mineralização utilizando-se vermelho de alizarina para marcar nódulos de mineralização formados em cultura de células após 14 (barra preta) e 21 (barra cinza) dias de mineralização. O controle (Ct) consistiu em células cultivadas na ausência dos compostos. Os dados apresentados contam com *p =0,0172 e ****p < 0,0001.	73
Figura 26: Análises de liberação do SrM por HPLC a) cromatograma ampliado para comparação dos tempos de retenção da morina (8.18min) (linha preta) e do SrM (8.60min) (linha azul) b) espectro UV-vis da SrM em PBS c) espectro UV-vis da morina em PBS d) comparação dos cromatogramas da morina (linha preta), SrM (linha vermelha) e do meio de liberação (PBS) (linha azul)	76
Figura 27: a) Cromatograma da liberação de morina-Sr ²⁺ pelo cimento a base de PMMA no tempo zero b) espectro UV-vis do pico detectado.....	77
Figura 28: Leitura comparativas das amostras na faixa entre 220–340 nm. a) Leitura comparativa da amostra SRII b) Leitura comparativa da amostra SRIII c) Leitura comparativa da amostra SRVI	78
Figura 29: HPLC da curva de calibração de duas amostras revisitada na faixa entre 220–240 nm. a) amostra padrão diluída duas vezes (morina com_2x) com tempo de retenção 10.97min. b) Amostra padrão diluída quatro vezes (morina com_4x) com tempo de retenção 10.17min.	79

Índice de Tabelas

Tabela 1: Gradiente de concentração da fase móvel	38
Tabela 2: Deslocamento químico (δ) de grupos OH nos espectros de RMN. Comparativo entre Qt (literatura e experimental) e SrQ (experimental).....	47
Tabela 3: Análise elementar de C e H para o composto SrQ. Valor calculado pela estrutura teórica (teórico) e valor obtido pela análise (experimental)	49

Siglas e Abreviaturas

Ar – Absortion rate (taxa de absorção)

ALP – Alkaline phosphatase (fosfatase alcalina)

ATR – Attenuated Total Reflection (Refletância Total Atenuada)

BMD – Bone mineral density (densidade mineral óssea)

Cal – Calistefina

CaR – Receptor sensível a Cálcio

DMSO – Dimetilsulfóxido

FTIR - Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

MAPK – Mitogen-activated protein kinase (proteína quinase ativada por mitógeno)

MTT – (*brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio*)

NFAT – Nuclear factor of an activated T cell (fator nuclear de células T ativadas)

OPG – Osteoprotegerina

OSX - Osterix

PBS – Phosphate Buffer Solution (solução tampão)

PTH – Parathyroid hormone (paratormônio)

PMMA – Polimetilmetacrilato

RANK – Receptor activator of nuclear factor (NF)- κ B (receptor ativador do fator nuclear (NF)- κ B)

RANKL – Receptor activator of nuclear factor (NF)- κ B ligant (Ligante do receptor ativador do fator nuclear (NF)- κ B)

RhoA - membro da família homóloga de Ras A

RMN – Ressonâncias Magnética Nuclear

Runx-2 – Runt-related transcription factor 2 (Fator de transcrição II relacionado a runt)

SFB – Soro Fetal Bovino

SrM – Composto Morina-Sr²⁺

SrQ – Composto Quercetina-Sr²⁺

SrR – Ranelato de Estrôncio

TNAP - Tissue-nonspecific alkaline phosphatase (fosfatase alcalina inespecífica tecidual)

TRAP – Tartrate resistant acid phosphatase (fosfatase ácida resistente a tartarato)

Wi – Initial weight (massa inicial)

Wt – Final weight (massa final)

Introdução

1. Descrição histológica do tecido ósseo

1.1 Composição

O esqueleto é composto pelo tecido ósseo que serve de suporte para os tecidos moles, protege órgãos vitais, aloja a medula óssea, desempenha o papel de alavanca no momento da contração muscular e serve como repositório de íons, que são distribuídos de acordo com a necessidade do organismo ¹. Este é um tecido conjuntivo que apresenta uma parcela orgânica, composta por colágeno tipo I, proteoglicanos e glicoproteínas. O tecido compreende, além da parcela orgânica, uma parcela inorgânica. Os íons mais encontrados são o fosfato e o cálcio – componentes da apatita biológica – ocorrendo também bicarbonato, magnésio, potássio e sódio. No ponto de vista termodinâmico de modelos *in vitro*, para a formação da parcela inorgânica, os íons solúveis ali presentes, que estão em um patamar de energia livre elevado, passam por um processo de nucleação e posterior formação de cristais gerando uma deposição mineral junto à matriz extracelular de proteínas e polissacarídeos, assim como apresentado esquematicamente pela Figura 1. Para que isso ocorra, é essencial que os precursores vençam a barreira energética (ΔG) prevista para a formação da fase mineral (patamar de energia livre mais baixo). No ponto de vista cinético, as fases intermediárias 1 e 2 apresentadas na figura representam precursores menos estáveis, como o fosfato de cálcio amorfo e o octacálciofosfato, que antecedem a fase cristalina final de hidroxiapatita. Tais sequências de transições de fase são controladas pelas barreiras $\Delta G_{1,2,3}$ ^{1,2}.

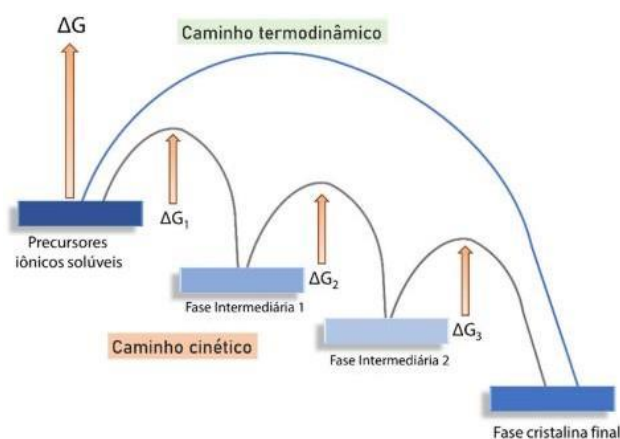


Figura 1: Representação esquemática do processo da variação de energia livre de Gibbs (ΔG) durante o processo de deposição mineral ².

O tecido ósseo está em constante processo de remodelação de sua forma e estrutura, fundamental para renovação e preservação da qualidade do esqueleto ³. Existem tipos celulares específicos envolvidos nos processos de formação, reabsorção, manutenção e remodelação óssea, e estes tipos derivam de duas linhagens: uma relacionada a um aspecto formativo do tecido e outra relacionado à sua reabsorção.

1.2 Estruturas celulares: formação, manutenção e reabsorção do tecido

A primeira linhagem (relacionada à formação do tecido) são os osteoblastos e osteócitos (Figura 2). Os osteoblastos são células de núcleo esférico e citoplasma basófilo que atuam na deposição de matriz proteica e de cristais de apatita no processo de formação óssea ^{1,4,5}.

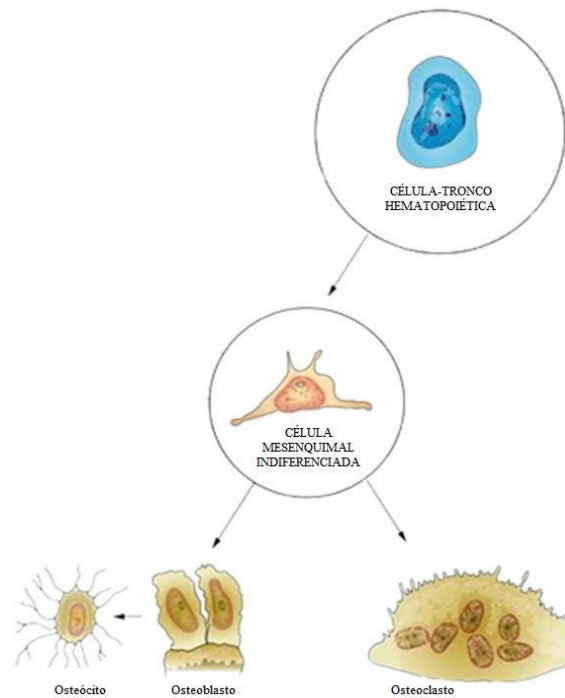


Figura 2: Tipos celulares presentes no processo de remodelação óssea. Imagem adaptada da referência ¹.

Osteoblastos se originam da célula progenitora mesenquimal multipotente que, com o gradual aumento na capacidade de diferenciação e uma queda na capacidade proliferativa, vão aos poucos se tornando células progenitoras, seguindo para pré-osteoblastos e por fim, osteoblastos maduros – período pós-mitótico. Nesse processo, vários fatores de transcrição são requeridos, dentre eles o Fator de transcrição II relacionado a runt (Runx-2) e o Osterix (OSX) ⁶. O fator de transcrição Runx-2 possui

um domínio altamente conservado runt, constituído por cerca de 128 aminoácidos, que se liga ao DNA e no estágio da embriogênese a fim de determinar a linhagem osteoblástica de células mesenquimais⁷. Enquanto o Runx-2 atua na formação de precursores de osteoblastos, o OSX irá ativar genes específicos para a formação de osteoblastos maduros e funcionais⁸.

Os osteoblastos também são responsáveis pela síntese da matriz extracelular óssea. Após maturação, os osteoblastos ficam presos na matriz recém-sintetizada, e passam a ser chamado osteócitos, tipo celular esse que se encontra em lacunas. Estando cobertos pela matriz, formam canalículos que se comunicam com outros osteócitos e com capilares sanguíneos, permitindo troca de íons¹.

Osteoclastos (Figura 2), células móveis e multinucleadas, são responsáveis pela reabsorção do tecido, de maneira a formar escavações na superfície óssea – lacunas de Howship^{1,4,5}. Em seu artigo Andia, Cerri e Spolidrio explicam que a “reabsorção pode ser auto-regulável, devido à dissolução mineral que precede a degradação da matriz orgânica, o que significaria o desenvolvimento de uma matriz porosa adjacente à borda em escova do osteoclasto.”⁴. O processo de reabsorção por osteoclastos também é responsável pela distribuição de íons pelo organismo, e, portanto, transcende a simples ideia de renovação do tecido.

A manutenção dos níveis de Ca^{2+} é essencial para a vida, visto que este íon opera na contração no músculo esquelético e cardíaco além de servir com um transdutor de sinal, agindo em receptores de membrana e atuando na secreção hormonal e na neurotransmissão. Quando a concentração de Ca^{2+} sérico se encontra em baixos níveis, ocorre a secreção do paratormônio (PTH), ocasionando o aumento do influxo de Ca^{2+} no espaço extracelular através de reabsorção óssea mediada por osteoclastos⁹. A alta capacidade absorptiva dos osteoclastos, provém da criação de um compartimento ácido (proveniente da secreção direcionada de H^+ por uma bomba de prótons), favorecendo a ação de enzimas hidrolíticas e que resulta na solubilização apatita biológica^{1,10}. O transporte dos íons para fora do compartimento de absorção pode ocorrer por variáveis vias, dentre elas: vesículas da membrana; proteínas de ligação de cálcio/fosfato; canais iônicos; bombas na membrana¹⁰.

1.3 Interação Osteoblasto-Osteoclasto

O sistema biológico exige uma remodelação óssea equilibrada, desta forma uma dinâmica balanceada entre a atividade dos osteoblastos e osteoclastos, sendo este equilíbrio perpetuado pelo sistema imune ⁴. As ações advindas desses dois tipos celulares não são isoladas. De fato, ambos se comunicam e regulam-se, de modo a suprir e atender necessidades sistêmicas ou locais. A remodelação óssea pode ser dividida em três partes:

- Iniciação: diferenciação de osteoclastos e reabsorção do tecido
- Transição: apoptose de osteoclastos e diferenciação de osteoblastos
- Terminação: mineralização e entrada em quiescência

e todas as etapas passam por essa comunicação célula-célula. Por exemplo, células precursoras de osteoblastos expressam RANKL que é um ligante que estimula a osteoclastogênese e que se comunica com o RANK (receptor transmembrana) presente em células precursoras. Como consequência, a expressão desse ligante pode desencadear a diferenciação de osteoclastos. Toda via, osteoblastos também expressam osteoprotegerina (OPG), que é uma molécula que se liga ao receptor RANK e inibi a osteoclastogênese ¹¹, tornando o processo regulado.

Na fase intermediária, pode-se evidenciar comunicações célula-célula (Figura 3). Ephrin são proteínas presentes em osteoclastos que se ligam a receptores de tirosina quinase (Eph) presentes em osteoblastos e a expressão de ambas resulta em transdução de sinal bidirecional. Uma via (sinalização reversa) suprime a diferenciação de osteoclasto. A segunda via (sinalização direta) ocasiona a diferenciação osteoblástica. A supressão da osteoclastogênese é resultado do bloqueio da expressão dos fatores de transcrição c-Fos e NFAT (fator nuclear de células T ativadas) enquanto o aumento da diferenciação precursoras de osteoblastos decorre da inibição da atividade da proteína membro da família homóloga de Ras A (RhoA) ¹¹.

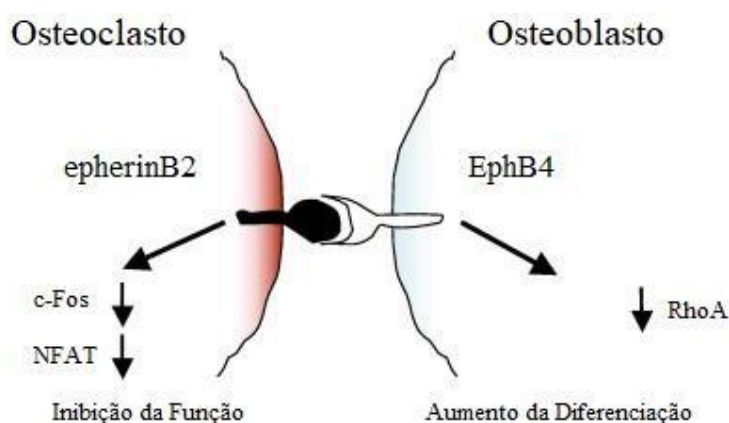


Figura 3 Representação da interação osteoclasto-osteoblasto – Transdução de sinal bidirecional. Imagem adaptada da referência ¹¹.

Apesar de sua capacidade de auto-regeneração, defeitos críticos causados por trauma ou mesmo por patologias como osteoporose, osteomalácia, no hiperparatiroidismo, na osteogênese imperfeita, entre outras, podem não ser naturalmente preenchidos ³. Na odontologia defeitos ósseos resultantes da reabsorção (quebra do equilíbrio no processo de remodelação) são recorrentes de infecções causadas por bactérias que se encontram ao redor do dente ou do implante ¹². Souza et al. ¹³ cita que diversos processos patológicos (lesões periapicais, cistos, neoplasias e doença periodontal) geram lesões na cavidade bucal e reabsorção do osso circundante, afetando o metabolismo do tecido.

Implantes autólogos, ou seja, retirados do próprio paciente e reimplantados no local do defeito são ainda a melhor opção para regeneração óssea. Porém, a necessidade de uma cirurgia adicional e risco de infecções devem ser considerados. Desta forma, a busca por biomateriais exógenos que possam atuar como substitutos ou estimular a regeneração óssea local se torna cada vez mais importante.

1.3.1 Substituintes ósseos – Os Biomateriais

Biomateriais são definidos como dispositivos, que entram em contato com sistemas biológicos, com aplicações diagnósticas, vacinais, cirúrgicas ou terapêuticas, podendo ter composição de origem sintética ou natural ¹⁴. Após a aplicação, este

material deve manter as suas propriedades e características estruturais, mas também, simultaneamente, substituir a função para a qual foi projetado e designado ¹⁵.

Compostos utilizados como enxertos ósseos podem ser divididos em autoenxerto, xenoenxerto, aloenxerto e materiais sintéticos, podendo ocorrer a combinações entre os mesmos. O denominado autoenxerto – enxerto autógeno – está relacionado ao tecido colhido e implantado no mesmo indivíduo. O aloenxerto – enxerto homólogos – é o tecido colhido de um indivíduo e implantado em outro de mesma espécie. O xenoenxerto refere-se ao enxerto que provém de outra espécie ¹⁶.

Materiais sintéticos também constituem ferramentas disponíveis para enxerto ósseo. A diversidade e capacidade de manipulação na composição destes materiais levam a variação de osteocondutividade e osteoindutividade, custo e resistência motora ¹⁶. Quando se fala em osteocondução fala-se acerca da capacidade do material permitir o crescimento do osso em sua superfície e o termo osteoindutividade remete à capacidade do material promover a diferenciação celular, fenômenos essenciais e que regem o processo de osteointegração ¹⁷. Além disso, há propriedades biológicas e químicas que são destaques em relação a estes materiais, como biocompatibilidade que está associado à citotoxicidade e alergenicidade do material e a estabilidade do material e sua forma de decomposição quando em contato com o organismo ¹⁴.

Estudar a tensão de ruptura, flexibilidade e módulo de elasticidade são parâmetros de suma importância para descrever a capacidade de suportar cargas e resistência a fraturas ¹⁴. Propriedades mecânicas mal avaliadas podem levar a uma distribuição de carga equivocada e resultar em falhas na incorporação do material. Por exemplo, materiais metálicos, por terem um elevado módulo elástico, podem levar a perda de densidade óssea decorrente do *stress shielding*, pois priva o osso da carga imposta e, seguindo a Lei de Wolff, inicia-se um processo de fragilização do tecido e falha do implante ¹⁸. Ainda, propriedades como molhabilidade do material e topografia (rugosidade e porosidade) que irão reger a adsorção de proteínas, as respectivas alterações conformacionais e orientação na superfície do material. Materiais de caráter hidrofílico tem melhor interação com proteínas presentes na matriz extracelular¹⁹. Superfícies rugosas podem elevar a diferenciação de osteoblastos e levar um aumento de formação de tecido na interface osso-implante ²⁰. A presença de poros em

biomateriais pode favorecer o processo de osteointegração, permitindo com que tecido cresça no interior do material ²¹.

Todas as propriedades descritas são essenciais para os processos de adesão e proliferação celular e devem ser levadas em consideração durante o planejamento de síntese do biomaterial. Para a formação de tecido sobre o implante (Figura 4), é necessário que ocorra, primeiramente a adsorção de proteínas pela superfície do material implantado. Uma vez em contato com os fluídos biológicos, em questão de segundos algumas proteínas já se encontram na superfície do material. Em questão de minutos, uma monocamada de proteínas é formada, para que logo após (período de 1 a 24h) ocorram processos de adesão e proliferação celular. Essa interação superfície-proteína-célula desencadeará sinalizações celulares que levarão a divisão celular, diferenciação e apoptose ^{22,23}.

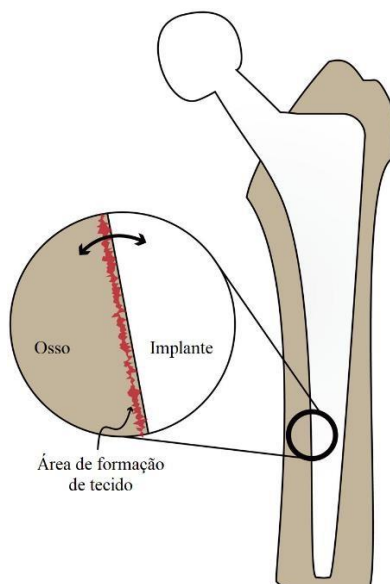


Figura 4: Representação da interface implante-tecido. Caso a interface não leve a formação de um tecido robusto, pode ocorrer um afrouxamento e necessidade de novos procedimentos cirúrgicos. Imagem adaptada da referência ²⁴.

Na sequência de aminoácidos de uma proteína adsorvida, o motivo Arg–Gly–Asp pode ser reconhecido pelas integrinas, que atuam como pontes entre proteínas na superfície e as células ^{23,25}. As integrinas são compostas por duas subunidades (α e β) que têm interações diretas com o citoesqueleto (filamentos de actina) via talina (Figura 5). As características de cada superfície a ser implantada irão resultar em adsorção diferencial e culminar na expressão diferencial de integrinas ¹⁹.

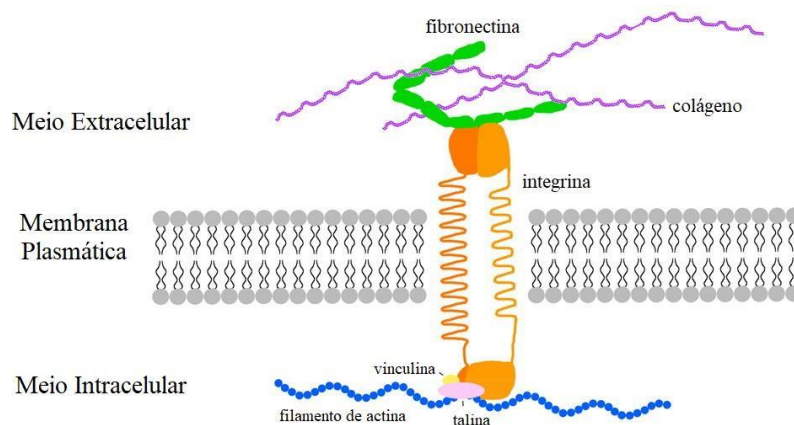


Figura 5: Representação da interação das proteínas da matriz extracelular com a célula via proteínas transmembrana. Imagem adaptada da referência ²⁴.

1.3.2 Biomateriais: primeira, segunda e terceira geração

O campo de estudo voltado a biomateriais evoluiu muito nos últimos anos. Por possuírem as mais diversas composições e propriedades químicas, físicas e biológicas, eles passaram a ser classificados em três categorias: primeira geração, segunda geração e terceira geração. Biomateriais de primeira geração estão relacionados com o fato de serem inertes. Projetados para desempenhar um papel de substitutos em um organismo deficiente, ao mesmo passo que não são capazes de gerar respostas a nível celular e molecular, não são citotóxicos. Logo, polímeros, materiais metálicos e cerâmicos são utilizados para compensar, preencher ou corrigir defeitos com interação mínima com o hospedeiro ²⁶⁻²⁸.

Já os de segunda geração tem capacidade de interagir com o organismo (bioatividade), ou seja, são capazes de permitir diferenciação e crescimento celular na superfície do material, além de serem biodegradáveis. Pensando na ortopedia e odontologia, sais de cálcio foram as substâncias mais utilizada na confecção de biomateriais de segunda geração, como biocerâmicas de hidroxiapatita, fosfatos e silicatos de cálcio ^{26,28}. Polímeros sintéticos (PMMA, por exemplo) e naturais (polissacarídeos) também são amplamente estudados, não só como materiais de segunda geração, mas também como alvos de melhorias para ampliação de propriedades ou geração de novos materiais que pudessem conter substâncias instrutivas e que desencadeassem repostas específicas (terceira geração) ^{29,30}.

Por fim, a terceira geração buscou, além de compensar, preencher ou corrigir defeitos no tecido, gerar uma resposta a nível molecular, ativando genes específicos e direcionando todo o movimento do organismo para um caminho. Além de biocompatíveis e bioativos, biomateriais de terceira geração partem da primícia da liberação controlada e local de moléculas. No caso de aplicações relacionadas ao tecido ósseo, além de atuarem no organismo a nível molecular, favorecem a osteoindução e osteointegração.^{26-29,31}

1.3.3 Cimento ósseo poroso da base de polimetacrilato (PMMA): da segunda para a terceira geração

O PMMA, resina acrílica utilizada em cirurgias ortopédicas, é um exemplo de polímero sintético resultante da polimerização do metacrilato de metila e que pode causar efeitos tóxicos devido a conversão incompleta do metil metacrilato (presença de monômeros residuais)^{14,32}. O cimento ósseo a base de PMMA apresenta biocompatibilidade, moldabilidade e estabilidade mecânica e rápida polimerização. Foi pela primeira vez utilizado na década de 60 como material de fixação de materiais metálicos em cirurgias ortopédicas e atualmente possui uma vasta presença no mercado e baixo custo^{30,33,34}. Apesar de ser já clinicamente utilizado, há restrições que dificultam o seu uso, como por exemplo, a não indução à remodelação óssea^{14,32}. Embora não tenha capacidade de induzir a remodelação, pesquisas recentes como a de Bastidas-Coral et al.³⁵ sugerem que o PMMA não é citotóxico, não interfere no potencial de diferenciação osteogênica, não afeta marcadores reguladores de osteoblastos e, por fim, não inibe a formação óssea. Um agravante em relação ao seu uso é que em um período de 10 a 15 anos, os pacientes necessitam de uma nova cirurgia devido à falha entre o osso e o implante, fenômeno associado à falta de integração entre a superfície do cimento e as superfícies do osso e da prótese³⁶. Outra barreira que ainda se encontra é o fato de o cimento ósseo de PMMA apresentar um caráter hidrofóbico. Além da baixa interação com a água, tal caráter cria efeitos desfavoráveis quando se analisa o implante em contato com o meio biológico donde a adsorção de proteínas ocorre de maneira intensa pela superfície, podendo ser irreversível, levando à possível desnaturação da proteína³⁷ e afetando, por consequência, biocompatibilidade, adesão e proliferação celular^{19,22,38}. Nos últimos anos, pesquisas apontaram que o cimento de

PMMA poroso apresenta uma melhor osteointegração quando comparada ao cimento compacto³³. A Figura 6 traz comparação entre o cimento poroso e o cimento compacto e fica evidente a dificuldade em determinar a interface entre osso-cimento poroso após um período de seis meses, apontando um processo de osteointegração mais eficaz. Kohn²¹ aponta que, a presença de poros ou superfícies porosas em um material, por permitir com que o tecido cresça nos poros, cria-se uma interdigitação entre o osso e a superfície gerando até uma distribuição de tensão mais uniforme²¹.



Figura 6: microtomografia computadorizada (micro-CT) comparando o processo de osteointegração fratura com cimento poroso (CI e DI), cimento compacto (CII e DII) e fratura sem cimento (CIII e DIII) após três e seis meses. Imagem adaptada da referência³³.

Além disso, muitas pesquisas envolvendo cimento a base de PMMA têm visado a liberação controlada de moléculas que possam desempenhar um papel benéfico a nível local³⁹⁻⁴¹. Pesquisas como a de Tomazela, L. et al.³⁰ mostram que nanopartículas contendo Sr^{2+} incorporada em cimento ósseo o aumentam a atividade da TNAP. A TNAP é uma ectoenzima, ou seja, está localizada na superfície externa de osteoblastos, que promove a hidrólise de ésteres e a formação do fosfato inorgânico, aumentando sua concentração local para a futura cristalização, ou seja, este é um marcador bioquímico que retrata a formação óssea^{42,43}.

1.4 Moléculas ativas na regeneração óssea

1.4.1 Ranelato de Estrôncio: um terapêutico descontinuado

Em 2004, um artigo publicado na revista *The New England Journal of Medicine*⁴⁴ apontou um novo medicamento para combater a fragilidade óssea decorrente da diminuição de densidade mineral em mulheres na pós-menopausa (estudo clínico de fase 2), o ranelato de estrôncio (SrR). O novo medicamento (Figura 7), composto por dois átomos de estrôncio e uma molécula de ácido ranélico, ingerido por via oral – consequentemente, uma entrega sistêmica do medicamento – levava a uma diminuição do risco de fraturas vertebrais e a um aumento da densidade mineral óssea.^{44,45}

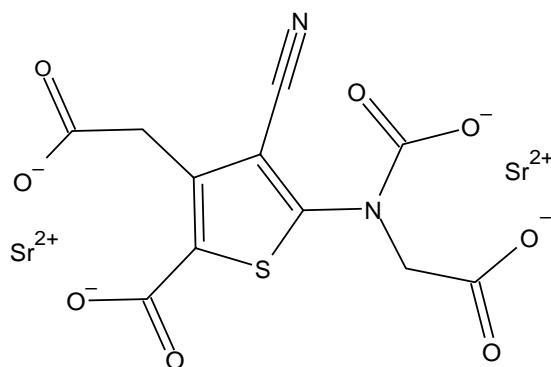


Figura 7: estrutura molecular do SrR.

O estrôncio (Sr), é um metal alcalino-terroso (Família IIA), com número de massa 87 u e número atômico 38, que se encontra no quinto período da tabela periódica. Suas propriedades químicas são semelhantes às do elemento cálcio (Símbolo: Ca; A = 40 u; Z= 20; quarto período), pois se encontram na mesma família, são divalentes e a relação carga/raio atômico são próximos. Em uma dieta regular, 99% do estrôncio consumido pelo ser humano é incorporado no esqueleto, o que ocasiona cerca de 0,035% de substituição do Ca por Sr^{45,46}. Além disso, é princípio ativo do medicamento SrR, atuando por mecanismos envolvendo o receptor sensível a Ca e gera influência na ação de osteoblastos (ativação de replicação celular via sinalização MAPK) e osteoclastos (inibição de diferenciação pela expressão de OPG)⁴⁷. Além disso, o Sr atua na expressão da β -catenina, contribuindo com a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais⁴⁸. Ainda, pode substituir íons Ca^{2+} na estrutura da apatita biológica, gerando um mineral com características químicas e físicas distintas da fase

mineral óssea natural ⁴⁶. Neste ponto reside o diferencial do Sr²⁺ comparado a outros compostos utilizado no tratamento de doenças óssea, este íon atuar tanto em vias de sinalização celular regulando simultaneamente atividade de osteoblastos e osteoclastos, como na alteração de propriedades do mineral apatita⁴⁷.

Contudo, efeitos adversos colaterais relacionados à administração de SrR fizeram com que este medicamento fosse descontinuado. Em 2014 um estudo apontou a ocorrência de eventos cardíacos em um ensaio clínico randomizado ⁵⁰. Náuseas, diarreia, dores de cabeça são eventos que podem ocorrer, além de existir uma discussão sobre a possibilidade de gerar incidentes cardíacos ⁵¹. Uma revisão bibliográfica recente (2021) recomenda o uso do medicamento genérico para indivíduos que apresentam altos riscos de lesão e não possuem fatores de risco cardiovascular, mas aponta fortes evidências de ocorrências de doença tromboembólica pelo uso do SrR ⁴⁵. Cabe ressaltar que a dose diária recomendada de SrR era de 1 g/dia. Em conjunto, esses eventos mais graves são causados por mineralização ectópica decorrente do uso de SrR em altas concentrações. Desta forma, a busca por novos compostos para o tratamento de doenças continua acentuada. A escolha de substitutos ao SrR, que apresentem efeito positivo na mineralização óssea, com possibilidade de administração em concentração reduzida é uma alternativa atraente. Dentre ligantes de íons divalentes para esta função podemos citar os flavonoides.

1.4.2 Flavonoides: uma revisão do seu potencial medicinal

De origem vegetal, flavonoides são polifenóis que possuem uma sequência de 15 carbonos na forma de dois anéis aromáticos (Anel A e Anel B) interligados por meio de uma pirano (Anel C). A estrutura apresentada abaixo (Figura 8), constitui o esqueleto desses metabólitos secundários, onde ligantes se conectam em alguns dos carbonos enumerados por meio de reações como metilação, hidroxilação, glicosilação, acilação e etc, gerando variantes ^{52,53}

Esses compostos naturalmente encontrados em plantas e vegetais possuem diversas aplicações, tanto na indústria de cosméticos quanto na agricultura. No ramo da farmácia, diversas drogas sintéticas têm sido substituídas por essas moléculas naturais por conta das suas propriedades anti-inflamatórias, hipotensoras, antitumorais, hipocolesterolêmicas e por atuarem como agentes antiparasitários ⁵⁴.

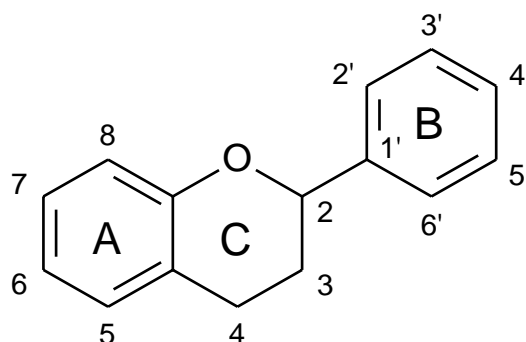


Figura 8: Estrutura base dos flavonoides.

Dentre seus principais potenciais, a atividade antioxidante atua na prevenção da oxidação de lipídeos e outras moléculas dos organismos, prevenindo uma série de reações em cadeia. Propriedades anti-inflamatórias e reversivas ou retardantes da hiperproliferação celular (prevenção ao câncer), tornam flavonóides objeto de interesse para estudos científicos ^{52,53,55}. Já foram catalogados mais de 4000 flavonóides naturais e a literatura científica traz diversos estudos sobre os efeitos de flavonóides no processo de perda de massa do tecido ósseo, a osteoclastogênese ⁵⁶.

Estudos *in vitro* utilizando a linhagem celular MC3T3-E1 mostram que diversos flavonóides têm a capacidade de atuar na diferenciação de osteoblastos, enquanto testes *in vivo* apresentam uma redução de perda de tecido ⁵⁷. Desta forma, síntese e caracterização química e farmacológica de compostos sintetizados a partir de flavonóides e estrôncio pode ser explorada como potenciais substitutos ao SrR. Aqui daremos destaques para duas espécies fitoquímicas: morina e quercetina. Estudos recentes mostraram que por si só, a morina apresenta efeito positivo sobre o metabolismo ósseo ⁵⁸ e a sua associação com estrôncio pode vir a melhorar essa propriedade ⁴⁹. Recentemente, nosso grupo sintetizou o composto morina-Sr²⁺ (SrM) [(C₁₅H₉O₇)Sr(H₂O)₂]Cl₃H₂O, mostrando seu efeito em manutenção da atividade e mineralização dos osteoblastos e de diminuir o número de osteoclastos maduros, quando comparado ao fármaco SrR ⁴⁹.

Marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo, em geral, podem retratar a formação ou reabsorção óssea. A fosfatase alcalina (ALP) é uma enzima marcadora de formação óssea resultante de atividade osteoblástica ⁴². Além disso, esta enzima é capaz de catalisar a hidrólise de diversos ésteres de fosfato ⁴³ gerando fosfato inorgânico

essencial no processo de mineralização. A capacidade do SrM de atuar na diferenciação osteoblástica foi relacionado ao aumento da expressão e atividade da ALP ⁴⁹. A fosfatase ácida resistente a tartarato (TRAP) é uma enzima específica marcadora da reabsorção óssea que é expressa por osteoclastos ⁵⁹ e que atua em diversos processos biológicos, tais como o desenvolvimento esquelético, degradando fosfoproteínas do esqueleto ⁶⁰. Em Cruz et al. ⁴⁹ vê-se que a capacidade do flavonóide em atuar na reabsorção está relacionada à menor formação de células com atividade TRAP, ou seja, o composto é capaz de diminuir a diferenciação de osteoclastos. Estes resultados evidenciam o efeito simultâneo deste flavonóide estruturado sobre metabolismo de osteoblastos e osteoclastos.

Além da morina, quercetina (Qt), seu isômero, tem sua ação sobre a osteogênese descrita na literatura. Propriedades como: redução da apoptose de osteoblastos; indução do aumento da diferenciação de osteoblastos; inibição da osteoclastogênese; diminuição do estresse oxidativo; são reportadas na literatura ⁶¹⁻⁶³. Através da inibição da atividade do complexo proteico (NF)- κ B, o flavonóide Qt foi capaz de inibir a diferenciação de precursores de osteoclastos. Além disso, evidências apontam que em determinadas concentrações, Qt seria capaz de aumentar o número de osteoblastos, a atividade da ALP, expressão da Runx-2 e induzir a mineralização ⁶².

A síntese de compostos de Qt com metais alcalinos-terrosos, terras raras e metais de transição (Figura 9), como cobre, zinco e ferro tem sido descrita na literatura ⁶³⁻⁷⁰. Propriedades antioxidantes foram reportadas, uma vez que, a redutibilidade da Qt foi aumentada quando associada a metais, sendo ela oxidada por radicais livres com mais facilidade ^{63,64,68,71,72}. Além disso, possíveis abordagens para tratamento de diabetes mellitus foram estudadas ⁷³ e a capacidade de aumento de atividade e expressão de ALP evidenciadas, bem como a regulação da expressão de Runx-2 e do colágeno do tipo I a nível molecular ^{66,74}. Por fim, tais colocações despertam interesse e trazem possibilidades de investigação e estudo em relação ao comportamento biológico de fitoquímicos associados a metais.

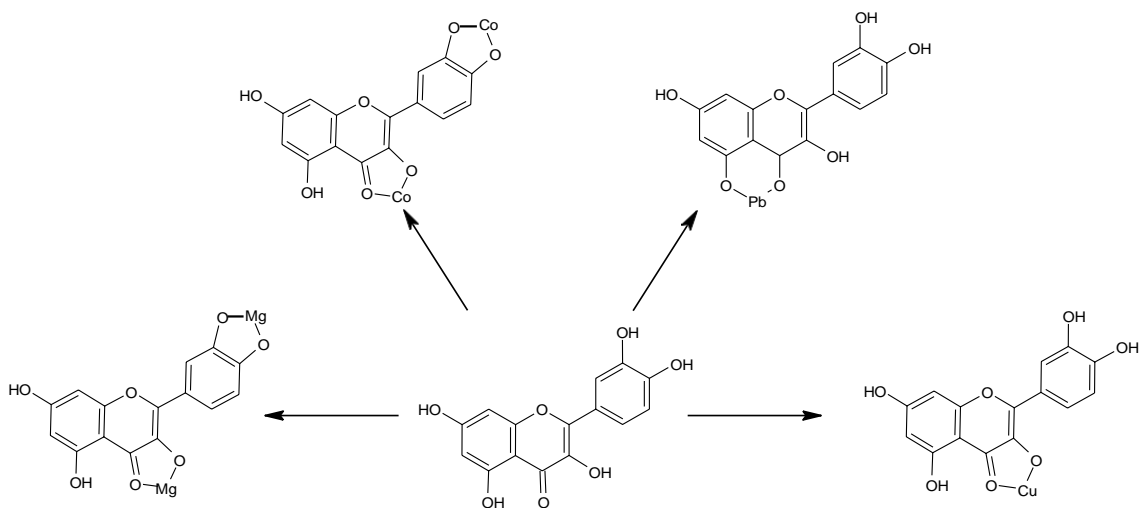


Figura 9: Representação das estruturas de Qt ligadas a metais. Estruturas adaptadas das referências 64–67.

1.4.3 Antocianinas

As antocianinas, pigmentos solúveis em água que são encontrados em frutas, raízes e entre outros são um subtipo de flavonóide (Figura 10-a). Antocianinas são derivadas do cátion flavilium ⁷⁵ (Figura 10-b) contendo dois anéis aromáticos (A e B) unidos por uma unidade de três carbonos ⁷⁶. Estes compostos fenólicos estão presentes em diversos alimentos e possuem atividade antioxidante, atuando sobre radicais livres. As antocianinas possuem atividades anti-inflamatórias e antioxidantes e potencial para reduzir doenças crônicas e cardiovasculares em humanos, visto que tais doenças tem associação com os efeitos causados por radicais livres ⁷⁷. Além destes, apresentam também propriedades anticancerígenas, antitumorais e antidiabéticos ⁷⁶.

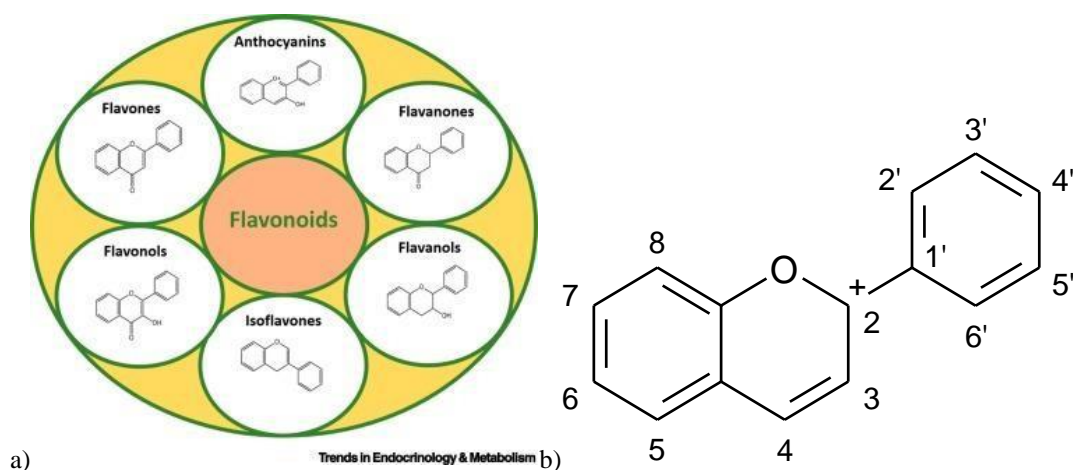


Figura 10: a) representação esquemática dos subtipos de flavonóides existentes (Imagens adaptada da referência 32) b) estrutura base das antocianinas.

O efeito das antocianinas na regeneração de tecidos moles tem sido descrito⁷⁸⁻⁸¹ e, apesar de ainda pouco explorado, o efeito de antocianinas em cultura de osteoblastos tem sido reportado. (77) mostraram recentemente que as antocianinas peonidin-3-O-glucósido e cianidina aumentaram a diferenciação de osteoblastos. A melhora na resposta osteogênica de osteoblastos pode estar relacionada com aumento na expressão de genes relacionados com mineralização como Runx-2 e ALP⁸³. Uma revisão recente também mostra os possíveis mecanismos de ação de antocianinas na osteogênese e no controle de reabsorção óssea, propondo-as como candidatas ao tratamento de osteoporose⁸⁴.

Objetivo

2.1 Objetivos Gerais

Preparar substituintes ósseos a base de PMMA contendo moléculas bioativas e seu efeito em culturas de osteoblastos.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Sintetizar um novo composto partindo de Sr^{2+} e quercetina (quercetina- Sr^{2+}), caracterizá-lo e analisar seus efeitos em cultura de osteoblastos *in vitro*.
- b) Incorporar o novo composto de quercetina- Sr^{2+} em cimento ósseo a base de PMMA.
- c) Preparar o composto morina- Sr^{2+} e incorporá-lo em cimento ósseo a base de PMMA.
- d) Caracterizar os cimentos ósseos modificados com os compostos flavonóides.

Metodologia

3.1 Síntese de flavonóides contendo estrôncio – *Morina*, *quercetina* e o Sr^{2+}

3.1.1 Síntese em solução metanólica

Para o estudo de formação do composto SrM por meio de espectroscopia UV-vis, adicionou-se 100 μ M de quercetina a 3mL de metanol (J.T. Baker, padrão HPLC), 5 μ L de NH_4OH (Dinâmica, 28-30% teor em NH_3) para a promoção da desprotonação dos grupos OH do flavonóide. Posteriormente, adicionou-se 30 μ L uma solução aquosa de $SrCl_2$ 0,01M, seguindo metodologia descrita em Cruz et al.⁴⁹

Para a síntese do composto partindo de Qt seguiu-se a mesma metodologia, porém efeito de diferentes concentrações de Sr^{2+} sobre a formação do composto foram estudados.

3.1.2 Isolamento dos compostos flavonóides- Sr^{2+} na forma de pó

O preparo desse novo composto se baseou no estudo de Cruz et al.⁴⁹. Brevemente, 0,151 g de quercetina foi solubilizada em 50,0 mL de metanol com a adição de 100 μ L de solução de NH_4OH (Dinâmica, 28-30% teor em NH_3). Sob agitação interrompida, 0,800g de cloreto de estrôncio hexahidratado foram adicionados lentamente a esta mistura e mantidos sob agitação por 2 h. O material formado foi centrifugado e posteriormente lavado com solução de clorofórmio: t-butanol (1:1, v/v) e seco a uma temperatura de 37°C.

3.2 Caracterização Química - Elucidação da estrutura do novo composto a base de quercetina e estrôncio

3.2.1 Espectroscopia UV-vis

Ambos quercetina e SrQ foram solubilizados em metanol e, com o auxílio de um espectrofotômetro Hewlett Packard 8453 e de uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1,00 obteve-se os espectros eletrônicos de absorção no UV-vis.

3.2.2 Espectroscopia de infravermelho (FTIR)

Com auxílio do espectrofotômetro Shimadzu-IR Prestige-21, o precipitado obtido foi disposto em uma pastilha de KBr e realizou-se leitura na faixa de 400–4000 cm^{-1} com resolução de 2 cm^{-1} .

3.2.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética (RMN)

Após solubilizar em DMSO-Deuterado, os espectros de ^1H -RMN foram obtidos através de um equipamento a Bruker Avance DRX-500 500 MHz (DQ-FFCLRP).

3.2.4 Análise Elementar

Com o auxílio de um analisador elementar - Perkin Elmer 2400 series II, as amostras foram dispostas em uma atmosfera de oxigênio e levadas à combustão. Os produtos dessa combustão foram quantificados em um detector de condutividade térmica (IQ-USP/SP).

3.2 Análise dos efeitos dos compostos flavonóides em cultura de osteoblastos *in vitro*

in vitro

A metodologia para cultivo de osteoblastos foi baseada nos trabalhos prévios do grupo de pesquisa (REFSSS). Utilizou-se a linhagem de células osteoblásticas MC3T3-E1 que foram cultivadas em α -MEM suplementado com 10% de SFB e 1% (v/v) de penicilina/ estreptomicina. Ao atingir 70% de confluência, as células serão tratadas com tripsina, ressuspensas em α -MEM e dispostas em placas de 24 poços de 2×10^4 células por poço (37 °C; 5% de CO_2), utilizando do ácido ascórbico e β -glicerofosfato como meio osteogênico. As células foram deixadas por 24h para adesão à superfície inferior das placas. Após solubilizar o composto SrM, SrQ e Calistefina (Cal) em DMSO, as células foram tratadas com diferentes concentrações. O meio foi trocado a cada 2 dias.

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio MTT (*brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio*) clássico após 24, 48 e 72 horas utilizando o protocolo adaptado por Faria et al (2015). A partir da coleta de uma fração da

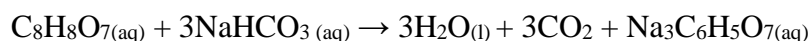
membrana plasmática após 7 e 14 dias, a atividade da ALP foi determinada com o auxílio do substrato fosfato de *p*-nitrofenil (PNPP), utilizando o protocolo proposto por (81). A viabilidade celular foi expressa em porcentagem tomando como padrão uma cultura de controle enquanto a atividade do ALP será expressa em U.mg⁻¹ onde U (unidade de enzima) é o montante de enzima que hidrolisou 1.0 nmol do substrato/ min a 37°C por mg de proteína.

Ensaio de mineralização foram realizados utilizando-se vermelho de alizarina. Os testes foram realizados após 21 dias de cultura, seguindo a abordagem proposta por (82).

Por fim, utilizou-se a técnica Western Blot para quantificar as proteínas fosfatase alcaline tecido não-específica (TNAP) e Runx-2, a fim de determinar a capacidade dos compostos em estimular a produção destas proteínas células cultivadas nos períodos de 7 e 14 dias. Todos os ensaios com células foram realizados ao menos em triplicada. Os experimentos foram realizados em triplicata e as comparações foram feitas através da análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey.

3.3 Preparação do cimento ósseo

O procedimento de preparo do cimento foi inspirado em Cimatti⁸⁷ e Tomazela³⁰ e a mistura foi realizada de acordo com a instruções do cimento cirúrgico utilizado no experimento (Cimento cirúrgico Jonhson & Jonhson®, marca De Puy® Smart Set Endurance MV, England). Brevemente, 40,0 g do componente em pó (PMMA) foi adicionado em cuba de aço inoxidável sendo logo em seguida adicionados 8,0 g de ácido cítrico e 10,5 g de bicarbonato de sódio. Em seguida, foi adicionado à mistura um dos seguintes compostos: SrM e SrQ nas quantidades de 500 µg. Após obtenção de uma mistura homogênea, foram adicionados 18,8 g do agente polimerizante fornecido pelo fabricante. Passados três minutos, foram adicionados 5,0 mL de água deionizada à mistura. A reação com o bicarbonato de sódio, libera CO₂ que se distribui de forma aleatória no material e gerando um cimento poroso. A equação abaixo demonstra o processo de produção do dióxido de carbono.



No quarto minuto o cimento foi colocado em moldes de teflon com 6 cm de altura e 3 cm de diâmetro e tampado no quinto minuto impedindo a sua expansão. Após 48h o cimento foi removido dos moldes.

3.4 Análise e Caracterização dos cimentos

3.4.1 Usinagem dos corpos de prova

Os cimentos ósseos foram usinados em torno de alta pressão, resultando em cilindros de 5,0 mm de altura e 13,0 mm de diâmetro, na oficina de precisão PCARP-Ribeirão Preto

3.4.2 Análise de liberação por HPLC

Após a retirada dos moldes de teflon e sua usinagem, os corpos de prova (5 x 15 mm) foram mergulhados em 4 mL de uma solução de tampão fosfato-salino (PBS) durante diferentes períodos de tempo (0, 12, 72, 120, 168 e 336 horas) a $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. A análise de liberação dos reagentes foi feita através por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

As análises por HPLC foram inspiradas em Muñoz, Machado e Gonzáles⁸⁸, contendo pequenas modificações. Para as análises cromatográficas, utilizou-se uma coluna C18 (Phenomenex Luna, 150 x 4.60 mm, 5 micron e 100 Å) com vazão de 1mL/min (Loop de 20 µL) com um detector operando no comprimento de onda 370 nm. Para fase móvel utilizou-se o um gradiente, conforme descrito na tabela a seguir.

Tabela 1: Gradiente de concentração da fase móvel

Bomba A	Bomba B	Gradiente
<i>Ácido fosfórico</i>	<i>Metanol</i>	<i>Tempo</i>
<i>em água</i>		<i>(min)</i>
<i>(0.08% v/v)</i>		
	35%	0-1.5
	55%	4
	55%-100%	12

100%	20
35%	21
35%	30

3.4.3 ATR-FTIR

Com auxílio do espectrofotômetro Shimadzu-IR Prestige-21, os corpos de prova foram macerados e sua composição analisada, a fim de evidenciar mudanças na composição do cimento após adição dos compostos. Para isso, foi acoplado ao equipamento um acessório para refletância total atenuada (ATR).

3.4.3 Teste de absorção (*Swelling*) ou Intumescimento

Foram testadas três amostras: cimento ósseo a base de PMMA; cimento ósseo a base de PMMA incorporado com SrM; cimento ósseo a base de PMMA incorporado com SrQ.

As amostras foram mergulhadas em água deionizada ou solução PBS à 37°C. As amostras tiveram suas massas aferidas antes de serem mergulhadas. De tempo em tempos, as amostras eram retiradas do meio em questão, o excesso de líquido removido com o auxílio de papel filtro e sua massa aferida novamente. Por fim, calculou-se a taxa de absorção de água (Ar) de cada cimento ósseo utilizando a fórmula a seguir:

$$Ar = \frac{Wt - Wi}{Wi} \cdot 100\%$$

onde Wt é a massa final e Wi é a massa inicial.

Resultados e

Discussão

4.1 Caracterização do composto morina-Sr²⁺ (SrM) e do novo composto quercetina-Sr²⁺ (SrQ) por espectroscopia UV-Vis

A Figura 11 traz o espectro UV-Vis do composto SrM, comparando-o com o espectro UV-vis do flavonóide livre, ambos solubilizados em metanol.

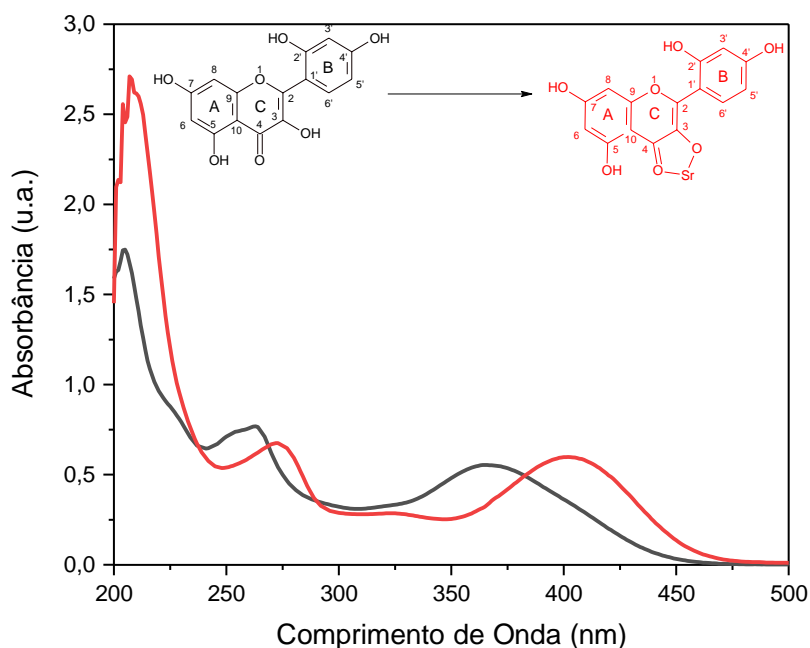


Figura 11: Espectro UV-Vis de solução 100 μM de morina (linha preta) e do composto SrM (linha vermelha) em metanol. Inserção: estrutura da morina (preto) e SrM (vermelho)

A inserção na Figura 11 apresenta a estrutura da morina e, conforme mostrado por Malešev & Kuntić ⁶⁷, a espectroscopia UV-vis para flavonóides sugere o surgimento de duas bandas. A primeira banda entre 240–280 nm referente às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ do anel “A”. A segunda banda surge dentro de um intervalo de 300 – 400 nm, referente às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ do anel “B”.

Em relação ao espectro UV-Vis obtido para morina, é possível evidenciar duas bandas principais, uma ocorrendo em torno de 263 nm e a segunda ocorrendo por volta de 365 nm (Figura 11, linha preta). É possível verificar que a banda referente ao anel B sofreu deslocamento batocrômico, ocorrendo por volta de 409 nm. Tal evidência, como

apontam Cruz et al. e Malešev & Kuntić^{49,67}, pode ser entendida como um indicativo do sucesso em relação à reação de complexação do cátion metálico ao flavonóide. Cruz et al.⁴⁹ elucidaram a estrutura do composto formado entre morina e Sr²⁺ chegando à fórmula [(C₁₅H₉O₇)Sr(H₂O)₂]Cl.3H₂O. Com o sucesso na replicação do experimento, a incorporação do composto produzido na estrutura do cimento será descrita nos tópicos adiante.

Inspirados nesta substância, partiu-se para a síntese de novos compostos utilizando quercetina (Qt). Compostos de Qt com metais já foram descritos na literatura^{64,65}, porém, a união deste flavonóide com Sr²⁺ é inédita. Analisando o espectro UV-Vis da Qt em metanol e em solução metanólica basificada com NH₄OH e suas estruturas apresentados na Figura 12, podemos atribuir a banda localizada em 372 nm (banda I) à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ no sistema cinamoil (anel B). A banda 255 nm (banda II) é atribuída à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ no sistema benzoil (anel A)^{71,89}. Em meio básico, evidencia-se que a banda I e banda II se deslocam para maiores comprimentos de onda, como efeito da desprotonação de grupos OH e diminuição de energia atribuída à contribuição dos elétrons π para aumento da ressonância, enquanto a banda em ~ 302 nm, menos intensa, foi deslocada para 332 nm e teve sua intensidade aumentada.

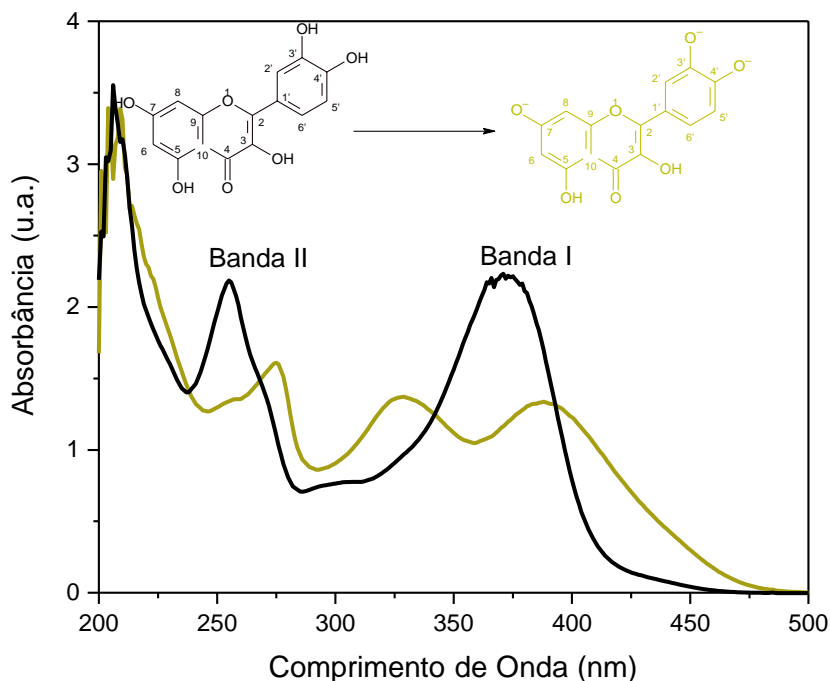
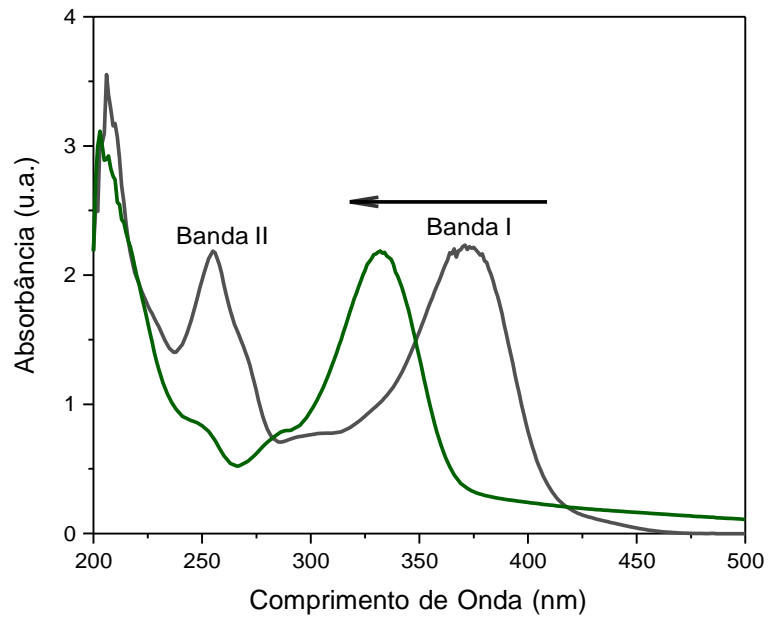


Figura 12: Espectros UV-vis de solução de Qt em metanol (linha preta) e em metanol meio básico (pH \cong 9,05) (linha amarela). Inserção: estrutura da Qt com os grupos OH protonados (preto) e estrutura da Qt com os grupos 3'OH, 4'OH e 7OH desprotonados (amarelo).

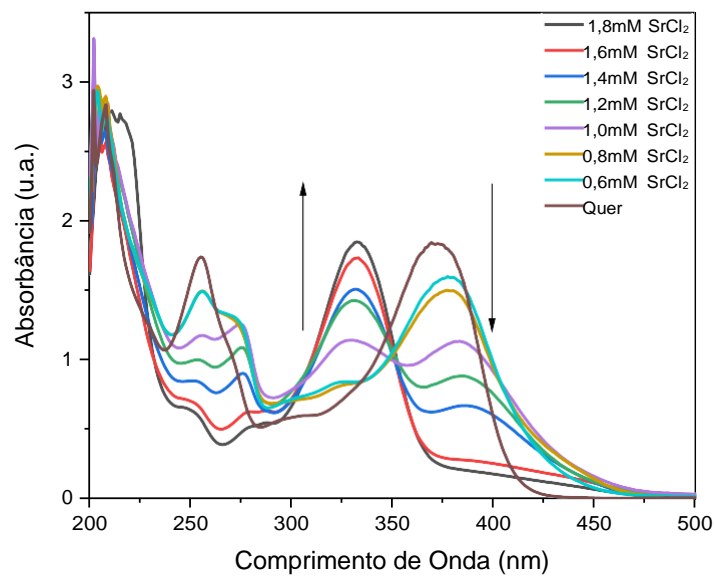
Sauerwald et al.⁹⁰ descrevem que a Qt possui três valores de pKa, onde o pK1 e pK2 estão relacionados com a desprotonação dos grupos OH dos grupos 3'OH, 4'OH (pK1 \cong 7,00) e 7OH (pK2 \cong 9,00). A Qt possui a seguinte ordem de desprotonação 5OH < 3OH < 3'OH < 7OH < 4'OH, ou seja, em pH fisiológico apenas os grupos 5OH e 3OH (pK3 = 11,55)⁹¹ estariam protonados⁹². O nosso método de síntese consiste na adição de 5 μ L de NH₄OH em 3 mL de Qt 100 μ M, o que nos fornece um pH \cong 9,05. Desta forma, poderia se esperar que os grupos 3'OH, 4'OH e 7OH estejam desprotonados e que a complexação com o metal divalente, pudesse vir a ocorrer com nos grupos 3'OH e 4'OH. Mesmo nesse contexto, a literatura descreve inúmeros compostos onde a ligação do metal ocorre no grupo carbonila do anel C e com o grupo 3OH, visto que esta hidroxila possui grande poder de quelação e uma natureza ácida^{67,68,71,93}.

Analisando a molécula, a adição de íons à solução pode ocasionar a complexação em três regiões distintas: nos grupos 3'OH e 4'OH; no grupo 3OH com a carbonila do anel C; no grupo 5OH com a carbonila do anel C⁶⁷. Além disso, há a possibilidade de complexação em duas regiões simultâneas: nos grupos 3'OH e 4'OH e no grupo 3OH com a carbonila do anel C^{94,95}.

Após adicionar SrCl₂ à solução, os espectros UV-Vis mostrados na Figura 13, indicam que ocorre um deslocamento hipsocrômico da banda I e um efeito hipocrômico na banda II (Figura 13-a). Gulbin et al.⁶⁵ relata um efeito semelhante em relação ao deslocamento hipsocrômico da banda I em seu estudo sobre a formação de compostos de Qt com Fe²⁺. A presença de um ponto isobéptico próximo a 350 nm (figura 13-b), mostra que a reação química ocorre de fato e uma nova espécie é formada.



a)



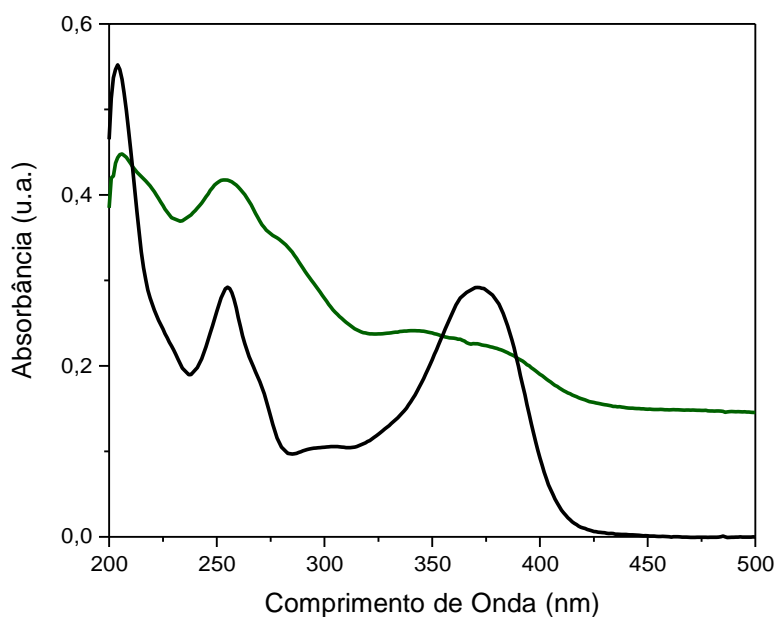
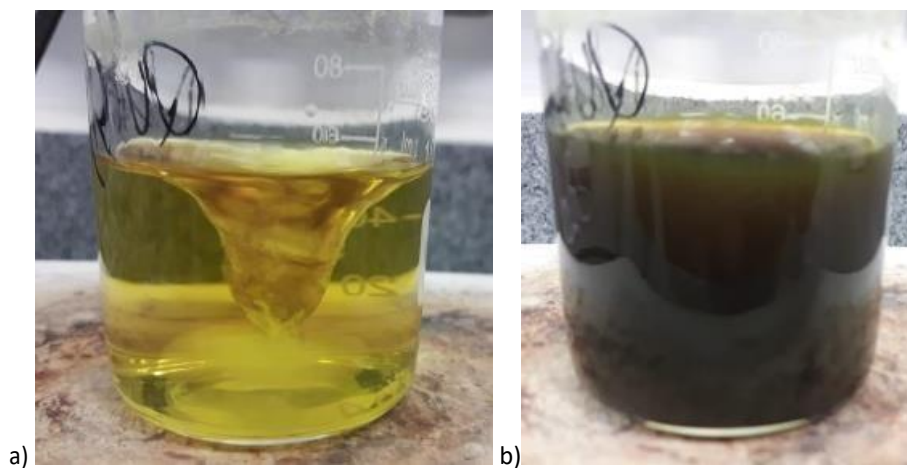
b)

Figura 13: Espectros UV-Vis do composto SrQ. a) comparativo entre os espectros da Qt (linha preta) e do composto SrQ (linha verde) b) solução metanólica de Qt (100 μ M) com diferentes concentrações de SrCl_2 .

4.2 Isolamento do novo flavonóide quercetina-Sr²⁺ (SrQ)

A Figura 14 traz fotografias das soluções de Qt pré (14-a) e pós (14-b) adição do sal de estrôncio. Nota-se mudança da coloração de amarelo para marrom com a adição de Sr²⁺ ao meio contendo Qt. Essa alteração de cor já havia sido descrita por Cruz et al^{49,96}, como uma das formas de se confirmar a formação do composto SrM.

Analisando o espectro UV-Vis do composto formado (Figura 14-c), evidencia-se uma banda em torno de 344 nm. Tal fato pode ser entendido como uma possível ligação do Sr²⁺ ao grupo carbonila presente no C4 e do grupo hidroxila presente no C3 do anel C, uma vez que ocorre um deslocamento da banda I da Qt para regiões de menores comprimentos de onda e há um deslocamento hiperacrômico da banda II.



c)

Figura 14: Formação do composto quercetina-Sr²⁺. Fotografias da a) solução metanólica de quercetina pré adição de SrCl₂ e b) solução metanólica de quercetina pós adição de SrCl₂ e c) Espectros UV-vis comparativo do composto SrQ (linha verde) e da Qt (linha preta).

4.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) do flavonóide SrQ

Por meio dos espectros de FTIR apresentados na Figura 15, é possível se identificar presença de bandas coincidentes entre os espectros da Qt pura e do composto. Porém a redução do número de modos vibracionais intensidade para todas as bandas na molécula complexada é um indicativo da formação de uma estrutura mais rígida, atribuída à estruturação do flavonóide com o Sr²⁺.

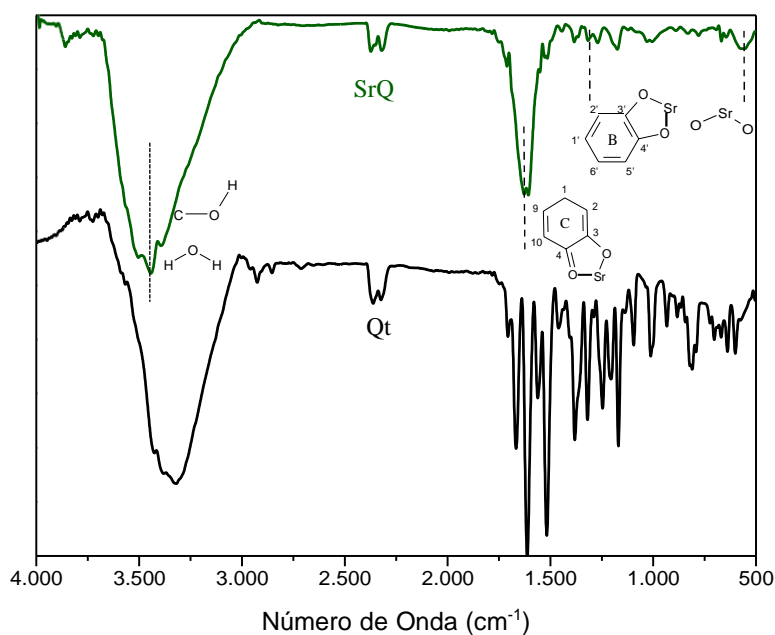


Figura 15: Comparação de espectros infravermelho da Qt (linha preta) do SrQ (linha verde).

A banda larga na região entre 3200-3400 cm⁻¹ revela a presença de grupos -OH ou moléculas de água de estrutura, tanto para a Qt (3318 cm⁻¹) quanto para a SrQ (3442 cm⁻¹)^{69,73}. Além disso, nessa região é indicado a deformação do grupo C-O-H, que para o composto, se encontra deslocado para menores valores de número de onda. Este deslocamento é indício de ligação do cátion aos grupos OH desprotonados devido ao

aumento de pH na molécula de Qt, conforme reportado e descrito pelo resultado obtido no espectro UV-Vis (Figura 12).

Em aproximadamente 1660 cm^{-1} observa-se para a Qt uma banda atribuída ao estiramento do grupo $C4=O$. Para a SrQ essa mesma banda é deslocada para valores menores de número de onda (1627 cm^{-1}) levando a inferir a participação desse grupo na complexação. Dados semelhantes foram reportados em estudos de ligação da Qt com magnésio, cobre, zinco e chumbo^{68,69,71,97}. Por fim, a presença de uma banda em 554 cm^{-1} (ausente na Qt), relacionada ao estiramento $Sr-O$ dá indícios da complexação do Sr^{2+} , uma vez que estudos envolvendo complexação com outros íons metálicos apresentam bandas na mesma região e a colocam como evidência de complexação^{68,71,73,98}. Por fim, para a Qt encontramos ainda uma banda por volta de 1319 cm^{-1} que para o SrQ se localiza em 1365 cm^{-1} . Resultado semelhante foi indicado em compostos partindo de magnésio e que é atribuído à ligação do metal no anel B⁶⁸. A análise dos espectros UV-Vis e FTIR suportam a formação de flavonoide SrQ. Os resultados de análise elementar e RMN a seguir dão suporte à elucidação da estrutura.

4.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os grupos 3-OH, 4'-OH e 3'-OH foram classificados, através de estudo bibliográfico e análises experimentais, como candidatos a formação de ligações com o Sr^{2+} ^{94,95}. As análises de RMN demonstram que esses grupos pressupostos, se mostram ausentes para o precipitado formado conforme a metodologia descrita, conforme aponta a tabela 2 e suporta a figura 16.

Tabela 2: Deslocamento químico (δ) de grupos OH nos espectros de RMN. Comparativo entre Qt (literatura e experimental) e SrQ (experimental).

Grupos δ (ppm)	5-OH	7-OH	3-OH	4'-OH	3'-OH
Literatura – Qt 68,71,93,99	δ 12.49	δ 10.8	δ 9.6	δ 9.39	δ 9.29
Experimental – Qt	δ 12.43	δ 10,72 (baixa absorbância)	δ 9,95		
Experimental – SrQ	δ 15.00	-	-	-	-

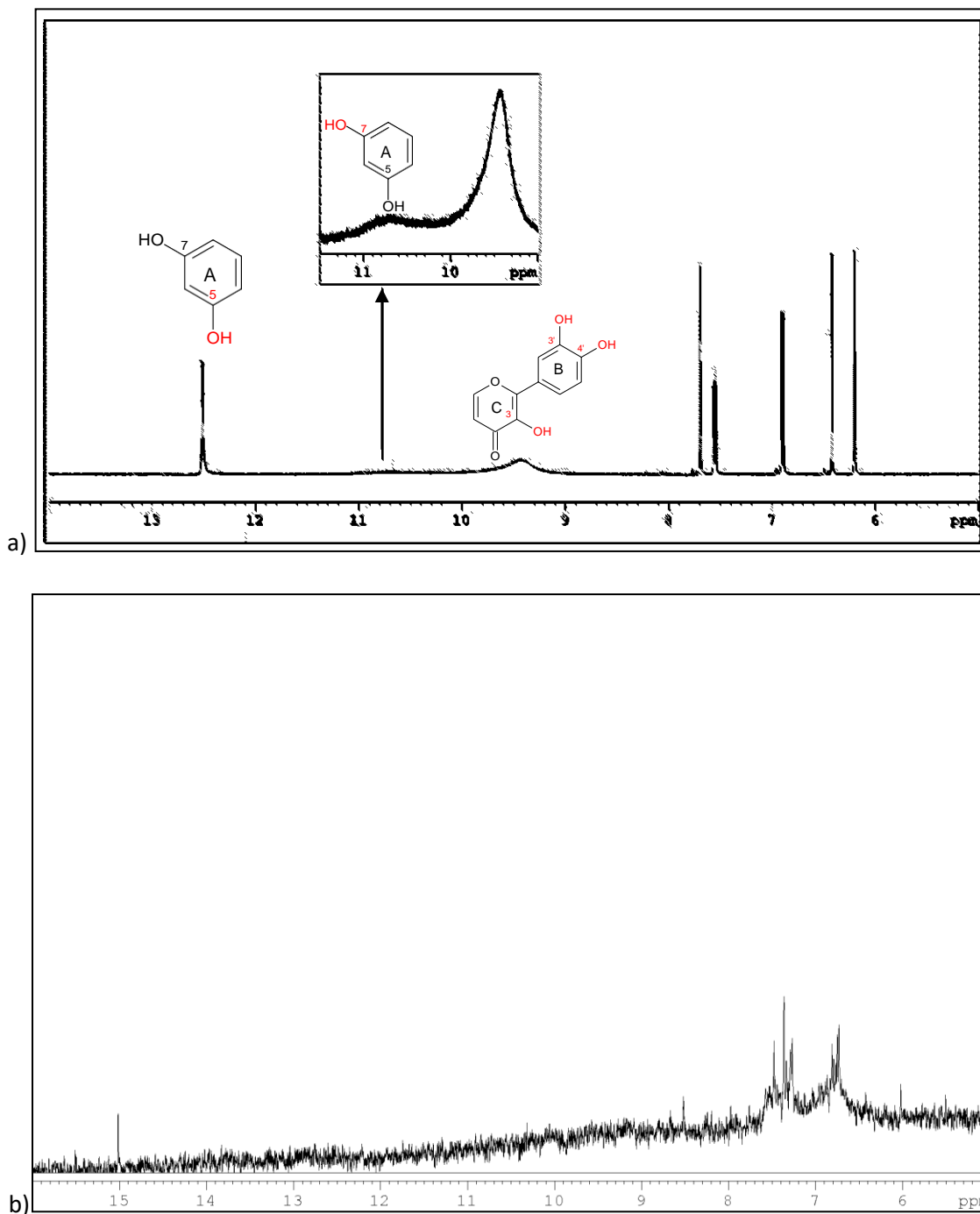


Figura 16: Espectros RMN do flavonóide Qt (a) e do composto SrQ (b).

Na figura 16-a, observa-se apenas um pico para os grupos 3-OH, 4'-OH e 3'-OH em 9,95 ppm, que estão ausentes na figura 16-b. No espectro da Qt, o pico em 10,72 ppm, relacionado do grupo 7-OH está presente, porém com baixa intensidade, sendo possível observá-lo após ampliação do espectro (ver insert na figura 16-a). Esse mesmo grupo não se apresenta no espectro do composto SrQ.

Logo, as análises sustentam que a estrutura do composto SrQt sintetizado por nosso grupo de pesquisa é formado por meio da ligação do metal com o grupo 3'OH e 4'OH e o grupo 3OH com a carbonila do anel C, conforme estrutura da figura 17.

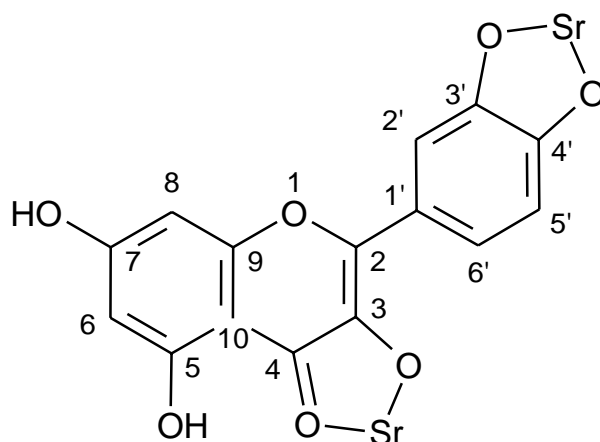


Figura 17: Flavonóide Qt ligada a dois átomos de estrôncio (Sr).

4.5 Análise Elementar

De forma a se confirma a estrutura do composto, foram realizadas análises de análise elementar C e H. Os dados obtidos foram comparados com a estrutura elucidada por UV-Vis, FTIR e RMN (Tabela 3). Os átomos de C são provenientes apenas da estrutura do flavonóide, enquanto H estão presentes no flavonóide e nas possíveis águas de hidratação indicadas no espectro de FTIR. A % de H obtida pela análise elementar indica a existência de 19 átomos de hidrogênio, donde espera-se que 7 sejam do composto SrQ. Os demais hidrogênios (12) levam a crer que existam cerca de 6 moléculas de água que podem ser entendidos como moléculas de hidratação.

Tabela 3: Análise elementar de C e H para o composto SrQ. Valor calculado pela estrutura teórica (teórico) e valor obtido pela análise (experimental).

C Teórico%	C Experimental%	H Teórico%	H Experimental %	Massa do Composto SrQ (teórico)	Massa do Composto SrQ (Experimental)
29,92%	30,96%	3,28%	3,36%	582,354g.mol ⁻¹	581,925g.mol ⁻¹

Utilizando a ideia de que houve a formação de um composto contendo dois átomos de estrôncio e seis moléculas de água, obtemos um valor de massa teórico para o SrQ (582,354 g.mol⁻¹) próximo ao valor experimental. A massa molar da estrutura por

nós proposta é $581,925 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Por fim, com todas as análises presentes, obtemos a seguinte fórmula para o composto sintetizado $[(\text{C}_{15}\text{H}_7\text{O}_7)\text{Sr}_2]\cdot 6(\text{H}_2\text{O})$.

4.6 Análise dos efeitos das moléculas bioativas na regeneração óssea em meio de cultura de Osteoblastos *in vitro*

De forma a se testar o potencial de flavonóides – e antocianinas¹ – na formação de matrizes mineralizadas, células pré-osteoblásticas MC3T3 foram cultivadas por 7, 14 e 21 dias, em meio osteogênico contendo os compostos. O primeiro passo foi analisar a viabilidade celular em função da concentração de forma a se investigar a citotoxicidade das amostras. Como comparação, foi utilizado o medicamento ranelato de estrôncio (SrR). Desta forma, no meio de cultura foram adicionamos os seguintes compostos em duas concentrações: ranelato de estrôncio $10 \mu\text{M}$ (SrR₁₀) e $80 \mu\text{M}$ (SrR₈₀); quercetina $10 \mu\text{M}$ (Qt₁₀) e $80 \mu\text{M}$ (Qt₈₀); o novo composto quercetina-Sr²⁺ $10 \mu\text{M}$ (SrQ₁₀) e $80 \mu\text{M}$ (SrQ₈₀); A figura 18 apresenta os resultados obtidos.

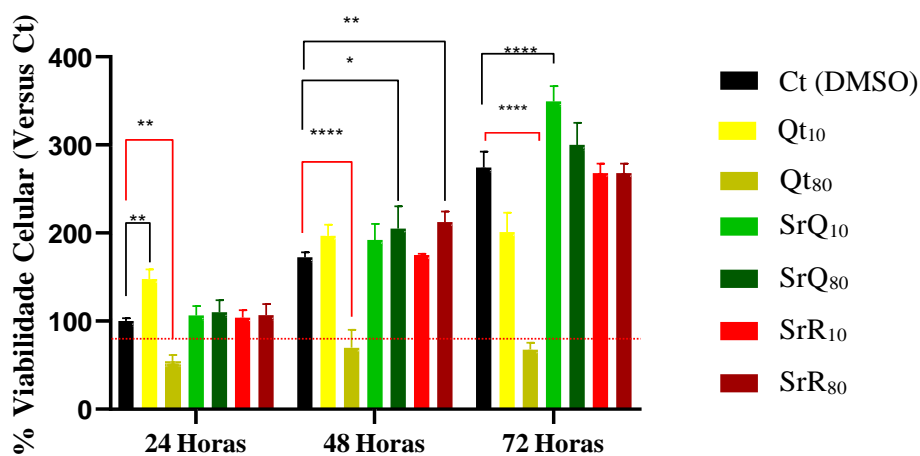
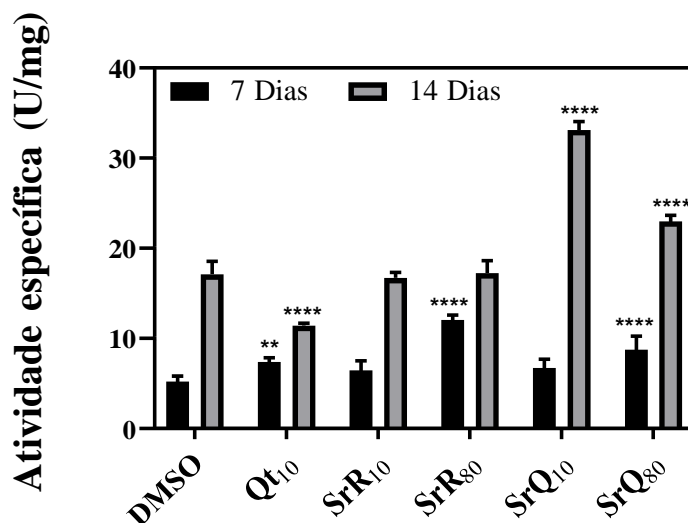


Figura 18: Viabilidade de osteoblastos em presença de quercetina (Qt), quercetina-Sr²⁺ (SrQ) e ranelato de estrôncio (SrR), após 24, 48 e 72h de cultura. A linha pontilhada indica o valor de 80% que é utilizado para demarcar o limite de não-citotoxicidade. O controle (Ct) consistiu em células cultivadas na ausência dos compostos. Os dados apresentados contam com *p =0,0398 **p <0,0085 e ****p < 0,0001.

Os resultados apresentados na figura 18 mostram que nas primeiras 24h houve diminuição de 50% na viabilidade para as amostras contendo Qt $80 \mu\text{M}$, que se estendeu

¹ Olhar Apêndice A – testes iniciais da antocianina Calistefina *in vitro*.

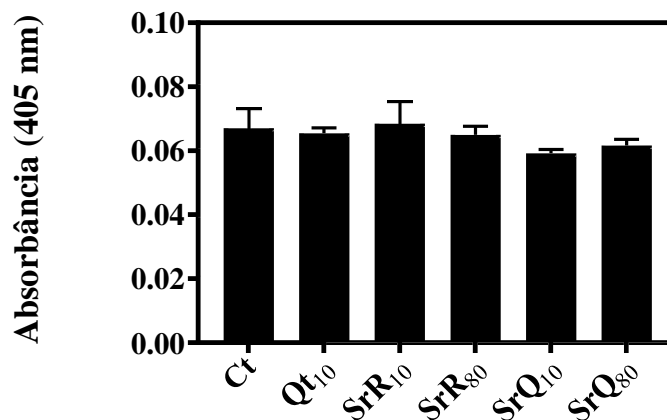
para os outros períodos de tempo, indicando citotoxicidade do flavonóide puro nesta concentração. Visto os dados obtidos, os experimentos posteriores contaram apenas a Qt na concentração de 10 μ M. É interessante notar que a associação do flavonóide à estrôncio diminui sua toxicidade, uma vez que a amostra SrQ não foi citotóxica nas concentrações estudadas em nenhum intervalo de tempo. O composto desenvolvido pelo grupo (SrQ), não se apresentou citotóxico em nenhuma concentração (10 μ M ou 80 μ M), sendo que em baixas concentrações não houve diferença estatística nas primeiras 48h da cultura comparado ao controle, mas elevou a viabilidade celular em 72h. Por fim, o fármaco SrR não se apresentou citotóxico nas concentrações estudadas (Figura 18) e, pensando na análise referente a atividade da TNAP (Figura 19-a), não ocorreram reduções de atividade em nenhum dos períodos para ambas as concentrações.



a)



b)



c)

Figura 19: a) Efeito sobre mineralização. Atividade Específica da TNAP após 7 e 14 dias de cultura. b) Western blot das proteínas Runx-2 e TNAP após 7 dias de cultura. c) Ensaio de mineralização utilizando vermelho de alizarina para marcar nódulos de mineralização formados em cultura de células após 21 dias.

O controle (Ct) consistiu em células cultivadas na ausência dos compostos. Os dados apresentados contam com *p =0,0398 **p <0,0085 e ****p < 0,0001.

Pensando na atividade da TNAP apresentada na figura 19-a, na concentração de 10 μM , o composto Qt apresentou nos primeiros sete dias uma elevação da atividade da TNAP. Contudo, no 14º dia, representou a maior queda.

No período de 7 dias, o teste com o compostos SrQ na concentração de 10 μM apresentou uma atividade de TNAP igual ao controle, mas para a concentração de 80 μM houve um aumento. Em 14 dias ambas as concentrações aumentaram a atividade de TNAP com em relação ao Ct e à Qt pura. Esse fato (com destaque para a menor concentração) reforça, mais uma vez, o papel do íon divalente na ativação desta enzima. Este feito já foi descrito para o composto SrM ^{49,96} e para nanopartículas contendo Sr^{2+} ³⁰, adicionadas a culturas de osteoblastos. Esse dado indica que o aumento da atividade evidenciada pela SrQ é um reflexo do aumento da sua capacidade de obtenção de fosfato, podendo ainda, estar atrelado ao aumento de conteúdo proteico.

No estudo de Cruz et al. ⁴⁹, os autores reportaram que o aumento de atividade de TNAP estava também relacionado com aumento de sua expressão em presença do flavonóide SrM. A figura 18-b indica, por meio de uma análise semiquantitativa por meio de mudanças na intensidade de pixels, a diferença de conteúdo proteico entre as drogas e o controle. Em sete dias, o SrQ apontou uma expressão de Runx-2 e TNAP pouco mais elevada que o controle. Estudos sobre compostos de Qt associados a zinco e

cobre utilizaram das técnicas Western blot e RT-PCR e apontaram uma maior expressão da proteína Runx-2 decorrente do uso de compostos quando comparados como o meio de cultura controle^{66,74}. Nosso estudo aponta que a capacidade de produção de fosfato é o principal fator contribuinte para explicar o aumento da atividade evidenciada em nos dados apresentados nas figuras 19-a, mas também se relaciona a expressão da enzima e diferenciação de osteoblastos.

Por fim, os ensaios de mineralização após 21 dias de cultura (Figura 19-c) não mostraram diferença estatística em relação ao Ct. De fato, os dados obtidos em relação a este teste apresentam leituras que estão no limite de detecção do equipamento, porém, um teste piloto realizado previamente mostrou que em determinadas concentrações, o novo composto foi capaz de promover a mineralização².

Para real afirmação da potencialidade dessa nova droga *in vitro*, se faz necessário desenvolvimento de estudos voltados ao seu efeito em osteoclastos. Os efeitos na osteoclastogênese da Qt e do Sr²⁺ – individualmente – já foram descritos por diversos estudos, porém, o efeito de ambos associados será alvo de investigação no futuro.

4.7 Síntese ósseos a base de PMMA incorporados com SrM e SrQ

Cimentos ósseos de PMMA foram preparados com adição e SrM e SrQ em sua composição, conforme procedimento adaptado de Tomazela et al. ³⁰, como uma forma potencial de entrega local destes compostos. A figura 19 traz fotografia dos materiais obtidos após retirada do molde (fig.19a) e após cortes em discos para os ensaios de liberação/entumecimento.

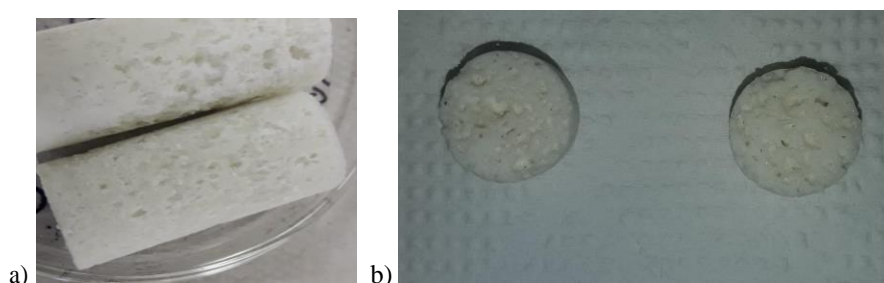
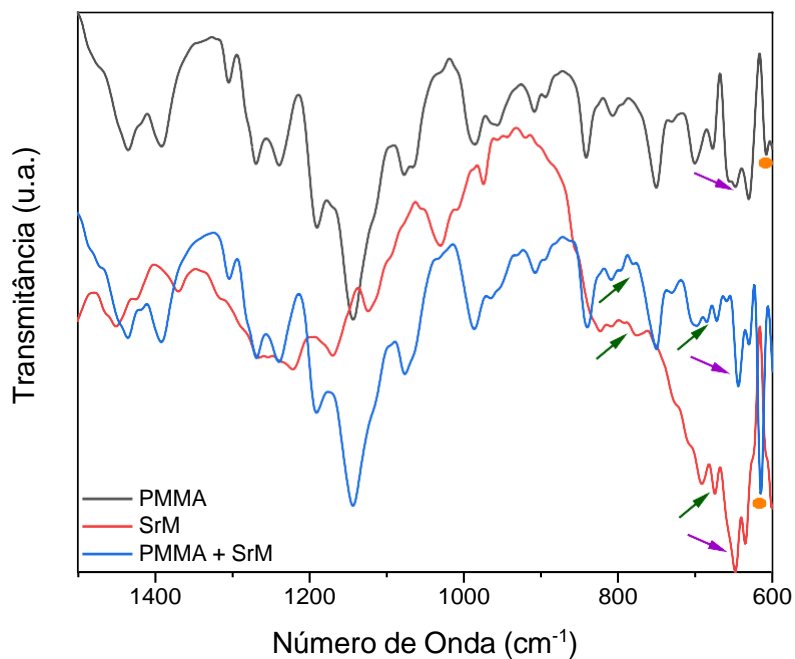


Figura 20: a) Cimento Ósseo a base de PMMA incorporado com SrM b) Corpos de prova usinados.

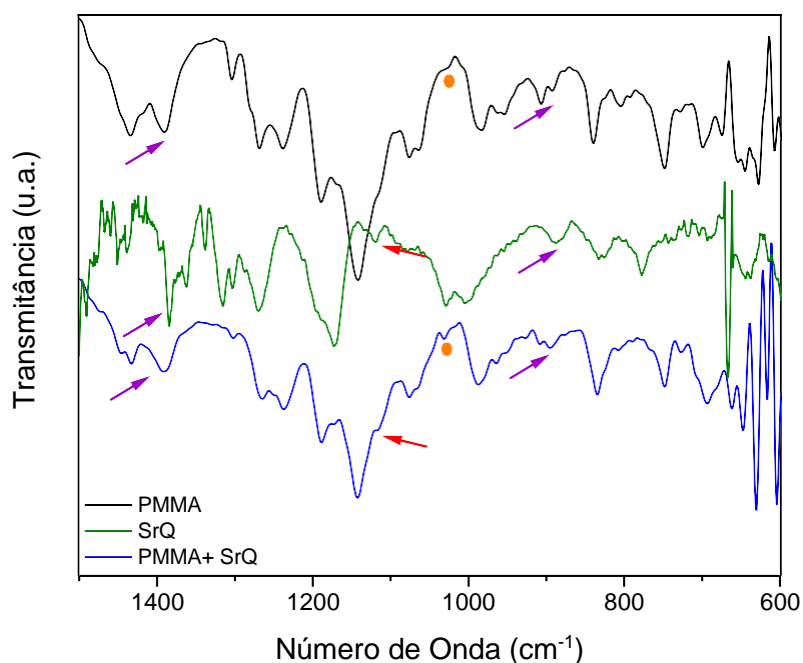
² Olhar Apêndice B – Teste inicial de mineralização em culturas de osteoblastos com a Quercetina-Sr²⁺

Testes de liberação dos compostos a partir dos cimentos foram realizados por HPLC. Porém, não foram obtidos cromatogramas nítidos o suficiente para confirmação da liberação por esta técnica.³ Optou-se, desta forma, por se caracterizar a incorporação dos compostos à estrutura do composto por ATR-FTIR. Os gráficos (Figura 20) apresentados abaixo mostram os resultados obtidos no intervalo entre 1550-600 cm^{-1} .



a)

³ Olhar Apêndice C – Testes de liberação por HPLC



b)

Figura 21: Análises por ATR-FTIR dos cimentos contendo flavonóides. a) comparação entre o cimento ósseo a base de PMMA puro, cimento ósseo a base de PMMA incorporado com SrM e composto SrM. b) comparação entre o cimento ósseo a base de PMMA puro, cimento ósseo a base de PMMA incorporado com SrQ e composto SrQ.

O espectro apresentado na figura 20-a realiza comparações entre o cimento a base de PMMA puro, cimento a base de PMMA incorporado com SrM (PMMA + SrM) e o SrM puro. Nota-se que que em 685 e 780 cm^{-1} surgem bandas para o cimento incorporado, não presentes no cimento puro, que coincidem com bandas da SrM (ver seta verde no espectro). Na região entre 648 - 639 cm^{-1} ocorre uma inversão de intensidade de duas bandas para o cimento incorporado, indicadas com seta roxa. Além disso, uma banda em 608 cm^{-1} para o cimento puro é deslocada para números de onda maiores no cimento incorporado (olhar os pontos laranjas). As diferenças sutis que ocorrem se dão pelo fato de que a quantidade de composto de estrôncio incorporado é muito menor do que o componente em pó utilizado para a síntese do cimento.

O espectro apresentado na figura 20-b realiza comparações entre o cimento a base de PMMA puro, cimento a base de PMMA incorporado com SrQ (PMMA + SrQ) e o SrQ puro e, mais uma vez, os espectros do PMMA puro e o PMMA incorporado apresentam aspectos muito semelhantes, porém, evidencia-se inversões de

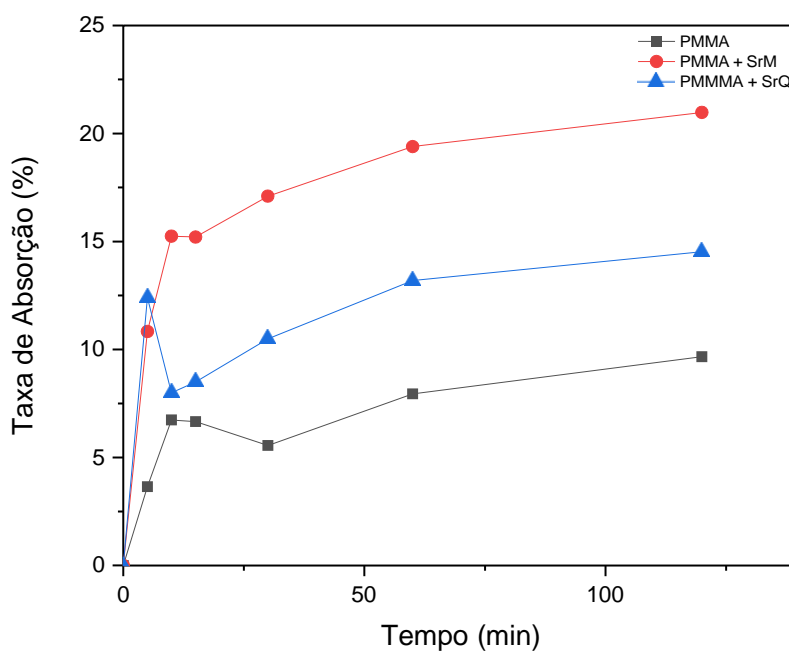
intensidades entre algumas bandas e deslocamentos para outros números de onda para outras.

Veja que na região entre 920–880 cm^{-1} as bandas apresentam números de ondas próximos, contudo, quando acrescentamos o SrQ ao PMMA, ocorre uma inversão nas intensidades (apresentado pela seta roxa no espectro). O mesmo ocorre na região entre 1460 –1360 cm^{-1} . Quando olhamos para o espectro do PMMA+SrQ as bandas apontadas por bolinhas laranjas ficaram mais intensas e esse aumento coincide com bandas do SrQ puro, evidenciando assim, a sua contribuição. Em 1118 cm^{-1} surgem bandas (setas vermelhas) para o cimento incorporado, as quais estão ausentes no cimento puro, mas que, mais uma vez, correspondem a bandas do composto SrQ.

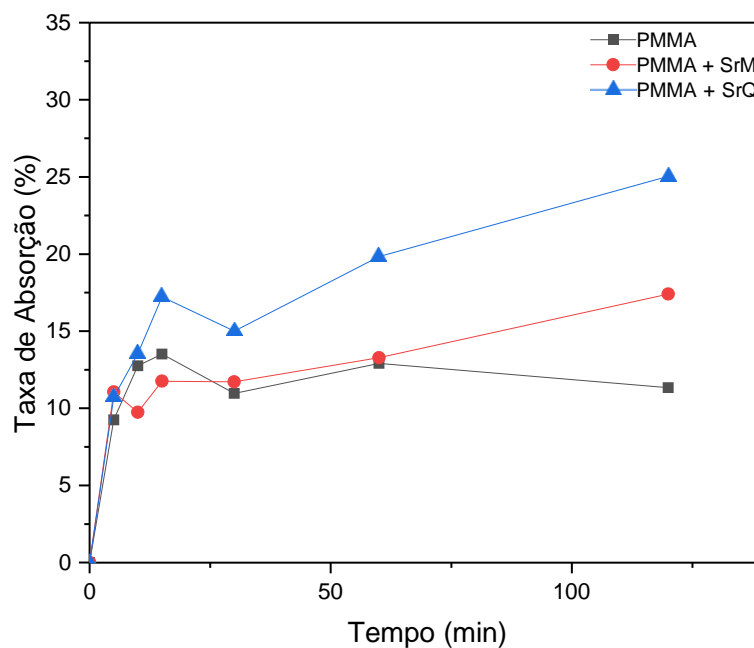
4.8 Teste de absorção (*Swelling*) ou Intumescimento

Ao expor qualquer material ao ambiente biológico, há uma rápida adsorção de proteínas na superfície, de maneira que as propriedades da superfície do material governam a composição, quantidade e conformação de proteínas adsorvidas ¹⁰⁰. Contudo, o cimento utilizado em nosso estudo possui um caráter hidrofóbico. Tal caráter resulta em uma forte adsorção – irreversível – da albumina ^{34,101}, o que dificulta a adsorção de proteínas de adesão como a fibronectina, bloqueando a interação célula-implante ^{34,100}. Por fim, a fibronectina (promotora de adesão celular) adsorvida mantém sua funcionalidade em superfícies hidrofílicas, e tem esta funcionalidade acentuadamente reduzida em superfícies hidrofóbicas ¹⁹.

A fim de obter uma boa interação com os fluidos corpóreos, para absorção de nutrientes, o cimento ósseo a base de PMMA pós incorporação dos compostos SrM e SrQ sofreu alterações na capacidade de absorção do material. Os gráficos apresentados na figura 22-a, trazem os resultados dos testes de absorção em água milli-q. Note que já nos primeiros 15 minutos de interação, o cimento puro apresenta uma taxa de absorção inferior aos cimentos incorporados (cerca de 6,67%). Ao final de duas horas o cimento incorporado com SrM apresentou uma taxa de absorção próxima a 20,97%, enquanto o cimento modificado com SrQ apresentou uma taxa de absorção próxima a 14,53%. Os resultados mostram que a modificação do PMMA o torna mais hidrofílico, o que pode favorecer seu contato com fluido corpóreo e auxiliar em sua osteointegração



a)



b)

Figura 22: Taxa de absorção de água pelo cimento ósseo a base de PMMA incorporado com compostos flavonóides imersos em a) água milli-q b) tampão fosfato-salino.

Em tampão PBS (figura 22-b), nos primeiros 15min o cimento puro apresentou uma absorção inferior (9,75%) ao cimento incorporado com SrQ (13,53%), porém superior ao cimento incorporado com sem (11,76%). Ao final de duas horas vemos que

o o cimento puro repete o comportamento analisado na figura 22-a e se torna o corpo de prova com menor taxa de absorção, enquanto o SrQ e SrM, apresentaram taxas iguais a 25,05% e 17,40%, respectivamente.

Em seus estudos, Tomazela ³⁴ mostrou um aumento na molhabilidade de nanopartículas de hidroxiapatita decorrente da incorporação do Sr²⁺ na nanoestrutura, favorecendo o contato do cimento ósseo a base de PMMA com fluido corpóreo. Park, Kim e Jang mostraram que, bem como superfícies de titânio incorporadas com íons estrôncio e fosfato, também possuem molhabilidade aumentada ¹⁰². Superfícies modificadas com flavonóides se mostraram mais hidrofílicas quando comparados a superfícies de titânio não incorporadas ¹⁰³.

Conclusões

A síntese de um novo composto baseado no flavonóide Qt, ligada à estrôncio foi sintetizado e caracterizado. A estrutura proposta é $[(C_{15}H_7O_7)Sr_2].6(H_2O)$, suportado por análises de UV-Vis, FTIR, RMN e análise elementar e carbono e hidrogênio. Este composto foi comparado ao morina- Sr^{2+} previamente sintetizado pelo grupo, e com o fármaco ranelato de estrôncio quando à sua capacidade de induzir mineralização em osteoblastos. Os resultados mostraram que a ligação de estrôncio à Qt diminui a citotoxicidade do flavonóide, obtidas por ensaios de viabilidade de celular, reforçando o papel da do Sr^{2+} e sua ação na associada a flavonóides no processo de remodelação óssea. A atividade de fosfatase alcalina sofreu uma elevação nos testes com SrQ nos períodos de 14 e 21 dias nas duas concentrações trabalhadas, atividade essa que foi superior ao SrR. O uso da técnica Western blot auxiliou a compreender a relação do aumento de atividade da TNAP e a expressão de Runx-2 e TNAP. A análise feita no período de 7 dias apontou que o aumento atividade estaria atrelado, principalmente, ao aumento da capacidade de obtenção de fosfato pela enzima. São requeridos estudos *in vitro* acerca da osteoclastogênese para determinar a real ação do SrQ na formação de tecido.

O método de síntese para os cimentos revelou a formação de uma estrutura porosa e, com o acessório para refletância total atenuada, análises de ATR-FTIR apontaram a funcionalização do cimento com biomoléculas ativas na regeneração óssea. Houve a presença de picos referentes as biomoléculas, inversão de intensidade de bandas, porém, essas diferenças foram sutis e isso decorre do fato de que a concentração de SrM e SrQ serem inferiores ao componente em pó utilizado no preparo do cimento.

A incorporação dos compostos SrM e SrQ ao cimento ósseo poroso a base de PMMA elevaram a capacidade de absorção do material, apontando que a funcionalização do cimento com esses compostos influencia na capacidade de interação com fluidos.

Referências

1. Junqueira, L. C. U. & Carneiro, J. *Histologia básica: Texto e Atlas*. (2013).
2. Cruz, M. *et al.* Aspectos Químicos Da Biomineralização Óssea. *Quim Nova* (2021) doi:10.21577/0100-4042.20170851.
3. Saraiva, G. L. & Lazaretti-Castro, M. Marcadores Bioquímicos da Remodelação Óssea na Prática Clínica. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* **46**, 72–78 (2002).
4. Andia, D. C., Cerri, P. S. & Spolidorio, L. C. Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos. *Rev. odontol. UNESP* **35**, 191–198 (2006).
5. Souza, M. P. G. de. Diagnostico E Tratamento Da Osteoporose. *Medico* **45**, 220–229 (2010).
6. Shen, L., Hu, G. & Karner, C. M. Bioenergetic Metabolism In Osteoblast Differentiation. *Curr Osteoporos Rep* **20**, 53–64 (2022).
7. Ziros, P. G., Basdra, E. K. & Papavassiliou, A. G. Runx2: of bone and stretch. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* vol. 40 1659–1663 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.05.024> (2008).
8. Sinha, K. M. & Zhou, X. Genetic and molecular control of osterix in skeletal formation. *J Cell Biochem* **114**, 975–984 (2013).
9. Favus, M. Regulation of calcium, magnesium, and phosphate metabolism. *Disorders of Bone and Mineral Metabolism* 76–117 (2006).
10. Väänänen, H. K. & Laitala-Leinonen, T. Osteoclast lineage and function. *Arch Biochem Biophys* **473**, 132–138 (2008).
11. Matsuo, K. & Irie, N. Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys* **473**, 201–209 (2008).
12. Lage, T. C. Análise in vitro da citotoxicidade em osteoblastos de dispositivos poliméricos incorporados com antimicrobianos para uso local. (2017).
13. Souza, D. M. de, Kantorski, K. Z., Rocha, R. F. da & Leite, H. F. Expansão e disseminação das lesões pelos tecidos bucais. *Revista Biociências* **10**, 215–221 (2004).
14. Pires, A. L. R., Bierhalz, A. C. K. & Moraes, Â. M. Biomateriais: Tipos, aplicações e mercado. *Quim Nova* **38**, 957–971 (2015).
15. Gutierrez, M. *et al.* Substitutos ósseos: Conceitos gerais e estado actual. *Arquivos de Medicina* **19**, 153–162 (2005).
16. BAUER, T. W. & MUSCHLER, G. F. Bone Graft Materials. *Clin Orthop Relat Res* 10–27 (2000) doi:10.1016/j.cden.2007.03.004.
17. Daculsi, G., Fellah, B. H., Miramond, T. & Durand, M. Osteoconduction, Osteogenicity, Osteoinduction, what are the fundamental properties for a smart bone substitutes. *Irbm* **34**, 346–348 (2013).
18. Ridzwan, M. I. Z., Shuib, S., Hassan, A. Y., Shokri, A. A. & Mohammad Ibrahim, M. N. Problem of stress shielding and improvement to the hip implant designs: A review. *Journal of Medical Sciences* **7**, 460–467 (2007).

19. Gentleman, M. M. & Gentleman, E. The role of surface free energy in osteoblast-biomaterial interactions. *International Materials Reviews* **59**, 417–429 (2014).
20. Gittens, R. A. *et al.* The effects of combined micron-/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation. *Biomaterials* **32**, 3395–3403 (2011).
21. Kohn, D. H. *Porous coatings in orthopedics. Comprehensive Biomaterials* vol. 6 (Elsevier Ltd., 2011).
22. Cristina Rosifini ALVES REZENDE, M. *et al.* O papel da adsorção de proteínas na osseointegração. *Arch Health Invest* **4**, 2015 (2015).
23. Howe, A., Aplin, A. E., Alahari, S. K. & Juliano, R. Integrin signaling and cell growth control. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 220–231 (1998).
24. Gentleman, M. M. & Gentleman, E. The role of surface free energy in osteoblast-biomaterial interactions. *International Materials Reviews* **59**, 417–429 (2014).
25. Ruoslahti, E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**, 697–715 (1996).
26. Navarro, M., Michiardi, A., Castaño, O. & Planell, J. A. Biomaterials in orthopaedics. *J R Soc Interface* **5**, 1137–1158 (2008).
27. Hanson, E. T., Lewis, R. L., Auerbach, R., Thomson, J. A. & Applica-, B. Third-Generation Biomedical Materials. **295**, (2002).
28. Gautam, G., Kumar, S. & Kumar, K. Processing of biomaterials for bone tissue engineering: State of the art. *Mater Today Proc* **50**, 2206–2217 (2021).
29. Qu, H., Fu, H., Han, Z. & Sun, Y. Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: A review. *RSC Adv* **9**, 26252–26262 (2019).
30. Tomazela, L. *et al.* Fabrication and characterization of a bioactive polymethylmethacrylate-based porous cement loaded with strontium/calcium apatite nanoparticles. *J Biomed Mater Res A* **110**, 812–826 (2022).
31. Tosato, M. G. *et al.* Comparative study of transdermal drug delivery systems of resveratrol: High efficiency of deformable liposomes. *Materials Science and Engineering C* **90**, 356–364 (2018).
32. Santos, M. H. F., Ribeiro, A. M., Mesquita, W. D. & Gurgel, M. F. C. Evolução dos Biomateriais na Ortopedia e Cardiologia. *Revista Processos Químicos* **13**, 35–42 (2020).
33. Cimatti, B. *et al.* Safety, osseointegration, and bone ingrowth analysis of PMMA-based porous cement on animal metaphyseal bone defect model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **106**, 649–658 (2018).
34. TOMAZELA, Larissa. Desenvolvimento, caracterização física e química e análise de propriedades osteogênicas de cimento ósseo poroso à base de PMMA contendo estrôncio. 2020. Dissertação (Mestrado em Química) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

35. Bastidas-Coral, A. P. *et al.* Polymethyl methacrylate does not adversely affect the osteogenic potential of human adipose stem cells or primary osteoblasts. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 1–10 (2019) doi:10.1002/jbm.b.34501.
36. Gonçalves, G. A. B. NANOCOMPÓSITOS DE PMMA / HA / GRAFENO PARA Gil Alberto Batista Gonçalves NANOCOMPÓSITOS DE PMMA / HA / GRAFENO PARA. (2012).
37. FERREIRA, C. F. D. G. ADSORÇÃO DA PROTEÍNA GlnB DE *Herbaspirillum seropedicae* SOBRE A SUPERFÍCIE DA MICA ANALISADA POR MICROSCOPIA. 2008. Curitiba. (2008).
38. Roach, P., Farrar, D. & Perry, C. C. Interpretation of protein adsorption: Surface-induced conformational changes. *J Am Chem Soc* **127**, 8168–8173 (2005).
39. Van De Belt, H. *et al.* Surface roughness, porosity and wettability of gentamicin-loaded bone cements and their antibiotic release. *Biomaterials* **21**, 1981–1987 (2000).
40. Allende, C., Mangupli, M., Bagliardelli, J., Diaz, P. & Allende, B. T. Infected nonunions of long bones of the upper extremity: staged reconstruction using polymethylmethacrylate and bone graft impregnated with antibiotics. *Chir Organi Mov* **93**, 137–142 (2009).
41. Wall, V., Nguyen, T. H., Nguyen, N. & Tran, P. A. Controlling antibiotic release from polymethylmethacrylate bone cement. *Biomedicines* **9**, 1–22 (2021).
42. Vieira, J. G. H. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* **43**, 415–422 (1999).
43. Kaplan, M. M. Progress in Hepatology. *Gastroenterology* **62**, 452–468 (1972).
44. Meunier, P. J. *et al.* The Effects of Strontium Ranelate on the Risk of Vertebral Fracture in Women with Postmenopausal Osteoporosis. *Calcif Tissue Int* **83**, 308–314 (2004).
45. Curtis, E. M., Cooper, C. & Harvey, N. C. Cardiovascular safety of calcium, magnesium and strontium: what does the evidence say? *Aging Clin Exp Res* **33**, 479–494 (2021).
46. Bussola Tovani, C. *et al.* Formation of stable strontium-rich amorphous calcium phosphate: Possible effects on bone mineral. *Acta Biomater* **92**, 315–324 (2019).
47. Brown, E. M. Is the calcium receptor a molecular target for the actions of strontium on bone? *Osteoporos Int* **14 Suppl 3**, 25–34 (2003).
48. Yang, F. *et al.* Strontium enhances osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and in vivo bone formation by activating Wnt/catenin signaling. *Stem Cells* **29**, 981–991 (2011).
49. Cruz, M. A. E. *et al.* Synthesis of Sr-morin complex and its: In vitro response: Decrease in osteoclast differentiation while sustaining osteoblast mineralization ability. *J Mater Chem B* **7**, 823–829 (2019).
50. Reginster, J. Y. Cardiac concerns associated with strontium ranelate. *Expert Opin Drug Saf* **13**, 1209–1213 (2014).

51. Zarins, J., Pilmane, M., Sidhoma, E. & Salma, I. Does Local Application of Strontium Increase Osteogenesis and Biomaterial Osteointegration in Osteoporotic and Other Bone Tissue Conditions : Review of Literature. **2016**, 17–23 (2017).
52. Machado, Hussen; Nagem, Tanus; Peters, Vera; Fonseca, Cristiane; Oliveira, T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução* **27**, 33–39 (2008).
53. Rodrigues da Silva, L. *et al.* Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. *Acta toxicológica argentina* **23**, 36–43 (2015).
54. Barrios-González, J. Secondary Metabolites Production. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* 257–283 (2018) doi:10.1016/b978-0-444-63990-5.00013-x.
55. Dos Santos, D. S. & Farias Rodrigues, M. M. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. *Estação Científica (UNIFAP)* **7**, 29 (2017).
56. Wu, Y. W., Chen, S. C., Lai, W. F. T., Chen, Y. C. & Tsai, Y. H. Screening of flavonoids for effective osteoclastogenesis suppression. *Anal Biochem* **433**, 48–55 (2013).
57. Bellavia, D. *et al.* Flavonoids in Bone Erosive Diseases: Perspectives in Osteoporosis Treatment. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **32**, 76–94 (2021).
58. Wan, J., Ma, T., Jin, Y. & Qiu, S. The effects of morin on bone regeneration to accelerate healing in bone defects in mice. *Int J Immunopathol Pharmacol* **34**, (2020).
59. Revilla, M. *et al.* Tartrate-resistant acid phosphatase as a biological marker of bone modelling and turnover in women in relation to their gonadal state. *J Obstet Gynaecol (Lahore)* **12**, 191–194 (1992).
60. Hayman, A. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. *Autoimmunity* **41**, 218–223 (2008).
61. Srivastava, S., Bankar, R. & Roy, P. Assessment of the role of flavonoids for inducing osteoblast differentiation in isolated mouse bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Phytomedicine* **20**, 683–690 (2013).
62. Wong, S. K., Chin, K. Y. & Ima-Nirwana, S. Quercetin as an agent for protecting the bone: A review of the current evidence. *Int J Mol Sci* **21**, 1–37 (2020).
63. Xu, D., Hu, M. J., Wang, Y. Q. & Cui, Y. L. Antioxidant activities of quercetin and its complexes for medicinal application. *Molecules* **24**, (2019).
64. Bratu, M. M. *et al.* Biological activities of Zn(II) and Cu(II) complexes with quercetin and rutin: Antioxidant properties and UV-protection capacity. *Revista de Chimie* **65**, 544–549 (2014).
65. Gulbin, E., Karadag, R. & Emre, D. Potentiometric and Spectrophotometric Determination of the Stability Constants of Quercetin Aluminium (III) and Iron (II). *Rev Anal Chem* **24/4**, 247–261 (2005).
66. Raj Preeth, D. *et al.* Bioactive Zinc(II) complex incorporated PCL/gelatin electrospun nanofiber enhanced bone tissue regeneration. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **160**, 105768 (2021).

67. Malešev, D. & Kuntić, V. Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the Serbian Chemical Society* **72**, 921–939 (2007).
68. Ghosh, N. *et al.* Synthesis, characterization and study of antioxidant activity of quercetin-magnesium complex. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **151**, 807–813 (2015).
69. Ravichandran, R., Rajendran, M. & Devapiriam, D. Structural characterization and physicochemical properties of quercetin-Pb complex. *J Coord Chem* **67**, 1449–1462 (2014).
70. Vimalraj, S. *et al.* Mixed-ligand copper(II) complex of quercetin regulate osteogenesis and angiogenesis. *Materials Science and Engineering C* **83**, 187–194 (2018).
71. Bukhari, S. B., Memon, S., Mahroof-Tahir, M. & Bhanger, M. I. Synthesis, characterization and antioxidant activity copper-quercetin complex. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **71**, 1901–1906 (2009).
72. Pełkal, A., Biesaga, M. & Pyrzynska, K. Interaction of quercetin with copper ions: Complexation, oxidation and reactivity towards radicals. *BioMetals* **24**, 41–49 (2011).
73. Refat, M. S. *et al.* Quercetin/Zinc complex and stem cells: A new drug therapy to ameliorate glycometabolic control and pulmonary dysfunction in diabetes mellitus: Structural characterization and genetic studies. *PLoS ONE* vol. 16 (2021).
74. Vimalraj, S. *et al.* Mixed-ligand copper(II) complex of quercetin regulate osteogenesis and angiogenesis. *Materials Science and Engineering C* **83**, 187–194 (2018).
75. Pereira, G. K., Donate, P. M. & Galembeck, S. E. Electronic structure of hydroxylated derivatives of the flavylum cation. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **363**, 87–96 (1996).
76. Aguilera-Otíz, M., Reza-Vargas, M. del C., Chew-Madinaveita, R. G. & Meza-Velázquez, J. A. Propiedades Funcionales De Las Antocianinas. *Biotecnia* **13**, 16 (2011).
77. Wang, H. *et al.* Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries. *J Nat Prod* **62**, 294–296 (1999).
78. Duarte, L. J. *et al.* Molecular mechanism of action of Pelargonidin-3-O-glucoside, the main anthocyanin responsible for the anti-inflammatory effect of strawberry fruits. *Food Chem* **247**, 56–65 (2018).
79. Duarte, L. J. MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO COMPOSTO PELARGONIDINA-3-O-GLICOSÍDEO. 115 (2017).
80. Zhao, L. *et al.* Callistephin enhances the protective effects of isoflurane on microglial injury through downregulation of inflammation and apoptosis. *Mol Med Rep* **20**, 802–812 (2019).
81. Kelsey, N., Hulick, W., Winter, A., Ross, E. & Linseman, D. Neuroprotective effects of anthocyanins on apoptosis induced by mitochondrial oxidative stress. **14**, 249–260 (2011).

82. Ren, Z. *et al.* Peonidin-3-O-glucoside and cyanidin increase osteoblast differentiation and reduce RANKL-induced bone resorption in transgenic medaka. *Phytotherapy Research* **35**, 6255–6269 (2021).
83. Park, K. H., Gu, D. R., So, H. S., Kim, K. J. & Lee, S. H. Dual role of cyanidin-3-glucoside on the differentiation of bone cells. *J Dent Res* **94**, 1676–1683 (2015).
84. Mao, W. *et al.* Research Progress of the Role of Anthocyanins on Bone Regeneration. *Front Pharmacol* **12**, 1–10 (2021).
85. Camolezi, F. L., Daghestanli, K. R. P., Magalhães, P. P., Pizauro, J. M. & Ciancaglini, P. Construction of an alkaline phosphatase-liposome system: A tool for biomineralization study. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **34**, 1091–1101 (2002).
86. Gregory, C. A., Gunn, W. G., Peister, A. & Prockop, D. J. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: Comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem* **329**, 77–84 (2004).
87. Cimatti, B. Desenvolvimento e caracterização de um cimento ósseo esponjoso para preenchimento de falhas ósseas . Análise morfométrica e ensaio mecânico. 107 (2012) doi:10.11606/D.17.2012.tde-13092012-095904.
88. Muñoz, J. A. M., Machado, J. E. M. & González, M. T. Validación de una metodología por HPLC para cuantificar quercetina total en extractos de *Calendula officinalis*. *Revista Cubana de Farmacia* **49**, 91–102 (2015).
89. Do Nascimento Simões, V. *et al.* Síntese, caracterização e estudo das propriedades de um novo complexo mononuclear contendo quercetina e íon Ga(III). *Quim Nova* **36**, 495–501 (2013).
90. Sauerwald, N., Schwenk, M., Polster, J. & Bengsch, E. Spectrometric pK determination of daphnetin, chlorogenic acid and quercetin. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section B Journal of Chemical Sciences* **53**, 315–321 (1998).
91. Lemańska, K. *et al.* The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radic Biol Med* **31**, 869–881 (2001).
92. Momić, T., Savić, J., Černigoj, U., Trebše, P. & Vasić, V. Protolytic equilibria and photodegradation of quercetin in aqueous solution. *Collect Czechoslov Chem Commun* **72**, 1447–1460 (2007).
93. Dehghan, G. & Khoshkam, Z. Tin(II)-quercetin complex: Synthesis, spectral characterisation and antioxidant activity. *Food Chem* **131**, 422–426 (2012).
94. Bernardi, F., Nicolini, K. P. & Nicolini, J. Uso De Espectroscopia De Ultravioleta Visível (Uv-Vis) Para a Detecção De Quercetina Em Plantas Por Meio Da Formação Do Complexo Quercetina-Alumínio. *Infarma - Ciências Farmacêuticas* **29**, 271–276 (2017).
95. Frederice, R. Fluorescência molecular em nanopartículas de sílica marcadas com quercetina e rodamina B. 79 (2009).
96. CRUZ, Marcos Antônio Eufrasio. Desenvolvimento de materiais bioinspirados contendo Sr²⁺ para modificação de superfícies de Ti. 2017. Dissertação (Mestrado em Química) -

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

97. Raj Preeth, D. *et al.* Bioactive Zinc(II) complex incorporated PCL/gelatin electrospun nanofiber enhanced bone tissue regeneration. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **160**, 105768 (2021).
98. Chadha, R., Dureja, J. & Karan, M. Tempering trans-Resveratrol from the Molecule to Crystal Level: A Contemporary Approach toward Polymorphic Pursuits and Morphological Insights. *Cryst Growth Des* **16**, 605–616 (2016).
99. Birjees Bukhari, S., Memon, S., Mahroof Tahir, M. & Bhangar, M. I. Synthesis, characterization and investigation of antioxidant activity of cobalt-querctetin complex. *J Mol Struct* **892**, 39–46 (2008).
100. Allen, L. T. *et al.* Surface-induced changes in protein adsorption and implications for cellular phenotypic responses to surface interaction. *Biomaterials* **27**, 3096–3108 (2006).
101. Arima, Y. & Iwata, H. Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers. *Biomaterials* **28**, 3074–3082 (2007).
102. Park, J. W., Kim, Y. J. & Jang, J. H. Enhanced osteoblast response to hydrophilic strontium and/or phosphate ions-incorporated titanium oxide surfaces. *Clin Oral Implants Res* **21**, 398–408 (2010).
103. Córdoba, A. *et al.* Flavonoid-modified surfaces: Multifunctional bioactive biomaterials with osteopromotive, anti-inflammatory, and anti-fibrotic potential. *Adv Healthc Mater* **4**, 540–549 (2015).
104. Lopes, T., Xavier, M., Quadri, M. & Quadri, M. Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. *Revista brasileira de agrociencia* **13**, 291–297 (2007).

Apêndice A – testes iniciais da antocianina Calistefina *in vitro*

A quarta droga que visou ser testada neste projeto, com relação ao seu potencial osteogênico é a antocianina calistefina. Em uma primeira etapa, a molécula foi estudada com relação ao seu espectro UV-Vis. A antocianina tem sua estrutura ilustrada abaixo juntamente com o espectro de absorção do composto solubilizado em metanol (Figura 23).

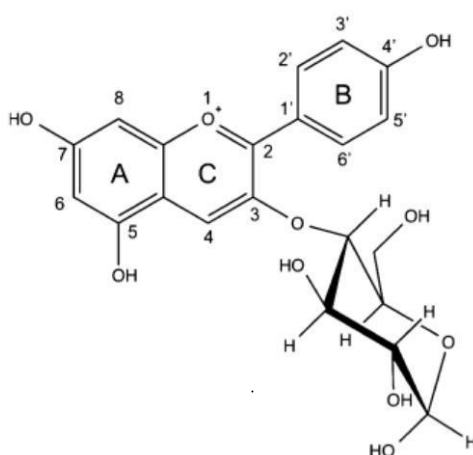
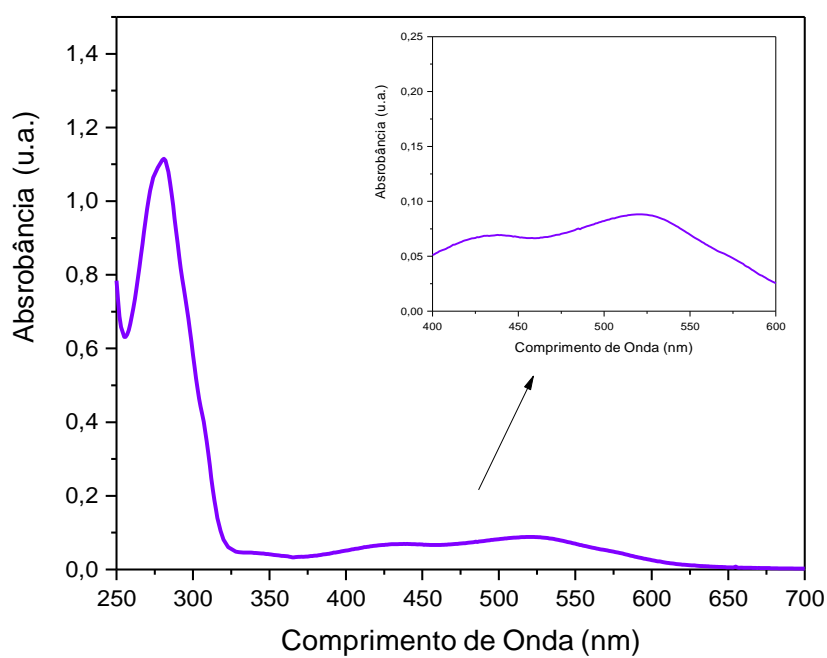
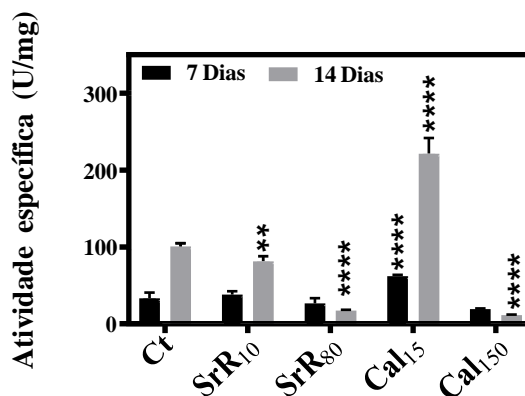


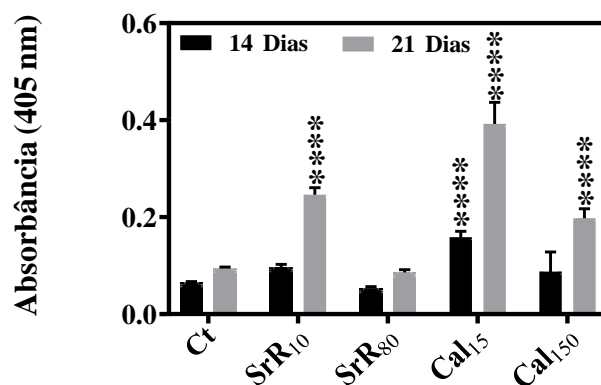
Figura 23: a) Solução 96 $\mu\text{mol/L}$ de calistefina solubilizado em metanol. b) Estrutura da calistefina (86).

Na Figura 23, evidencia-se dois picos de absorção, em 438nm e 522nm. Em Lopes et al. ¹⁰⁴ nota-se que antocianinas possuem uma absorção na região do visível atribuído ao anel B e ao pirano – o anel mencionado é indicado na estrutura da calistefina. Já o pico de absorção que surge na região do UV (280nm) é comumente atribuído ao anel A ¹⁰⁴.

A segunda etapa contou com experimentos em Cultura de Osteoblastos para determinar atividade Específica da TNAP e Mineralização. Para testar o potencial do composto Cal na formação de matriz mineralizadas, células pré-osteoblásticas foram cultivadas por 7, 14 e 21 dias na presença desses compostos. O primeiro marcador de mineralização investigado foi a atividade da enzima fosfatase alcalina (TNAP). Como comparação, foi utilizado o composto SrR. Desta forma, no meio de cultura foram adicionamos os seguintes compostos em duas concentrações: ranelato de estrôncio 10 μ M (SrR10) e 80 μ M (SrR80); calistefina 15 μ M (Cal15) e 150 μ M (Cal150). As concentrações foram baseadas em estudos feitos em outros tipos celulares, especialmente aquele desenvolvido por Kelsey et al. ⁸¹ onde os valores trabalhados seu estudo foram guia para determinar uma concentração limite que não viria a ser tóxica para nossas células. As drogas foram solubilizadas em DMSO (concentração final de DMSO por poço: 10%). Os resultados são apresentados na Figura 24.



a)



b)

Figura 24: Ensaios de mineralização com calistefina utilizando-se cultura de células MC3T3. a) Atividade Específica da TNAP após 7 (barra preta) e 14 dias (barra cinza) de cultura e b) ensaios de mineralização utilizando-se vermelho de alizarina para marcar nódulos de mineralização formados em cultura de células após 14 (barra preta) e 21 (barra cinza) dias de mineralização. O controle (Ct) consistiu em células cultivadas na ausência dos compostos. Os dados apresentados contam com * $p = 0,0172$ e **** $p < 0,0001$.

Na Figura 24-a observa-se que nos primeiros 7 dias, apenas a calistefina (CAL) 15 μ M induziu aumento na atividade da TNAP após 7 dias de cultura. As demais amostras não apresentaram diferença estatística em relação ao controle (Ct). Em comparação ao fármaco SrR, reduções de atividade também foram observadas para as maiores concentrações, entretanto, aumento também foi observado na menor concentração.

De maneira interessante, a antocianina CAL induziu aumento na atividade de TNAP após 7 e 14 dias de cultura, em concentração 15 μ M. Os efeitos de aumento de atividade de TNAP foram refletidos em aumento na formação de nódulos de mineralização, conforme indicaram os aumentos de absorbância em 405nm, nas amostras marcadas com vermelho de alizarina, após 21 dias de cultura. Podemos evidenciar, em relação a mineralização (Figura 24-b), que após 14 dias apenas a CAL na concentração 15 μ M apresentou um aumento significativo (**** $p < 0,0001$) do processo de mineralização em relação ao controle. Após 21 dias as células tratadas com o SrR (na concentração 10 μ M) e CAL (15 μ M e 150 μ M) apresentaram um aumento significativo da mineralização.

Aqui neste apêndice destaca-se o desempenho da calistefina, composto ainda não investigados na literatura em relação as suas propriedades em culturas de osteoblastos. Porém, por questões voltadas a tempo e recursos, não foi possível ajustar parâmetros experimentais (concentração de DMSO; concentração da droga) e nem

realizar testes mais robustos (análise de viabilidade celular; Western Blot) e trazer para este trabalho, dados mais concretos. Há indícios de que esta poderia ser uma droga com potencial osteogênico, mas sua investigação exige testes mais rigorosos e dados mais completos.

Apêndice B – Teste inicial de mineralização em culturas de osteoblastos com a Quercetina- Sr²⁺

Um dos primeiros testes de mineralização envolvendo esse novo composto ocorreu quando a estrutura ainda não estava completamente elucidada. Logo, assumiu-se a estruturação da quercetina apenas com um íon Sr²⁺, tal qual morina-Sr²⁺, utilizamos a mesma massa molar para formular soluções em DMSO para serem adicionadas ao meio de cultura. Tendo isso em mente, testes que foram pensados nas concentrações de 10 e 80µM, ocorreram, na realidade, em 08 e 60µM.

Células pré-osteoblásticas foram cultivadas por 14 e 21 dias na presença desses compostos. No meio de cultura foram adicionados os seguintes compostos em duas concentrações: ranelato de estrôncio 10µM (SrR10) e 80µM (SrR80); quercetina 10µM (SrR10) e 80µM (SrR80); quercetina-Sr²⁺ 08µM (SrQ8) e 60µM (SrQ60). As drogas foram solubilizadas em DMSO (concentração final de DMSO por poço: 10%). Os resultados são apresentados na Figura 25.

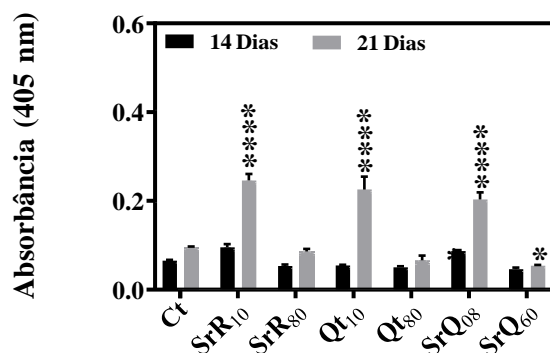


Figura 25: Ensaio de mineralização com quercetina-Sr²⁺ em cultura de células MC3T3: Ensaio de mineralização utilizando-se vermelho de alizarina para marcar nódulos de mineralização formados em cultura de células após 14 (barra preta) e 21 (barra cinza) dias de mineralização. O controle (Ct) consistiu em células cultivadas na ausência dos compostos. Os dados apresentados contam com *p =0,0172 e ***p < 0,0001.

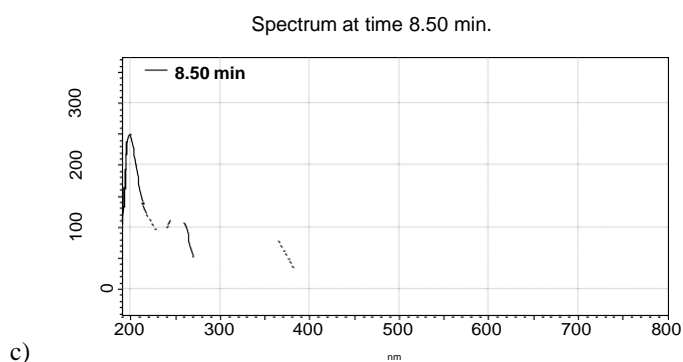
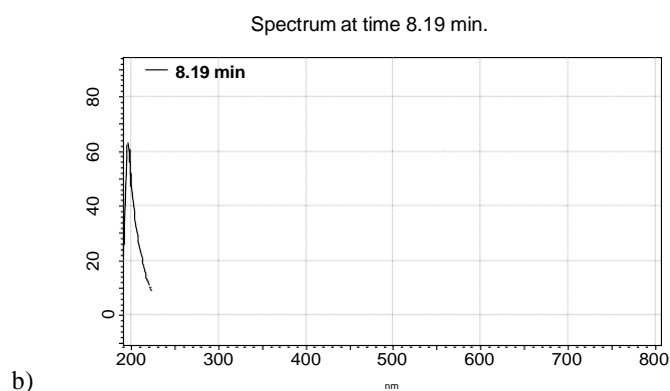
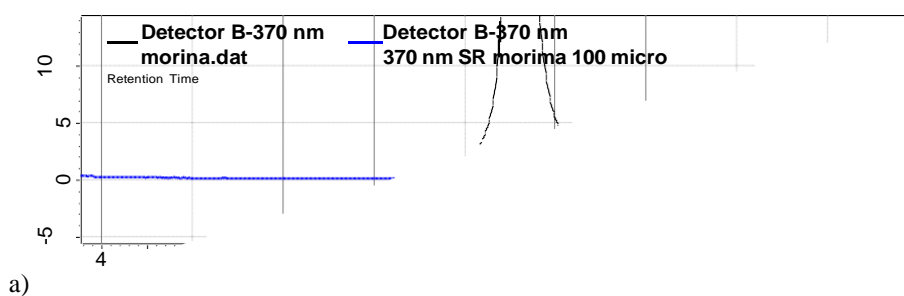
Com os testes apresentados acima, tivemos os primeiros indícios do potencial de mineralização da quercetina-Sr²⁺, uma vez que nas concentrações de 08 e 60µM apresentaram um aumento em relação ao controle pós 21 dias.

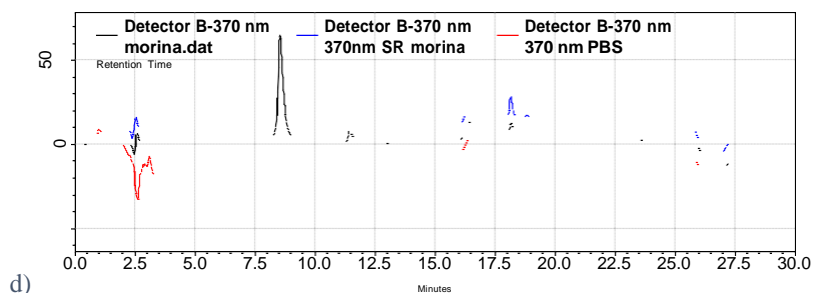
Aqui não colocaremos em pauta a comparação desta nova droga com a quercetina e o ranelato de estrôncio visto a diferença de concentrações, contudo, entre

esses dois compostos, é possível ver que tanto Qt quanto SrR apresentaram um potencial de mineralização superior ao controle nas concentrações de 10 μ M.

Apêndice C – testes de liberação por HPLC

Após o preparo e do cimento ósseo incorporado com biomoléculas, foi realizado a análise da liberação de morina-Sr²⁺. As análises de liberação iniciaram com uma comparação entre os cromatogramas da morina e do SrM, soluções padrão preparadas em tampão PBS (pH 7.4) (Figura 24). Nota-se no cromatograma que os compostos apresentam tempos de retenção próximos. Contudo, a intensidade do espectro do composto SrM se mostrou muito inferior a morina, mesmo estando nas mesmas concentrações.





d)

Figura 26: Análises de liberação do SrM por HPLC a) cromatograma ampliado para comparação dos tempos de retenção da morina (8.18min) (linha preta) e do SrM (8.60min) (linha azul) b) espectro UV-vis da SrM em PBS c) espectro UV-vis da morina em PBS d) comparação dos cromatogramas da morina (linha preta), SrM (linha vermelha) e do meio de liberação (PBS) (linha azul).

A análise de liberação das moléculas ativas na regeneração óssea é feita em PBS, que por sua vez, é um tampão de alta força iônica. Tornou-se evidente a capacidade do meio em promover a descomplexação do composto, uma vez que os espectros UV-vis (Figura 24b e 24c) acusaram o que parece ser o mesmo espectro. Tal feito se faz interessante visto que é esperado que em meio biológico o Sr^{2+} seja liberado para o organismo. Devido a sua similaridade com o Ca^{2+} , esse metal alcalino terroso pode ser incorporado na fase mineral durante a remodelação óssea. Tendo isso em vista, o estudo voltado para biomateriais tem buscado exatamente essa propriedade: o aumento da biodisponibilidade local de estrôncio e, conseqüentemente, uma melhora na reparação e formação do tecido⁵¹.

Na análise de liberação de imersão após um minuto (Figura 25a) já é possível constatar a liberação de SrM pela amostra uma vez que, seu tempo de retenção é próximo daquele apresentado na curva de calibração. O espectro obtido (Figura 25b) mostra bandas com absorção quase imperceptíveis. Além disso, encontrou-se uma barreira no prosseguimento das análises: a viscosidade das amostras.

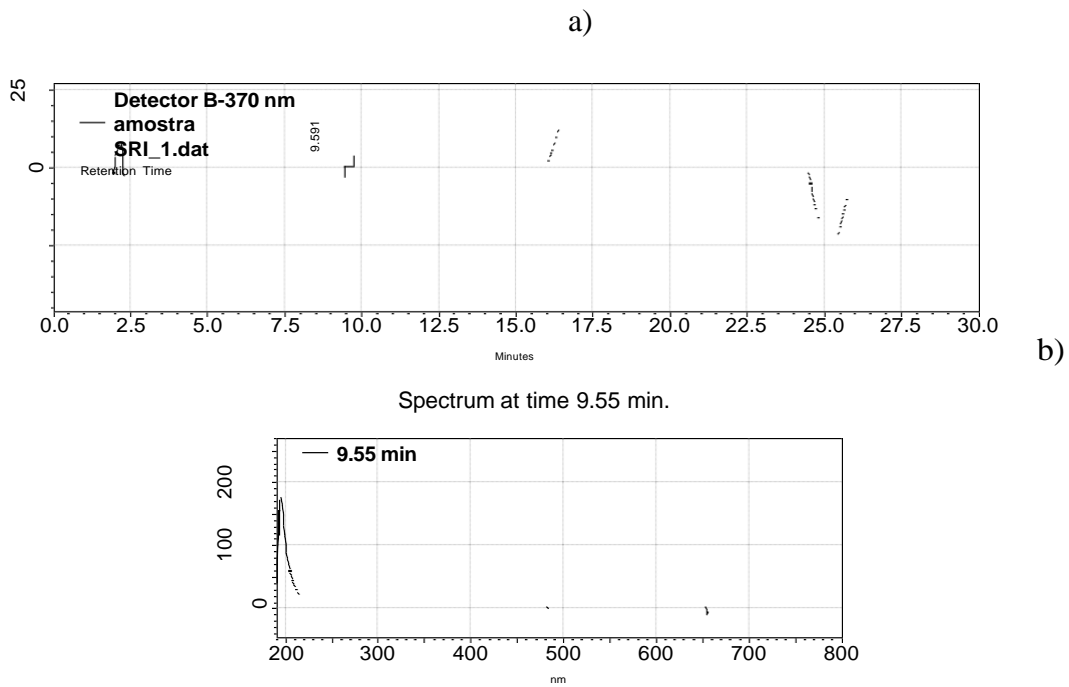
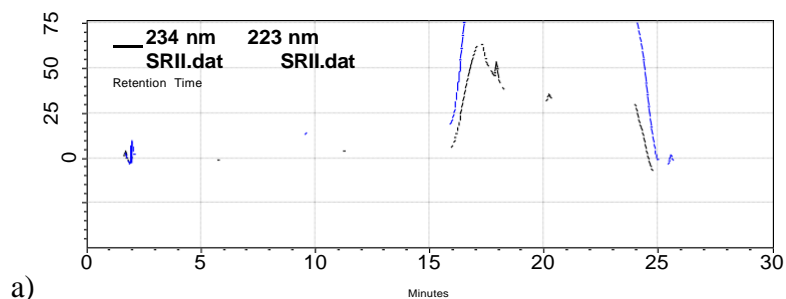
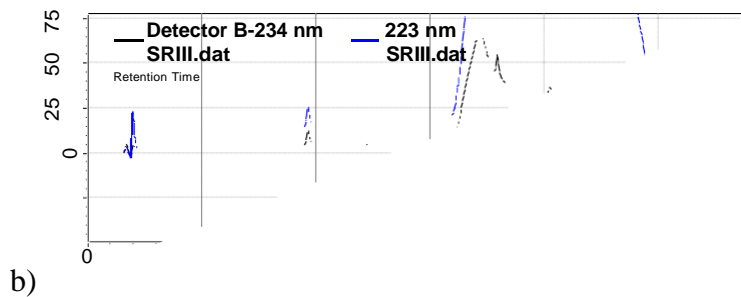


Figura 27: a) Cromatograma da liberação de morina-Sr²⁺ pelo cimento a base de PMMA no tempo zero
b) espectro UV-vis do pico detectado.

Por tanto, o experimento foi repetido e as amostras filtradas (filtro 0,22 μ m) para uma nova leitura. Nas condições já trabalhadas (370nm), a leitura pós-filtração não acusou picos. Contudo, a leitura das mesmas amostras, agora na faixa entre de 220–240nm, acusou o que parece ser um sinal em apenas três amostras: SRII (liberação de Sr²⁺ pelo cimento mergulhado em PBS por 12 horas), SRIII (liberação de Sr²⁺ pelo cimento mergulhado em PBS por 24 horas) e SRVI (liberação de Sr²⁺ pelo cimento mergulhado em PBS por 14 dias). A Figura 26 traz o cromatograma das três amostras observadas em tempos de retenção 12.38 min, 11.37 min e 9.61 min, respectivamente.



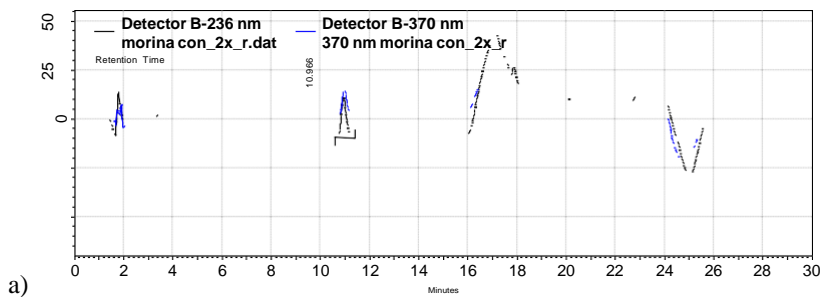


b)

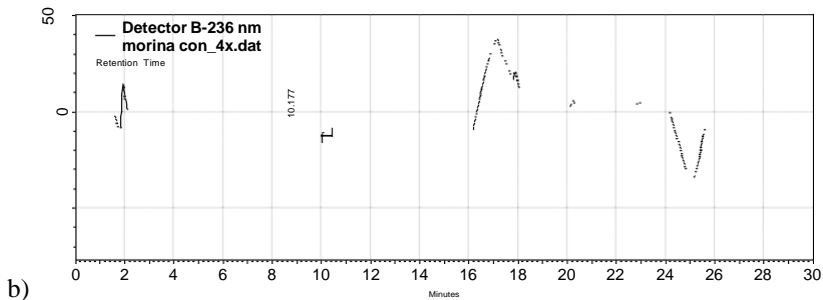
c)

Figura 28: Leitura comparativas das amostras na faixa entre 220–340 nm. a) Leitura comparativa da amostra SRII b) Leitura comparativa da amostra SRIII c) Leitura comparativa da amostra SRVI

Para aprofundar a análise, as amostras utilizadas para a curva de calibração foram revisitadas e analisadas novamente nesse mesmo intervalo (Figura 27). A amostra padrão (solução de morina em PBS) diluída duas e quatro vezes tem seus cromatogramas são apresentados abaixo.



a)



b)

Figura 29: HPLC da curva de calibração de duas amostras revisitada na faixa entre 220–240 nm. a) amostra padrão diluída duas vezes (morina com_2x) com tempo de retenção 10.97min. b) Amostra padrão diluída quatro vezes (morina com_4x) com tempo de retenção 10.17min.

O pico apresentado ocorreu em tempos próximos aos cromatogramas da Figura 26. A diferença que ocorre nos tempos de retenção pode ser explicada de acordo com as condições experimentais. Duas bombas são utilizadas para a promoção do gradiente da fase móvel (Tabela 1), contudo, uma delas (bomba B) apresentou falhas de funcionamento, gerando variações nas leituras. Os dados aqui apresentados não se sustentam, as leituras não apresentam dados concretos e investigações mais aprimoradas são necessárias. Por questões voltadas a tempo e recursos, a técnica foi deixada de lado.