

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Rosana Isabel da Costa Nascimento

**ANÁLISE DA VIABILIDADE DE CÉLULAS SHED CULTIVADAS EM
FILMES NANOBIOCOMPÓSITOS CONTENDO NANOFIBRAS DE
CELULOSE OU NANOTUBOS DE CARBONO**

Dissertação de Mestrado

JUIZ DE FORA

2023

ROSANA ISABEL DA COSTA NASCIMENTO

**ANÁLISE DA VIABILIDADE DE CÉLULAS SHED CULTIVADAS EM
FILMES NANOBIOCOMPÓSITOS CONTENDO NANOFIBRAS DE
CELULOSE OU NANOTUBOS DE CARBONO**

Dissertação de Mestrado do Curso de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Área: Genética e Biotecnologia para
obtenção do Título de Mestre em Ciências
Biológicas: Área Genética e Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Michele Munk Pereira

Co-orientadora: Dr^a. Rebecca Vasconcellos Botelho de Medeiros

Juiz de Fora

2023

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Nascimento, Rosana Isabel da Costa.

Análise da viabilidade de células shed cultivadas em filmes nanobiocompósitos contendo nanofibras de celulose ou nanotubos de carbono. / Rosana Isabel da Costa Nascimento. – 2023.

66 p. : il.

Orientadora: Michele Munk Pereira

Coorientadora: Rebecca Vasconcellos Botelho de Medeiros

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2023.

1. Nanomateriais. 2. Matriz extracelular. 3. Regeneração óssea. I. Pereira, Michele Munk, orient. II. Medeiros, Rebecca Vasconcellos Botelho de, coorient. III. Título.

Rosana Isabel da Costa Nascimento

Análise da viabilidade de células SHED cultivadas em filmes nanobiocompósitos contendo nanofibras de celulose ou nanotubos de carbono

Dissertação
apresentada ao
Programa de Pós-
graduação em
Ciências Biológicas
da Universidade
Federal de Juiz de
Fora como requisito
parcial à obtenção do
título de Mestre em
Ciências Biológicas.
Área de
concentração:
Genética &
Biotecnologia.

Aprovada em 24 de agosto de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Drª. Michele Munk Pereira - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Prof. Dr. João Vitor Paes Rettore
Universidade Presidente Antonio Carlos - UNIPAC

Juiz de Fora, 25/07/2023.



Documento assinado eletronicamente por **Michele Munk Pereira, Professor(a)**, em 24/08/2023, às 16:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Magno da Costa Maranduba, Professor(a)**, em 24/08/2023, às 21:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **João Vitor Paes Rettore, Usuário Externo**, em 05/09/2023, às 13:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1378548** e o código CRC **7BDF6A9F**.

A minha querida e amada mãe, Vanda.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo fomento concedido através do projeto APQ.02342-17.

Agradeço a meu esposo Edevaldo, por sempre me apoiar e incentivar a alcançar os meus objetivos.

Agradeço a minha querida mãe, que tanto batalhou para que hoje eu pudesse chegar até aqui, estando sempre em oração pela minha vida e caminhada e sendo sempre um suporte nos momentos difíceis.

Agradeço aos meus familiares, em especial aos meus irmãos, Ramon e Rafael que me dão sempre motivos para continuar.

Sou grata a minha professora e orientadora Dr^a Michele Munk, por tanta sabedoria e ensinamento compartilhados, além da dedicação, preocupação e carinho com seus orientados.

Agradeço também ao professor Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba juntamente com o GENETEC e ao professor Dr. Humberto de Mello Brandão e a Embrapa Gado de Leite por todas as contribuições.

Agradeço aos meus companheiros de laboratório: Leonara que tanto me ensinou e ajudou de diversas formas; Eduarda, que pude compartilhar de conversas e momentos agradáveis; Rebecca, que me ajudou e orientou; Carol e Davi, que sempre se mostraram dispostos a solícitos.

Agradeço aos colegas de trabalho, técnicos e professores dos laboratórios integrados ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da UFJF.

Agradeço a Universidade Federal de Juiz de Fora pela oportunidade de crescimento e aprendizagem.

Agradeço às agências de fomento: CAPES, CNPq, Rede AGRONAMO por me permitirem fazer pesquisa.

Agradeço Àquele que me levantou, cuidou e sustentou todos os dias da minha vida: Deus. Àquele que me deu fôlego de vida, colheu minhas lágrimas e não me deixou desistir quando eu achava que não conseguiria. A Ele Honra, Glória e Louvor!

“Nascemos para manifestar a glória de Deus. que está dentro de nós. Não está apenas em um de nós: está em todos nós. E conforme deixamos nossa própria luz brilhar, inconscientemente damos às outras pessoas permissão para fazer o mesmo. E conforme nos libertamos do nosso medo, nossa presença, automaticamente, liberta os outros.”

Nelson Mandela

RESUMO

O aumento das doenças ósseas na população representa um desafio significativo para a saúde pública. A busca por terapias eficazes é essencial para tratar essas condições debilitantes. Nesse contexto, a nanobiotecnologia, que envolve o uso de nanomateriais na área biomédica, surge como uma abordagem promissora, proporcionando soluções inovadoras no desenvolvimento de tratamentos avançados para doenças ósseas. Entre os NMs existentes, destacam-se as nanofibras de celulose (NFC) e os nanotubos de carbono (NTC), os quais, quando associados a polímeros biodegradáveis, como a quitosana, apresentam um potencial promissor na área da bioengenharia de tecido ósseo. Por meio da combinação desses componentes, é possível obter filmes nanobiocompósitos capazes de mimetizar a matriz extracelular (MEC) dos tecidos vivos, permitindo a adesão, proliferação e diferenciação celular. Neste contexto, esses nanobiocompósitos podem ser empregados no desenvolvimento de modelos *in vitro* de tecido ósseo, bem como no reparo ósseo. O objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade de células-tronco derivadas de polpas dentárias humanas (SHED) cultivadas em filmes nanobiocompósitos compostos por quitosana/NFC ou quitosana/NTC. Para tanto, a morfologia e a área celular foram avaliadas por meio de microscopia de luz, enquanto a viabilidade celular e a atividade mitocondrial foram analisadas por meio dos ensaios de Tripán Blue, Alamar Blue e MTT. A análise de variância (ANOVA) foi empregada para avaliar os resultados, e as médias foram comparadas utilizando o teste de Tukey. Valores de P inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. As médias foram apresentadas como valores médios \pm erro padrão (EP) da média. Os resultados obtidos indicaram que o filme nanobiocompósito reforçado com NFC alterou o metabolismo mitocondrial das células e a área celular ($P < 0,05$). No entanto, essas alterações não foram observadas com o nanobiocompósito reforçado com NTC nos tempos de 24 e 48 horas ($P > 0,05$). Ambos os nanobiocompósitos não afetaram a viabilidade das células SHED nos três tempos de cultivo ($P > 0,05$). Dessa forma, esses biomateriais apresentam um potencial promissor como arcabouços de cultivo *in vitro* para células-tronco, além de serem relevantes para aplicações na regeneração do tecido ósseo.

Palavras-chave: Nanomateriais, Matriz extracelular, Regeneração óssea.

ABSTRACT

The increase in bone diseases in the population represents a significant challenge for public health. The search for effective therapies is essential to treat these debilitating conditions. In this context, nanobiotechnology, which involves the use of nanomaterials in the biomedical field, emerges as a promising approach, providing innovative solutions in the development of advanced treatments for bone diseases. Among the existing nanomaterials, cellulose nanofibers (CNF) and carbon nanotubes (CNT) stand out. When associated with biodegradable polymers such as chitosan, they have promising potential in the field of bone tissue bioengineering. By combining these components, it is possible to obtain nanobiocomposite films capable of mimicking the extracellular matrix (ECM) of living tissues, allowing cell adhesion, proliferation, and differentiation. In this context, these nanobiocomposites can be employed in the development of in vitro models of bone tissue as well as in bone repair. The aim of this study was to evaluate the viability of human dental pulp-derived stem cells (SHED) cultured on nanobiocomposite films composed of chitosan/CNF or chitosan/CNT. For this purpose, cell morphology and area were assessed using light microscopy, while cell viability and mitochondrial activity were analyzed using Trypan Blue, Alamar Blue, and MTT assays. Analysis of variance (ANOVA) was used to evaluate the results, and means were compared using Tukey's test. P values less than 0.05 were considered statistically significant. Means were presented as mean values \pm standard error (SE) of the mean. The results obtained indicated that the nanobiocomposite film reinforced with CNF altered the mitochondrial metabolism of the cells and cell area ($P < 0.05$). However, these changes were not observed with the nanobiocomposite reinforced with CNT at 24 and 48 hours ($P > 0.05$). Both nanobiocomposites did not affect the viability of SHED cells at the three culture times ($P > 0.05$). Thus, these biomaterials have promising potential as in vitro culture scaffolds for stem cells and are relevant for applications in bone tissue regeneration.

Keywords: Nanomaterials, Extracellular matrix, Bone regeneration.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 TECIDO ÓSSEO E DOENÇAS RELACIONADAS.....	21
2.2 NANOBIOTECNOLOGIA.....	22
2.3 FILMES NANOBIOCOMPÓSITOS.....	23
2.4 CÉLULAS TRONCO.....	28
2.5 NANOTOXICIDADE.....	30
2.6 BIOENSAIOS.....	32
2.6.1 Viabilidade celular pela técnica de Trypan Blue.....	32
2.6.2 Metabolismo mitocondrial pela técnica de Alamar Blue.....	32
2.6.3 Metabolismo mitocondrial pela técnica de MTT.....	33
2.7 TESTES DE CARACTERIZAÇÃO DE BIOMATERIAIS.....	33
2.7.1 Ensaio de intumescimento.....	33
2.7.2 Avaliação do ângulo de contato.....	34
2.7.3 Infravermelho por Transformada de Fourier.....	34
3 OBJETIVOS.....	35
3.1 OBJETIVO GERAL.....	35
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	36
4.1.1 Delineamento experimental.....	36
4.2 PREPARO DOS FILMES NANOBIOCOMPÓSITOS.....	36

4.3 ANÁLISE DA TOPOGRAFIA POR MICROSCOPIA INVERTIDA 3D.....	37
4.4 ENSAIO DE INTUMESCIMENTO.....	37
4.5 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	38
4.6 AVALIAÇÃO DO ÂNGULO DE CONTATO.....	38
4.7 CULTIVO DE CÉLULAS IN-VITRO.....	39
4.8 VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE EXCLUSÃO DO TRYPAN BLUE.....	39
4.9 VIABILIDADE MITOCONDRIAL PELO ALAMAR BLUE.....	40
4.10 VIABILIDADE MITOCONDRIAL PELO MTT.....	40
4.11 CRESCIMENTO E MORFOLOGIA CELULAR.....	40
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
5 RESULTADOS.....	42
5.1 ANÁLISE DA TOPOGRAFIA DOS NANOBIOCOMPÓSITOS POR MICROSCOPIA INVERTIDA 3D.....	42
5.2 ENSAIO DE INTUMESCIMENTO.....	42
5.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	43
5.4 AVALIAÇÃO DO ÂNGULO DE CONTATO.....	44
5.5 CRESCIMENTO E MORFOLOGIA CELULAR	45
5.6 VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE EXCLUSÃO DO TRYPAN BLUE.....	49
5.7 AVALIAÇÃO DO METABOLISMO MITOCONDRIAL PELO MÉTODO DE ALAMAR BLUE	50
5.8 METABOLISMO MITOCONDRIAL AVALIADO PELO ENSAIO DE MTT.....	51
6 DISCUSSÃO.....	52
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Escala de tamanho dos materiais.....	22
Figura 2: Estrutura quitosana.....	24
Figura 3: Processo de obtenção da quitosana.....	25
Figura 4: Estrutura molecular da celulose.....	26
Figura 5: Nanotubos de carbono.....	26
Figura 6: Representação Células-tronco mesenquimais (MSC/CTMs) oriundas da polpa dentária humana.....	29
Figura 7: Delineamento experimental.....	36
Figura 8: Microscopia de luz invertida dos filmes formados por quitosana pura e nanobiocompósitos.....	42
Figura 9: Percentual de intumescimento dos filmes nanobiocompósitos.....	43
Figura 10: Caracterização dos filmes por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.....	43
Figura 11: Representação gráfica do ângulo de contato.....	45
Figura 12: Morfologia celular por microscopia de luz invertida das células-tronco da polpa de dentes decíduos esfoliados no tempo de 24 horas nos tratamentos.....	46
Figura 13: Morfologia celular por microscopia de luz invertida das células-tronco da polpa de dentes decíduos esfoliados no tempo de 48 horas nos tratamentos.....	47
Figura 14: Morfologia celular por microscopia de luz invertida das células-tronco da polpa de dentes decíduos esfoliados no tempo de 72 horas nos tratamentos.....	48
Figura 15: Viabilidade das células-tronco mesenquimais pelo Azul de Tripán expostas aos grupos nos tempos de 24, 48 e 72h.....	49
Figura 16: Viabilidade das células-tronco mesenquimais pelo Alamar Blue expostas aos grupos nos tempos de 24, 48 e 72h.....	50

Figura 17: Viabilidade das células-tronco mesenquimais pelo MTT expostas aos grupos nos tempos de 24, 48 e 72h.....51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupos experimentais.....	36
Tabela 2: Médias da área celular.....	49

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ALP – fosfatase alcalina

ANOVA – análise de variância

BDH – banco de dentes humano

°C – grau Célsius

CO₂ – dióxido de carbono

CNW – nanowhisker de celulose

CONEP – comissão nacional de ética em pesquisa

DEMEM – Dulbecco's modified Eagle's medium

DNA – ácido desoxirribonucleico

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICT – instituição científica e tecnológica

m – Metros

MEC – matriz extracelular

MSC – células-tronco mesenquimais

NaOH – hidróxido de sódio

NFC – nanofibra de celulose

nHAP/MWCNT – hidroxiapatita associada a nanotubos de carbono

NP – nanopartícula

nm – nanômetro

NM – nanomaterial

OPN – osteopontina

PBAT – poli (butileno adipato-co-terafilatato)

PLGA – poli (ácido lático-co-glicólico)

QTS – quitosana

QTI – quitina

RNA – ácido ribonucleico

SFB – soro fetal bovino

SHED – células-tronco da polpa dentária humana

TGF- β – fator de crescimento transformador β

TPP – tripolifosfato de sódio

μg – micrograma

1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo tem diferentes funções de importância no organismo dos vertebrados, é um tecido conjuntivo, composto por uma matriz extracelular, responsável pela integridade desse tecido com potencial regenerativo (CARDOSO, 2020). Atuam na sustentação do organismo, locomoção, armazenamento de íons (cálcio, fosfato) e na proteção dos órgãos vitais (RAMOS et al., 2021), além de estar envolvido com controles hormonais relacionados às citocinas e fatores de crescimento. (ZANETTI, 2019; FERNANDES, 2021).

O papel de suporte e proteção aos órgãos e locomoção do organismo são realizados pelo tecido que basicamente é formado por células osteoblastos, osteócitos e osteoclastos (TRINDADE et al., 2021). Possuem regiões compactas (cortical), que está relacionada a região periférica dos ossos ou esponjosa (trabecular) referente aos espaços que se comunicam abrigando a medula óssea. Além disso, podem ser classificados em primário ou imaturo, quando encontrado em recém-nascidos ou regiões lesionadas e secundário, representado pelo tecido já maduro, com suas fibras dispostas em seu interior (TÓRRES et al., 2019).

A população brasileira obteve um aumento significativo no número de pessoas com 60 anos ou mais nos últimos anos. Em 2021, pessoas nessa faixa etária apresentaram um percentual de 14,7% no senso, ou seja, um total de 31,2 milhões. (IBGE, 2022). Com o aumento da expectativa de vida, também se observa a incidência das principais doenças ósseas como osteoporoses, caracterizada pela perda da massa óssea, artrites causadas por processos inflamatórios, artroses, câncer ósseo entre outras. Fatores como a idade avançada, menopausa, alimentação pobre em vitaminas, maus-hábitos, traumas entre outros são responsáveis pelo acometimento de tais doenças (SOLIS, 2021; BITTENCOURT&COUTO, 2019).

Considerando estes aspectos, existe a necessidade da realização de tratamentos com a finalidade de melhorar a qualidade de vida da população e minimizar os efeitos causados por essas doenças (CARDOSO et al., 2022). A partir da nanotecnologia, a produção de nanobiocompósitos tem crescido na engenharia

de tecidos, visando a realização de procedimentos médicos mais eficientes e menos invasivos relacionados a regeneração tecidual (SANTANA, 2019).

A nanotecnologia consiste na habilidade da manipulação da matéria em escala nanométrica, criando-se estruturas com uma organização molecular diferenciada (TOMKELSKI *et al.*, 2019). Os nanomateriais (NM) são aqueles formados por átomos e partículas ou aglomerados delas no qual compreendem pelo menos uma das dimensões na escala entre 1-100nm (1 nanômetro = 1 bilionésimo de metro = 1×10^{-9}) podendo ser naturais, incidentais e manufacturados/engenhirados, sendo este último, projetado especificamente para um determinado fim, visando as características e propriedades encontradas na escala nanométrica (TONET & LEONEL, 2019; SANTOS, 2021).

A nanobiotecnologia por sua vez, trata-se da aplicação dos conceitos da nanotecnologia, envolvendo processos biológicos (DIAS *et al.*, 2019). Seu uso vem crescendo cada vez mais, com o intuito da produção de novos materiais superiores aos já comercializados, devido as propriedades físico-químicas oferecidas pelos NMs. Pesquisas e aplicações como: novos fármacos com potencial de ação mais eficaz comparado aos fármacos tradicionais; novos polímeros; sistemas de detecção de biomarcadores; nanossensores; biochips, bem como a produção de nanoscaffolds que tem a capacidade de simular tecidos biológicos que podem promover a proliferação celular e serem usados em terapias regenerativas estão sendo amplamente estudados (BERGER, 2020).

A nanobiotecnologia aplicada a área de engenharia tecidual torna possível a criação de nanoscaffolds como membranas sintéticas que são capazes de simular as matrizes extracelulares dos tecidos biológicos. Essa tecnologia pode beneficiar a produção de modelos teciduais *in vitro*, aplicados a métodos alternativos ao uso de animais em testes de laboratórios ou a tratamentos e restaurações em resposta a lesões que podem ocorrer nos tecidos (BORDINI, 2021).

Visto o crescente desenvolvimento dessa nova tecnologia, a produção de nanobiocompósitos para a utilização na área de saúde tem se tornado bem eficiente na simulação da matriz de tecidos humanos para o crescimento de células-tronco, como é o caso das células-tronco mesenquimais (MSCs) (SANTANA, 2019). Alguns dos materiais utilizados na formação desses filmes é a quitosana, que é um

polissacarídeo encontrado na natureza, biodegradável, biocompatível e biofuncional (RODRIGUES et al., 2020). São usadas na forma de filmes como curativos e suturas, devido às propriedades que elas possuem como antioxidantes, antimicrobianas, não antigênicas, afinidade entre moléculas e atividades antitumorais (PEREIRA et al., 2021; TAGLIARI et al., 2022; TAO, et al., 2019; ABD EL-HACK, et al., 2020). Embora essas propriedades oferecidas pela quitosana, ela é considerada mecanicamente fraca e de baixa resistência (ZANETTE, et al., 2017; ZANETTE, 2019) e por esta razão, a adição de nanomateriais como as nanofibras de celulose (NFC) e os nanotubos de carbono (NTC) podem melhorar o seu uso.

As NFCs ou celulose nanofibrilares são utilizadas em diversas áreas da tecnologia e, por possuírem ótimas características químicas e físicas, são bem exploradas na medicina (MEDEIROS, 2019; LIMA, 2019). Fatores como: rigidez, resistência mecânica, propriedades similares ao colágeno tornam esses NMs aplicáveis em diferentes áreas, além de serem produtos de fontes renováveis são produtos biodegradáveis (SILVA et al., 2020). Os NTCs também são nanomateriais que apresentam propriedades vantajosas tais como ópticas, mecânicas e eletrônicas, grande área superficial podendo atuar como veículos de agentes terapêuticos além de serem materiais biocompatíveis, podendo ser utilizados na engenharia tecidual (OLIVEIRA et al., 2021).

Estudos realizados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (ZANETTE, 2019), comprovaram que os filmes nanobiocompósitos de quitosana contendo NFCs foram capazes de estimularem o aumento da expressão de fosfatase alcalina e deposição de nódulos de mineralização em células-tronco mesenquimais extraídas da polpa de dentes decíduos (SHED), no entanto, ainda não foi avaliada a citocompatibilidade de nanobiocompósito contendo NTC em células SHED.

No presente estudo, após o cultivo *in vitro* das células SHED nos nanobiocompósitos, foi realizada a análise da viabilidade celular pela integridade da membrana, utilizando o ensaio de Azul de Tripán; avaliou-se a viabilidade mitocondrial por meio dos ensaios de Alamar Blue e MTT; realizou-se a análise da morfologia por microscopia de luz, além dos ensaios de caracterização desses filmes, como intumescência, ângulo de contato e infravermelho.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 TECIDO ÓSSEO E DOENÇAS RELACIONADAS

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado que desempenha um papel crucial no suporte estrutural, proteção de órgãos e armazenamento de minerais. Histologicamente, esse tecido é composto por células e uma matriz extracelular mineralizada.

As células principais encontradas no tecido ósseo são os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Os osteoblastos são responsáveis pela síntese e secreção da matriz óssea, que é composta principalmente por fibras de colágeno tipo I (CARDOSO, 2020; RAMOS et al., 2021). À medida que os osteoblastos depositam a matriz, eles se tornam aprisionados nela e se transformam em osteócitos, que são as células maduras do tecido ósseo. Os osteócitos têm prolongamentos que se comunicam entre si através de canaliculos e desempenham um papel na manutenção e regulação do tecido ósseo. Por outro lado, os osteoclastos são células multinucleadas responsáveis pela reabsorção óssea, ou seja, pela quebra e remoção da matriz óssea mineralizada (HUANG et al., 2023; SONG et al., 2023; OTANI et al., 2023; COSTA & DAL BÓ, 2020).

A matriz extracelular do tecido ósseo é composta principalmente por sais de cálcio e fosfato, formando hidroxapatita, que confere ao tecido ósseo sua resistência e rigidez. Além disso, a matriz contém proteoglicanos e outras proteínas que desempenham um papel na regulação da mineralização óssea (FERREIRA et al., 2019; CARDOSO, 2020).

No entanto, devido ao envelhecimento populacional, fatores genéticos ou ambientais, o tecido ósseo pode ser afetado por diversas doenças. A osteoporose é uma condição caracterizada pela perda progressiva de massa óssea, tornando os ossos mais frágeis e suscetíveis a fraturas (SOLIS, 2021). A osteoartrite é uma doença degenerativa que afeta as articulações e resulta no desgaste da cartilagem, causando dor e limitação de movimento. A doença de Paget é uma condição crônica que envolve uma remodelação óssea anormal, levando a ossos deformados, dor e fraturas (REZZO et al., 2022; RODRIGUES et al., 2023). Outras doenças, como a

osteogênese imperfeita e o câncer ósseo, também afetam o tecido ósseo de maneira significativa (MARTINS et al., 2022).

Diante dessas doenças e de suas consequências para a saúde óssea, há uma necessidade crescente de desenvolver novas terapias e abordagens de tratamento. Neste sentido, novas estratégias terapêuticas estão sendo exploradas, incluindo terapias genéticas, medicamentos moduladores do metabolismo ósseo e avanços na bioengenharia tecidual para o desenvolvimento de substitutos ósseos e medicina regenerativa (BORDINI, 2021; SANTANA, 2019).

2.2 NANOBIOTECNOLOGIA

A nanobiotecnologia compreende um ramo da nanotecnologia responsável pela aplicação dos produtos das áreas biológicas, farmacêuticas, médicas, diagnósticos entre outros. Para esses fins, observa-se a manipulação da matéria átomo a átomo na formação de nanocristais, nanofibras, nanofilmes, nanobiossensores etc (ZAMANI *et al.*, 2018). Por se tratar de materiais de tamanho na escala nano ($1 \text{ nm} = 1 \times 10^{-9} \text{ m}$) (Figura 1), o uso de NMs cresce cada vez mais no desenvolvimento de novos produtos que apresentam características superiores aos produtos da escala macro (HASNAIN & NAYAK, 2019).

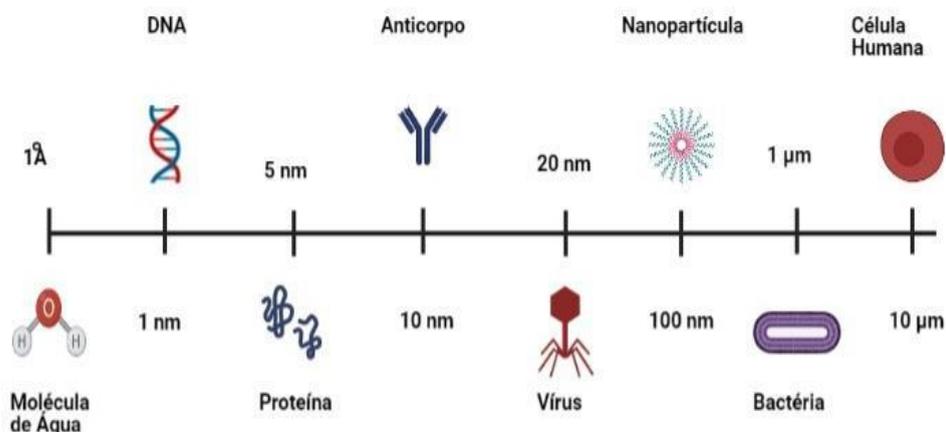


Figura 1 – Escala de tamanho dos materiais. Fonte: Adaptado de: Zanette (2019)

Amplamente explorada, a nanobiotecnologia está presente na química, física, informática, farmacologia, biologia, medicina e na engenharia de tecidos (DIAS et al., 2019). Um dos ramos da engenharia de tecidos é o cultivo de células em biomateriais, como os filmes nanobiocompósitos, capazes de simular a matriz extracelular (MEC), bem como também a produção de tecidos/órgãos vivos capazes de substituir e/ou serem utilizados em tratamentos que envolvam enfermidades ou trauma (PIOVESANA, 2020).

Nesse contexto, a medicina regenerativa busca por meio do uso de biomateriais, tratamentos que venham favorecer pacientes que sofreram algum dano em seu tecido ósseo (PETRY, 2019). Correlacionado ao avanço da idade, registra-se também um número maior de tratamentos relacionados a traumas e doenças crônicas nos ossos e articulações, visto que são problemas que acometem indivíduos mais velhos (MURILO et al., 2020).

Os biomateriais como os filmes nanobiocompósitos de quitosana e NFC, além das propriedades mecânicas superiores (ZANETTE et al., 2017), são de fácil produção, biofuncionais e apresentam propriedades para a aderência celular. Essas características são essenciais para seu bom funcionamento e sucesso do tratamento (NARCISO et al., 2019).

Por conta desses fatores, a nanobiotecnologia segue tendo diversos investimentos por parte dos setores de desenvolvimento e pesquisa (FLORÊNCIO et al., 2017), em especial, o desenvolvimento de biomateriais para aplicações biomédicas.

2.3 FILMES NANOBIOCOMPÓSITOS

A produção industrial de polímeros sintéticos é responsável em grande parte pelo acúmulo de resíduos sólidos, uma vez que são materiais de alta resistência, não biodegradáveis e que resultam em um alto impacto ambiental (MOCARZEL et al., 2019; MACEDO et al., 2020). A fim de substituir esse tipo de material, cresce cada vez mais o interesse pelos polímeros biodegradáveis que, provenientes de

fontes naturais, são degradados por fungos e microorganismos (ARAÚJO et al., 2021).

Filmes nanobiocompósitos são uma proposta de polímeros biodegradáveis apresentando funções que atendem a diversas áreas como, produção de embalagens, produção de curativos e, na engenharia tecidual, em tratamentos relacionados ao tecido ósseo (ZANETTE, 2019).

Os filmes nanobiocompósitos apresentam como importante característica a nanotopografia e a biocompatibilidade, características necessárias para a mimetização da matriz extracelular natural e uso em implantes (MARINS, 2019; SILVA, 2023). Dentre os materiais utilizados para a produção desses filmes nanobiocompósitos, destaca-se quitosana (QTS). Por possuir propriedades vantajosas como boa interação com outros materiais levando a uma alta aplicabilidade na área médica, abundância na natureza, semelhança a estruturas encontradas na MEC (ROSENDO et al., 2020), a quitosana (Figura 2) vem sendo amplamente explorada na produção de biofilmes. É um polímero natural oriundo da quitina (QTI), que possui propriedades biocompatíveis (SANTOS et al., 2021; XAVIER, et al., 2020).

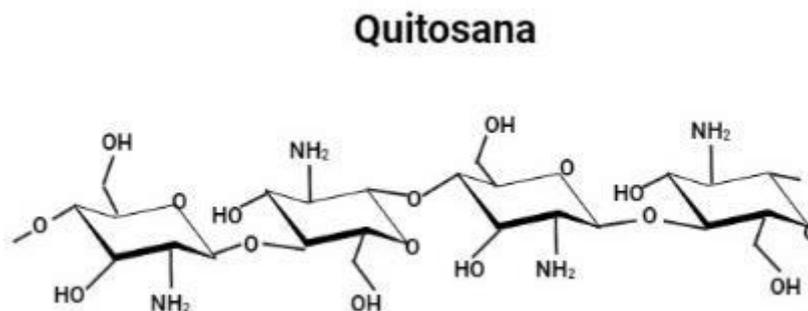


Figura 2 – Estrutura quitosana. Fonte: Adaptado de: Silva et al. (2016)

A quitosana é um polissacarídeo (β -(1 \rightarrow 4) -2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose) bastante abundante na natureza depois da celulose, sendo encontrada em insetos, animais marinhos entre outros. São descritos também como antimicrobianos, e por isso podem ser utilizados como *scaffolds* (arcabouços para a cultura celular) por promover a adesão e proliferação celular, bem como apresentam características

semelhantes aos glicosaminoglicanos, que são abundantes na matriz extracelular natural dos tecidos (ZANETTE, 2017; GARCIA et al., 2018; ROSENDO et al., 2020).

A obtenção da quitosana é por meio do processo de desacetilação da quitina (Figura 3) (LADEIRA, 2020).

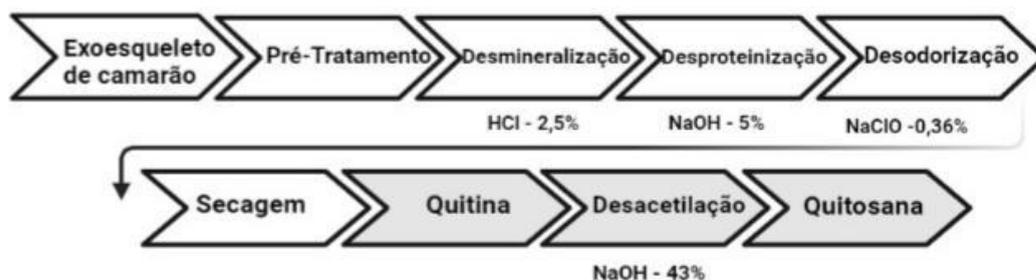


Figura 3 – Processo de obtenção da quitosana. Fonte: Adaptado de: Silva et al. (2016)

Em diversos estudos, os polímeros de quitosana são usados em conjunto com outros NMs para a modificação de propriedades funcionais dos polímeros que propiciem o cultivo, proliferação e diferenciação celular. Por exemplo, a quitosana não apresenta fortes propriedades ligantes com as células, observando-se uma baixa afinidade e instabilidade (ANTUNES et al., 2019), logo, necessitando assim de se associar com NMs para um resultado ideal.

Nesse contexto, a associação de NMs aos filmes de quitosana tem por finalidade contribuir na formação de filmes nanobiocompósitos funcionais. As NFCs são excelentes para essa utilização uma vez que, são NMs provenientes da celulose, material mais abundante na natureza (TEDESCO, 2021), sendo biodegradáveis, possuem flexibilidade, estabilidade térmica, resistência mecânica e de permeação de líquidos além de propriedades similares ao colágeno, que é o composto principal na construção do tecido ósseo (SILVA, 2020; SOUZA, 2021).

A celulose (Figura 4), que pode ser extraída de diferentes fontes, tem como uma de suas principais funções, prover resistência às estruturas no qual a mesma é inserida (TEDESCO, 2021).

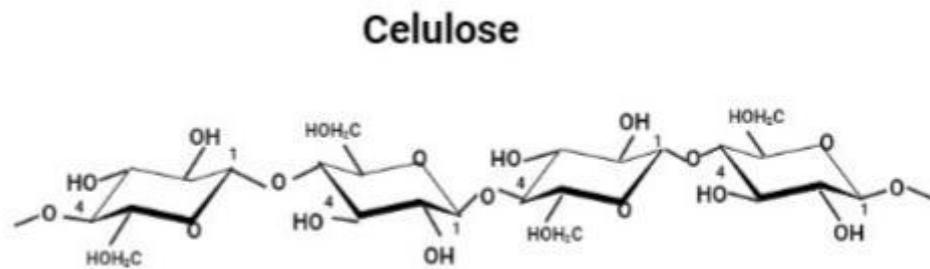


Figura 4: Estrutura molecular da celulose. Fonte: Adaptado de: Moço (2013)

Os NTCs (Figura 5), assim como as NFCs também são materiais que possuem grande potencial na produção de nanobiocompósitos. Pertencente ao grupo dos fulerenos, são resultantes do enrolamento de folhas de grafeno com tamanho aproximado de 10 nm de diâmetro. São classificados em nanotubos de parede simples (SWCNTs), que são aqueles formados por apenas uma folha de grafeno enrolada e os nanotubos de parede múltipla (MWCNTs), compostos por mais de uma folha de grafeno (LOPES, 2022).

Por estarem na escala nanométrica, os NTCs apresentam características promissoras por conta de seu tamanho e a capacidade de funcionalização. Além disso, a quantidade de camada que os formam também está relacionada às características que eles podem apresentar (ópticas, elétricas e mecânicas; biocompatibilidade), sendo cada vez mais utilizado na engenharia tecidual (MONTEIRO et al., 2021, OLIVEIRA et al., 2021).

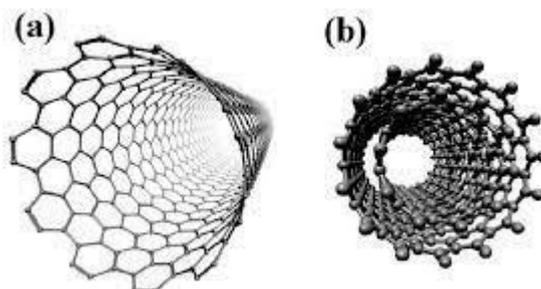


Figura 5: (a) Nanotubo de carbono de parede simples; (b) Nanotubo de carbono de parede múltipla. Fonte Zarbin & Oliveira (2013).

Uma maior procura por fontes que sejam consideradas renováveis e de baixo ou nenhum impacto dos resíduos ao meio ambiente vem cada vez mais aumentando (SOUZA & OLIVEIRA, 2019), e as pesquisas desses biocompósitos bem como a sua incorporação no mercado igualmente veio a crescer. É aí que a engenharia de tecidos tem a sua contribuição: a união entre os polímeros de quitosana com as NFCs ou NTCs permite a produção de filmes nanobiocompósitos capazes de promover adesão celular devido a nanotopografia do *scaffold* e estabilidade mecânicas, além de fornecer propriedades antibacterianas e capacidade de retenção líquida (GARCIA, et al., 2018; LIRA, 2021). Essas propriedades também são importantes na produção de *scaffolds* aplicados na restauração, reparo, implantes de tecidos degradados, devido a capacidade de promover crescimento e diferenciação celular. Adicionalmente tem o potencial de promover o desenvolvimento de tecidos biomiméticos para a substituição de animais de experimentação em testes toxicológicos (ROSSI, 2021; COSTA et al., 2020).

A procura pelo uso desses materiais diferenciados na área da engenharia tecidual se dá por se tratar de materiais que apresentam um bom custo-benefício, visto a oferta dos mesmos na natureza (BARBOSA, 2018) bem como a semelhança que eles apresentam aos componentes da matriz extracelular dos tecidos dos organismos.

A técnica de cultivo celular nas NFCs ou NTCs juntamente com os polímeros de quitosana tem como finalidade o aprimoramento desse cultivo permitindo que as células-tronco sejam capazes de se aderirem a esses filmes e se diferenciarem, como aconteceria normalmente no tecido natural (ANTUNES, 2019).

Portanto, pensando-se desta maneira, ao mesmo ponto que pesquisas envolvendo filmes nanoestruturados são de extrema relevância para as áreas biomédicas, também se considera de extrema importância estudos que comprovem a segurança do uso desses biomateriais para aplicações biomédicas.

2.4 CÉLULAS TRONCO

Células-tronco são células com capacidade de autorrenovação e diferenciação em diferentes tipos celulares, desempenhando um papel crucial na regeneração e reparo de tecidos danificados. Diversos tipos de células-tronco têm sido explorados na medicina regenerativa e na engenharia tecidual, oferecendo uma nova abordagem para o tratamento de diversas doenças e lesões (SILVA, et al., 2019; BORTZ et al., 2019; ALVES et al., 2019; MORAES et al., 2021).

Um dos tipos mais conhecidos de células-tronco são as células-tronco embrionárias, também conhecidas como células totipotentes, obtidas a partir do embrião em estágio inicial. Essas células possuem um potencial de diferenciação praticamente ilimitado, podendo se transformar em qualquer tipo celular do organismo. No entanto, seu uso é questionado devido a questões éticas relacionadas à destruição do embrião durante a obtenção dessas células (MENDES et al., 2021).

As células-tronco adultas, por sua vez, são encontradas em tecidos específicos do organismo, como a medula óssea, o sangue periférico, o tecido adiposo e a polpa dentária. Essas células são responsáveis pela regeneração e reparo contínuos dos tecidos durante a vida adulta.

Células-tronco pluripotentes também possuem a capacidade de diferenciação em tecidos embrionários, tendo seu número reduzido na fase adulta e são capazes de originar tecidos como dos ossos e sangue, por exemplo. As células-tronco multipotentes possuem uma capacidade reduzida em comparação às totipotentes e pluripotentes. Essas células se diferenciam de acordo com os órgãos e tecidos ao qual estão destinadas, se responsabilizando pela regeneração tecidual (RODRIGUES & CARVALHO, 2022; COUTO & FREIRE, 2022).

Dentre as células-tronco adultas, as células-tronco da polpa dentária humana de dentes decíduos (SHEDs) têm despertado grande interesse devido às suas propriedades regenerativas e à facilidade de obtenção (SANTOS, 2020; SILVA et al., 2019).

As SHEDs (Fig. 6) são células-tronco mesenquimais encontradas na polpa dentária de dentes decíduos, também conhecidos como dentes de leite. Essas células possuem um potencial de diferenciação em diferentes tipos celulares, como células ósseas, cartilaginosas, adiposas, neurais e dentinogênicas (BALDERRAMA et al., 2021; SOARES, 2019; ARAÚJO et al., 2020; SARRA, 2019). Além disso, as SHEDs têm uma alta taxa de proliferação e são imunologicamente compatíveis com o doador do dente, o que reduz os riscos de rejeição quando utilizadas em terapias regenerativas (COSTA et al. 2020, SARTORI, 2020).

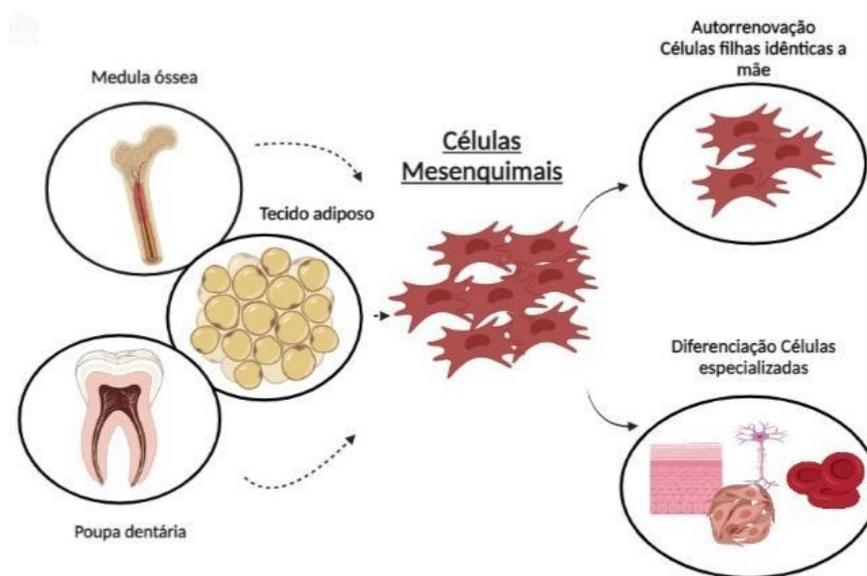


Figura 6: Representação Células-tronco mesenquimais (oriundas da polpa dentária humana (SHED)). Fonte: Adaptado de: Freitas (2011)

As SHEDs têm sido extensivamente investigadas para uma variedade de aplicações na medicina regenerativa e engenharia tecidual. A utilização das SHEDs na medicina regenerativa e engenharia tecidual oferece perspectivas promissoras para o tratamento de doenças e lesões. A facilidade de obtenção e a capacidade de diferenciação das SHEDs as tornam uma opção viável para o desenvolvimento de terapias personalizadas e eficazes. Em trabalho recente do nosso grupo de pesquisa, Zanette et al., (2021) avaliaram filmes de quitosana contendo NFC adquiridas a partir do algodão juntamente com biopolímeros de quitosana a fim de criar uma MEC artificial capaz de estimularem a diferenciação osteogênica de SHEDs. Esses autores observaram informações sobre as interações entre as NFCs

juntamente com os polímeros de quitosana que aumentaram as propriedades mecânicas desse polímero. Foi observado ainda o potencial do nanobiocompósito em promover a adesão das células, revelando boa citocompatibilidade. Nesse estudo, os autores observaram que os nanobiocompósitos apresentaram uma superfície com uma nanotopografia que possibilitou a adesão, proliferação e diferenciação de SHEDs.

2.5 NANOTOXICIDADE

Os NMs apresentam propriedades físicas-químicas, ópticas, magnéticas e mecânicas particulares que são utilizadas em diversas aplicações tecnológicas (OLIVEIRA & JUNIOR, 2019). Dentro de uma vasta oportunidade de aplicações – área alimentícia, informática/eletrônica, cosmética/farmacêutica, biotecnologia -, o investimento no Brasil voltado para a nanotecnologia, de acordo com a Financiadora de Inovação e Pesquisa (Finep) superou a marca dos 400 milhões em demandas para as instituições científicas e tecnológicas (ICTs) em 2018 (Ministério da ciência, Tecnologia e Inovações, 2019).

Diversos estudos relacionados com aplicação de NMs concentram-se na produção de nanopartículas com funções terapêuticas e/ou transporte de genes por meios de mecanismos endocitóticos ou não, diagnóstico *in vivo/in vitro*, tecidos sintéticos que podem substituir e/ou diminuir o uso de animais de experimentação e, imageamento celular (MUNK *et al.*, 2016).

Por conta da facilidade de manipulação da matéria assim como as diferenças vantajosas encontradas nos materiais da escala nanométrica comparadas com materiais de tamanho macro (TOMKKELSKI *et al.*, 2019), ainda se observam preocupações quanto as aplicações dos NMs relacionados a impactos que possam causar tanto aos organismos no quais são implantados quanto a destinação estes mesmos no meio-ambiente (TONET & LEONEL, 2019).

Devido a isso, nos últimos anos uma nova área do conhecimento conhecida como nanotoxicologia tem despertado interesse. A nanotoxicologia consiste no

estudo causado pelos efeitos adversos do uso de NMs em contato com sistemas biológicos (ZIELINSKA et al., 2020; LADEIRA, 2019).

Os NMs possuem como tendência, formar agregados por interações das forças de Van der Waals que agem entre eles (atração entre moléculas, íons, átomos) (ECHEVERRIGARAY, 2018), possuem alto potencial de transpassar paredes e tecidos dos organismos promovendo diversas respostas no mesmo, além de causarem possíveis efeitos desconhecidos (TONET & LEONEL, 2019). O uso de filmes nanobiocompósitos também apresentam uma preocupação frente a sua utilização, uma vez que, alguns efeitos gerados através desses materiais se relacionam com possíveis alterações causadas nas células que são cultivadas nos mesmos, desencadeando fatores como estresse celular, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e alterações na expressão gênica (SANTANA, 2019), e morte celular.

Nanocompósitos formados a partir de poliuretanos (PUs) reforçados com *nanowhisker* de celulose (CNW) (refere-se a monocristais na forma de filamentos) foram desenvolvidos por Shahrsvand e colaboradores (2017) no qual serviram como *scaffolds* para a adesão de MSC humanas, proliferação e sua possível diferenciação osteogênica. Após os testes de caracterização dos filmes, viabilidade celular entre outros, os autores puderam concluir que, a adição dos CNWs como reforço aos nanocompósitos foi benéfica para o cultivo de MSCs. Os *scaffolds* obtiveram características semelhantes as estruturas da MEC, mostrando-se apropriados para diferenciação osteogênica das MSCs.

OLIVEIRA (2017), em suas pesquisas, avaliou em osteoblastos humanos o potencial osteogênico de nanocompósitos nHAp/MWCNT-GO (hidroxiapatita associada a nanotubos de carbono com exposição de óxido de grafeno nas pontas) evidenciados pela análise de expressão gênica. Foram avaliados os genes de fosfatase alcalina (ALP), osteocalcina (OC), osteonectina (ONC), colágeno tipo I (COL-1) e fator de transcrição (RUNX2). Para o ALP, o autor observou um aumento expressivo da atividade em todos os grupos de exposição ao nanobiocompósito quando comparado ao grupo controle, em período de 14 dias. Portanto, a utilização de nanobiocompósitos têm o potencial de aumentar a atividade osteoblástica.

Pesquisas realizadas por AMARAL e colaboradores (2018), avaliaram o potencial de indução de diferenciação osteogênica de hidrogéis contendo nanopartículas de titanato de bário (NP TB). Foi observado que o gene para ALP, um marcador de diferenciação e mineralização, teve maior expressão em células cultivadas em contato com os hidrogéis contendo nanopartículas. Por outro lado, o gene para proteína morfogenética (BMP 2) teve expressão aumentada apenas no hidrogel sem nanopartículas.

Frente a esses fatores, a avaliação dos efeitos citotóxicos em células cultivadas em contato com os filmes nanobiocompósitos reforçados com NFC ou NTC é de extrema necessidade para uma perfeita compreensão do uso desses nanomateriais.

1.6 BIOENSAIOS

1.6.1 Viabilidade celular pela técnica de Trypan Blue

O Trypan Blue ou azul de tripan é um tipo de corante utilizado em métodos colorimétricos a fim de avaliar a viabilidade de células por meio da integridade da membrana (TAVARES, 2020). Esse método se dá através da contagem de células viáveis, utilizando-se um contador de células. Quando as células submetidas a este ensaio se encontram viáveis, ou seja, saudáveis quanto a sua estrutura, as mesmas não se mostram coradas, ao contrário das células não viáveis, que logo absorvem o corante por perda de seletividade da membrana. Posteriormente, é realizada a contagem celular através do contador (câmara de Neubauer) por microscopia de luz (MELO, 2019).

2.6.2 Metabolismo mitocondrial pela técnica de Alamar Blue

A técnica de AlamarBlue (Resazurina) também é utilizada em ensaios de viabilidade mitocondrial, uma vez que, é um indicador de oxirredução marcando células vivas. Após a exposição, a cor do reagente nas células viáveis muda,

passando de azul para rosa, resultado do processo de oxirredução. O corante atua como um aceptor de elétrons intermediário na cadeia de transporte, detectando os níveis de NADPH. A intensidade da fluorescência é proporcional a quantidade de células vivas. As células que são expostas a esse ensaio, posteriormente podem ser reutilizadas, uma vez que este composto não causa a morte das células (COSTA, 2019; ROCA et al., 2019).

2.6.3 Metabolismo mitocondrial pela técnica de MTT

O ensaio de MTT [3- (4,5- dimetil -2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazólio] ocorre com a análise quantitativa da atividade mitocondrial pela desidrogenase, nas reações de NADH e NAD⁺, reduzindo em atividade formazan nas células vivas. Nesse processo, a enzima oxiredutase através da quebra de moléculas, transforma o sal tetrazólio (NADH) ao sal formazan (NAD⁺) com a transferência de um elétron, este agora, insolúvel em água. A quantidade de formazan presente na amostra é diretamente proporcional ao número de células vivas (BENOV, 2019; GRELA et al., 2018).

2.7 TESTES DE CARACTERIZAÇÃO DE BIOMATERIAIS

Biomateriais apresentam características únicas de acordo com o material que são formados, tendo resultados diferentes quanto a sua utilização e diante desse fator, estudar a maneira como os biomateriais se relacionam com os organismos é de extrema importância (HASAN, 2020). Alguns ensaios são realizados para caracterizar as estruturas desses biomateriais e explicar sua interação.

2.7.1 Ensaio de intumescimento

A matriz extracelular apresenta características que proporcionam um ambiente adequado para que as células se desenvolvam. Uma das características importantes para a proliferação e desenvolvimento celular é a presença de um

ambiente umedecido, uma vez que as células dependem de um meio aquoso para completar o seu ciclo (KARAMANOS et al., 2021). O ensaio de intumescimento nos filmes nanobiocompósitos tem por finalidade identificar a capacidade que esses nanobiocompósitos tem de absorção de líquidos, que está diretamente relacionado a capacidade de mimetização da matriz extracelular.

2.7.2 Avaliação de ângulo de contato

Assim como a avaliação de intumescimento, a caracterização pelo ângulo de contato também se faz importante nos filmes nanobiocompósitos. O uso desses filmes necessita que tais filmes apresentem boa afinidade com a água. Os filmes nanobiocompósitos reforçados com NFC ou NTC dependem de apresentarem características hidrofílicas em seu uso na engenharia tecidual. O ensaio de ângulo de contato permite observar a relação entre o nanobiocompósito e as partículas de água. Para um resultado considerado hidrofílico, a gota necessita ter ângulo menor 90° , representando uma boa fluidez do líquido e alto nível de umedecimento. Quando o ângulo é maior do que 90° , significa que esse biomaterial é hidrofóbico. Esse fator inviabiliza as trocas a serem realizadas pelos organismos aderidos nesse material (SOUZA et al., 2021;

2.7.3 Infravermelho por transformada de Fourier

A caracterização pela espectroscopia de infravermelho é responsável pela identificação dos elementos que compõem os materiais que estão sendo avaliados. Através da radiação, que é absorvida pelas amostras e transmitida, é possível se identificar a assinatura química dos nanobiocompósitos, que são as moléculas de suas estruturas químicas. Por terem a sua utilização na bioengenharia tecidual, é de muita importância que se conheça quais são os elementos que os formam (COSTA, 2021).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a citotoxicidade de filmes nanobiocompósitos compostos por nanofibras de celulose ou nanotubos de carbono utilizando células-tronco da polpa dentária humana cultivadas in vitro.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a morfologia e área das células SHED cultivadas nos filmes nanobiocompósitos;
- Avaliar a viabilidade das células SHED cultivadas nos filmes nanobiocompósitos;
- Avaliar a atividade mitocondrial das células SHED cultivadas nos filmes nanobiocompósitos;
- Caracterizar os filmes nanobiocompósitos utilizando o teste de intumescência, ângulo de contato, microscopia de luz e infravermelho.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Na Tabela 1 estão descritos os grupos experimentais avaliados no presente estudo.

Tabela 1- Grupos Experimentais – Ensaio de avaliação do cultivo das células SHED nos nanobiocompósitos.

GRUPOS	DESCRIÇÃO
1	Placa de poliestireno (Controle)
2	Filme de quitosana
3	Filme nanobiocompósito reforçado com NFC (1000 µg mL ⁻¹)
4	Filme nanobiocompósito reforçado com NTC (1000 µg mL ⁻¹)

4.1.1 Delineamento experimental

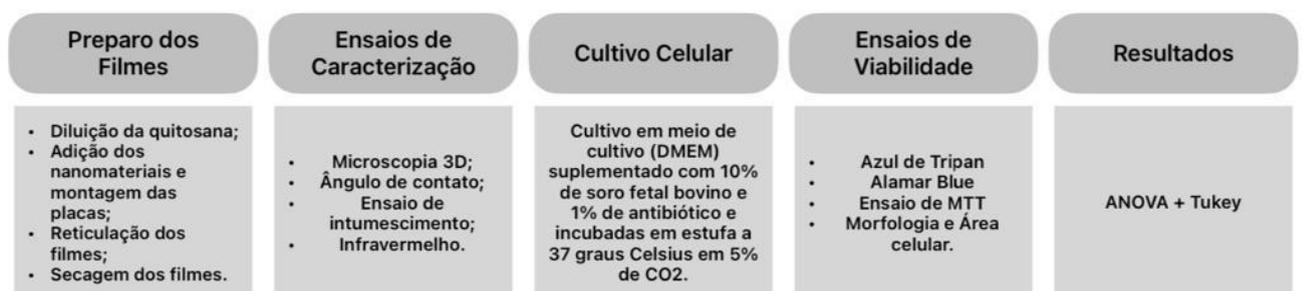


Figura 7: Delineamento experimental. Fonte: O autor (2023)

4.2 PREPARO DOS FILMES NANOBIOCOMPÓSITOS

As soluções dos filmes foram preparadas a partir da dissolução 1% (m/v) quitosana (baixo peso molecular, grau de desacetilação de 75-85%; Sigma) em ácido acético a 1% (v/v), seguido de agitação constante por um período de 24 horas

em temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionadas 0.01% de nanofibras de celulose/nanotubo de carbono na solução de quitosana. Os filmes foram processados pela técnica de casting (evaporação de solvente), no qual 250 μL de cada solução foram dispostos em placas de Petri de polipropileno e submetidos à secagem em estufa à 37° C por 72 horas. Em seguida, os filmes foram imersos em solução de 1 M NaOH por 24 horas e lavados em água destilada.

Os filmes foram reticulados pela técnica de gelificação iônica em solução de 1,3% de Tripolifosfato de sódio (TPP) (Sigma) por 2 horas a 4° C. O pH da solução de reticulação foi ajustado para 5 (1 M HCl). Posteriormente, os filmes foram lavados em água destilada e secos em estufa à 37° C por 72 horas. Por fim, os filmes foram neutralizados em 1M NaOH por 30 minutos (pH 7) e lavados com meio de cultura DMEM contendo antibiótico (10.000 U mL^{-1} penicilina e 10.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ estreptomicina).

4.3 ANÁLISE DA TOPOGRAFIA POR MICROSCOPIA INVERTIDA 3D

Os filmes nanobiocompósitos com topografia 3D foram sintetizadas em placas poliestireno tratadas para o cultivo celular, a seguir elas foram analisadas utilizando o microscópio invertido Primovert (Zeiss, Alemanha) com câmera (AxioCam ERc 5s) acoplado à um computador para as imagens serem capadas no software da Zen 2.3 lite.

4.4 ENSAIO DE INTUMESCIMENTO

O ensaio de intumescimento foi realizado pesando previamente os filmes nanobiocompositos secos (peso inicial), sendo então cobertos com 1 mL de PBS 1X e mantidos em incubadora umidificada com 5% de CO_2 , a 37°C. Após 2, 4, 6 e 24 horas, o meio não absorvido foi retirado e as amostras foram pesadas novamente (peso final). Esses tempos de exposição foram escolhidos pois foi observado em

outro estudo que após 24h não houve mudanças (ZANETTE, 2019). Os ensaios foram feitos em triplicata, repetidos três vezes.

4.5 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Os espectros de absorção de infravermelho com transformada de Fourier foram obtidos em espectrofotômetro FTIR MB-102 de identificação dos grupos funcionais dos materiais analisados, no laboratório de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora. As análises foram obtidas na região de 5000 cm^{-1} a 0 cm^{-1} .

4.6 AVALIAÇÃO DO ÂNGULO DE CONTATO

Os filmes de quitosana contendo nanofibra de celulose ($1000\text{ }\mu\text{g/mL}$), nanotubo de carbono ($1000\text{ }\mu\text{g/mL}$) e um apenas com quitosana foram sintetizados em placas de Petri tratadas de modo que os filmes ficariam presos e totalmente esticados. Após os filmes prontos a borda da placa de Petri foi cortada para que conseguíssemos visualizar melhor a gota, então foi depositada uma gota com volume de $50\text{ }\mu\text{L}$ sobre a superfície de cada filme e essa foi registrada com câmera fotográfica (Canon EOS, Japão). A seguir as imagens foram analisadas no programa ImageJ (National Institutes of Health, NIH, USA) onde foi possível calcular o ângulo de contato. Os resultados foram por análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo ensaio de Tukey. Os resultados serão apresentados como médias \pm erro padrão da média e valores de $p < 0,05$ serão considerados significativos.

4.7 CULTIVO DE CÉLULAS IN-VITRO

As células-tronco mesenquimais isoladas a partir da polpa dentária humana de dentes decíduos esfoliados utilizadas foram obtidas do Laboratório de Genética Humana e Terapia Celular (GENETEC), Departamento de Biologia do Instituto de

Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, processo número 67168522.4.0000.5147 (CONEP) e previamente caracterizadas (FERREIRA et al., 2019; ZANETTE, 2016).

As células-tronco foram cultivadas em meio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM; Nutricell) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB, Sigma), 100U/mL de penicilina (GIBCO), 100µg/mL de estreptomicina (GIBCO) e 2 mM de L-glutamina (Invitrogen) incubadas em estufa a 37° C em uma atmosfera umidificada contendo 95% de ar e 5% CO₂. O meio de cultivo foi trocado a cada três dias. Após atingirem 80% de confluência nas garrafas, as células foram plaqueadas nos três grupos de experimento: (controle, quitosana e nanobiocompósitos contendo NFC ou NTC 1000 µg/mL) em triplicata em 3 diferentes placas de 24 poços. Um total de 40.000 células foram distribuídas em cada poço dos tratamentos sendo no grupo controle utilizado apenas as células e meio de cultura. As imagens foram tiradas utilizando o microscópio de luz invertida, captando 5 campos diferentes de cada poço.

4.8 VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE EXCLUSÃO DO TRYPAN BLUE

Após o cultivo das células no grupo controle, filme de quitosana e sobre os filmes nanobiocompósitos contendo NFC e NTC (24, 48 e 72 horas), as mesmas foram coradas com Azul de Tripán (0,5%) em solução salina (0,85%), que avalia a integridade da membrana celular. A porcentagem de células viáveis (não coradas) foi obtida considerando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de células viáveis} = \frac{\text{número de células viáveis (não coradas)}}{\text{número total de células}} \times 100$$

4.9 VIABILIDADE MITOCONDRIAL PELO ALAMAR BLUE

Após o cultivo das células no grupo controle, filme de quitosana e sobre os filmes nanobiocompósitos contendo NFC e NTC (24, 48 e 72 horas), as mesmas foram coradas com AlamarBlue® (0,1%) e incubadas por 4h a 37°C em incubadora de cultura celular. Após a incubação, foi realizada a leitura da fluorescência em um espectrofotômetro (Varioskan Flash Multimode Reader, Thermo Fisher Scientific, EUA).

4.10 VIABILIDADE MITOCONDRIAL PELO MTT

Após o cultivo das células no grupo controle, filme de quitosana e sobre os filmes nanobiocompósitos contendo NFC e NTC (24, 48 e 72 horas), foi adicionado o MTT (Sigma Aldrich, EUA) a 10% (v/v) e incubadas por 4h a 37° em incubadora de cultura celular. Após a incubação, o MTT foi reduzido por meio de enzimas oxidorreductase gerando os cristais de formazan. Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Varioskan Flash Multimode Reader, Thermo Fisher Scientific, EUA) a 570nm.

4.11 CRESCIMENTO E MORFOLOGIA CELULAR

Após o cultivo das células no grupo controle, filme de quitosana e sobre os filmes nanobiocompósitos contendo NFC e NTC (24, 48 e 72 horas), essas células foram fotografadas. As imagens foram obtidas usando a objetiva de 10X utilizando-se o microscópio de luz invertida, onde foram capturadas em 5 campos diferentes de cada poço. As células foram medidas no programa ImageJ (National Institutes of Health, NIH, USA) onde foi possível obter o tamanho e a área celular das mesmas. Foram avaliados um 'N' amostral de 100 células para cada tratamento em cada um dos tempos avaliados.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados da viabilidade, metabolismo mitocondrial e área celular foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. Os resultados foram apresentados como médias \pm erro padrão (EP) da média.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DA TOPOGRAFIA DOS NANOBIOCOMPÓSITOS POR MICROSCOPIA INVERTIDA 3D

A figura 8 representa a maneira como os polímeros, tanto isolado como junto com os NMs se comportam em suas estruturas. No filme de quitosana (A) é possível observar menos pontos em que a superfície apresenta rugosidade e estruturação; os filmes nanobiocompósitos reforçados com NFC e NTC por outro lado, apresentam pontos com maior rugosidade e uniformidade em torno da superfície (B e C respectivamente).

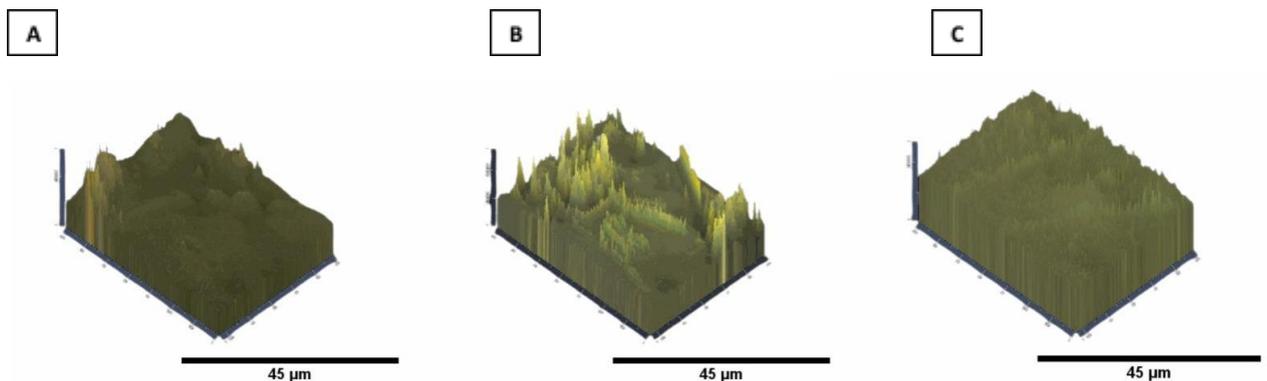


Figura 8: Microscopia de luz invertida dos filmes formados por quitosana pura e nanobiocompósitos reforçados com nanofibra de celulose ou nanotubo de carbono. Os tratamentos referem-se ao filme de quitosana pura (A), nanobiocompósito reforçado com nanofibra de celulose (NFC) (B) e nanobiocompósito reforçado com nanotubo de carbono (NTC) (C). Barra de escala: 45µm.

5.2 ENSAIO DE INTUMESCIMENTO

A figura 9 apresentara os resultados referentes a pesagem dos filmes. Os filmes apresentaram pesos aproximados tanto secos quanto após os tempos de avaliação. Não foi apresentada nenhuma diferença significativa entre eles ($P > 0,05$).

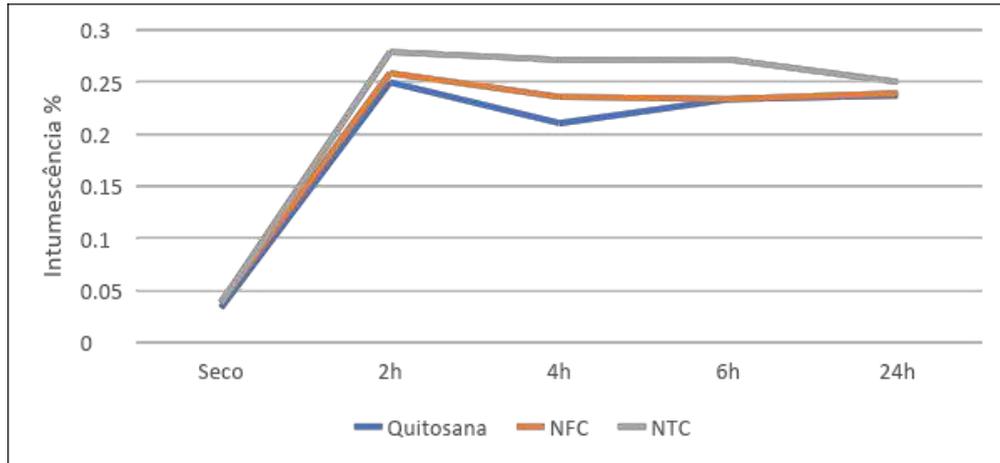
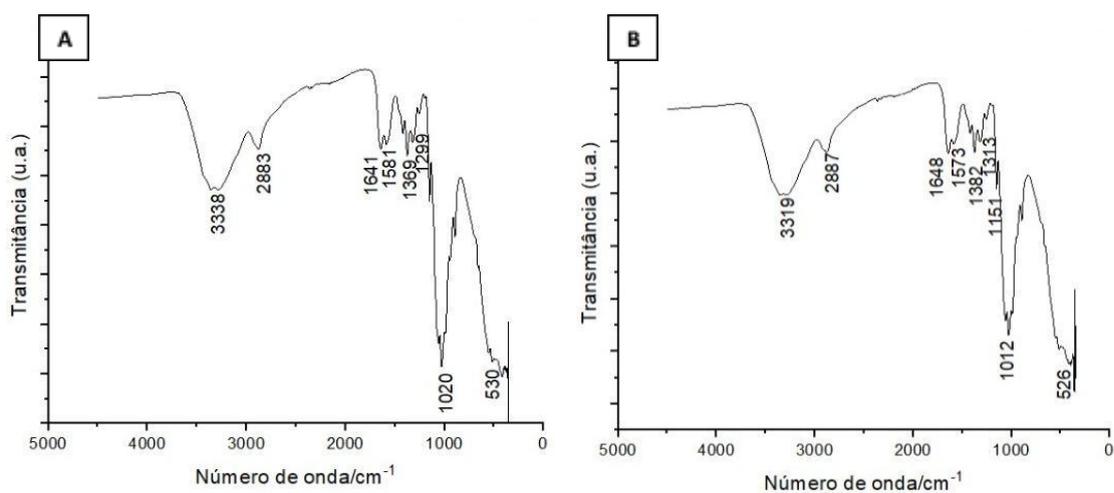


Figura 9: Percentual de intumescimento dos filmes de quitosana e dos nanobiocompósitos reforçados com nanofibras de celulose (NFC) ou com nanotubos de carbono (NTC) em solução salina tamponada com fosfato (PBS 1X) em relação ao tempo.

5.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Nas figuras 10 (A), (B) e (C) temos a representação da absorção do infravermelho nos filmes formados por quitosana pura, nanobiocompósito reforçado com NFC ou NTC respectivamente. Os gráficos se mostraram semelhantes em relação as suas regiões de absorção.



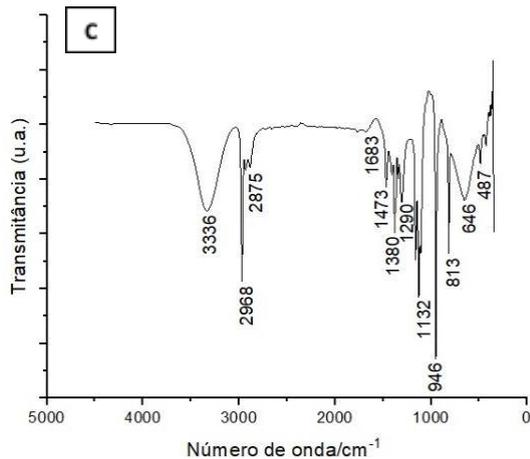


Figura 10: Caracterização dos filmes de quitosana pura (A), nanobiocompósito reforçado com NFC (B) e nanobiocompósito reforçado com NTC (C) utilizando espectroscopia de espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier (FTIR). Valores de transmitância entre 3600 e 3200 representam pontos de ligações entre oxigênio e hidrogênio (O-H); os valores de transmitância de 2883, 2887, 2968 e 2875 estão relacionados às ligações entre carbono e hidrogênio (C-H). Os valores de transmitância de 1641, 1648 e 1683 estão associados às ligações entre carbono e oxigênio (C-O) enquanto as transmitâncias 1881 e 1573 representam ligações de NH_2 e 1473 ligações de CH_2 . Os valores de transmitância entre 1300 e 1000 encontram-se ligações entre carbono-carbono (CC), carbono e oxigênio (C-O) e enxofre e oxigênio (SO). O valor de transmitância de 946 representa ligações de carbono e hidrogênio.

5.4 AVALIAÇÃO DO ÂNGULO DE CONTATO

A figura 11 mostra o gráfico que compara os resultados do ângulo de contato entre os tratamentos e a gota de água nos filmes de quitosana pura (B), nanobiocompósito reforçado com NFC (C) e nanobiocompósito reforçado com NTC (D). Tanto o filme composto apenas com quitosana quanto os filmes nanobiocompósitos apresentaram ângulo menor que 90° .

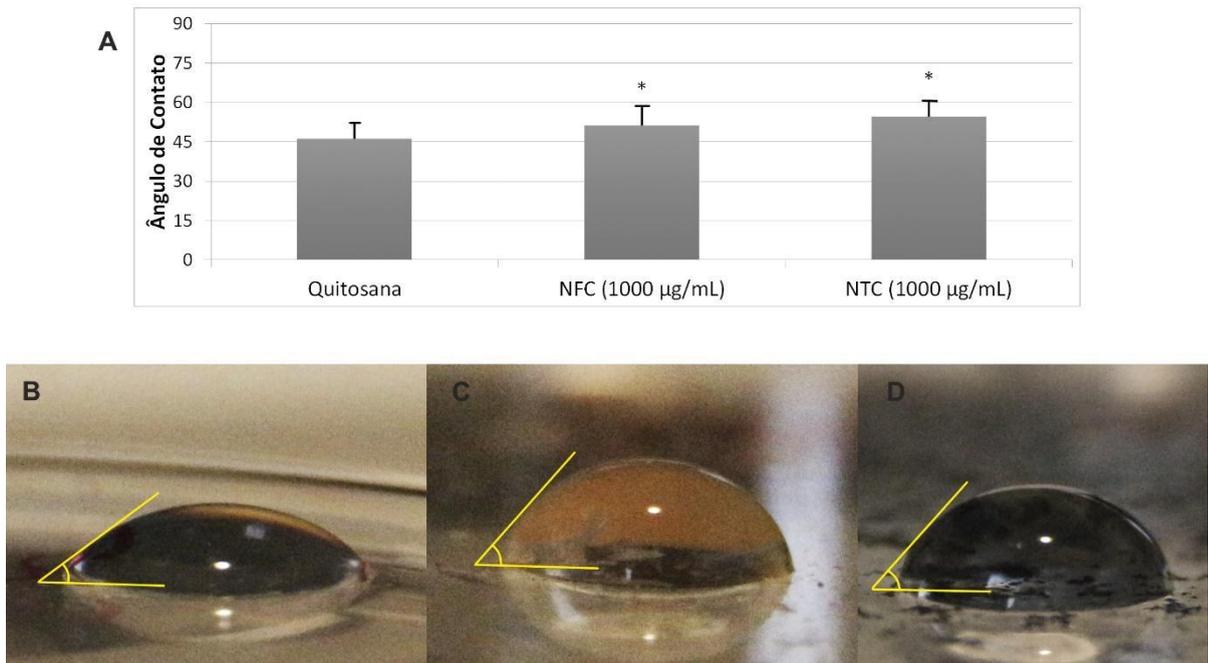


Figura 11: (A) Representação gráfica do ângulo de contato dos filmes de quitosana e nanobiocompósito reforçados com nanofibra de celulose (NFC) e nanotubo de carbono (NTC). (*) representa diferença significativa entre os grupos. Ângulo de contato pela gota de água no filme de quitosana (B), nanobiocompósito reforçado com nanofibra de celulose (NFC) (C) e nanobiocompósito reforçado com nanotubo de carbono (NTC) (D).

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023

5.5 CRESCIMENTO E MORFOLOGIA CELULAR

Nas figuras 12, 13 e 14 foi possível observar uma mudança de morfologia das células nos tratamentos de filme quitosana e nanobiocompósito reforçado com NFC quando comparado ao grupo controle. Tais grupos deixaram de apresentar células em formato fibroblastóides e essas células passaram a apresentar um formato mais arredondado. O nanobiocompósito reforçado com NTC não apresentou alteração em sua morfologia. Quando foi analisada a área celular, o nanobiocompósito reforçado com NFC induziu uma redução da área das células ($P < 0,05$) nos tempos de 24, 48 e 72h (Tabela 2), enquanto no nanobiocompósito reforçado com NTC, houve alteração apenas nos tempos de 24 e 72h ($P < 0,05$). No tempo de 48h o nanobiocompósito

reforçado com NTC não apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo controle ($P>0,05$, Tabela 2).

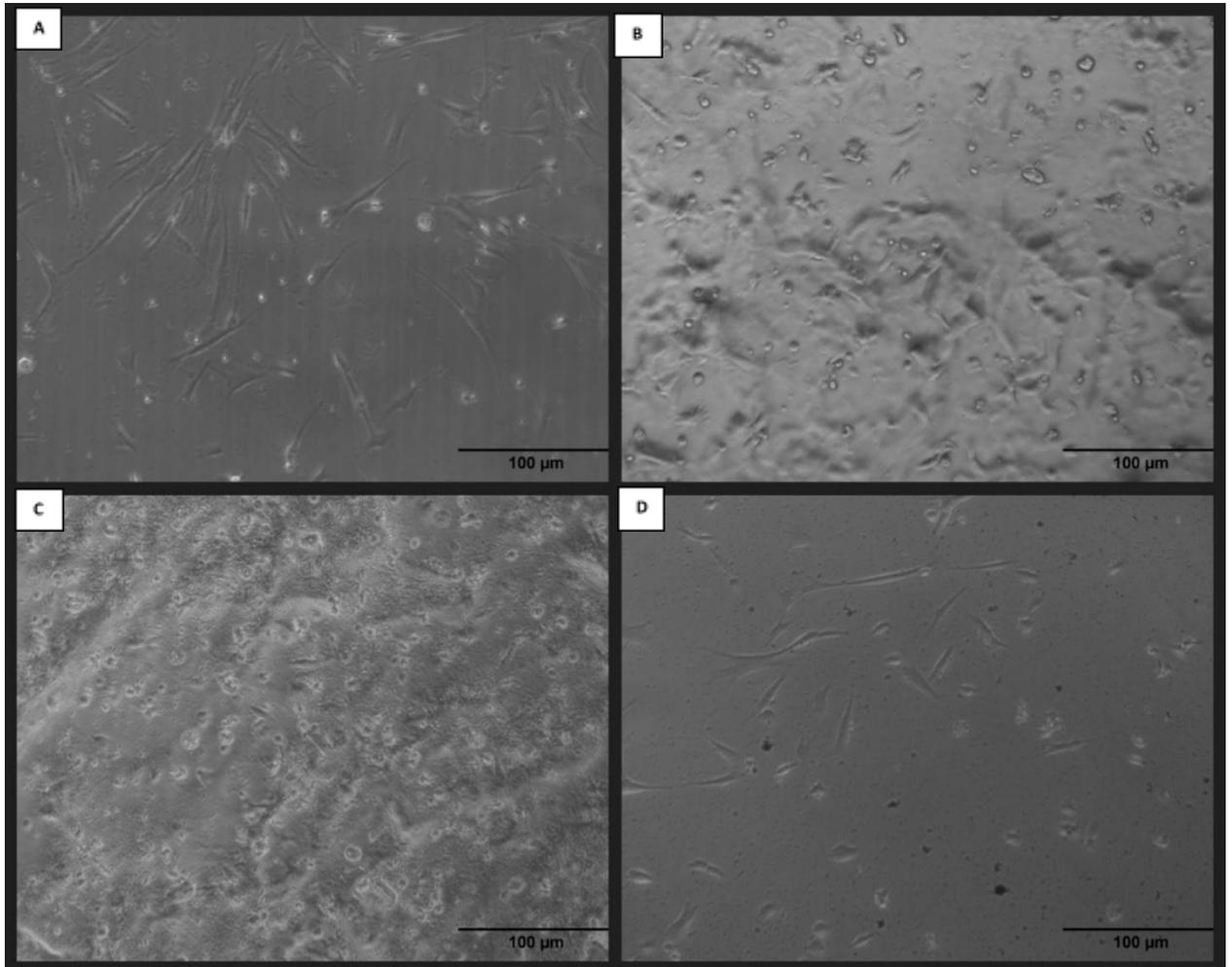


Figura 12: Morfologia celular por microscopia de luz invertida das células-tronco da polpa de dentes decíduos esfoliados (SHED). As imagens foram capturadas usando a objetiva de 10X nos tratamentos controle – placa de poliestireno (A), filme de quitosana (B), nanobiocompósito contendo nanofibras de celulose (NFC) (C) ou nanotubos de carbono (NTC) (D) em função do tempo de 24h de exposição. Barra de escala: 100µm.

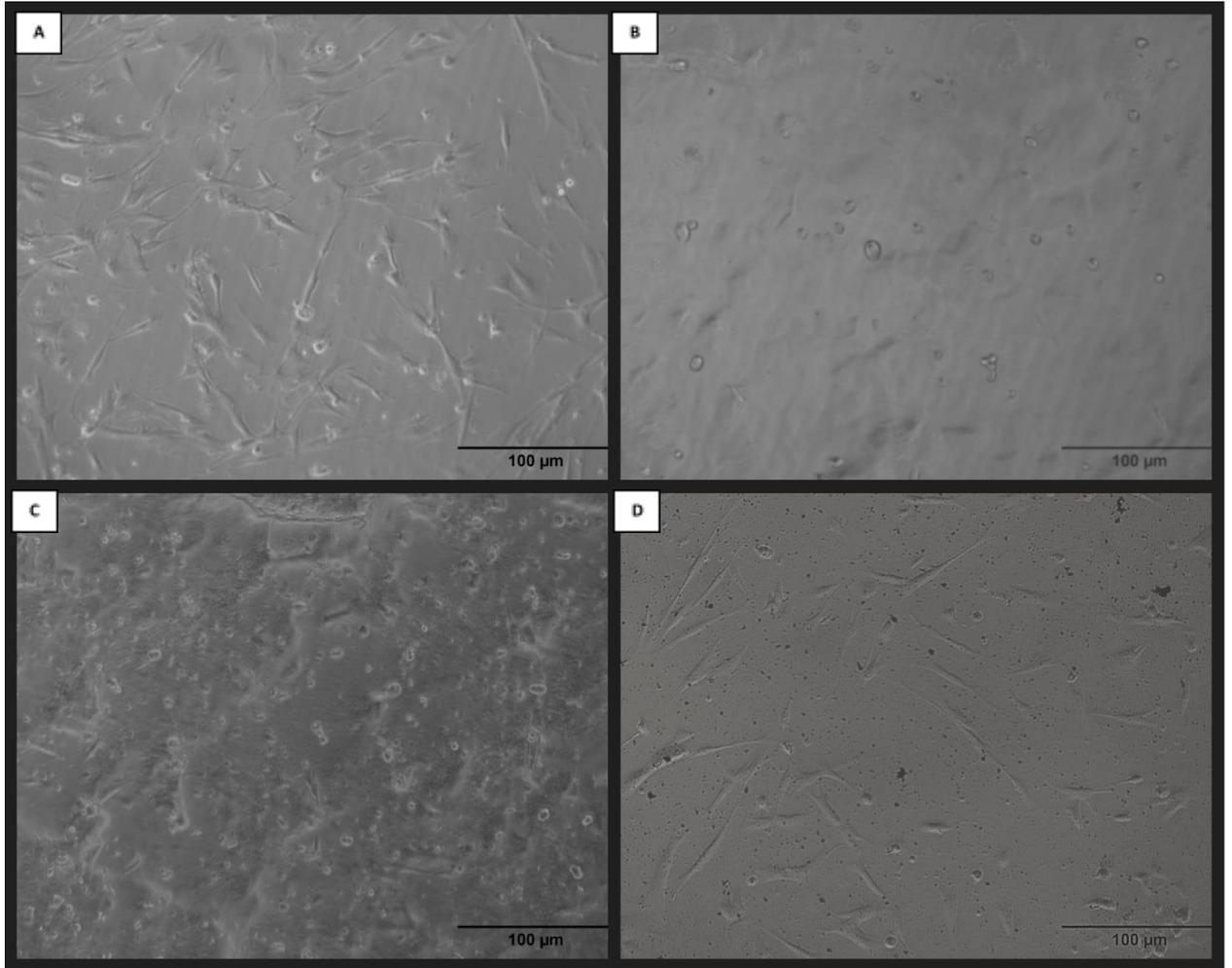


Figura 13: Morfologia celular por microscopia de luz invertida das células-tronco da polpa de dentes decíduos esfoliados (SHED). As imagens foram capturadas usando a objetiva de 10X nos tratamentos controle – placa de poliestireno (A), filme de quitosana (B), nanobiocompósito contendo nanofibras de celulose (NFC) (C) ou nanotubos de carbono (NTC) (D) em função do tempo de 48h de exposição. Barra de escala: 100μm.

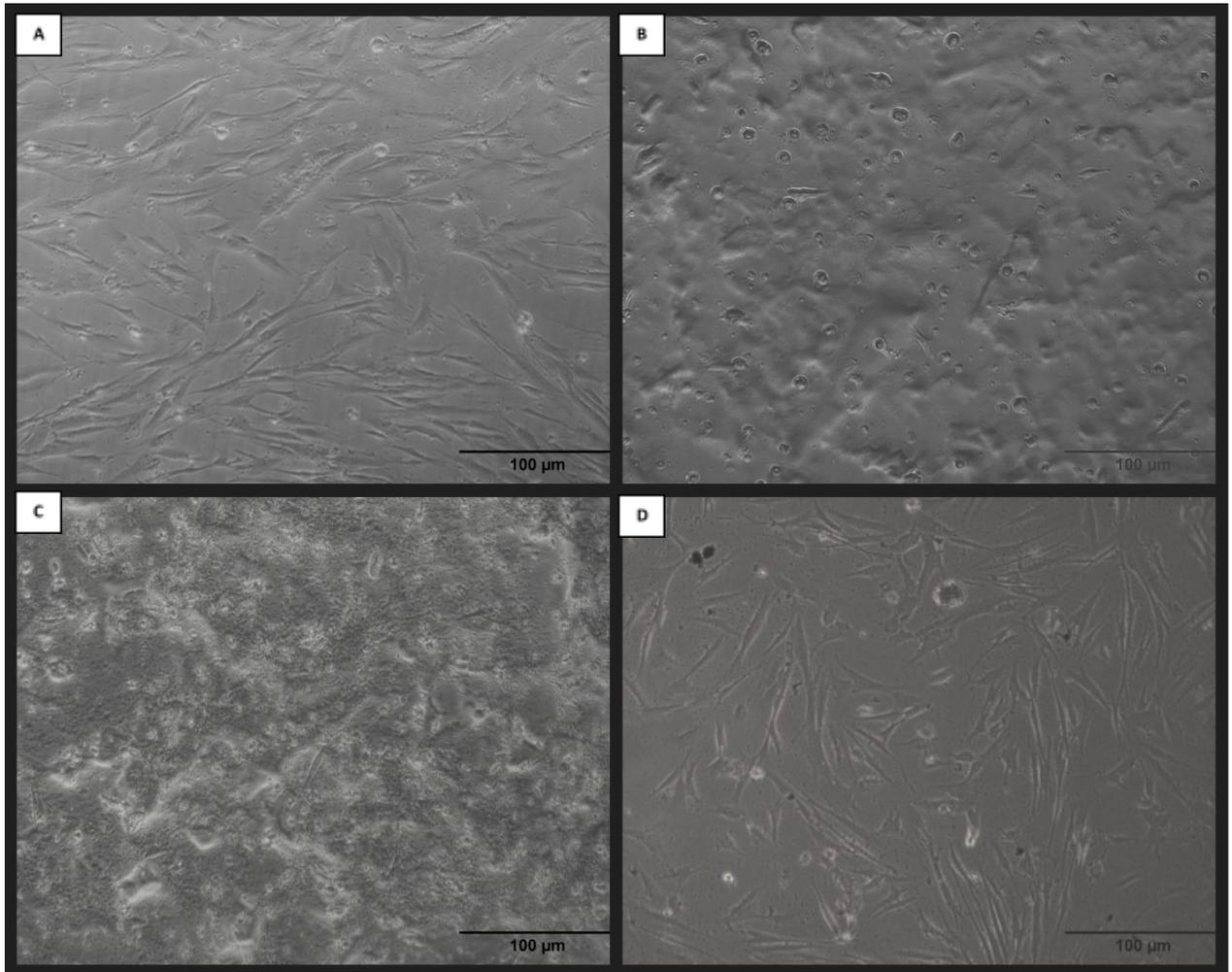


Figura 14: Morfologia celular por microscopia de luz invertida das células-tronco da polpa de dentes decíduos esfoliados (SHED). As imagens foram capturadas usando a objetiva de 10X nos tratamentos controle – placa de poliestireno (A), filme de quitosana (B), nanobiocompósito contendo nanofibras de celulose (NFC) (C) ou nanotubos de carbono (NTC) (D) em função do tempo de 72h de exposição. Barra de escala: 100µm.

Os dados de microscopia de luz sugerem uma mudança de morfologia das células cultivadas nos filmes de quitosana e no nanobiocompósito reforçado com NFC quando comparado ao controle. As células cultivadas nos nanobiocompósitos reforçados com NTC não apresentaram alteração em sua morfologia. Quando a área celular foi analisada (Tabela 2), o nanobiocompósito reforçado com NFC promoveu uma redução da área das células ($P < 0,05$) nos tempos de 24, 48 e 72h, enquanto o nanobiocompósito reforçado com NTC, apenas nos tempos de 24 e 72h foi observada alteração ($P < 0,05$). No tempo de 48h o nanobiocompósito reforçado com

NTC não apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo controle ($P>0,05$).

Tabela 2: Média obtida da área celular em μm^2 das células-tronco provenientes da polpa de dentes decíduos esfoliados (SHED) obtidas por microscopia de luz invertida nos tempos de 24, 48 e 72h de cultivo in vitro nos diferentes grupos experimentais.

	24 h	48 h	72 h
Controle	238,566 μm^2 ^a	232,621 μm^2 ^a	288,172 μm^2 ^a
Filme de Quitosana	204,083 μm^2 ^{ab}	120,376 μm^2 ^b	172,524 μm^2 ^b
Nanobiocompósito contendo NFC	123,738 μm^2 ^c	131,118 μm^2 ^{bc}	129,571 μm^2 ^c
Nanobiocompósito contendo NTC	188,931 μm^2 ^{bd}	199,399 μm^2 ^a	247,363 μm^2 ^d

Grupos experimentais: Controle, Filme de quitosana, Nanobiocompósito contendo nanofibras de celulose (NFC) e Nanobiocompósito contendo nanotubos de carbono (NTC). As células foram avaliadas utilizando o programa ImageJ. As médias semelhantes são representadas por letras iguais.

5.6 VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE EXCLUSÃO DO TRYPAN BLUE

A viabilidade celular, demonstrada na figura 15 é dada em função do número de células vivas sobre o número total de células. Os resultados mostram que não houve diferença significativa entre os nanobiocompósitos e o grupo controle após exposição das células nos três tempos analisados ($P>0,05$). O filme formado apenas por quitosana foi significativamente diferente nos tempos de 24 e 48h ($P<0,05$).

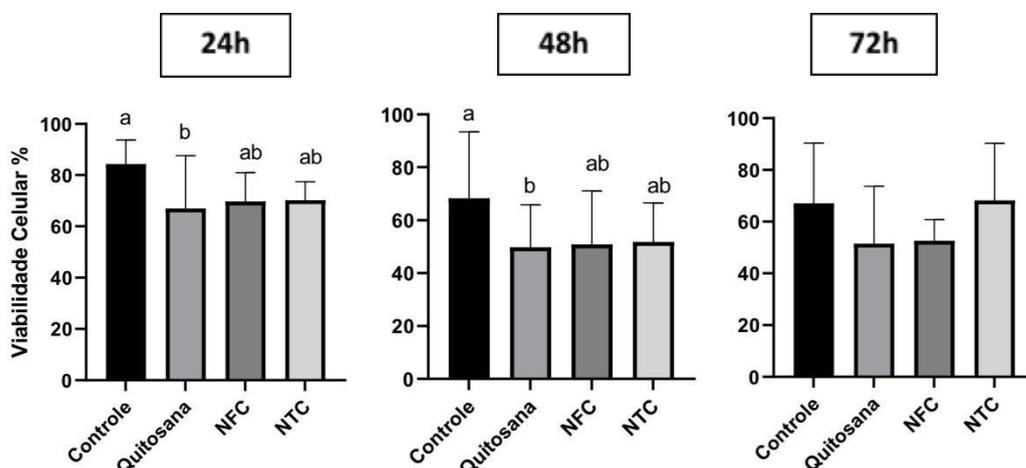


Figura 15 - Viabilidade das células-tronco extraídas da polpa de dentes decíduos esfoliados (SHED) pelo ensaio de Azul de Tripán expostas aos filmes de quitosana, nanobiocompósitos reforçados com nanofibra de celulose (NFC), nanotubo de carbono (NTC) (1000 µg/mL) e grupo controle (placa de poliestireno) em função dos tempos de 24, 48 e 72 horas. Não foi apresentada diferença significativa entre os nanobiocompósitos e o grupo controle nos três tempos avaliados ($P>0,05$). Apenas os filmes de quitosana divergiram em relação ao grupo controle nos tempos de 24 e 48h ($P<0,05$). Letras iguais indicam médias que não diferiram entre si. Resultados expressos como média \pm erro padrão da média.

5.7 AVALIAÇÃO DO METABOLISMO MITOCONDRIAL PELO MÉTODO DE ALAMAR BLUE

Os resultados da figura 16, que são medidos pelo nível de fluorescência mostram que o nanobiocompósito reforçado com NFC apresentou diferença significativa em relação aos demais grupos nos três tempos avaliados ($P>0,05$). O nanobiocompósito reforçado com NTC e filme composto por quitosana apresentaram diferença significativa em relação aos demais grupos apenas no tempo de 72h ($P>0,05$), mantendo-se semelhantes ao grupo controle nos tempos de 24 e 48h ($P<0,05$).

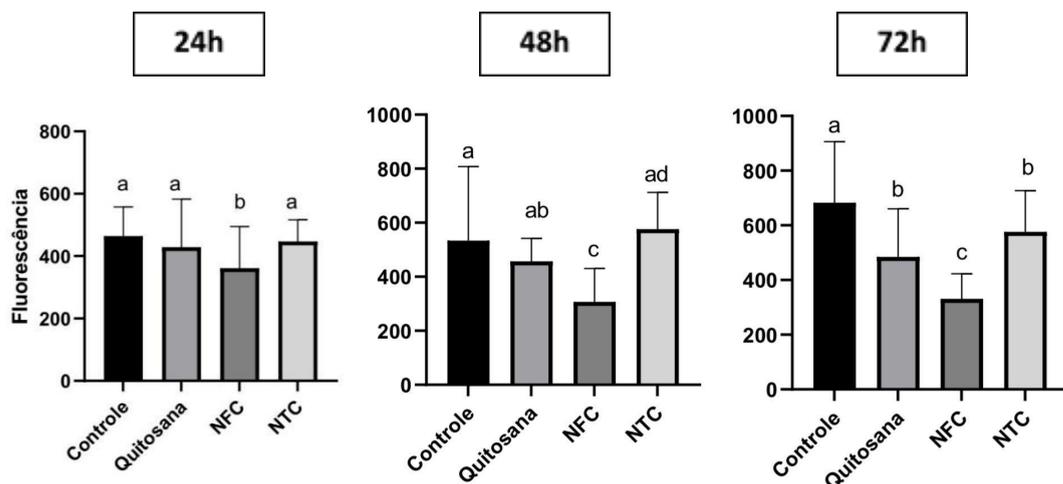


Figura 16 – Avaliação do metabolismo mitocondrial das células-tronco extraídas da polpa de dentes decíduos exfoliados (SHED) expostas ao filme de quitosana, nanobiocompósito reforçado com nanofibra de celulose (NFC), nanotubo de carbono (NTC) (1000 µg/mL) e grupo controle (placa de poliestireno) em função dos tempos de 24, 48 e 72 horas pelo ensaio de Alamar Blue. Observou-se diferença significativa entre o nanobiocompósito reforçado com NFC e demais grupos nos três tempos ($P<0,05$). O nanobiocompósito reforçado com NTC e filme de quitosana não apresentaram diferença significativa nos tempos de 24 e 48h ($P>0,05$).

porém apresentaram no tempo de 72h ($P < 0,05$). Letras iguais indicam médias que não diferiram entre si. Resultados expressos como média \pm erro padrão da média.

5.8 METABOLISMO MITOCONDRIAL AVALIADO PELO ENSAIO DE MTT

Os dados da figura 17 revelaram que nos três tempos o nanobiocompósito de NFC mostrou-se diferente quando comparado ao grupo controle e quitosana ($P < 0,05$) mas semelhante ao nanobiocompósito de NTC no tempo de 24h ($P > 0,05$). O nanobiocompósito reforçado com NTC não apresentou nenhuma diferença significativa em relação ao controle (24h) e controle e quitosana (48h) ($P > 0,05$), mostrando-se diferente significativamente do controle no tempo de 72h ($P < 0,05$).

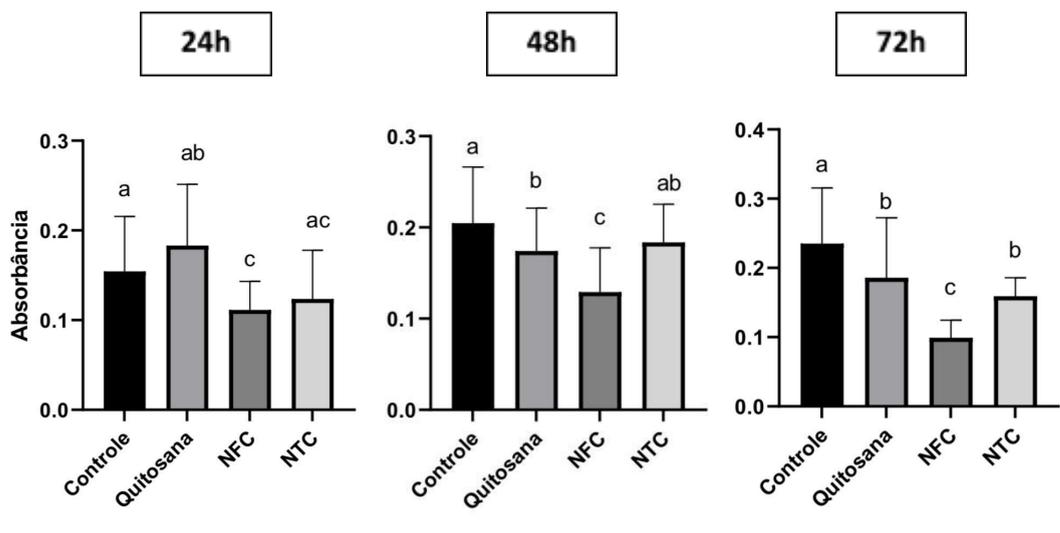


Figura 17 – Avaliação do metabolismo mitocondrial das células-tronco extraídas da polpa de dentes decíduos exfoliados (SHED) pelo ensaio de MTT expostas aos filmes de quitosana, nanobiocompósito reforçado com nanofibra de celulose (NFC), nanotubo de carbono (NTC) (1000 $\mu\text{g/mL}$) e grupo controle (placa de poliestireno) em função dos tempos de 24, 48 e 72 horas. Foi observada diferença significativa em relação ao nanobiocompósito reforçado com NFC com grupos controle e quitosana nos três tempos avaliados ($P < 0,05$) mas semelhança ao nanobiocompósito reforçado com NTC no tempo de 24h ($P > 0,05$). O nanobiocompósito reforçado com NTC se mostrou semelhante aos grupos controle (24h) e controle e quitosana (48h) ($P > 0,05$) mas com diferença significativa no tempo de 72h ($P < 0,05$). Letras iguais indicam médias que não diferiram entre si. Resultados expressos como média \pm erro padrão da média.

6 DISCUSSÃO

Os polímeros formados por quitosana são bastante visados na biotecnologia, uma vez que esses materiais são encontrados facilmente na natureza, além de possuírem propriedades atrativas para seu uso. Apesar disso, esses polímeros não apresentam características tão vantajosas quando estão sozinhos em relação a alguns usos (*scaffolds*), sendo necessário a adição de outros compostos com a capacidade de se reforçar essas matrizes (JUNIOR et al., 2021; PEREK & FERRARI 2019). O uso de nanomateriais vem cada vez mais crescendo e uma de suas utilizações é na engenharia tecidual. Dentre as diversas vantagens que eles podem ter, destacamos a capacidade que os nanomateriais tem de aprimorar quanto as propriedades mecânicas, ópticas, físico-químicas de um material, favorecendo assim a criação de nanomaterial biocompósito com diversas áreas de aplicações (AMARAL et al., 2020; SOUZA, 2021). Especificamente, a incorporação de nanomateriais para a engenharia de tecidos e seu uso na terapia regenerativa tem como principais funções proporcionar rigidez, flexibilidade, permeabilidade, promover uma estrutura tridimensional bem como ser capaz de simular as estruturas da matriz extra-celular (SANTOS, 2019; PEREK & FERRARI 2019). Nos ensaios de microscopia 3D (Figura 8) é possível observar a topografia dos filmes de quitosana pura, nanobiocompósito reforçado com NFC e nanobiocompósito reforçado com NTC (A, B e C respectivamente). A figura mostra a diferença superficial de cada um dos filmes, onde é possível observar que o filme composto apenas por quitosana possui menor estruturação quando comparado com os filmes nanobiocompósitos, o que se relaciona com alteração da topografia e a capacidade de adesão celular.

Os filmes de quitosana puro e nanobiocompósitos reforçados com NFC/NTC demonstraram um aumento de forma equilibrada em seu peso ao serem submetidos ao ensaio de intumescimento (Figura 9). Os valores de peso seco e úmido ao longo do tempo avaliado não mostraram diferença entre os grupos. As propriedades de intumescimento/solubilidade estão relacionadas a capacidade que o composto tem de absorção de água. O líquido é capaz de fluir por entre as fibras. A característica hidrofílica dos nanobiocompósitos tende a se assemelhar às mesmas características

encontradas na matriz extracelular, capazes de propiciar às células uma boa interatividade e crescimento (AMBROSIO et al., 2022; SOUZA & OLIVEIRA, 2019).

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é a técnica utilizada nas pesquisas com finalidade de se obter as interações químicas das matrizes analisadas, formadas por compostos covalentes, orgânicos ou inorgânicos, sendo considerada a “impressão digital química” de um composto. Os elementos no qual compõem essas matrizes, entram em um estágio de agitação/excitação e aumento de energia após a absorção do infravermelho (COSTA, 2021). A Figura 10 mostra a representação dos filmes analisados pelo infravermelho (A, B e C respectivamente: quitosana, nanobiocompósito reforçado com NFC e NTC). É possível observar uma semelhança entre os filmes de quitosana e nanobiocompósito reforçado com NCF. Nos três filmes, são observadas bandas de pico forte com espectro de 3319, 3338 e 3336 cm^{-1} (quitosana, nanobiocompósito reforçado com NFC e NTC respectivamente) que podemos atribuir às vibrações de OH, estando relacionadas às ligações intramoleculares dos hidrogênios, contidos nas moléculas de água presentes na superfície dos filmes, como resultado da associação entre os polímeros. Tais bandas tendem a serem mais intensas de acordo com a concentração dos grupos funcionais (ZANETE, 2019; HARDIANSYAH et al., 2022). As bandas nas regiões entre 2883, 2887, 2968 e 2875 cm^{-1} (quitosana, nanobiocompósito reforçado com NFC e as duas últimas com NTC respectivamente) se referem a presença de ligações de CH alifáticos, podendo ser também com ligações de CH_2 e CH_3 (ABID et al., 2016). Esses picos formados por ligações que contém carbono e hidrogênio nos filmes nanobiocompósitos reforçados com NFC são referentes a presença dos elementos que compõem a celulose. As ligações de CO são encontradas nas bandas 1641, 1648 e 1683 cm^{-1} , representando um grupo amida não substituídas. Nas bandas localizadas nas regiões de 1581 e 1573 (quitosana e nanobiocompósito reforçado com NFC respectivamente) encontramos a presença de NH_2 , que está ligado a deformações do plano (KODOTH, et al., 2019; KUMARI et al., 2021). Na banda 1473 cm^{-1} (nanobiocompósito reforçado com NTC) tem-se a presença do grupo CH_2 de uma deformação angular. Nas bandas entre 1300 a 1000 cm^{-1} encontramos ligações formadas por carbono e oxigênio (CO), carbono e carbono (CC) bem como SO representado pela presença de sulfato nos filmes, enquanto que a banda 946 cm^{-1} (nanobiocompósito reforçado com NTC) tem

sua formação por ligações de carbono e hidrogênio (C-H) (ZANETTE, 2019; ABID et al., 2016; MOREIRA et al., 2017). Os picos de ligações de carbono-carbono representam a presença direta dos nanobiocompósitos reforçados com NTC, sendo a formação desses nanomateriais composta por esses elementos.

Também foi realizado o teste de ângulo de contato onde os filmes apresentaram ângulo de 46°, 51° e 54° (quitosana, nanobiocompósito reforçado com nanofibra de celulose e nanobiocompósito reforçado com nanotubo de carbono respectivamente). O filme formado apenas por quitosana apresentou um ângulo menor do que os filmes nanobiocompósitos, mostrando que a inclusão dos nanomateriais de certa forma influenciou no aumento do ângulo de contato na matriz polimérica, contudo, os filmes nanobiocompósitos ainda são considerados hidrofílicos, pois apresentaram ângulo menor que 90° (Figura 11). A condição de molhabilidade depende das características e composição de cada material. O fator hidrofóbico condiz com superfícies capazes de manter a integridade de determinados compostos, estando relacionado com a tensão existente sobre essa superfície. Ao contrário, o comportamento hidrofílico dos nanobiocompósitos relaciona-se a disposição dos átomos que compõem esses filmes. A água é capaz de reagir com os materiais da superfície, permeando esses materiais. Essa condição hidrofílica é a mesma que possibilita que os organismos biológicos realizem interações, trocas e funções importantes (SOUZA et al., 2021; GARRIDO et al., 2021; DAYANE & WILLIAM, 2017).

Neste estudo, as células SHED apresentaram características morfológicas semelhante a células fibroblastóides quando observamos o grupo controle. Essas características já foram observadas em trabalhos anteriores. Vu et al (2022) descreve em seu trabalho as células SHED como células com características fusiforme e aparência típica de fibroblastos. Quando avaliamos a morfologia dessas células após exposição aos filmes nanobiocompósitos, é possível observar que, as células expostas aos filmes reforçados com NFC apresentaram em parte, uma mudança em suas características quanto ao seu formato nos três tempos avaliados (Figuras 12C, 13C e 14C). Sugere-se que essas mudanças estejam relacionadas ao processo de diferenciação das células induzido pelos filmes formados com NFC. Além da alteração morfológica, as células cultivadas nesses filmes nanobiocompósitos também apresentaram uma redução em sua área (Tabela 2). Em

trabalhos realizados anteriormente, Zanette (2019) ao expor células SHED aos filmes nanobiocompósitos reforçados com NFC, não observou alterações nessas células, embora seus ensaios tenham sido baseados em concentrações menores de NFC (0,1; 10; 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$). As alterações também puderam ser observadas nas células cultivadas nos filmes compostos apenas por quitosana.

Ao analisar as células cultivadas nos filmes nanobiocompósitos reforçados com NTC, não foram observadas nenhuma modificação quanto a sua morfologia, permanecendo as mesmas com as características fibroblastóides, formato fusado, semelhante às células do grupo controle (Figuras 12D, 13D e 14D). A área das células cultivadas nesses filmes nanobiocompósitos quando analisada nos tempos de 24 e 72h apresentou redução quando comparado com o grupo controle, no entanto, no tempo de 48h elas não apresentaram essa redução (Tabela 2). Resultados semelhantes podem ser observados no trabalho desenvolvido por Oliveira et al. (2022) ao expor células-tronco mesenquimais aos nanotubos de carbono.

Os resultados do ensaio de Azul de Tripán mostraram que o filme nanobiocompósito reforçado com NFC e com NTC não apresentaram diferença significativa quanto a viabilidade das células em sua integridade de membrana nos três tempos avaliados (Figura 15). Na literatura não encontramos resultados apresentados referente aos mesmos nanobiocompósitos e concentrações, sendo este trabalho pioneiro nessa investigação. Silva (2023) realizou experimentos com um nanomaterial formado por nanotubos de carbono e nanopartículas de TiO_2 e, em seu ensaio com Azul de Tripán não foram observados efeitos citotóxicos nas células nas concentrações e tempos avaliados. Lopes (2021) também utilizou o ensaio de Azul de Tripán a fim de se avaliar os efeitos citotóxicos de nanopartículas metálicas. Seus resultados mostram que a exposição das células utilizadas à essas nanopartículas não comprometeu a viabilidade celular, indicando que esses materiais não danificaram a membrana dessas células.

Apesar dos resultados apresentados, outros ensaios se tornam necessários para se avaliar a citotoxicidade dos nanobiocompósitos. O ensaio de Alamar Blue tem por finalidade a avaliação da citotoxicidade por meio da atividade mitocondrial das células por oxiredução. Por meio das reações anabólicas, o corante funciona

como receptor de elétrons na cadeia de transporte (LEÃO, 2021). A Figura 16 mostra que as células expostas aos filmes nanobiocompósitos reforçados com NFC apresentaram diferença estatística quando comparadas às células do grupo controle nos três tempos avaliados. Quando observado os nanobiocompósitos reforçados com NTC, essa diferença foi observada apenas no tempo de 72 horas. Gouveia (2019) observou que, após a exposição de células em nanocompósitos formados por hidroxiapatita reforçados com nanotubo de carbono houve uma diminuição da viabilidade celular quando cultivadas nos tempos de 7 e 14 dias (resultados expressos comparado ao grupo controle). Apesar disso, foi concluído que os nanocompósitos não apresentaram efeitos citotóxicos às células uma vez que não foi observada uma redução significativa no número de células vivas expostas a esses nanomateriais. Também, Evangelista (2021) utilizou nanopartículas poliméricas e avaliou os efeitos citotóxicos que esses materiais podem exercer sobre as células. Em seu trabalho, os resultados mostraram que a exposição das células a esses nanomateriais não foi afetada em sua viabilidade após serem submetidas ao ensaio de Alamar Blue, mostrando-se biocompatíveis. Hardiansyah et al (2022) produziu nanofolhas magnéticas de grafeno com biopolímeros para utilização em ensaios de terapia celular. Nesses ensaios, os filmes produzidos se mostraram citocompatíveis com as células utilizadas e os testes realizados com Alamar Blue demonstraram que tais filmes não induziram efeitos citotóxicos em determinadas concentrações.

Além do ensaio de Alamar Blue, também foram realizados ensaios de MTT. Esse ensaio também tem por finalidade avaliar a viabilidade celular por meio da atividade mitocondrial. Nesse teste, ocorre a desidrogenase mitocondrial, como resultado das reações catabólicas (NADH em NAD^+) (SILVA et al., 2021; SILVA et al., 2021). Nossos resultados mostram que os nanobiocompósitos reforçados com NFC (Figura 17) apresentaram diferença estatística nos três tempos analisados em relação ao grupo controle. Quando analisamos os nanobiocompósitos reforçados com NTC, essa diferença não foi evidenciada nos tempos de 24 e 48h, sendo esse resultado semelhante ao grupo controle, mas sim em 72h. Júnior (2021) realizou ensaios de citotoxicidade em filmes nanocompósitos de quitosana e nanopartículas de prata. Em seu experimento, células fibroblastos não perderam a viabilidade e os filmes não apresentaram efeitos negativos sobre elas. Valente (2019) também

realizou testes com nanocompósitos poliméricos para utilização na engenharia tecidual. Nesses ensaios, foram avaliados diferentes compostos junto aos polímeros e os resultados mostram que a adição de óxido de grafeno reduzido (OGR) melhorou significativamente as propriedades desses polímeros. Foi realizado o ensaio de MTT e foi observado que esses nanocompósitos mantiveram a viabilidade das células quando comparado ao seu grupo controle. Cadete (2022) produziu nanomateriais de celulose e avaliou o efeito citotóxico que esses filmes poderiam proporcionar às células experimentais. Foi realizado o ensaio de MTT em diferentes concentrações. Ao fim dos ensaios, foi observada uma diminuição da viabilidade celular quando se compara as maiores concentrações com o controle negativo. Apesar disso, o autor conclui em seus estudos que os filmes não apresentaram efeitos citotóxicos sobre as células, isso porque para que os filmes sejam considerados citotóxicos, é necessário que a viabilidade seja menor do que 70%, o que não ocorre no experimento.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O nanobiocompósito reforçado com NFC induziu alterações no metabolismo mitocondrial e redução da área celular. No entanto, o nanobiocompósito reforçado com NTC não impactou o metabolismo mitocondrial em 24 e 48h. Além disso, os nanobiocompósitos reforçados com NFC e NTC mantiveram a viabilidade das células SHED nos três tempos avaliados. Assim, nossos resultados sugerem que esses nanobiocompósitos são promissores para aplicações na engenharia de tecidos ósseos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL-HACK, M. E. et al. **Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan and its derivatives and their applications: A review.** International Journal of Biological Macromolecules, 164, p. 2726-2744, 2020

ALMEIDA, R.S. et al. **Produção, caracterização e avaliação *in vitro* de partículas de quitosana e hidroxiapatita para substituição óssea.** Articles • Cerâmica v.65, n.376 • Oct-Dec 2019

ALMEIDA, V. B. de. **Células-tronco mesenquimais.** Academia de Ciências e Tecnologia de São José do Rio Preto, 2019

ALVES, S., et al. **O uso terapêutico de células-tronco.** Revista Saúde em Foco, n.11, 2019

AMARAL, D. L. A. S. do et al. **Induction of osteogenic differentiation by demineralized and decellularized bovine extracellular matrix derived hydrogels associated with barium titanate.** Biologicals, 2020

AMBROSI, J. A. R. et al. **Estudo do efeito da concentração de gelatina na morfologia e no grau de intumescimento do hidrogel.** Revista Processos Químicos, 2022

ANTUNES, J. B. **Materiais capazes de transportar e libertar colagenase para o tratamento de lesões cutâneas: síntese e caracterização.** 2019

ANTUNES, L. B., et al. **Efeito do glicerol nas propriedades mecânicas de filmes a base de quitosana.** Revista Desafios, v.6, Especial, 2019

ARAÚJO, A. C. G. de., et al. **Células-tronco derivadas da polpa dentária – Diferenciação, Proliferação e mediadores químicos envolvidos: Uma revisão de literatura.** Salusvita, Bauru, v.39, n.2, p.435-458, 2020.

ARAÚJO, B. A., et al. **A aplicação de polímeros biodegradáveis como uma alternativa sustentável.** Research, Society and Development, v.10, n.9, e49010918248, 2021

ASCOM. **Para ministro, investimento em nanotecnologia pode acelerar desenvolvimento econômico.** Ministério da ciência, Tecnologia e Inovação, 2018

BARBOSA, T. V. et al. **Fabrication, morphological, mechanical and biological performance of 3D printed poly (--caprolactone)/ bioglass composite scaffolds for bone tissue engineering applications.** BIOMEDICAL MATERIALS (BMM), v. 17, 2022.

BALDERRAMA, Í. de F., et al. **Clinical applicability of undifferentiated mesenchymal stem cells from adipose tissue for bone regeneration surgeries**

of the atrophic maxilla and mandible. Research, Society and Development, v.10, n.6, e48810616023, 2021

BAVARESCO, C. S., et al. Efeito de células-tronco mesenquimais na regeneração das estruturas associadas à articulação temporomandibular: revisão narrativa. ARTIGO DE REVISÃO • BrJP v.3, n.3 • Jul-Set 2020

BENOV, L. Effect of growth media on the MTT colorimetric assay in bacteria. 2019

BERGER, C. de S. et al. O ensino da nanotecnologia via metodologias ativas: nanociência por meio de uma abordagem colaborativa. Repositório Institucional. 2020

BORDINI E. A. F. et al. Chitosan in association with osteogenic factors as a cell-homing platform for dentin regeneration: Analysis in a pulp-in-a-chip model. DENTAL MATERIALS, v.38, p.655-669, 2022.

BORTZ, G., et al. Construção das terapias com células-tronco na Argentina: regulação, gestão de risco e políticas de inovação. DOSSIER • Sociologias v.21, n.50 • Abr., 2019

CARDOSO, K. M. M. C. et al. Phenotype and synthesis activity of joint chondrocytes extracted from newborn rats with prenatal ethanol exposure. HUMAN & EXPERIMENTAL TOXICOLOGY, 2021.

CARDOSO, C. R. G. da S, et al. Desenvolvimento de pastas de fosfato de cálcio para regeneração óssea. 2020

CARDOSO P. M. M. et al. A influência do envelhecimento osteoarticular na qualidade de vida dos idosos. Revista Eletrônica Acervo Saúde, v.15, 2022

CARVALHO, B. T. de., et al. Pesquisa com células-tronco embrionárias: implicações bioéticas. Brazilian Journal of Development, Curitiba, v.7, n.8, p.84244, Ago., 2021

COSTA, A. S. da. Et al. Produção e caracterização de biomateriais de celulose bacteriana e queratina para aplicação em engenharia de tecidos. 2020

COSTA, M. et al. Elaboração e caracterização de filmes biodegradáveis de amido de taro (*Colocasia Esculenta* (L). Schott) e amido de milho (*Zea mays*). 2019

COSTA, R. O. de A. et al. Caracterização físico-química de inibidor de tripsina isolado de sementes de tamarindo (*Tamarindus indica* L.)

Nanoencapsulado em proteína do leite isolada. Brazilian Journal of Health Review, v. 2, p. 3026-3031, 2019.

COSTA, W. R. da; DAL BÓ, J. C. **Regeneração óssea guiada utilizando barreira de polipropileno.** 2020

COUTO, A. L. M. R.; FREIRE, M. de S. **Células-tronco de dentes decíduos, fonte promissora de células-tronco: revisão de literatura narrativa.** Uningá Journal, v.59, 2022

DA COSTA, J. M. et al. **Characterization of Biodiesel from Animal Fat, Vegetable Oil, and Adulterants by Infrared Spectroscopy Combined with Chemometric Methods.** Energy & fuels, v. 35, p. 13801-13812, 2021.

DA SILVA, A. A. F. **The effectiveness of hydroxyapatite-beta tricalcium phosphate incorporated into stem cells from human exfoliated deciduous teeth for reconstruction of rat calvarial bone defects.** Clinical Oral Investigations, v. 25, p. 1-14, 2021.

DA SILVA, G. H. **TiO₂-MWCNT nanohybrid: Cytotoxicity, protein corona formation and cellular internalisation in RTG-2 fish cell line.** AQUATIC TOXICOLOGY, v. 257, 2023.

DAYANE T. M. A; WILLIAM M.S. **Verificação do ângulo de contato e da tensão interfacial na superfície de liga de titânio.** 14º Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Órgãos artificiais e Engenharia de tecidos, 2017

DIAS, J. A. et al. **Fomento para pesquisas de nanobiotecnologia a partir de compromisso de ajustamento de conduta e sob a ótica da biopolítica.** SCIENTIA IURIS, Londrina, v.23, n.2, p. 91-109, jul. 2019.

DE MACEDO, G. S. A., et al. **Estudo das características físico-químicas e térmicas dos materiais não biodegradáveis e biodegradáveis à base de amido de milho.** Brazilian Journal of Development, v.6, n.12, 2020.

DIAS, V. L.; PÊGO-FERNANDES, P. M. **Fatores solúveis de células-tronco mesenquimais (FS-CTM) como uma ferramenta potencial para reduzir a inflamação nos pulmões de doadores após choque hipovolêmico.** ARTIGO ORIGINAL • J. Bras. Pneumol. V.47, n.4 • 2021

EVANGELISTA, R. P. et al. **Copolymer-nanocapsules of Zinc Phenyl-thio-phthalocyanine and amphotericin-B in association for Antimicrobial Photodynamic Therapy (PDTa) applications against Candida albicans yeasts.** Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, v. 34, p. 102273, 2021.

FERREIRA, L. S. et al. **Short-term evaluation of photobiomodulation therapy on the proliferation and undifferentiated status of dental Pulp stem cells.** Lasers in Medical Science, [s.l.], v.34, n.4, p.659-666, 2019

GOUVEIA, D. M. et al. **Nanocompósitos de hidroxiapatita associado a uma fibrina derivada de veneno de serpente: análise físico-química.** In: VII Encontro de Pós-graduação - EPG, 2019, São Paulo. Anais do VII Encontro de Pós-graduação - EPG 2019. São Paulo, 2019. v. 1.

GRELA, E. et al. **Current methodology of MTT assay in bacteria.** Acta Histochemica, v.120, p.303-311, 2018

GRONTHOS, S. et al. **Stem cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells.** Journal of Dental Research, v.81, n.8, p.531-535, 2002

HARDIANSYAH, A. et al. **Magnetic Graphene-based nanosheets with pluronic F127-Chitosan biopolymers encapsulated α -Mangosteen drugs for breast cancer cells therapy.** Journal Polymers, v.14, 2022

HASNAIN, M. S.; NAYAK, A. K. **Nanocomposites for improved orthopedic and bone tissue engineering applications.** Applications of Nanocomposite Materials in Orthopedics, p.145-177, 2019

HUANG et al. **Exercise maintains bone homeostasis by promoting osteogenesis through STAT3.** Int J Biol Sci, v.19, n.7, p.2021-2033, 2023

IBGE. **População cresce, mas número de pessoas com menos de 30 anos cai 5,4% de 2012 a 2021.** Estatísticas Sociais. Julho, 2022.

JÚNIOR, A. F et al. **Biophysical properties of electrospun chitosan-grafted poly (lactic acid) nanofibrous scaffolds loaded with chondroitin sulfate and silver nanoparticles.** JOURNAL OF BIOMATERIALS APPLICATIONS, v. 36, 2021.

KODOTH, A.K. et al. **Pectin-based silver nanocomposite film for transdermal delivery of Donepezil.** International Journal of Biological Macromolecules, 2019

KUMARI S. et al. **Characterization of a novel nanocomposite film based on functionalized chitosan-Pt-Fe₃O₄ Hybrid nanoparticles.** Journals nanomaterials, v.11, 2021

LEÃO, D. P. **Desenvolvimento de hidrogel de cará-roxo (*Dioscorea trifida* L.) incorporado com açaí (*Euterpe precatória* Mart): Uma rota regional para melhoria do exercício físico.** 2021

LEVIN, G., et al. **Medicina regenerativa e engenharia de tecidos.** Genética na escola, v.14, n.1, 2019

LOPES L. C. et al. **Gold nanoparticles capped with polysaccharides extracted from pineapple gum: Evaluation of their hemocompatibility and electrochemical sensing properties.** TALANTA, v. 223, 2021.

MARTINS, R. S. et al. **Osteogênese imperfeita em adultos: A experiência de um centro hospitalar.** Medicina Interna, v.29, n.2, 2020.

MEDEIROS, C. H. S. et al. **Study of antimicrobial properties of nanocellulose films and silver nanoparticles.** XVIII Brazil MRS, 2019

MENDES, A. B. dos S., et al. **Potencial terapêutico de células-tronco mesenquimais na laminite equina.** Research, Society and Development, v.10, n.10, e436101018902, 2021

MENDES, R. A. M., et al. **Proteínas morfogenéticas ósseas em defeitos maxilofaciais: uma breve atualização.** Brazilian Journal Development, Curitiba, v.7, n.5, p.47541-47553, Mai, 2021

MOCARZEL, M. M. V., et al. **Conscientização sobre uso de canudos plásticos: projeto interdisciplinar sobre polímeros no Unilasalle-RJ.** Conhecimento & Diversidade, Niterói, v. 11, n. 25, p. 11 – 27 set./dez. 2019

MORAES, A. S. de., et al. **Perspectivas do uso de células-tronco na cirurgia plástica.** Revista Eletrônica Acervo Saúde, v.13, n.4, 2021

MOREIRA, C. D.L.F.A. et al. **Sistemas multicomponentes com o acetato de hecogenina: doseamento e caracterização.** Anais do 5º encontro brasileiro para inovação terapêutica, 2017

MÖRSCHBÄCHER, P. D., et al. **Associação de arcabouço de polipropileno e células-tronco mesenquimais para uso em engenharia de tecido.** R. bras. Ci. Vet., v. 27, n. 4, p.168-, out/dez. 2020

MUNK, M., et al. **Biocompatibility assessment of fibrous nanomaterials in mammalian embryos.** Nanomedicine: Nanotechnology Biology and Medicine, v.12, n.5, p.1151-1159, 2016.

MURILO, B. M. da C., et al. **Análise dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da osteoporose em idosos.** Anais do VII CIEH, Campina Grande. Realize Editora, 2020

NARCISO, A. et al. **Síntese verde de nanopartículas de prata para uso em biomateriais odontológicos.** Revista Interdisciplinar de Estudos em Saúde da UNIARP, v.9, n.2, p.18, 2019

OLIVEIRA, A. A. de.; JUNIOR, L. A. P. **Fotoluminescência em nanomateriais semicondutores.** 28 Congresso de Iniciação Científica-Unicamp, 2019

PEREIRA, R. C. et al. **Caracterização de filmes de quitosana produzidos a partir da incorporação de extrato de anacardium microcarpum ducke**. Brazilian Journal of Development, Curitiba, v.7, n.5, p.51376-51394, MAY, 2021

PEREK, K. V.; FERRARI, P. C. **Caracterização físico-química, antimicrobiana e de resistência de membranas de quitosana reforçadas por celulose nanofibrilada incorporadas com sulfadiazina de prata**. 2019

RAMOS, R. M., et al. **Regeneração óssea guiada horizontal e vertical**. Revista FAIPE, v.11, n.1, p.87-101, Jan./Jun., 2021

REZZO, T. C. da S. et al. **Ozonioterapia: terapia adjuvante no tratamento da osteoartrite de joelho**. Research, Society and Development, v.11, n.4, 2022

ROCA, B. M., et al. **Avaliação do uso de resazurina em teste de susceptibilidade in vitro frente a Sporothrix brasilienses**. Vittalle –Revista de Ciências da Saúde v.31, n.2, p.32-37, 2019

RODRIGUES, F. de A; CARVALHO, L. F. C. **Células-tronco no tratamento da dor**. Recisatec, v.2, n.7, 2022

RODRIGUES, L. O. et al. **Produção de biofilme de quitosana, reduzida da quitina, extraída de exoesqueleto de crustáceos: proposta e disponibilização sustentável**. Braz. Ap. Sci. Rev.Curitiba, v. 4, n. 1, p. 218-239 jan/fev 2020.

RODRIGUES, M. I. et al. **A rare case of Paget disease**. Acta Radiológica Portuguesa, v.35, n.1, p.30-31, 2023

ROSENDO, R. A., et al. **Estruturas de quitosana utilizadas para regeneração óssea in vivo: uma revisão de literatura**. Research, Society and Development, v.9, n.7, e891974538, 2020

SANTOS, E. J. C.; KAUFMANN, O. G.; MAZZEO, Â. **Células-tronco mesenquimais: uma nova perspectiva no tratamento da pneumonia induzida pelo SARS-Cov-2 (Covid-19)**. Rev Med, São Paulo, v.99, n.3, p.272-277, Maio, 2020

SANTOS, M. S. dos. **Extração de células-tronco da polpa de dentes decíduos e permanentes: Revisão de literatura**. Interdisciplinaridade na promoção da Saúde, 2020.

SANTOS, V. S., et al. **Avaliação e caracterização de biofilme comestível de carboximetilcelulose contendo nanopartículas de celulose de quitosana e Cúrcuma longa**. Artigos Matéria, Rio de Janeiro, v.26, n.01, 2021.

SHAHROUSVAND, E., et al. **Preparation and evaluation of polyurethane/cellulose nanowhisker bimodal foam nanocomposites for osteogenic differentiation of hMSCs**. Carbohydrate Polymers, v.171, p.281-291, 2017

SILVA, A. L. et al. **Caracterização biométrica e teste de tetrazólio em sementes de *Campomanesia phaea* O. Berg.** Landrum. Journal of Seed Science, v.43, 2021

SILVA, C. N., et al. **O tecido da polpa dentária como fonte de células-tronco.** Revista Saúde em foco, v.11, 2019

SILVA, M. de L. et al. **Aproveitamento de resíduos vegetais como alternativa na fabricação de embalagens biodegradáveis.** Braz. J. of Develop., Curitiba, v.6, n.11, p.86238-86250, Nov, 2020

SILVA, R. N.O da et al. **Methodological adjustments to the tetrazolium test in coriander seeds.** Journal of Seeds Science, v.43, 2021

SIQUEIRA, P. et al. **Three-Dimensional Stable Alginate-Nanocellulose Gels for Biomedical Applications.** Towards Tunable Mechanical Properties and Cell Growing. Nanomaterials, v. 9, p. 78, 2019.

SOLIS, M. Y. **Nutrição e exercício no envelhecimento e nas doenças crônicas.** 2021

SONG et al. **Osteoblast-intrinsic defect in glucose metabolism impairs bone formation in type II diabetic male mice.** Elife, v.12, n.5, 2023

DE SOUSA, M. M. et al. **Development and Characterization of Sustainable Antimicrobial Films Incorporated with Natamycin and Cellulose Nanocrystals for Cheese Preservation.** Polysaccharides, v. 4, p. 53-64, 2023.

SOUZA, A. C.; OLIVEIRA, F. L. M. **Materiais biodegradáveis de fécula de mandioca reforçados com nanopartículas de argila e nanofibras de celulose.** Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 2019

SOUZA, A. L.; PELISSARI, F. M. **Desenvolvimento de nanocompósito à base de amido de fruta-de-lobo (*Solanum lycocarpum* St. Hill) reforçado com nanopartículas de celulose.** In: III Simpósio de Engenharia de Alimentos. 2019, Montes Claros: ICA/UFVJM.

SOUZA, B. L. M. de et al. **Influência da agitação no crescimento de nanotubos de TiO₂ na superfície de discos de titânio comercialmente puro.** Revista Matéria, v.26, n.1, 2021

TAO F., et al. **Applications of chitin and chitosan nanofibers in bone regenerative engineering,** Carbohydrate Polymers. 2019

TAGLIARI I. et al. **Biocomponents based on hydroxyapatite: Influence of sterilization on the mechanical resistance.** Rev. bras. Ortop., v.57, 2022

TOMKELSKI, M. L., et al. **Ensino de nanociência e nanotecnologia: perspectivas manifestadas por professores da educação básica e superior.** Artigos • Ciênc. educ. (Bauru) v.25, n.3 • Jul-Set, 2019

TONET, M. D.; LOENEL, A. A. **Nanociência e Nanotecnologia: uma revisão bibliográfica acerca das contribuições e desafios para o ensino de Física.** Caderno Brasileiro de Ensino de Física, v. 36, n. 2, p. 431-456, ago. 2019.

TÔRRES, R. C. S., et al. **Radiologia dos ossos e articulações de cães e gatos.** Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia, n.93, 2019

TRINDADE, J. dos S. et al. **Estudo sobre a utilização de polianidrido como abordagem terapêutica para o tratamento de lesões no tecido ósseo.** Research, Society and Development, v. 10, n. 4, e42610414204, 2021.

VU, H.T. et al. **Investigating the effects of conditioned media from stem cells of human exfoliated deciduous teeth on dental pulp stem cells.** Journals Biomedicines, v.10, 2022

ZAMANI, R. et al. **Recent Advances in Cell Electrospinning of Natural and Synthetic Nanofibers for Regenerative Medicine.** Drug Research, v. 68, n. 08, p. 425-435, 2018

ZANETTE, R. de S. S. **Produção de matrizes biológicas a partir de valvas cardíacas de suínos e recelularização com células tronco da polpa dentária humana.** 2016. Universidade Federal de Juiz de Fora, [s. l.], 2016.

ZANETT et al. **Cytocompatibility and osteogenic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth with cotton cellulose nanofibers for tissue engineering and regenerative medicine.** Journal of Biomaterials Science, PolymerEdition, v.33, n.5, p.627-650, 2021

ZARBIN, A.; OLIVEIRA, M. **Nanoestruturas de carbono (nanotubos, grafeno): Quo Vadis?** Química nova, v.36, n.10, p.1533-1539, 2013.