

HEITOR AKIO KIMURA

**Desenvolvimento e avaliação de carbono ativado aplicado na bioengenharia
de tecidos ósseos**

São Paulo

2019

HEITOR AKIO KIMURA

**Desenvolvimento e avaliação de carbono ativado aplicado na bioengenharia
de tecidos ósseos**

Trabalho de formatura apresentado à
Escola Politécnica da Universidade de
São Paulo

Departamento de Engenharia
Metalúrgica e de Materiais

Orientador: Prof. Dr. Guilherme
Frederico Bernardo Lenz e Silva

São Paulo

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Kimura, Heitor Akio

Desenvolvimento e avaliação de carbono ativado aplicado na bioengenharia de tecidos ósseos / H. A. Kimura -- São Paulo, 2019.
89 p.

Trabalho de Formatura - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais.

1. Carbono 2. Biomateriais 3. Células-tronco 4. Engenharia tecidual
5. Osso e Ossos I. Universidade de São Paulo. Escola Politécnica.
Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais II.t.

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado, principalmente, aos meus pais, Humberto Massahiko Kimura e Selma Hayashida Kimura, à minha irmã, Karen Tiemi Kimura, e à Lídia Jorge Tasima, melhor amiga e companheira para a vida toda. Essas pessoas acompanharam de perto meus momentos de fraqueza e não há palavras para agradecer por todas as vezes que estiveram ao meu lado me oferecendo todo o suporte que precisei.

Dedico aos meus amigos, por terem ajudado a superar vários momentos de dificuldade tanto por meio de conselhos quanto por descontrações, e que acabaram deixando o processo todo muito mais fácil de lidar.

Por fim, dedico aos meus professores, que proporcionaram experiências incríveis e oportunidades únicas para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

A todos, muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Guilherme F. B. Lenz e Silva, pela esplêndida orientação, pelos valiosos ensinamentos e pela disponibilização dos recursos necessários ao longo de todas as etapas deste trabalho.

À Dra. Daniela Franco Bueno, cujo espírito visionário permitiu a minha participação em sua equipe de pesquisa e viabilizou meu aprendizado em uma série de tópicos dentro das Ciências da Saúde, inclusive os abordados neste trabalho.

À Dra. Patrícia de Almeida Mattos, pela imensa dedicação e inestimável paciência ao me auxiliar na elaboração, execução e interpretação dos resultados deste projeto.

À Carla Cristina Gomes Pinheiro, pela transmissão de sua vasta experiência em técnicas de cultivo celular e análises correlatas, pelo auxílio no planejamento e execução dos experimentos e, principalmente, por sua amizade.

À Dra. Gisele Aparecida Amaral Labat, pela ajuda com a seleção e análise de materiais, tais quais tornaram este trabalho mais completo.

À Lídia Jorge Tasima, pela ajuda com as análises estatísticas e pelo apoio de valor incomensurável tanto neste trabalho quanto em muitos outros aspectos da vida.

À equipe de profissionais do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Escola Politécnica da USP, em especial ao Dr. Daniel Luiz Rodrigues Junior.

Ao Hospital Sírio-Libanês, pela permissão de utilização de suas dependências.

Por fim, agradeço a todos os amigos e colegas que me apoiaram nesta jornada.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	V
ANEXOS	VI
RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. A Fissura Labiopalatina	3
2.2. O carbono como elemento central no desenvolvimento de biomateriais	5
2.3. Óleos vegetais e minerais como precursores de materiais carbonosos	10
2.3.1. Mineral	10
2.3.2. Gérmen de Trigo	10
2.3.4. Cânhamo	11
2.4. Funcionalização de Superfícies	11
2.5. Células Tronco Mesenquimais	12
2.6. Microscopia Eletrônica de Varredura	13
2.7. Espectroscopia por Energia Dispersiva	14
2.8. Espectroscopia Raman	14
2.9. Citometria de Fluxo	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1. Síntese de Microesferas de Carbono	16
3.2. Síntese da Espuma de Carbono	17
3.3.1. Tratamento com HNO ₃ a quente	18
3.3.2. Tratamento com H ₂ O ₂	19

3.4. Expansão Celular	20
3.5. Caracterização celular por citometria de fluxo	21
3.6. Planejamento de grupos amostrais.....	22
3.7. Plaquetamento de CTMs nos biomateriais	23
3.8. Preparação para Microscopia Eletrônica de Varredura.....	24
3.9. Quantificação de Matriz Óssea	24
3.10. Análise estatística da quantificação da absorvância	25
4 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS.....	26
4.1. Preparação das microesferas	26
4.2. Carbonização das microesferas.....	28
4.3. Espectroscopia Raman.....	30
4.4. Preparação da espuma	32
4.5. Carbonização da espuma	34
4.6. Funcionalização de superfície	37
4.7. Expansão celular	47
4.8. Imunofenotipagem por citometria de fluxo	49
4.9. Adesão Celular	53
4.10. Diferenciação Osteogênica	57
5 CONCLUSÕES	64
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
7 ANEXOS	70

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - HISTÓRICO DE DEPÓSITO DE PATENTES REFERENTES AO GRAFENO NO REINO UNIDO. FONTE: INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE, UK, 2011.	5
FIGURA 2 - ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA IDENTIFICAÇÃO DE PICOS CARACTERÍSTICOS DO GRAFENO.. FONTE: LASOCKA ET AL., 2018.	6
FIGURA 3 - COMPARAÇÃO MORFOLÓGICA DE FIBROBLASTOS "L929" CULTIVADOS EM SUPERFÍCIE DE VIDRO (CONTROLE) E DE GRAFENO POR UM PERÍODO DE 24H. FONTE: LASOCKA ET AL. 2018.	7
FIGURA 4 - ATIVIDADE MITOCONDRIAL DE FIBROBLASTOS CULTIVADOS EM SUPERFÍCIE DE VIDRO OU DE GRAFENO. P-VALUE < 0.01.	7
FIGURA 5 - IMAGEM DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DOS NANOTUBOS DE CARBONO MULTICELULARES. O SEGMENTO BRANCO NO CANTO SUPERIOR ESQUERDO EQUIVALE A 20 MM. FONTE: ABARRATEGI ET AL., 2008.	8
FIGURA 6 - ESPUMA DE CARBONO PRODUZIDO A PARTIR DE ESPONJA DOMÉSTICA E SACAROSE.	9
FIGURA 7 - PREPARAÇÃO PARA A CARBONIZAÇÃO DA ESPONJA IMPREGNADA.	17
FIGURA 8 - TRATAMENTO DAS AMOSTRAS COM HNO ₃ A QUENTE.	19
FIGURA 9 - TRATAMENTO DAS AMOSTRAS COM H ₂ O ₂	20
FIGURA 10 - EMULSÃO FEITA A PARTIR DO ÓLEO MINERAL APÓS TRATAMENTO A 90 °C. FONTE: AUTORAL	26
FIGURA 11 - EMULSÃO GT APÓS TRATAMENTO TÉRMICO A 250 °C E FILTRAGEM À VÁCUO.	27
FIGURA 12 - EMULSÃO C APÓS TRATAMENTO TÉRMICO A 250 °C E FILTRAGEM À VÁCUO	27
FIGURA 13 - EMULSÃO SA APÓS TRATAMENTO TÉRMICO A 250 °C E FILTRAGEM À VÁCUO.	28
FIGURA 14 - CURVA TERMOGRAVIMÉTRICA DE MICROESFERAS TRATADAS (AHGM) E NÃO TRATADAS COM ÁCIDO (GM).	29
FIGURA 15 - ESPECTRO RAMAN DAS MICROESFERAS SINTETIZADAS POR GE ET AL. (2009).	31

FIGURA 16 - ESPONJA IMPREGNADA COM SOLUÇÃO DE SACAROSE (AO FUNDO) E CONTROLE APÓS 1 H EM ESTUFA A 120 °C.	33
FIGURA 17 - ESPONJA IMPREGNADA APÓS 48H EM ESTUFA A 120 °C.....	33
FIGURA 18 - GRUPO CONTROLE DA ESPONJA APÓS 48H EM ESTUFA A 120 °C.	34
FIGURA 19 - ALTERAÇÃO MORFOLÓGICA OCORRIDA APÓS A CARBONIZAÇÃO DA ESPONJA IMPREGNADA.....	35
FIGURA 20 - MEV DA ESPUMA DE CARBONO APÓS CARBONIZAÇÃO. DUAS FASES DISTINTAS ESTÃO INDICADAS PELAS SETAS BRANCA E PRETA.....	36
FIGURA 21 - ANÁLISE POR EDS DA FASE RETICULADA DA ESPUMA DE CARBONO. ANEXO 1.	37
FIGURA 22 - ANÁLISE POR EDS DA FASE ESFÉRICA DA ESPUMA DE CARBONO. ANEXO 2.	37
FIGURA 23 - MICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA SA TRATADA COM H ₂ O ₂	39
FIGURA 24 - ANÁLISE POR EDS DA AMOSTRA SA TRATADA COM H ₂ O ₂ . ANEXO 3.....	39
FIGURA 25 - MICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA GT TRATADA COM H ₂ O ₂	40
FIGURA 26 - ANÁLISE POR EDS DA AMOSTRA GT TRATADA COM H ₂ O ₂ . ANEXO 4.....	40
FIGURA 27 - MICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA C TRATADA COM H ₂ O ₂	41
FIGURA 28 - MICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA C ANTERIOR À FUNCIONALIZAÇÃO DE SUPERFÍCIE.....	41
FIGURA 29 - ANÁLISE POR EDS DA AMOSTRA C TRATADA COM H ₂ O ₂ . ANEXO 5.....	42
FIGURA 30 - MICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA ES TRATADA COM H ₂ O ₂	42
FIGURA 31 - ANÁLISE POR EDS DA AMOSTRA ES TRATADA COM H ₂ O ₂ . ANEXO 6.....	43
FIGURA 32 - MICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA SA TRATADA COM HNO ₃	43
FIGURA 33 - ANÁLISE POR EDS DA AMOSTRA SA TRATADA COM HNO ₃ . ANEXO 7.	44
FIGURA 34 - MICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA GT TRATADA COM HNO ₃	44

FIGURA 35 - ANÁLISE POR EDS DA AMOSTRA GT TRATADA COM HNO ₃ . ANEXO 8.	45
FIGURA 36 - MICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA C TRATADA COM HNO ₃	45
FIGURA 37 - ANÁLISE POR EDS DA AMOSTRA C TRATADA COM HNO ₃ . ANEXO 9.	46
FIGURA 38 - MICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA ES TRATADA COM HNO ₃	46
FIGURA 39 - ANÁLISE POR EDS DA AMOSTRA ES TRATADA COM HNO ₃ . ANEXO 10.	47
FIGURA 40 - CTMS 48 HORAS APÓS DESCONGELAMENTO. AUMENTO DE 100X.	48
FIGURA 41 - CTMS 96 HORAS APÓS DESCONGELAMENTO. AUMENTO DE 100X.	48
FIGURA 42 - CONTAGEM DE CÉLULAS VIVAS E MORTAS, TAMANHO MÉDIO E DISTRIBUIÇÃO POR TAMANHO DA CULTURA CELULAR APÓS A QUINTA PASSAGEM.	49
FIGURA 43 - AMOSTRA SA-H ₂ O ₂ COM CTM ADERIDA À SUPERFÍCIE (DIREITA) EM COMPARAÇÃO COM MOMENTO ANTERIOR AO PLAQUEAMENTO (ESQUERDA).	54
FIGURA 44 - AMOSTRA C-H ₂ O ₂ COM CTM ADERIDA À SUPERFÍCIE (DIREITA) EM COMPARAÇÃO COM MOMENTO ANTERIOR AO PLAQUEAMENTO (ESQUERDA).	54
FIGURA 45 - AMOSTRA C-HNO ₃ COM CTMS ADERIDAS À SUPERFÍCIE (DIREITA) EM COMPARAÇÃO COM MOMENTO ANTERIOR AO PLAQUEAMENTO (ESQUERDA). FONTE: AUTORAL	55
FIGURA 46 - AMOSTRA ES-H ₂ O ₂ COM CTMS ADERIDAS À SUPERFÍCIE (DIREITA) EM COMPARAÇÃO COM MOMENTO ANTERIOR AO PLAQUEAMENTO (ESQUERDA).	55
FIGURA 47 - AMOSTRA ES-HNO ₃ COM CTM ADERIDA À SUPERFÍCIE (DIREITA) EM COMPARAÇÃO COM MOMENTO ANTERIOR AO PLAQUEAMENTO (ESQUERDA).	56
FIGURA 48 - ACOMPANHAMENTO DOS GRUPOS CONTROLE AO LONGO DE 14 DIAS. TODOS OS REGISTROS FORAM FEITOS COM AUMENTO DE 100 X. LEGENDA: A, C, E E G SÃO OS GRUPOS DE CTMS + MEIO DE DIFERENCIAÇÃO A 3, 7, 10 E 14 DIAS DE CULTIVO,	

RESPECTIVAMENTE. B, D, F E H SÃO OS GRUPOS DE CTMS +
MEIO BASAL NO MESMO PERÍODO, RESPECTIVAMENTE.58

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DOS GRUPOS AMOSTRAIS DE ACORDO COM ÓLEO PRECURSOR OU ESPUMA E RESPECTIVOS TRATAMENTOS DE SUPERFÍCIE.....	22
TABELA 2 - RELAÇÃO DE INTENSIDADE DOS PICOS D E G DAS MICROESFERAS.	32
TABELA 3 - ALTERAÇÃO DE MASSA DAS AMOSTRAS ANTES E DEPOIS DA FUNCIONALIZAÇÃO DE SUPERFÍCIE.....	38
TABELA 4 - ANTÍGENOS ESPECÍFICOS DE SUPERFÍCIE, NOME ALTERNATIVO E CARACTERÍSTICAS.	50
TABELA 5 - PERFIL IMUNOFENOTÍPICO DA POPULAÇÃO CELULAR PARA OS MARCADORES CD29 E CD44 (POSITIVOS).....	51
TABELA 6 - PERFIL IMUNOFENOTÍPICO DA POPULAÇÃO CELULAR PARA OS MARCADORES CD90 E CD105 (POSITIVOS).....	52
TABELA 7 - PERFIL IMUNOFENOTÍPICO DA POPULAÇÃO CELULAR PARA OS MARCADORES CD34 E CD45 (NEGATIVOS).	52

ANEXOS

ANEXO 1 - ANÁLISE QUÍMICA SEMIQUANTITATIVA POR EDS DA ESPUMA DE CARBONO. FIGURA 21.	70
ANEXO 2 - ANÁLISE QUÍMICA SEMIQUANTITATIVA POR EDS DA ESPUMA DE CARBONO. FIGURA 22.	70
ANEXO 3 - ANÁLISE QUÍMICA SEMIQUANTITATIVA POR EDS DA AMOSTRA SA TRATADA COM H ₂ O ₂ . FIGURA 24.	70
ANEXO 4 - ANÁLISE QUÍMICA SEMIQUANTITATIVA POR EDS DA AMOSTRA GT TRATADA COM H ₂ O ₂ . FIGURA 26.	70
ANEXO 5 - ANÁLISE QUÍMICA SEMIQUANTITATIVA POR EDS DA AMOSTRA C TRATADA COM H ₂ O ₂ . FIGURA 28.	71
ANEXO 6 - ANÁLISE QUÍMICA SEMIQUANTITATIVA POR EDS DA AMOSTRA ES TRATADA COM H ₂ O ₂ . FIGURA 30.	71
ANEXO 7 - ANÁLISE QUÍMICA SEMIQUANTITATIVA POR EDS DA AMOSTRA SA TRATADA COM HNO ₃ . FIGURA 32.	71
ANEXO 8 - ANÁLISE QUÍMICA SEMIQUANTITATIVA POR EDS DA AMOSTRA GT TRATADA COM HNO ₃ . FIGURA 34.	71
ANEXO 9 - ANÁLISE QUÍMICA SEMIQUANTITATIVA POR EDS DA AMOSTRA C TRATADA COM HNO ₃ . FIGURA 36.	72
ANEXO 10 - ANÁLISE QUÍMICA SEMIQUANTITATIVA POR EDS DA AMOSTRA ES TRATADA COM HNO ₃ . FIGURA 38.	72
ANEXO 11 - TESTE DE MÚLTIPLAS COMPARAÇÕES DE DUNNETT DA AVALIAÇÃO ENTRE AMOSTRAS TIPO "D" E CONTROLE POSITIVO "DIFF" GERADA PELO SOFTWARE GRAPHPAD PRISM. GRÁFICO 4.	72
ANEXO 12 - TESTE DE MÚLTIPLAS COMPARAÇÕES DE DUNNETT DA AVALIAÇÃO ENTRE AMOSTRAS TIPO "B" E CONTROLE NEGATIVO "BASAL" GERADA PELO SOFTWARE GRAPHPAD PRISM. GRÁFICO 5.	72
ANEXO 13 - TESTE DE MÚLTIPLAS COMPARAÇÕES DE DUNNETT DA AVALIAÇÃO ENTRE AMOSTRAS TIPO "D-" E CONTROLE POSITIVO "DIFF" GERADA PELO SOFTWARE GRAPHPAD PRISM. GRÁFICO 6.	73

ANEXO 14 - TESTE DE MÚLTIPLAS COMPARAÇÕES DE DUNNETT DA AVALIAÇÃO ENTRE AMOSTRAS TIPO "B-" E CONTROLE NEGATIVO "BASAL" GERADA PELO SOFTWARE GRAPHPAD PRISM. GRÁFICO 7.....	73
--	----

RESUMO

KIMURA, H. A. **Desenvolvimento e avaliação de carbono ativado aplicado na bioengenharia de tecidos ósseos**. 2019. 89 p. Trabalho de formatura - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

No presente trabalho, cinco tipos de materiais carbonosos foram caracterizados e testados como estratégias de biomateriais dentro do contexto da bioengenharia de tecidos. Com isso, visam-se alternativas ao tratamento padrão ouro da fissura labiopalatina, denominado transplante de enxerto autólogo, que depende da retirada de tecido ósseo saudável do paciente. Desenvolveram-se microesferas derivadas da emulsão entre solução aquosa de gelatina hidrolisada e diferentes óleos de origem mineral ou vegetal, e espumas de carbono, ambos submetidos à carbonização. Os materiais foram analisados por meio de microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia de energia dispersiva e espectroscopia Raman, o que permitiu a formulação de hipóteses acerca da microestrutura encontrada. Foram também testadas as funcionalizações de superfície via tratamento com soluções de HNO_3 (a quente) e H_2O_2 . Realizou-se o plaqueamento de células-tronco mesenquimais da polpa de dente decíduo sobre as amostras, e foram avaliados os aspectos de adesão celular e formação de matriz óssea. Os resultados indicaram que a carbonização dos materiais resulta em grandes perdas percentuais de massa e a uma composição química de, basicamente, carbono e oxigênio. Também foi possível observar graus diferentes de adesão celular nas diferentes amostras. A combinação de melhor efetividade na integração com as células foi o uso de espumas de carbono tratadas com a solução de H_2O_2 , comprovadas por meio da observação por microscopia eletrônica de varredura e quantificação de matriz óssea por meio de espectrofotometria.

Palavras-chave: carbono, biomateriais, células-tronco mesenquimais, diferenciação osteogênica.

ABSTRACT

KIMURA, H. A. **Development and evaluation of activated carbon applied to bone tissue bioengineering**. 2019. 89 p. Trabalho de formatura - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

In this present work, five kinds of carbon materials were characterized and put to test as biomaterials strategies under a tissue bioengineering context. Thus, substitutes for the gold standard treatment for cleft lip and palate, named as autologous bone graft transplant, are intended, since this procedure requires the extraction of healthy bone tissue from the patient. Microspheres derived from an emulsion consisting of gelatin aqueous solution and mineral or vegetal oils and carbon foams were developed through carbonization. All the materials were analyzed through scanning electron microscopy, energy dispersive spectroscopy and Raman spectroscopy, as it allowed the formulation of hypothesis concerning the microstructures. Besides that, surface functionalization by HNO_3 and H_2O_2 oxidation were also tested. After protocol establishment for the materials synthesis and functionalization, it was performed the seeding of dental pulp stem cells into the materials and the evaluation of cell adhesion and bone matrix formation. Results showed that the carbonization leads to an extensive mass loss and a near pure chemical composition of carbon and oxygen. It was also concluded that both material and surface treatment present a significative influence over mesenchymal stem cells integration. Carbon foams previously treated with H_2O_2 showed the best effectiveness regarding cell-biomaterial integration, as it was confirmed by scanning electron microscopy over cell adhesion and bone matrix quantification by spectrophotometry analysis.

Keywords: carbon, biomaterials, mesenchymal stem cells, osteogenic differentiation.

1 INTRODUÇÃO

Dentre as malformações congênitas mais comuns no nascimento destaca-se a enfermidade denominada como fissura labiopalatina não sindrômica, que é marcada pelo desenvolvimento incompleto de estruturas relacionadas à formação do lábio superior e do palato.

O padrão ouro para o tratamento desta condição é realizado por meio do implante de enxerto ósseo autólogo proveniente da crista ilíaca, localizada na bacia. Entretanto, dentre as principais consequências negativas desta opção estão a redução de mobilidade e prolongamento do período de hospitalização.

A área denominada como bioengenharia de tecidos tem ganhado popularidade por apresentar possibilidades de tratamento sem a necessidade de retirada de tecido em locais críticos, oferecendo, assim, alternativas ao implante de enxerto ósseo. A princípio, desenvolve-se um ambiente favorável ao desenvolvimento de determinado tipo celular por meio da sinergia adquirida em conjunto a um biomaterial e fatores de crescimento. Uma vez viabilizada esta combinação, torna-se possível a regeneração ou neoformação de tecidos previamente defeituosos ou ausentes, além de possuir potencial para melhorar significativamente a qualidade de vida do paciente durante e após sua recuperação.

Em meio às estratégias encontradas para a regeneração de tecido ósseo, destacam-se duas opções de notável versatilidade: os materiais carbonosos e o uso de células-tronco mesenquimais.

Os materiais carbonosos já foram sintetizados nas mais diversas morfologias e utilizados em aplicações elétricas e térmicas, em sistemas de *drug delivery*, filtros e como biomateriais. Dentre alguns dos principais representantes deste grupo estão o grafeno, os nanotubos, as microesferas e as espumas. Cada uma destas estratégias possui boa aplicabilidade biológica e já serviram tanto como *scaffolds* para crescimento celular quanto inibidores de proliferação bacteriana (Kang et al, 2017; Szunerits e Boukherroub, 2016).

As células-tronco mesenquimais possuem a capacidade intrínseca de se diferenciarem em diversos tipos celulares, tais como condrócitos (células

cartilaginosas), miócitos (células musculares), osteócitos (células ósseas), dentre outros. Não somente, também se destacam as propriedades imunomodulatórias que, em um contexto de desenvolvimento de soluções para tratamento de fissura labiopalatina e outras malformações, apresentam uma significativa vantagem para a redução do risco de rejeição do implante.

Mediante a combinação destas estratégias, são inúmeras as possíveis abordagens para desenvolver soluções de igual ou maior efetividade em relação ao estado da arte e, possivelmente, menor custo.

Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de protocolos para a produção de biomateriais de carbono ativado e a avaliação inicial de seu desempenho *in vitro* junto a células tronco da polpa do dente de leite como estratégia para a regeneração de tecido ósseo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A Fissura Labiopalatina

As fissuras labiopalatinas não-sindrômicas (FLP) são consideradas como as malformações congênitas faciais mais comuns presentes no nascimento, com a prevalência mundial de aproximadamente 1,43 a cada 1000 nascidos vivos (Dixon et al., 2011), e são caracterizadas pela incompletude de processos de crescimento, diferenciação e fusão de estruturas associadas à formação do lábio superior e o palato (Bueno et al., 2011).

Devido às complicações decorrentes da malformação, os indivíduos que nascem portadores de FLP não têm somente problemas estéticos, mas também podem apresentar outras alterações sistêmicas como problemas de audição, de arcada dentária, malformações nos dentes, dificuldades de alimentação que podem levar a alterações nutricionais, além de poderem apresentar alterações psicológicas no decorrer de seu desenvolvimento. As correções são realizadas por meio de intervenções multidisciplinares que incluem: cirurgia, tratamento dentário, terapia da fala e acompanhamento psicológico para a reabilitação estética e funcional destes indivíduos (Shaw et al., 2004).

Por muito tempo, estabeleceu-se como padrão ouro para o tratamento de defeitos ósseos congênitos, inclusive as fissuras orofaciais, ou defeitos adquiridos em humanos, a inserção de enxertos ósseos autólogos no sítio de defeito, provenientes de tecido saudável do próprio paciente (Raposo-Amaral et al., 2014). Em relação ao tratamento de FLP, a região de utilização mais frequente para a obtenção de tecido ósseo para enxertos é a crista ilíaca, localizada no quadril (Eppley e Sadove, 2000).

Este método permite a obtenção de um volume abundante de osso trabecular (Beirne et al., 1996), apresenta relativa facilidade na extração do tecido e ainda possibilita a execução simultânea com o processo de implantação do enxerto (Rudman, 1997). Entretanto, a ideia de retirar tecido saudável deste local não é recebida com facilidade pela população, tais quais apresentam uma aceitabilidade de somente 23% (Hof et al., 2014). Não somente, destacam-se como pontos

negativos o desconforto local, mobilidade reduzida e período prolongado de hospitalização (Beirne et al., 1996). Sendo assim, deseja-se que a retirada de tecido ósseo saudável, e a consequente morbidez do paciente, seja evitada.

Como alternativa à utilização de enxertos autólogos, é possível adotar a abordagem conhecida como bioengenharia de tecidos. Este ramo do conhecimento foi descrito por Langer e Vacanti (1993, p. 920) como “uma área interdisciplinar que aplica os princípios de engenharia e as ciências da vida, visando o desenvolvimento de substitutos biológicos que restauram, mantêm ou melhoram a funcionalidade do tecido.” Basicamente, pode ser compreendida por meio de seus três elementos principais: o biomaterial ou “scaffold”, as células a serem semeadas neste material e o ambiente em que esta associação irá ser introduzida (Szpalski, 2012).

A revisão feita por Martín-del-Campo, Rosales-Ibañez e Rojo (2019) apresenta uma série de biomateriais destinados à recuperação de pacientes de FLP, tais como grânulos microestruturados de β -tricálcio fosfato, matrizes ósseas desmineralizadas e vidros bioativos no grupo das biocerâmicas, e a poli(ϵ -caprolactona), o poliácido láctico e o polihidroxialcanoatos como alguns exemplos de biomateriais poliméricos.

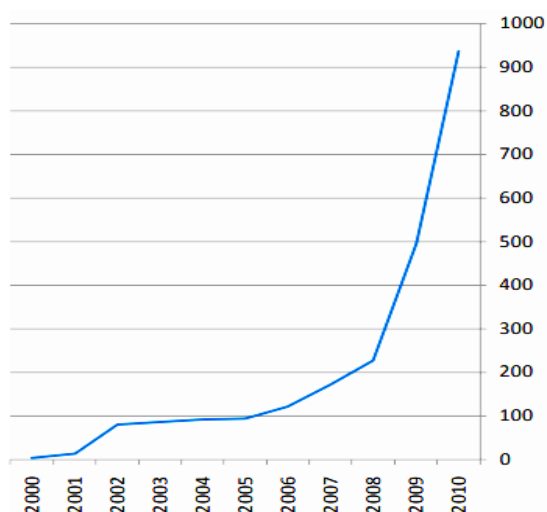
Em relação a este último grupo, foi destacada pelos autores a utilização de compósitos de poli(ϵ -caprolactona) e nanotubos de carbono, que, por sua vez, foram capazes de estimular a adesão e proliferação celular de células-tronco da polpa de dente, além de promover a diferenciação em tipos celulares de fenótipo normalmente encontrado em tecido ósseo (Martín-del-Campo, Rosales-Ibañez e Rojo, 2019). Além das biocerâmicas e polímeros apresentados na revisão, também foi introduzido o uso de materiais carbonosos na regeneração de tecido ósseo. Mediante uma melhor exploração de estratégias dentro desta categoria de materiais seria possível identificar alternativas interessantes à regeneração óssea em geral.

2.2. O carbono como elemento central no desenvolvimento de biomateriais

Pelas propriedades físicas, químicas e mecânicas distintas reportadas na literatura, foi dada aos materiais derivados de carbono, tais como o grafeno, as microesferas, os nanotubos de carbono e as espumas, especial atenção e curiosidade para aplicação em diversas áreas de pesquisa, inclusive a bioengenharia de tecidos.

A introdução do material conhecido como “grafeno” na comunidade científica é relativamente recente, e a evolução de sua popularidade, surpreendente. Em 1997, iniciaram-se as discussões sobre folhas de grafeno em condições isoladas. Em 2002, foram feitos os primeiros experimentos sobre o comportamento experimental de um número mínimo de camadas de carbono. Em 2004, foi publicado o primeiro artigo sobre a caracterização de “filmes gráfiticos monocristalinos”, em referência a este novo material. Apenas seis anos após esta publicação, foi concedido o Prêmio Nobel de Física aos contribuintes principais do estudo anterior, em meio à enorme repercussão mundial deste material e suas propriedades (Colapinto, 2018; Novoselov et al., 2004). Como uma das evidências desta repercussão, nota-se um crescimento extremamente expressivo da taxa de patentes por ano referentes ao grafeno na década de 2000, ao que foi reportado pelo *Intellectual Property Office*, órgão do Reino Unido responsável pelos direitos de Propriedade Intelectual (Figura 1) (Zhamu, 2017).

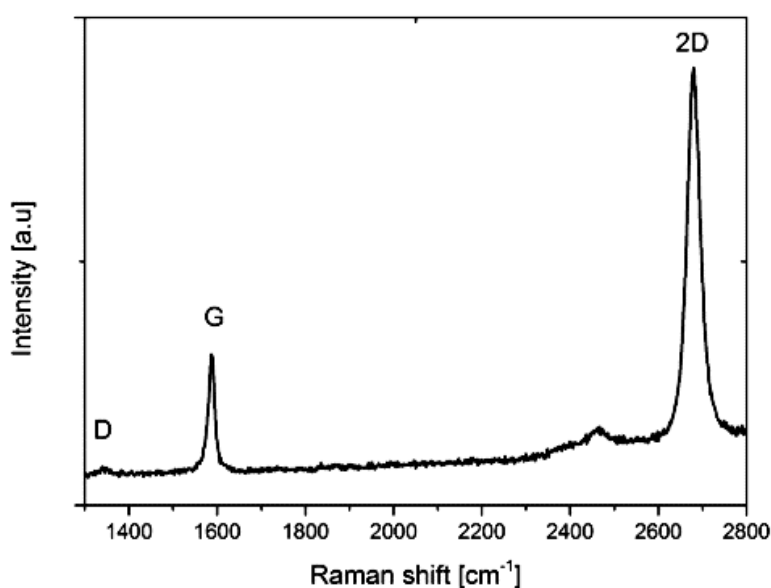
Figura 1 - Histórico de depósito de patentes referentes ao grafeno no Reino Unido.



Fonte: Intellectual Property Office, UK, 2011.

Recentemente, foi comprovada a biocompatibilidade do grafeno por meio de testes de scaffolds associados com fibroblastos. Lasocka et al. (2018) conduziu o experimento de modo a depositar o grafeno sobre um substrato de cobre, com posterior esterilização e transferência para placas de poços de cultura celular. Houve certificação da qualidade do método de preparação do material pela aplicação de espectroscopia Raman (Figura 2) para identificação de picos característicos e microscopia óptica para a confirmação da ausência de buracos ou rasgos na malha.

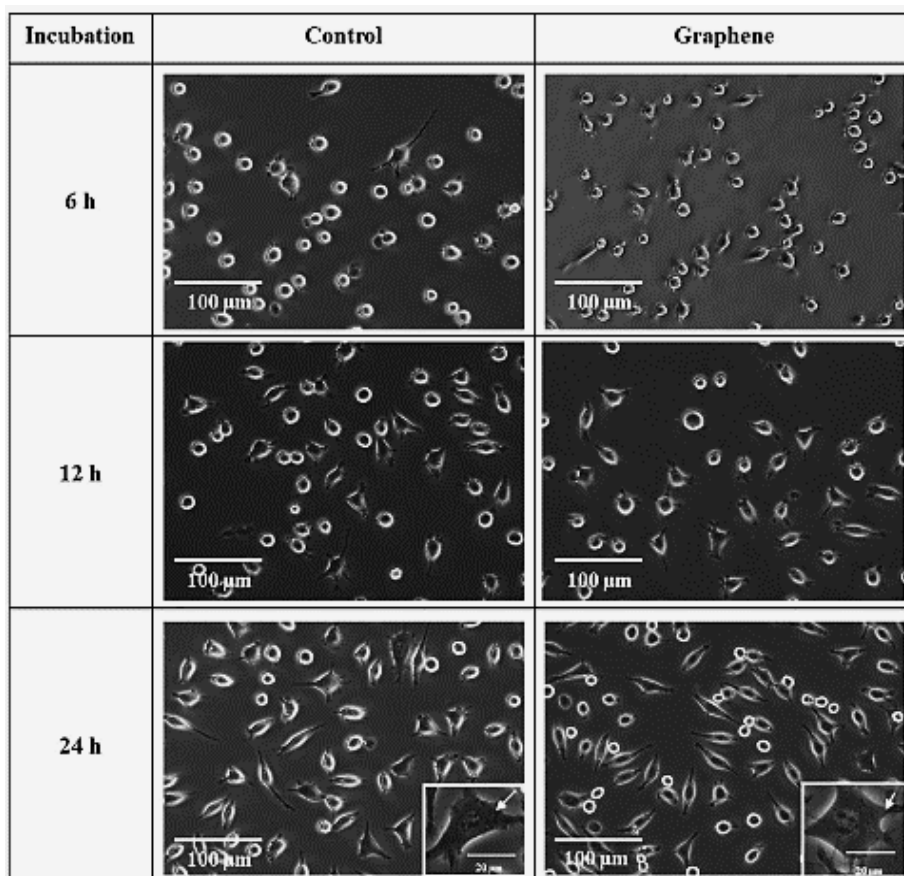
Figura 2 - Espectroscopia Raman para identificação de picos característicos do grafeno.



Fonte: Lasocka et al., 2018.

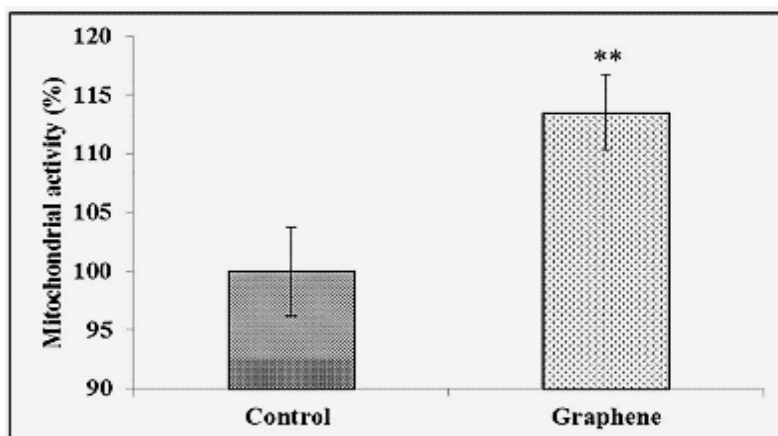
Fibroblastos derivados de tecido areolar e adiposo provenientes de ratos foram cultivados sobre uma superfície de grafeno e analisados segundo sua morfologia, viabilidade celular e proliferação. Em um período de 24 horas, relata-se que ocorreu a transição morfológica das células de um formato arredondado para um dito como “axial” (Figura 3). Ao final deste período também foi comprovada a viabilidade celular sob o critério de sobrevivência celular superior a 95 %, além de ter constatado que a proliferação celular em superfície de grafeno fora significativamente superior segundo a quantificação da atividade mitocondrial (Figura 4) (Lasocka et al., 2018).

Figura 3 - Comparação morfológica de fibroblastos "L929" cultivados em superfície de vidro (controle) e de grafeno por um período de 24h.



Fonte: Lasocka et al. 2018.

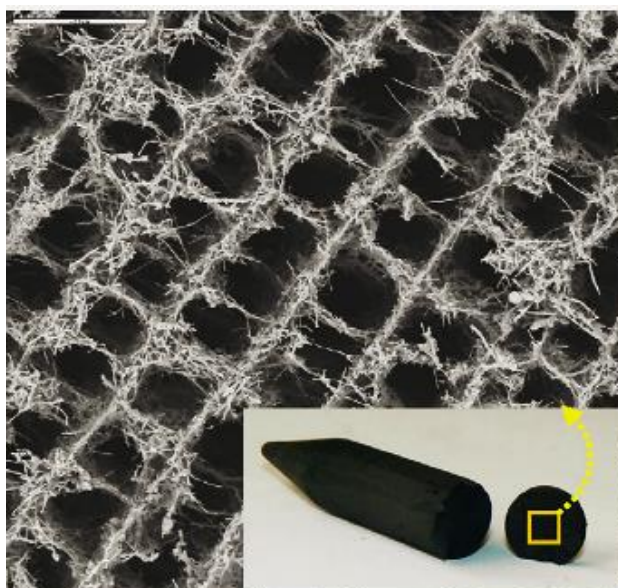
Figura 4 - Atividade mitocondrial de fibroblastos cultivados em superfície de vidro ou de grafeno. p-value < 0.01.



Fonte: Lasocka et al. 2018.

Idealmente, pretende-se utilizar os scaffolds para simular a matriz extracelular característica ao ambiente escolhido. O desenvolvimento de materiais porosos de rede interconectada pode promover o alojamento celular e promover a formação de novo tecido no local. Abarrategi et al. (2008) utilizaram scaffolds de nanotubos de carbono “multicelulares” (NCM) com uma pequena fração de quitosana em associação a mioblastos de ratos para seu estudo. O produto resultante deste processo foi observado por meio de microscopia eletrônica de varredura e pode ser visualizada na figura 5.

Figura 5 - Imagem de microscopia eletrônica de varredura dos nanotubos de carbono multicelulares. O segmento branco no canto superior esquerdo equivale a 20 μm .

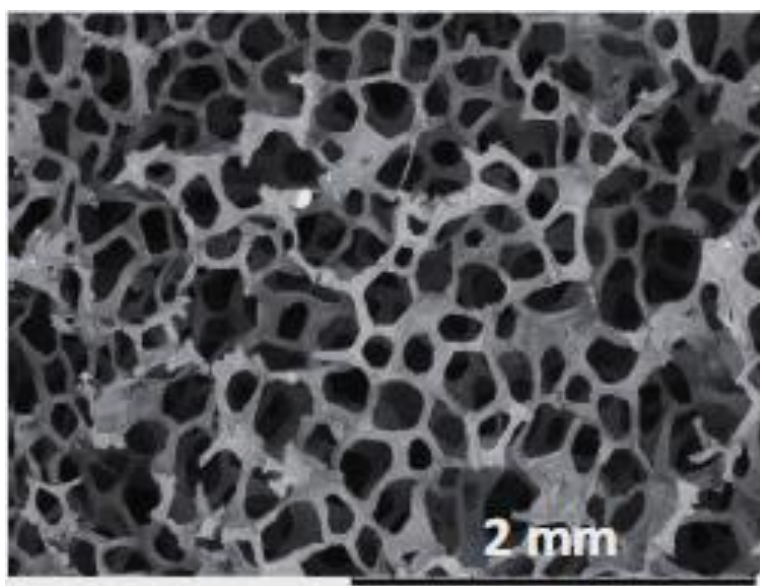


Fonte: Abarrategi et al., 2008.

Outra possibilidade de utilização do carbono como scaffold é na forma de espumas de carbono. Analogamente aos NCMs, é disponibilizado um ambiente tridimensional e poroso destinado à aderência celular por todo o volume do material. As espumas de carbono foram descritas por Chen et al. (2006) como um material similar a uma esponja de aspecto “leve” ($0,2$ a $0,8 \text{ g/cm}^3$), alta resistência térmica (até $3000 \text{ }^\circ\text{C}$ em atmosfera inerte) e mecânica (aproximadamente 20 MPa em compressão), extensa área superficial externa com rede aberta de poros e condutividade elétrica e térmica ajustáveis.

Uma estratégia para a produção das espumas foi a descrita por Jana et al. (2013), no qual impregnou-se sacarose ao longo de uma matriz de poliuretano de esponjas comerciais, ao passo em que este último foi volatilizado durante a carbonização, formando, ao final do processo, um ambiente tridimensional e poroso (figura 6). Observados os aspectos de praticidade e dos resultados no trabalho supracitado, optou-se pela inclusão desta metodologia em uma das seções do presente trabalho.

Figura 6 - Espuma de carbono produzido a partir de esponja doméstica e sacarose.



Fonte: Jana et al. (2013)

Até o presente momento, uma grande variedade de precursores, tanto naturais quanto sintéticos, foram utilizados na produção de scaffolds de carbono e mostraram resultados promissores, tais como a poliacrilonitrila (PAN), resinas fenólico-furânicas, resinas epóxi, carvão, extratos de N-metil-2-pirrolidona, piche de petróleo, de alcatrão, extratos de carvão hidrogenado, emulsões de estireno/divinilbenzeno, resinas fenólicas novolacas, dentre outros (Chen et al., 2006; Szeluga et al., 2018; Woodward et al., 2017). Dado que existe uma vasta diversidade de matérias-primas para a produção de materiais carbonosos, também se torna economicamente interessante a busca por precursores de custo cada vez mais reduzido.

O trabalho elaborado por Vandelli et al. (2004) e posteriormente incrementado por Ge et al. (2009) consistiu na síntese de microesferas orgânicas a partir da emulsão composta por uma solução aquosa de gelatina e óleo de semente de algodão. Contudo, dada a enorme variedade de óleos tanto vegetais quanto minerais utilizados em aplicações biológicas (Vandelli et al., 2004; Ge et al., 2009; Tanaka et al., 1963; Gumus et al., 2015), foram selecionadas algumas alternativas ao óleo de semente de algodão para serem submetidas ao mesmo trabalho experimental, com a motivação de que também poderiam apresentar propriedades interessantes à síntese de biomateriais.

2.3. Óleos vegetais e minerais como precursores de materiais carbonosos

2.3.1. Mineral

O trabalho no qual Vandelli et al. (2004) baseou a síntese de microesferas de gelatina foi proposto por Tanaka et al. (1963), que por sua vez utilizou o óleo mineral como componente da emulsão. O objetivo principal encontrado neste trabalho foi a elaboração de um sistema de liberação controlada de sulfanilamida e riboflavina. Como resultado, foram produzidos *micropellets* de diâmetro entre 0.3 a 0.5 mm.

A utilização destes precursores para o preparo da emulsão serviu de motivação para a sua inclusão neste trabalho.

2.3.2. Gérmen de Trigo

O óleo de gérmen de trigo (OGT) foi descrito por Gumus et al. (2015) como um óleo comestível rico em fitoquímicos, de propriedade antioxidante, e proteínas, além apresentar alguns benefícios para a saúde, tais como a redução dos níveis de plasma e colesterol no sangue (Kahlon, 1989). A substância também fora utilizada na fabricação de nanoesferas do complexo gérmen de trigo-aglutinina para a detecção de células cancerosas (Xie et al., 2007).

Por fim, Gumus et al. (2015) utilizou uma infusão de óleos de semente de cominho preto e gérmen de trigo para a produção de uma substância rotulada como “fito-nanoemulsão”, tal qual forneceu proteção contra radiação e melhorias no processo de cicatrização em testes *in vitro* com fibroblastos e hepatócitos.

Esta sinergia entre o óleo de gérmen de trigo e culturas celulares foi determinante na inclusão do material neste trabalho.

2.3.4. Cânhamo

Um dos registros da inclusão do óleo de cânhamo na ciência dos materiais foi a descrição de Quiles-Carrillo et al. (2017) para a melhoria de propriedades mecânicas de poli ácido láctico (PLA) injetado. Segundo os autores, a adição de até 10 % de óleo de cânhamo induziu um aumento na resistência ao impacto, módulo de elasticidade e tensão de ruptura do polímero, ao que foi explicado pela adição de ramificações e/ou reticulação das cadeias poliméricas por meio da reação entre os grupos anidrido maleico e hidroxila pertencentes ao óleo e ao PLA, respectivamente. Além disso, o aumento da tenacidade do material foi relacionado à dispersão micrométrica de gotas de óleo encontrada ao longo da matriz polimérica.

A apresentação de bons indicadores deste reagente na síntese e modificação de materiais também serviu de justificativa para a sua seleção neste trabalho.

2.4. Funcionalização de Superfícies

O caráter físico-químico da superfície dos biomateriais possui fundamental importância na adesão celular, visto que a funcionalização apropriada de superfícies pode promover e/ou regular a extensão e intensidade da adesão celular por meio da ligação entre receptores específicos de adesão, tais como as proteínas do grupo das integrinas e os terminais ativos da matriz extracelular (Bacakova et al., 2011)

A adesão celular, por sua vez, desempenha função não somente mecânica como também fisiológica na integração entre biomaterial e célula. Segundo Bacakova et al. (2011), há um papel central deste fator na regulação da proliferação celular e na transição entre o regime proliferativo e o de diferenciação celular. Não somente, relata-se que células dependentes de ancoragem, tais como fibroblastos e células-tronco em geral, não realizam a divisão e podem até submeter-se à apoptose caso não haja algum tipo de espalhamento pelo substrato. A correlação entre adesão celular e o achatamento de sua morfologia, portanto, torna-se evidente.

Entretanto, segundo o mesmo grupo, a proliferação e migração celular são otimizadas por meio de aderência celular em grau intermediário, ao passo em que um alto grau de adesão se correlaciona positivamente com a expressão de marcadores de diferenciação celular. Desse modo, a modulação apropriada da interface célula-biomaterial é dependente do tipo de tratamento de superfície adotado.

Duas simples estratégias para a funcionalização de superfícies foram descritas tanto por Muñiz et al. (2009) quanto por Takaoka et al. (2007), e envolvem a utilização de soluções de HNO_3 ou H_2O_2 para a inserção de grupos polares na superfície de carbonos ativados. Cada uma destas soluções possui um potencial oxidativo diferente e o estudo da influência de cada tratamento na adesão celular foi incluído neste trabalho.

2.5. Células-tronco Mesenquimais

Como células para associação ao biomaterial, foram utilizadas Células-tronco Mesenquimais (CTMs). A escolha de CTMs nesta estratégia tem como motivações a sua capacidade de regular a resposta imune e inflamatória do organismo e estimular a migração, proliferação e sobrevivência celular de suas adjacências via comunicação parácrina (Maxson et al., 2012). Também é importante destacar que o uso de biomateriais semeados com células tronco age em conjunto com a diminuição do uso de tecido saudável para sua implantação em locais lesionados, uma vez que é possível coletar CTMs de fontes comumente descartadas, tais como

o fluido sinovial e a gordura infrapatelar no joelho (também denominada gordura de Hoffa) (Fernandes et al., 2018), ou a polpa de dente decíduo (“dente de leite”) (Pinheiro et al., 2018) e diferenciá-las em diversos tipos celulares, tais como adipócitos, condroblastos e osteócitos. Com isso, é possível desenvolver soluções específicas a múltiplas situações (Aurrekoetxea et al., 2015).

Dentro do contexto da FLP, o osso a ser reconstruído é alveolar (Gimbel et al., 2007). De um ponto de vista estrutural, o tecido ósseo pode ser classificado como um material compósito anisotrópico com rede interconectada de poros que contém células ósseas (osteoblastos, osteócitos, osteoclastos, pré-osteoblastos, etc.), fibrilas de colágeno, biomoléculas (como as proteínas e os fatores de crescimento), hidroxiapatita e uma complexa rede de vascularização (Polo-Corrales et al., 2014).

Com esta presente heterogeneidade de estruturas, é possível adotar várias abordagens diferentes para projetar um material que mimetize este tecido, de forma a desenvolver terapias voltadas à regeneração óssea.

Pretende-se, então, elaborar e padronizar estratégias para a síntese de biomateriais baseados em carbono ativado, tais quais serão caracterizados pelas técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS) e Espectroscopia Raman.

2.6. Microscopia Eletrônica de Varredura

A Microscopia Eletrônica de Varredura, ou MEV, é uma das mais versáteis técnicas de observação a nível microscópico ou nanoscópico atualmente. Por meio de um feixe de elétrons incidido sobre o material, é possível detectar a emissão de elétrons de diferentes origens, e a informação carregada por cada um permite a obtenção de diversas características da amostra analisada. Dentre os principais tipos de emissão, estão os elétrons secundários (“secondary electron”), de baixa energia (< 50 eV), e os elétrons retroespalhados (“backscattering electron”) de maior energia (> 50 eV).

As informações transmitidas pelos elétrons secundários possuem estrita relação com o relevo da amostra e possuem resolução em torno de 3 a 5 nm. Ainda assim, por possuírem um livre caminho médio de 2 a 20 nm, só é possível detectar

os elétrons secundários muito próximos à superfície (Dedavid, Gomes e Machado, 2007, p. 12).

Em relação aos elétrons retroespalhados, afirma-se que as informações trazidas por este sinal refletem tanto o relevo da amostra quanto a composição química da amostra, ao qual este último é função no número atômico de elementos presentes dentro da região de penetração deste feixe (Dedavid, Gomes e Machado, 2007, p. 13).

2.7. Espectroscopia por Energia Dispersiva

A técnica conhecida como Espectroscopia por Energia Dispersiva ou Espectroscopia de Raios-X aproveita a incidência do feixe de elétrons oriundo do equipamento de MEV e lê a emissão de Raios-X pela amostra. Este tipo de sinal, por sua vez, decorre do retorno dos elétrons da amostra, anteriormente excitados pelo feixe de elétrons, ao seu estado de energia original. Este retorno emite Raios-X característicos aos átomos que sofreram tal processo. Em suma, portanto, a técnica EDS possui muita importância na caracterização de materiais, ao que permite uma rápida microanálise química semiquantitativa das amostras desejadas (MEE, 2019).

2.8. Espectroscopia Raman

A técnica conhecida como Espectroscopia Raman é descrita como uma análise química não-destrutiva que fornece informações detalhadas sobre a estrutura química, fases presentes e interações moleculares, tal qual baseia-se na interação das ligações químicas com a luz (Horiba, 2019).

A partir da incidência de um espectro de radiação laser de baixa potência sobre o material a ser analisado, são identificados dois fenômenos de espalhamento de luz: o elástico e o inelástico.

Boa parte da radiação espalhada pelo material ocorre de forma elástica, ou seja, com a mesma frequência (e conseqüentemente a mesma energia) da luz incidente,

e não fornece informações significativas a respeito do objeto analisado. Entretanto, em uma pequena parcela da radiação espalhada, nota-se uma diferença de energia em relação à incidente, tal qual é identificada como um decréscimo ou acréscimo de energia (espalhamento do tipo Stokes ou anti-Stokes, respectivamente). Este fenômeno foi primeiramente descrito pelo físico Chandrasekhara Venkata Raman em 1928 e, portanto, recebeu o nome de “efeito Raman”, e o espectro correspondente aos desvios de “espectro Raman” (de Faria, 2011; Kauffmann et al, 2019).

Segundo de Faria (2011), cada espécie química possui um espectro Raman característico devido à interação singular da luz incidente com os modos vibracionais dos átomos da substância em questão, o que serve como uma “impressão digital” da substância analisada. Sendo assim, por meio da identificação dos picos no espectro Raman, torna-se possível inferir sobre o perfil químico, geometria molecular, polimorfismos, contaminações, dentre outros aspectos acerca do material.

2.9. Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é um método popular na biologia celular que faz uso das interações entre células e luz para extrair uma série de informações sobre determinada população.

Por meio de três aspectos desta interação, com as denominações “Forward Scattered Light” (FSL), “Side Scattered Light” (SSL) e a emissão de fluorescência, caracteriza-se a população de acordo com tamanho, complexidade e marcadores específicos de superfície, respectivamente, e, assim, permitem a distinção entre vários tipos celulares (Antibodies-Online, 2013).

Neste trabalho, a citometria de fluxo foi utilizada para a identificação de CTMs segundo marcadores comumente apontados como identificadores de CTMs e o uso de controle negativo para a distinção entre esta população celular e células hematopoiéticas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Síntese de Microesferas de Carbono

A metodologia descrita a seguir, inspirada pela descrita por Ge et al. (2009), foi realizada de maneira idêntica para os óleos de germen de trigo (Peter Paiva), semente de algodão (Pazze), mineral (Peter Paiva) e cânhamo (Nutiva).

Dezoito gramas de gelatina hidrolisada em pó (Êxodo Científica) foram dissolvidos em 10 ml de água destilada a 60 °C durante 10 minutos em constante agitação. Sob mesmas condições, adicionou-se 120 ml de óleo gradativamente. Passados 10 minutos após a adição de óleo, as amostras foram colocadas em um banho a 5 °C durante 10 minutos e, posteriormente, aquecidas a até 90 ± 5 °C durante 2 horas. O processo de aquecimento foi feito por meio de placa de aquecimento com agitação magnética (MYLABOR).

As amostras foram então submetidas a uma temperatura de 250 °C por 8 horas em um forno mufla (Jung), com taxa de aquecimento a 10 °C.min⁻¹.

Em seguida, adicionou-se 100 ml de uma solução de H₂SO₄ (Química Moderna, P.A. A.C.S.) a uma concentração de 0,25 mol/l e temperatura ambiente, no qual repousou por 12 horas a 98 °C.

Por fim, em um forno tubular (Grion), aqueceu-se a amostra a até 900 °C por 2 horas, com rampa de aquecimento a 10 °C.min⁻¹ e em atmosfera de argônio.

Ambos os fornos esfriaram à temperatura ambiente.

Para análise, foi realizado MEV com o equipamento FEI Inspect F50, EDS com o Espectrômetro de Raios X EDS EDAX e a Espectrometria Raman com o Microscópio Confocal Raman LabRAM HR Evolution da Horiba Scientific a 532 cm⁻¹.

3.2. Síntese da Espuma de Carbono

Esta metodologia foi baseada na descrita por Jana et al. (2009).

2 g de sacarose (Açúcar refinado União) foi dissolvida em 10 ml de água destilada contendo 5 gotas de ácido nítrico (LS Chemicals, P.A. ACS 65 %). Esta solução foi despejada sobre 0,7 g de uma esponja convencional de limpeza doméstica (Cortag), recirculada algumas vezes para melhor distribuição pelo material, e a esponja impregnada foi posteriormente colocada em estufa a 120 °C durante 48 h. Outra esponja de mesma massa inicial sem o tratamento com a solução de sacarose foi submetida ao aquecimento como controle.

Após esta etapa, a amostra impregnada foi cortada para melhor encaixe no cadinho do forno (figura 7) e carbonizadas a 900 °C durante 1h, com rampa de aquecimento a 3 °C.min⁻¹ em atmosfera inerte de argônio.

Figura 7 - Preparação para a carbonização da esponja impregnada.



Fonte: Autoral

Ao final da síntese, realizou-se MEV e EDS com os mesmos equipamentos anteriormente descritos.

3.3. Funcionalização de superfície

A sequência de procedimentos descrita foi realizada tanto sobre as microesferas quanto para a espuma de carbono e baseia-se na descrição feita por Muñiz et al. (2009).

Para a funcionalização dos biomateriais, foram utilizadas duas estratégias que visam a oxidação superficial: tratamento com HNO_3 a quente e tratamento com H_2O_2 .

3.3.1. Tratamento com HNO_3 a quente

Uma solução de ácido nítrico foi preparada utilizando uma solução mãe de HNO_3 a 65% (LS Chemicals, P.A. ACS). Para obter a concentração de 5 mol/l, diluiu-se 35 ml da solução mãe com a adição de 65 ml de água e a mistura foi submetida à temperatura de 90 °C.

Uma vez atingida esta temperatura, mergulharam-se as amostras individualmente, no qual permaneceram nestas mesmas condições experimentais durante 3 h (figura 8, página 19).

Após este intervalo de tempo, todas as amostras foram submetidas à filtração a vácuo e lavagem a quente (70 °C, 20 minutos) duas vezes.

Finalmente, as amostras foram secas e armazenadas em estufa a 100 °C por um período superior a 48h.

Figura 8 - Tratamento das amostras com HNO₃ a quente.



Fonte: Autoral

3.3.2. Tratamento com H₂O₂

A solução de peróxido de hidrogênio foi preparada utilizando uma solução mãe de H₂O₂ a 30% (Synth, P.A. ACS). 320 ml de solução de H₂O₂ a 1,5 mol/l foi obtida pela mistura de 50 ml da solução mãe com 270 ml de água destilada.

Este tratamento foi realizado à temperatura ambiente por meio da simples imersão individual das amostras na solução descrita (figura 9, página 20). Com um volume inicial de 20 ml, adicionou-se este mesmo volume a cada hora até completar o total de 80 ml, e o processo pode ser visualizado na figura 9. Segundo Muñiz et al. (2009), a adição é feita de maneira fracionada para atrasar a decomposição espontânea do peróxido.

Uma hora após a última adição, foi realizada a filtragem a vácuo e lavagem a quente com água destilada (70 °C, 20 minutos) duas vezes.

Ao final, as amostras também foram secas e armazenadas em estufa a 100 °C.

Figura 9 - Tratamento das amostras com H₂O₂.



Fonte: Autoral

Ao final, realizou-se MEV e EDS com os mesmos equipamentos previamente especificados.

3.4. Expansão Celular

Todos os procedimentos adotados para o processamento de células e biomateriais foram realizados no Centro de Processamento Celular do Hospital Sírio-Libanês sob condições de Boas Práticas de Manipulação Celular e sob supervisão da Dra. Daniela Franco Bueno.

A preparação do meio denominado como basal consistiu em uma solução de Dulbecco's Modified Eagle Medium/NutrientMixture F-12 (DMEM/F-12; Gibco Invitrogen) suplementado com 15 % de soro fetal bovino (SFB, HyClone Standard Fetal Bovine Serum, GE Healthcare, USA), 1 % penicilina, 1 % streptomina e 2 % Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids (MEM-NEAA, ThermoFisher Scientific).

Para a diferenciação osteogênica, foi utilizado meio de cultura específico com fatores de crescimento StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit (Gibco Invitrogen, Grand Island, NY).

Para a expansão, as CTMs de polpa de dente de leite, anteriormente conservadas em condições de criogenia a aproximadamente $-212\text{ }^{\circ}\text{C}$, foram descongeladas e mantidas em meio basal a 37°C em atmosfera umidificada a 5% de CO_2 , com troca de meio realizada três vezes por semana. Ao atingir confluência, em um intervalo de 2 a 3 dias, as células foram lavadas em Phosphate Buffered Saline (PBS, pH 7,4, Thermo Fisher Scientific), coletadas sob tratamento com tripsina (TrypLE™ Express, Thermo Fisher Scientific, USA), e replaqueadas por meio de diluição 1:2 para a primeira subcultura. Todas as passagens subsequentes foram realizadas da mesma maneira. Ao final da expansão, na quinta passagem, realizou-se o teste de viabilidade celular com o contador de células Countess II Automated Cell Counter (Thermo Fisher Scientific). A distinção entre células vivas e mortas é realizada por meio da coloração por Azul de Tripán, que é impermeável à membrana celular. Dessa forma, células com a membrana celular comprometida adquirem coloração azulada e são identificadas pelo equipamento como mortas (Creative Bioarray, 2019). Outra importante informação fornecida pelo equipamento é a distribuição de tamanho da população celular, mensurada pelo sistema óptico do equipamento.

3.5. Caracterização celular por citometria de fluxo

A imunofenotipagem foi realizada por meio do equipamento FACSCalibur (BD, Becton Dickinson Franklin Lakes, NJ) e analisado no programa próprio CellQuest (BD, Becton Dickinson Franklin Lakes, NJ). As células obtidas das culturas celulares em uma concentração 1×10^5 células em $100\text{ }\mu\text{l}$ foram marcadas com os anticorpos monoclonais: CD29-PE, CD44-PE, CD90-FITC e CD105-PE, e negativa para CD34-FITC e CD45-FITC; Isotipos IgG-FITC e IgG-PE (BD Bioscience, Becton Dickinson Franklin Lakes, NJ), por 15 minutos em temperatura ambiente no escuro; depois foram adicionados $500\text{ }\mu\text{l}$ de PBS com 3% SFB, e incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente no escuro.

Primeiramente, foram analisadas as células sem marcação, a partir dessa análise foram utilizados os isotipos específicos, para o anticorpo utilizado na reação de marcação monoclonal, como controle negativo da reação.

3.6. Planejamento de grupos amostrais

Oito tipos de biomateriais foram incluídos, identificados com base no tipo de óleo precursor, no caso das microesferas, ou se tratava da espuma de carbono, e o tratamento de superfície utilizado e estão melhor detalhados na tabela 1.

Tabela 1 - Classificação dos grupos amostrais de acordo com óleo precursor ou espuma e respectivos tratamentos de superfície.

Material	Tratamento superficial	
	HNO ₃	H ₂ O ₂
Cânhamo	C-HNO ₃	C-H ₂ O ₂
Semente de Algodão	SA-HNO ₃	SA-H ₂ O ₂
Gérmen de Trigo	GT-HNO ₃	GT-H ₂ O ₂
Espuma	ESP-HNO ₃	ESP-H ₂ O ₂

Além disso, foram criados grupos controle para a viabilização de diferentes análises comparativas a respeito da interação entre biomaterial, CTMs e os meios de cultura e diferenciação.

São eles: (1) biomaterial e meio de diferenciação, (2) biomaterial e meio basal, (3) CTMs e meio de diferenciação e (4) CTMs e meio basal.

Tais grupos foram submetidos às mesmas rotinas de cultivo celular descritas neste trabalho.

3.7. Plaquemamento de CTMs nos biomateriais

Todos os biomateriais foram submetidos à autoclave (Cristófoli, Vitale Class), feita por meio da submissão dos materiais a esterilização úmida a uma faixa de temperatura entre 129 a 132 °C durante 20 minutos e adicionais 15 minutos de exposição à radiação ultravioleta (Philips, 253,7 nm, 30 W).

Para o plaqueamento das CTMs sobre as amostras, prepararam-se previamente placas de cultura celular de 6 poços com solução de albumina humana a 5% deixadas *overnight* em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. O tratamento das placas de cultura com albumina visa evitar a aderência de CTMs no fundo dos poços da placa e, conseqüentemente, o enviesamento das análises posteriores.

Após esse período, aspirou-se o excesso de albumina e posicionaram-se os biomateriais nos poços, que por sua vez foram tratados com 50 µl de soro fetal bovino puro em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ por 30 minutos. Com este procedimento, pretende-se aumentar a retenção de células na superfície do material. A massa aproximada de cada amostra foi cerca de 10 mg.

O excesso de soro foi retirado e, por fim, foram adicionados 100 µl da suspensão celular contendo cerca de 1×10^5 CTMs por amostra. As placas foram armazenadas em estufa sob as mesmas condições anteriormente citadas por 1 hora. Em seguida, foram adicionados 2 ml de meio basal em cada poço e armazenados em estufa por 12 horas.

Por fim, para os grupos amostrais destinados à análise com meio de diferenciação, houve a substituição do meio basal pelo meio de diferenciação osteogênico. Ambos os meios de cultura foram renovados a cada 2 dias durante um período de 14 dias.

Foram utilizados os rótulos previamente especificados na tabela 1 e a adição de uma letra ao final. Grupos terminados em “D” representam a associação entre biomaterial e CTMs imersos em meio de diferenciação osteogênico; terminados em “B” refere-se à mesma associação em meio basal; terminados em “D-“, ao biomaterial sem CTMs imerso em meio de diferenciação e “B-“, ao biomaterial sem CTMs imerso em meio basal. Adicionalmente, os grupos controle positivo e negativo foram representados por “Diff” e “Basal” nesta ordem e são compostos por

CTMs sem os biomateriais, mantidas em meio de diferenciação e basal respectivamente.

3.8. Preparação para Microscopia Eletrônica de Varredura

A preparação dos biomateriais com as CTMs consistiu em um processo de três partes: fixação, desidratação e recobrimento.

A fixação consistiu na imersão dos biomateriais plaqueados em 2 ml de solução de glutaraldeído a 0,01 %, ao qual foram deixados à temperatura ambiente por 1 hora e armazenados em refrigerador a 4 °C por um período superior a 36 horas.

Em seguida, aspirou-se a solução e adicionou-se 2 ml de solução de 4 % formaldeído à temperatura ambiente por 30 minutos.

Ao final, retirou-se a solução anterior e foi iniciada a etapa de desidratação.

O processo de desidratação foi feito por meio da adição de soluções aquosas de etanol a concentrações crescentes. Cada adição foi feita com tempo de repouso de 15 minutos, exceto à solução de etanol puro, que permaneceu até a preparação para a etapa de recobrimento. Ao final de cada período, retirou-se completamente a solução de etanol da amostra.

As concentrações utilizadas foram 50 %, 70 %, 95 % e 100 %, nesta ordem.

A observação por MEV foi viabilizada pela fixação das amostras em um porta-espécime metálico utilizando adesivo de carbono com posterior recobrimento com uma fina camada de ouro por meio do processo de vaporização sob vácuo no equipamento Balzers SCD 050 Sputter Coater. O equipamento utilizado para MEV foi o mesmo anteriormente mencionado.

3.9. Quantificação de Matriz Óssea

Após 14 dias em condições de cultivo celular, foi retirado o meio de diferenciação ou o meio basal das amostras. Todos os grupos foram lavados

duplamente com PBS e fixados em solução de etanol a 70 % por 30 minutos. Após este intervalo, foi feita a remoção do etanol e a adição de solução de Alizarin Red S (pH 4,2, Sigma-Aldrich) a 0,2 %. A coloração permaneceu em contato com as amostras durante 30 minutos sob agitação constante, seguido de lavagem com PBS e adição de 500 µl de solução aquosa de 10 % ácido acético e 20 % metanol, também sob agitação por 15 minutos.

Por fim, foram plaqueados 100 µl em triplicata da fase líquida de cada amostra em uma placa de 96 poços e encaminhados à quantificação de absorbância a 450 nm. O procedimento foi realizado por meio do leitor modular de absorbância TECAN Infinite M200 Pro, e software Magellan.

3.10. Análise estatística da quantificação da absorbância

A comparação entre os grupos foi feita por meio do teste ANOVA de uma via (One-Way ANOVA) e o teste de múltiplas comparações de Dunnett com o auxílio do programa GraphPad Prism 7.04.

4 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

4.1. Preparação das microesferas

Os resultados da primeira parte da síntese de microesferas estão descritos a seguir.

Particularmente à utilização de óleo mineral, houve relativa dificuldade na padronização de resultados da primeira etapa de síntese (figura 10) e, visando o bom cumprimento do cronograma de atividades, os materiais derivados deste precursor foram encaminhados a somente uma análise, a espectroscopia Raman, após a regularização da metodologia de síntese. Em momentos posteriores, prevê-se a repetição deste procedimento de modo a obter melhor regularidade de resultados.

Em exceção ao óleo mineral, todas as amostras desta abordagem apresentaram maior facilidade de manuseio e aspecto visual semelhante, com morfologia porosa e coloração negra (figuras 11, 12 e 13). Importante notar que a execução deste protocolo resultou na coalescência parcial das microesferas, criando assim uma estrutura tridimensional e porosa que facilitou a manipulação posterior na etapa de integração com CTMs.

Figura 10 - Emulsão feita a partir do óleo mineral após tratamento a 90 °C.



Fonte: Autoral

Figura 11 - Emulsão GT após tratamento térmico a 250 °C e filtragem à vácuo.



Fonte: Autoral.

Figura 12 - Emulsão C após tratamento térmico a 250 °C e filtragem à vácuo



Fonte: Autoral

Figura 13 - Emulsão SA após tratamento térmico a 250 °C e filtragem à vácuo.



Fonte: Autoral

4.2. Carbonização das microesferas

Todas as amostras foram pesadas em período anterior e posterior à carbonização e os dados estão dispostos no gráfico 1 (página 29).

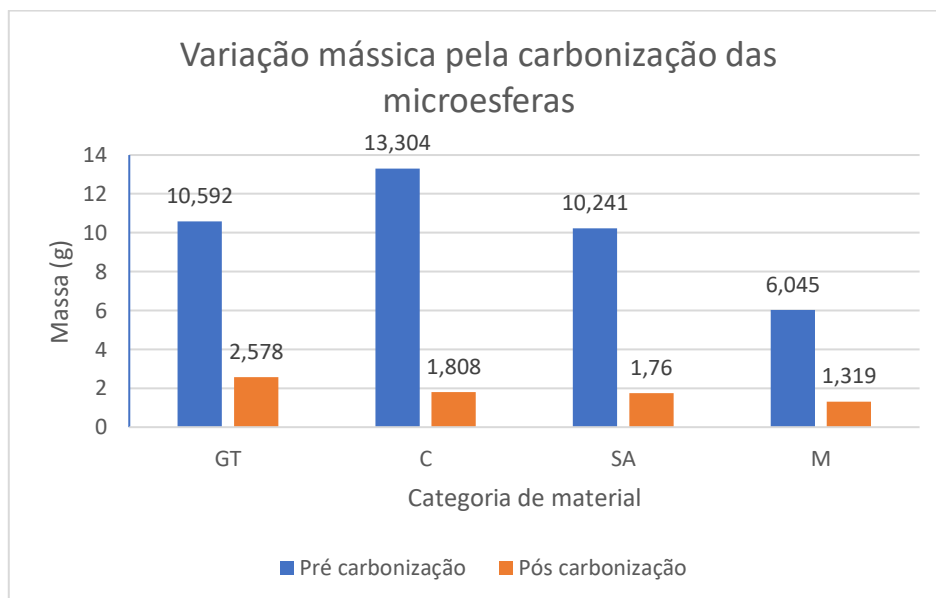
Segundo o obtido, as perdas de massa foram de 75,66 % para microesferas derivadas de óleo de gérmen de trigo (GT), 86,41 % para óleo de cânhamo (C), 82,81 % para óleo de semente de algodão (SA) e 78,18 % para óleo mineral (M).

Ge et al. (2009), por meio de curva termogravimétrica, reportou uma redução de massa de cerca de 70 %, tal qual foi explicada pela perda inicial de umidade, seguida de degradação proteica da gelatina e emissão de voláteis. O dado sobre a massa remanescente ao final da termogravimetria foi interpretado como a fração mássica de carbono.

Importante notar que, no trabalho supracitado, houve evidente diferença entre as curvas termogravimétricas entre as esferas tratadas ou não com ácido (figura 14). Em torno de 900 °C, nota-se que as esferas não tratadas apresentaram perda

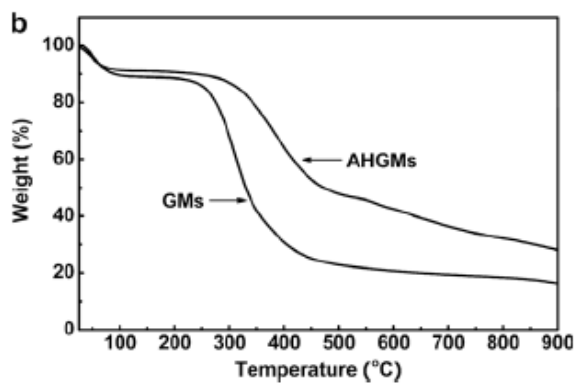
maior que 80 % da massa inicial, que coincide com os valores encontrados neste trabalho.

Gráfico 1 - Perda de massa devido à carbonização das microesferas. Legenda: Microesferas de óleo de Gérmen de Trigo (GT), de Cânhamo (C), de Semente de Algodão (SA) e Mineral (M)



Fonte: Autoral

Figura 14 - Curva termogravimétrica de microesferas tratadas (AHGM) e não tratadas com ácido (GM).



Fonte: Ge et al. (2009)

4.3. Espectroscopia Raman

Os espectros Raman das microesferas estão disponibilizados abaixo. Ao que se pode observar, todas as amostras analisadas apresentaram picos com o mesmo deslocamento Raman, salvo a diferença de intensidade.

Em comparação ao obtido por Ge et al. (2009) (gráfico 2 e figura 15), nota-se que, em ambas as espectroscopias, foram identificadas as bandas conhecidas como D e G (Ge et al., 2009; Hodkiewicz, 2010), situadas em torno de 1350 e 1582 cm^{-1} , respectivamente.

A interpretação dada por Ge et al. foi que, ao encontrar uma razão de intensidade entre os picos D e G de 0,98, seria possível afirmar que há uma quantidade significativa de carbono amorfo na microestrutura de suas microesferas.

Tal interpretação é apoiada por Hodkiewicz (2010), que explora de forma mais detalhada a origem de cada um dos picos típicos encontrados no espectro Raman de carbonos.

Primeiramente, a banda de denominação G associa-se ao desvio provocado pelas ligações do tipo sp^2 entre átomos de carbono, e pode ser utilizado para a distinção entre o diamante e outras estruturas carbonosas, tais como o grafite, grafeno e nanotubos de carbono a nível molecular (Hodkiewicz, 2010).

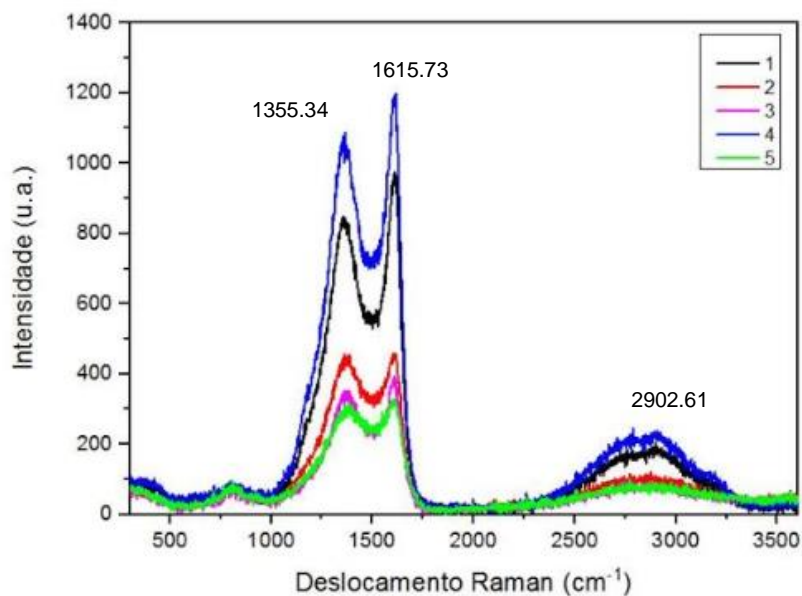
A banda denominada como D está associada a um modo vibracional híbrido encontrado nas bordas do grafeno e pode ser interpretada como um indicador de desordem na microestrutura (Hodkiewicz, 2010).

Sendo assim, a razão de intensidade entre picos D e G é justificadamente interpretada como um indicador da fração de desordem microestrutural presente nas amostras e que, no presente trabalho, apresentaram valores ligeiramente inferiores aos encontrados por Ge et al. (2009), indicando menor desordem microestrutural, e estão indicados na tabela 2.

Por fim, nota-se a presença de um pico largo em torno de 2900 cm^{-1} , tal qual foi apontado como um indicador da presença de ligações carbono-hidrogênio (Renishaw, 2019).

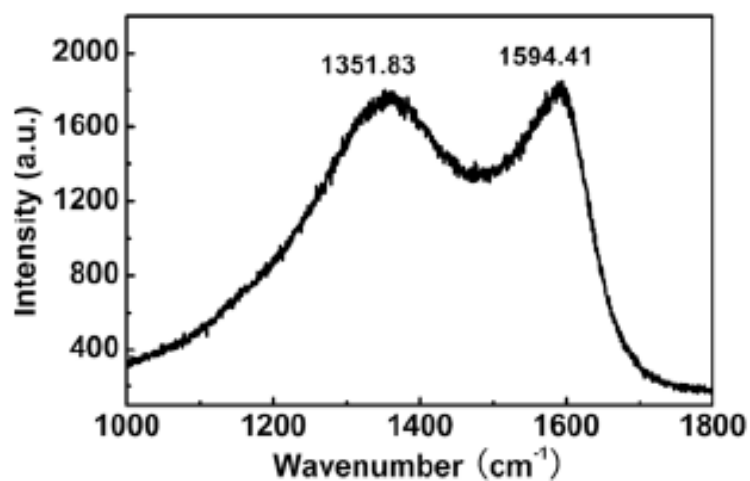
Gráfico 2 - Espectro Raman das microesferas. Os números indicados próximos ao gráfico são os números de onda correspondentes ao deslocamento Raman da amostra 4. Legenda:

1 - Gérmen de trigo sem tratamento em solução de H_2SO_4 ; 2 - Semente de algodão; 3 - Mineral; 4 - Cânhamo; 5 - Gérmen de trigo com tratamento em solução de H_2SO_4 .



Fonte: Autoral

Figura 15 - Espectro Raman das microesferas sintetizadas por Ge et al. (2009).



Fonte: Ge et al. (2009)

Tabela 2 - Relação de intensidade dos picos D e G das microesferas. A identificação das amostras foi feita da mesma maneira do gráfico 2.

Amostra	I(D) (1355.34 cm ⁻¹)	I(G) (1615.73 cm ⁻¹)	I(D)/I(G)
1	968	1081	0,89
2	515	542	0,95
3	404	457	0,88
4	1206	1329	0,91
5	356	404	0,88

Fonte: Autoral

4.4. Preparação da espuma

Observando a figura 16 (página 33), percebe-se que poucas horas de estufa são suficientes para a mudança de aspecto da esponja impregnada com solução de sacarose, dada a coloração marrom e o surgimento de pequenas bolhas na superfície adquiridos ao longo do processo.

Após o período de 48 horas, nota-se que não houve grande distinção entre esponja impregnada e grupo controle (figura 17 e 18, páginas 33 e 34). Sendo assim, as alterações descritas anteriormente podem ser seguramente atribuídas à aderência de sacarose por toda a extensão da matriz esponjosa original. De acordo com Jana et al. (2013), a exposição deste sistema à temperatura de 120 °C ocasiona a polimerização e desidratação da sacarose, e tem como produto uma resina viscosa aderente à esponja homogeneamente distribuída.

Figura 16 - Esponja impregnada com solução de sacarose (ao fundo) e controle após 1 h em estufa a 120 °C.



Fonte: Autoral

Figura 17 - Esponja impregnada após 48h em estufa a 120 °C.



Fonte: Autoral

Figura 18 - Grupo controle da esponja após 48h em estufa a 120 °C.



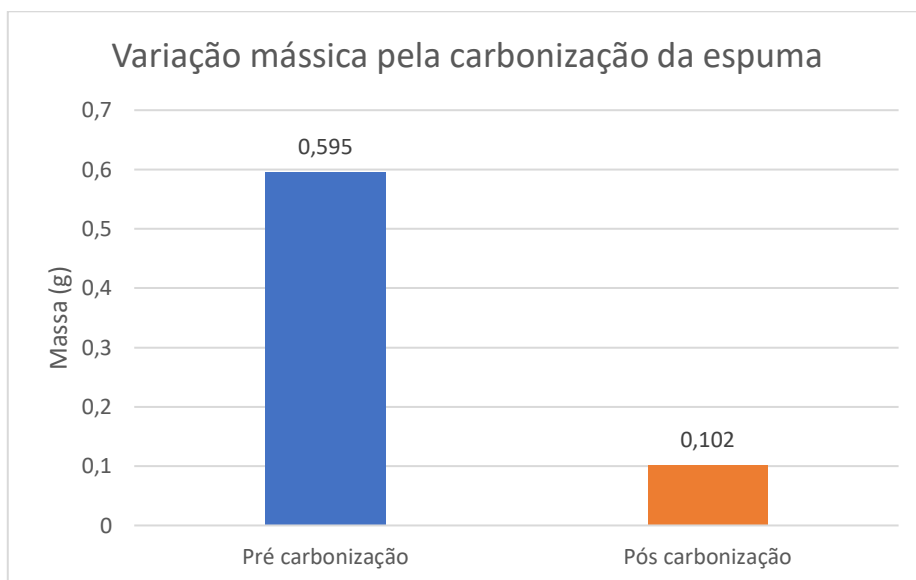
Fonte: Autoral

4.5. Carbonização da espuma

Ao comparar a massa de amostra em momento pré-carbonização com o pós-carbonização, foi encontrada uma perda mássica de 82,86 %. Além disso, houve grande contração do volume inicial, ilustrada pelo gráfico 3 e figura 19 (página 35).

Segundo Jana et al. (2013), utiliza-se a matriz da esponja, composta basicamente de poliuretano, como material de sacrifício. Ou seja, boa parte da estrutura tridimensional encontrada após a carbonização é proveniente da sacarose previamente impregnada na esponja. Com isso, deduz-se que a grande perda de massa encontrada é justificada principalmente pela volatilização da matriz de sacrifício, além de emissão de voláteis pertencentes à sacarose.

A redução de volume relatada por Jana et al. foi de 25 % para uma esponja impregnada com uma solução a 0,075 g de sacarose para 10 ml de água, mas não houve maior detalhamento sobre a contração com maiores concentrações de sacarose, apenas que a haveria de forma mais intensa.

Gráfico 3 - Perda de massa devido à carbonização da esponja impregnada.

Fonte: Autoral

Figura 19 - Alteração morfológica ocorrida após a carbonização da esponja impregnada.

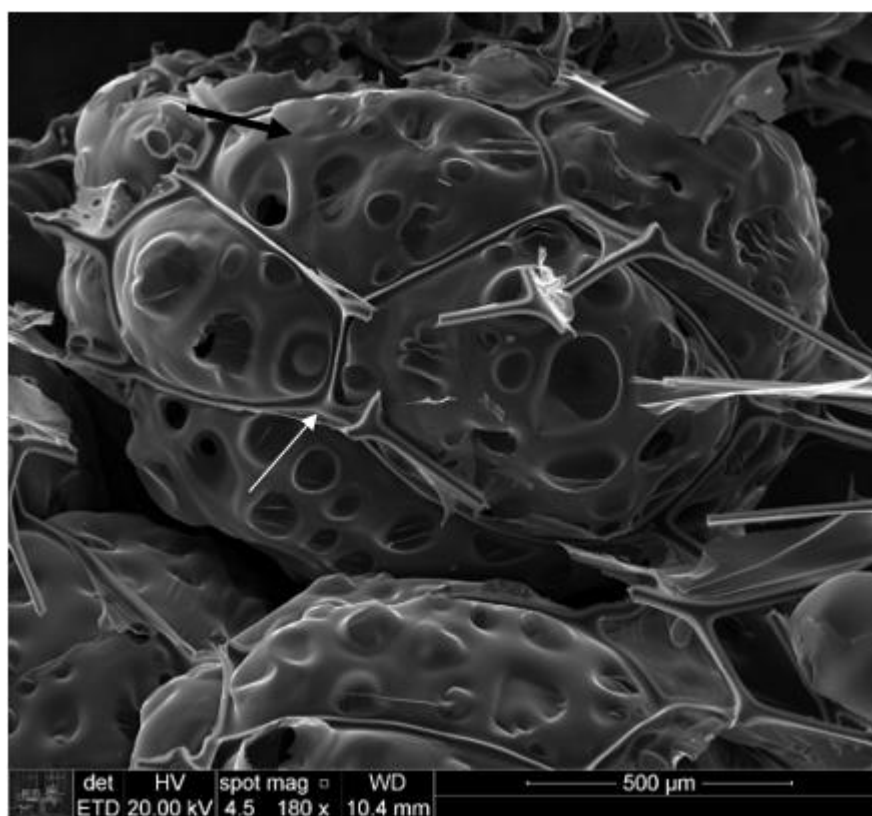
Fonte: Autoral

O aspecto microscópico da espuma de carbono está exibido na figura 20, página 36. Nota-se que, diferentemente de Jana et al. (2013), houve formação de duas fases de morfologia distinta, ao que, indicado pela seta branca, possui maior similaridade com o encontrado pelos outros autores (fase reticulada) e, indicado pela seta preta, identifica-se uma estrutura esférica repleta de poros que poderia

ser explicada pela sacarose em excesso e não aderente à matriz da esponja (fase esférica). Visa-se, futuramente, a utilização de uma matriz de maior área superficial, que ofereceria mais substrato para a aderência de sacarose e, conseqüentemente, menor formação de bolhas.

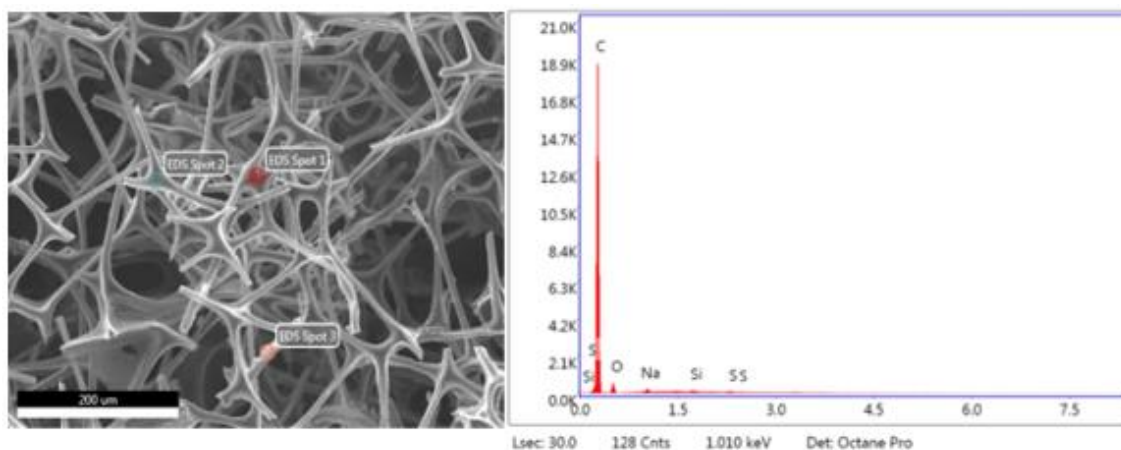
Mesmo assim, não foi observada nenhuma mudança significativa na composição química entre as duas fases, indicado pela análise por EDS feita separadamente (figuras 21 e 22, página 37).

Figura 20 - MEV da espuma de carbono após carbonização. Duas fases distintas estão indicadas pelas setas branca e preta.



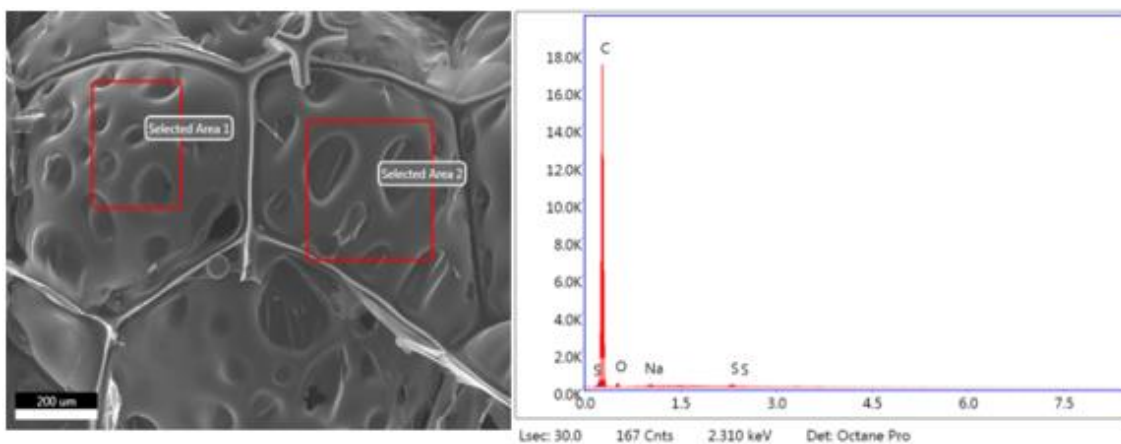
Fonte: Autoral

Figura 21 - Análise por EDS da fase reticulada da espuma de carbono. Anexo 1.



Fonte: Autoral

Figura 22 - Análise por EDS da fase esférica da espuma de carbono. Anexo 2.



Fonte: Autoral

4.6. Funcionalização de superfície

Após a carbonização das amostras, foi observada, sob avaliação visual, baixa afinidade superficial (molhabilidade) para meios aquosos, tais como o meio basal e o soro fetal bovino. Com isso, decidiu-se como necessária a investigação de protocolos de funcionalização de superfície, que elevariam a afinidade dos biomateriais aos meios anteriormente citados e, conseqüentemente, melhorariam a retenção de CTMs ao longo do volume das amostras.

A massa das amostras em momento anterior e posterior ao tratamento de superfície foi quantificada e está exibida na tabela 3, página 38. O decréscimo de

massa encontrada em todas as amostras pode ser explicado pelo processo de filtragem realizado duplamente para a remoção de contaminações, ao que parte das amostras ficaram retidas no filtro.

Por meio das micrografias por MEV, é possível notar que algumas amostras adquiriram manchas, indicadas pelas setas em branco (figuras 23, 25, 33 e 35). Em combinação com a análise de EDS, é possível afirmar que isso se deve à oxidação ou contaminação puramente superficial, pois não foi detectada nenhuma alteração na composição química. Não somente, em algumas amostras, houve a deposição de alguns artefatos provavelmente oriundos do processo de secagem ou do procedimento de funcionalização de superfície (figura 25). O restante das análises EDS está disponível nas figuras 24, 26, 29, 31, 33, 35, 37 e 39, e indicam que a composição química dos biomateriais consistiu em basicamente carbono e oxigênio.

Adicionalmente, em relação à micrografia da amostra C-H₂O₂ (figura 27), é possível identificar uma série de microesferas em processo intermediário de coalescência, dada a topografia rugosa encontrada. Em um momento anterior à funcionalização de superfície também foi possível encontrar morfologia semelhante (figura 28), o que permite afirmar que não há relação entre a formação desta estrutura e o processo de funcionalização.

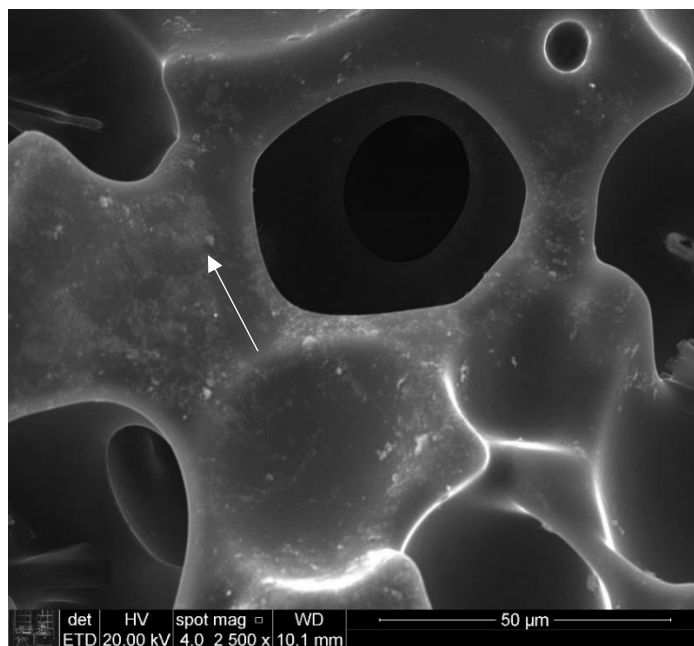
Por fim, as amostras ESP-H₂O₂, SA-HNO₃ e ESP-HNO₃ não apresentaram alterações perceptíveis (figuras 30, 32 e 38), salvo as pequenas fraturas encontradas na última.

Tabela 3 - Alteração de massa das amostras antes e depois da funcionalização de superfície.

Material	H ₂ O ₂		HNO ₃	
	Antes (g)	Depois (g)	Antes (g)	Depois (g)
GT	0,518	0,507	0,510	0,433
SA	0,510	0,492	0,499	0,476
C	0,470	0,443	0,487	0,460
ESP	0,064	0,056	0,080	0,063

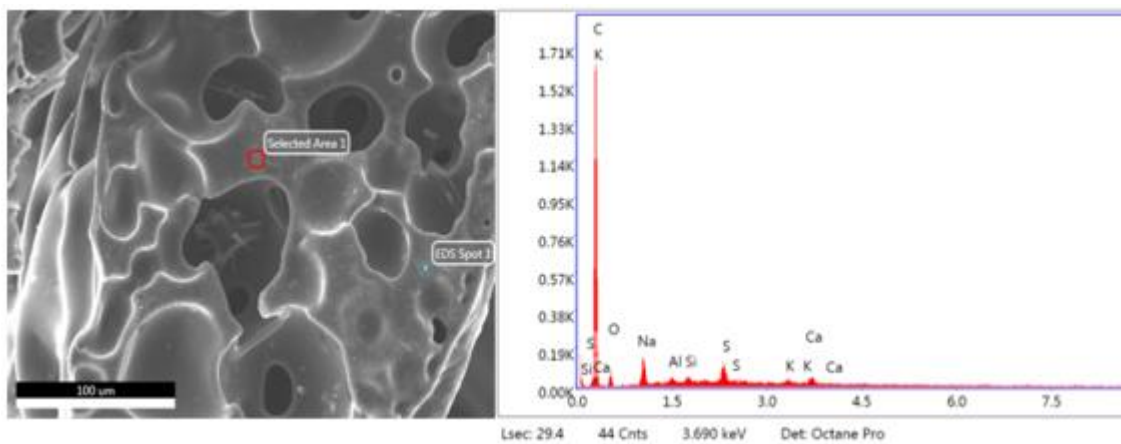
Fonte: Autoral

Figura 23 - Micrografia obtida por MEV da amostra SA tratada com H_2O_2 .



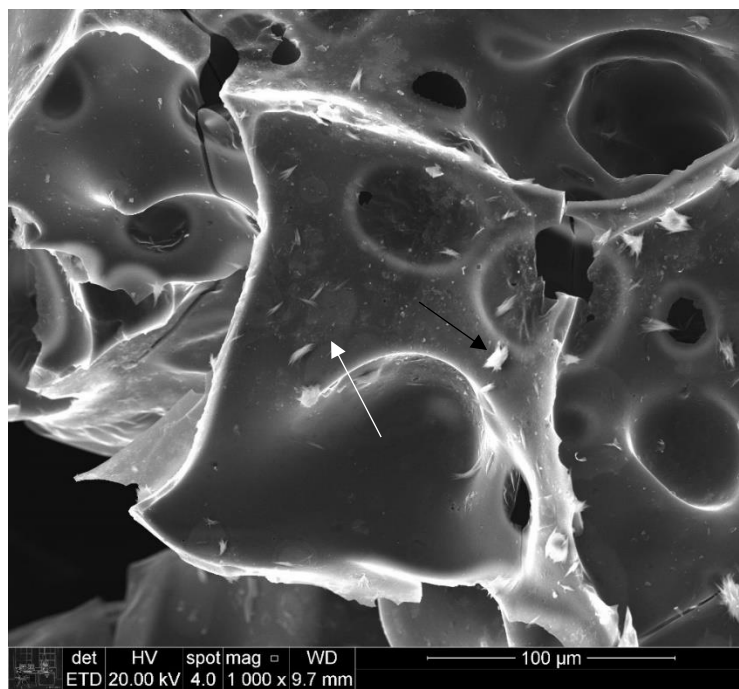
Fonte: Autoral

Figura 24 - Análise por EDS da amostra SA tratada com H_2O_2 . Anexo 3.



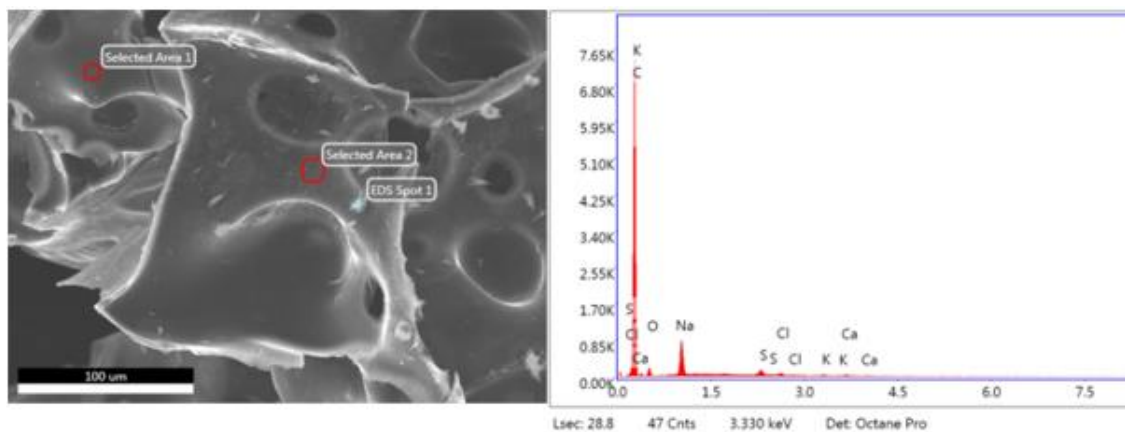
Fonte: Autoral

Figura 25 - Micrografia obtida por MEV da amostra GT tratada com H_2O_2 .



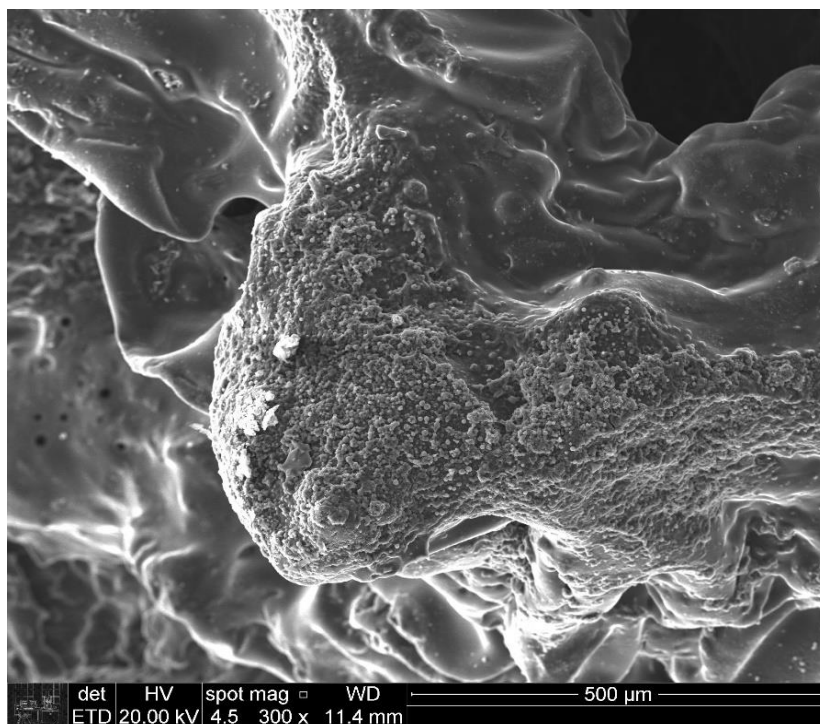
Fonte: Autoral

Figura 26 - Análise por EDS da amostra GT tratada com H_2O_2 . Anexo 4.



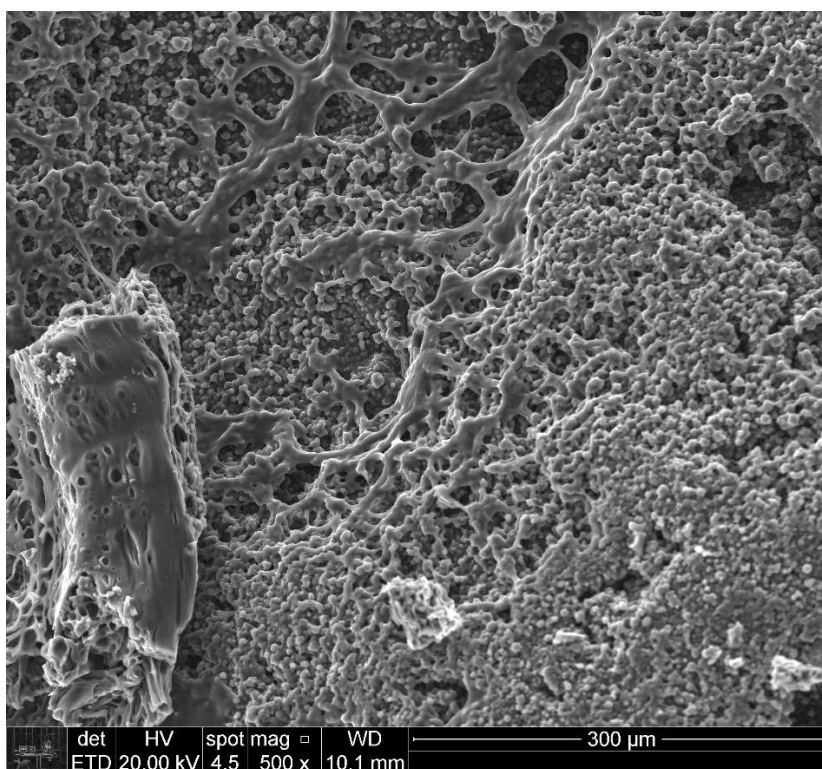
Fonte: Autoral

Figura 27 - Micrografia obtida por MEV da amostra C tratada com H_2O_2 .



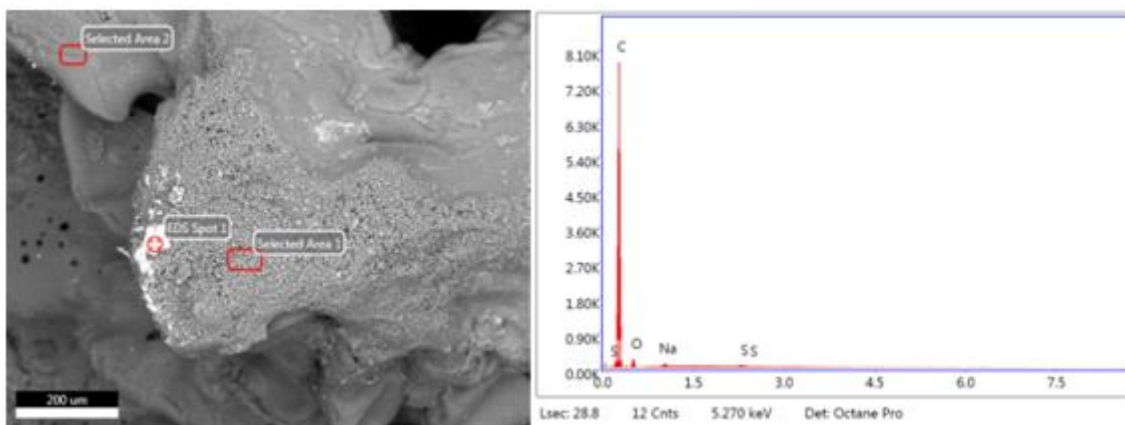
Fonte: Autoral

Figura 28 - Micrografia obtida por MEV da amostra C anterior à funcionalização de superfície.



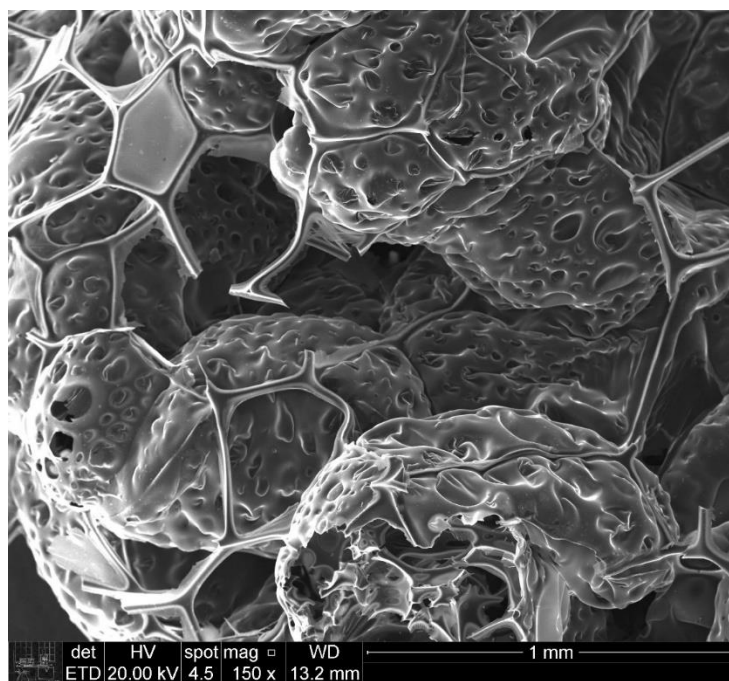
Fonte: Autoral

Figura 29 - Análise por EDS da amostra C tratada com H_2O_2 . Anexo 5.



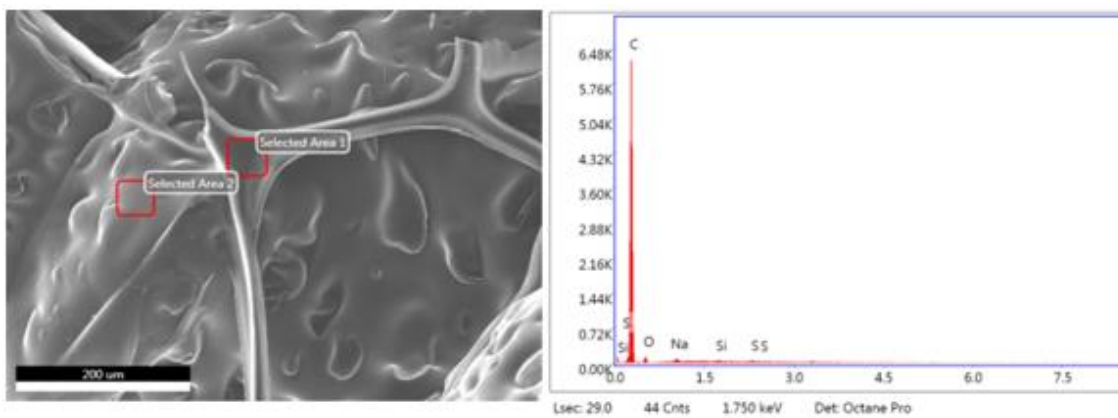
Fonte: Autoral

Figura 30 - Micrografia obtida por MEV da amostra ESP tratada com H_2O_2 .



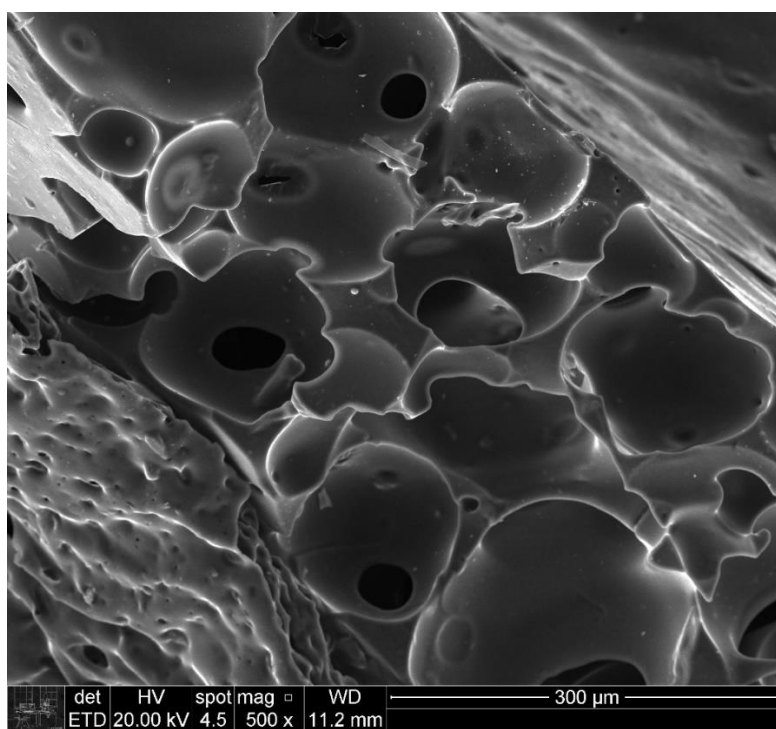
Fonte: Autoral

Figura 31 - Análise por EDS da amostra ESP tratada com H_2O_2 . Anexo 6.



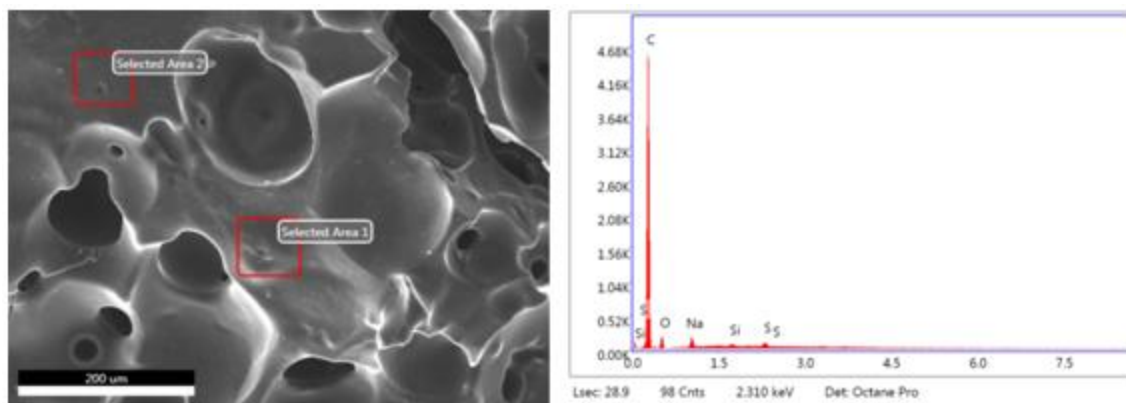
Fonte: Autoral

Figura 32 - Micrografia obtida por MEV da amostra SA tratada com HNO_3 .



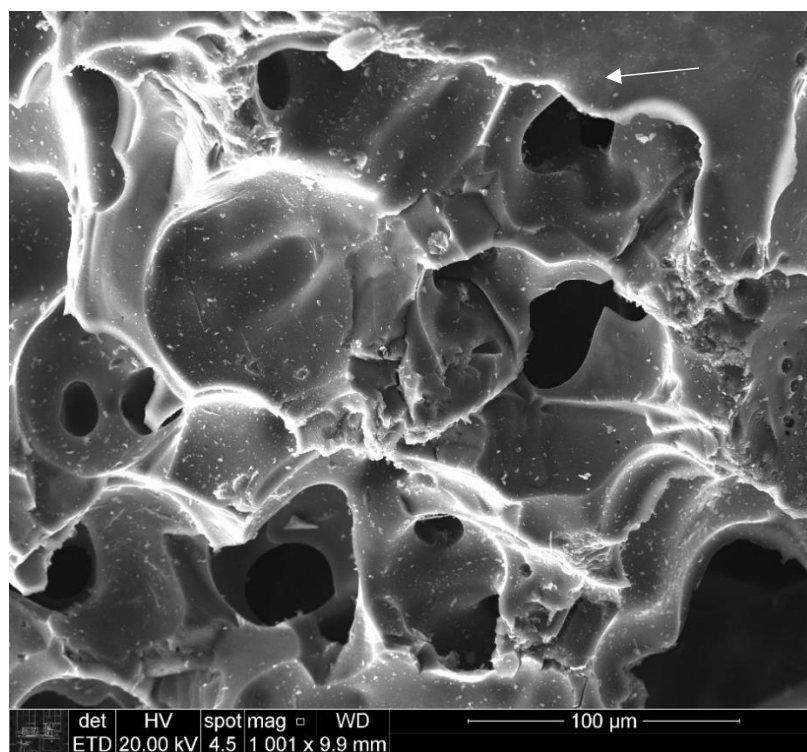
Fonte: Autoral

Figura 33 - Análise por EDS da amostra SA tratada com HNO_3 . Anexo 7.



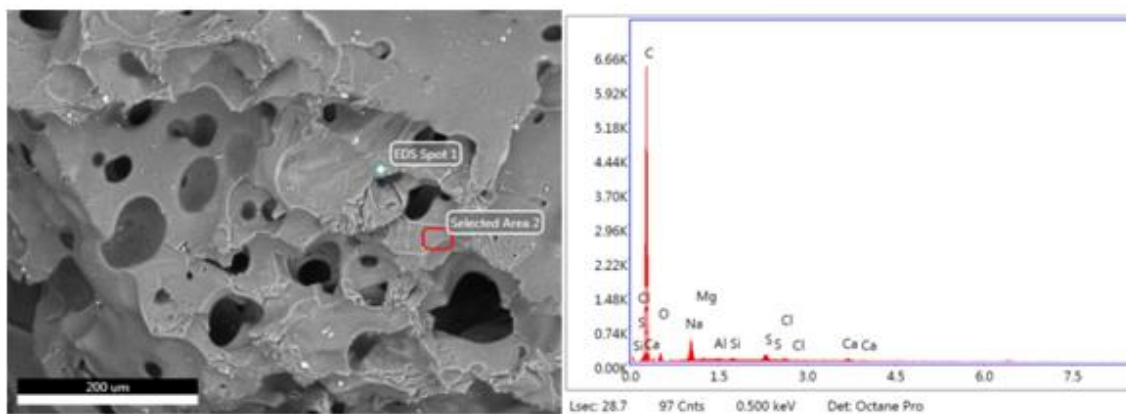
Fonte: Autoral

Figura 34 - Micrografia obtida por MEV da amostra GT tratada com HNO_3 .



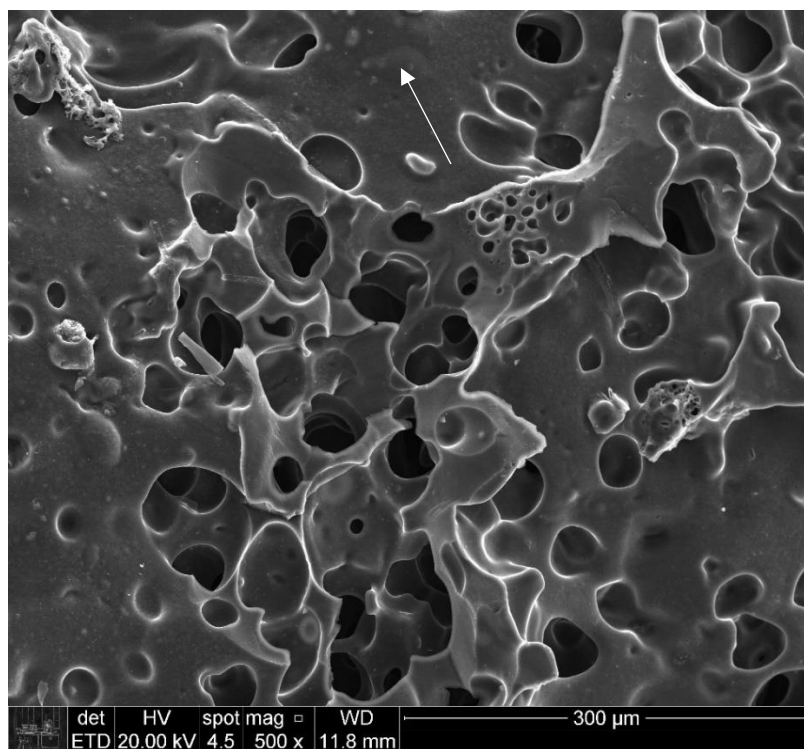
Fonte: Autoral

Figura 35 - Análise por EDS da amostra GT tratada com HNO_3 . Anexo 8.



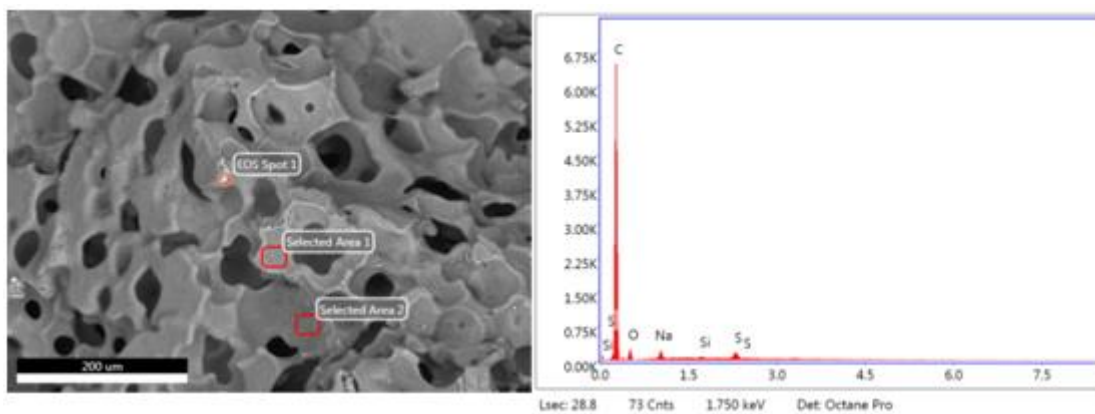
Fonte: Autoral

Figura 36 - Micrografia obtida por MEV da amostra C tratada com HNO_3 .



Fonte: Autoral

Figura 37 - Análise por EDS da amostra C tratada com HNO_3 . Anexo 9.



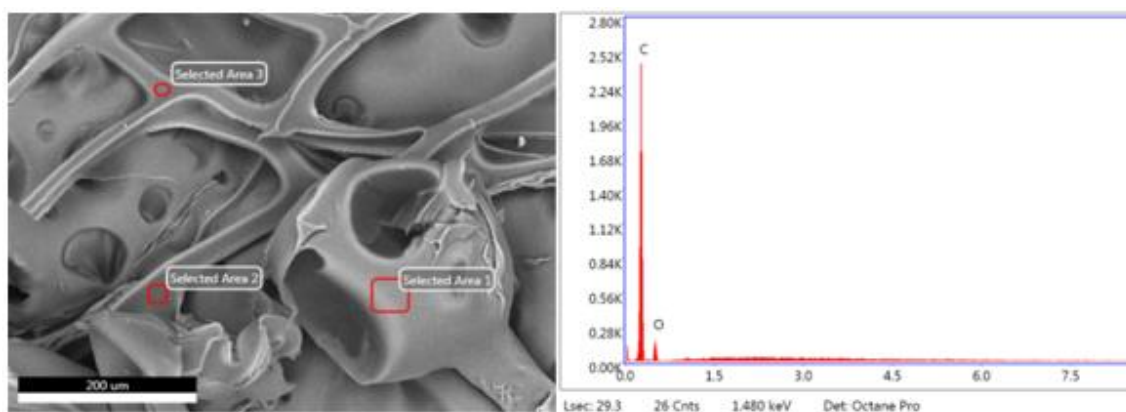
Fonte: Autoral

Figura 38 - Micrografia obtida por MEV da amostra ESP tratada com HNO_3 .



Fonte: Autoral

Figura 39 - Análise por EDS da amostra ESP tratada com HNO₃. Anexo 10.



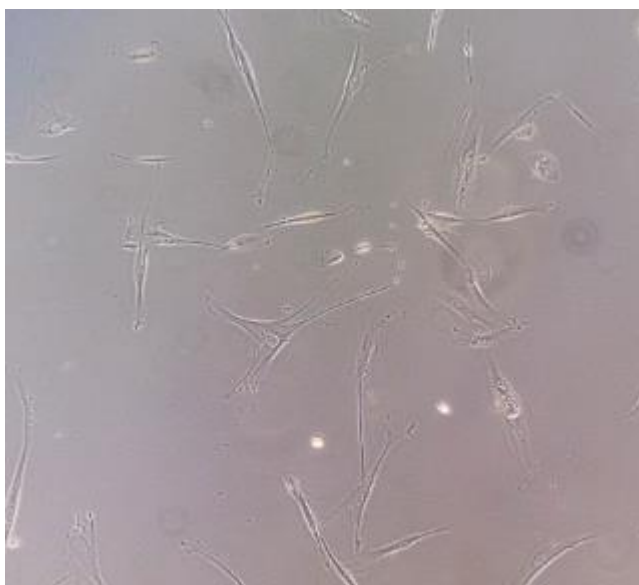
Fonte: Autoral

4.7. Expansão celular

Ao longo de todo o processo de expansão celular, foi observado que as CTMs permaneceram aderentes ao plástico das garrafas de cultura e com morfologia fibroblastoide (figuras 40 e 41, página 48). A partir dos dados extraídos da contagem celular, foi possível atingir uma densidade celular de $1,47 \times 10^7 \cdot \text{ml}^{-1}$ com 95 % de células vivas. Detalhes sobre a distribuição da população por tamanho também estão disponíveis na figura 42 (página 49).

Sendo assim, foi possível inferir que a integridade da cultura celular foi mantida e que seria possível prosseguir com as próximas etapas do trabalho.

Figura 40 - CTMs 48 horas após descongelamento. Aumento de 100x.



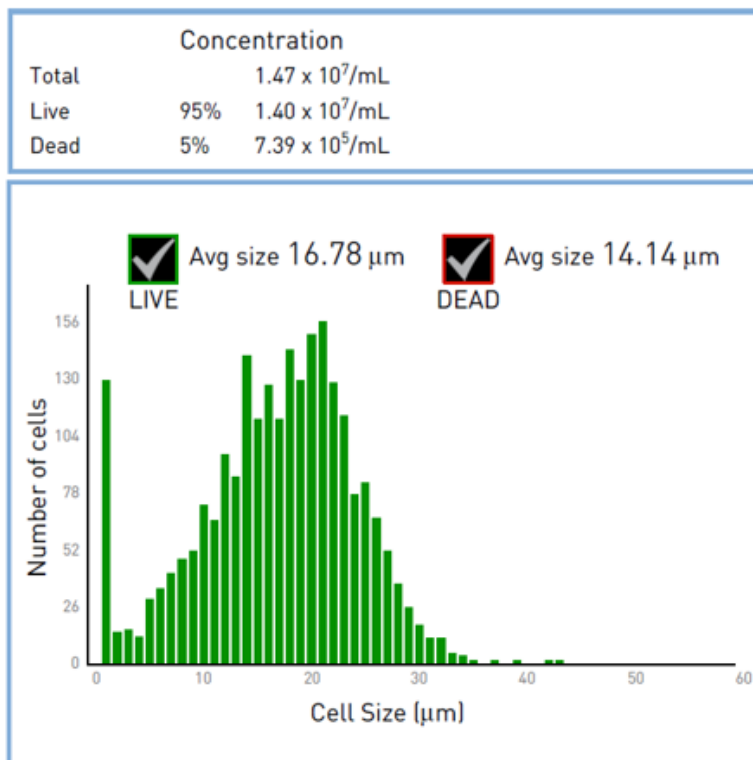
Fonte: Autoral

Figura 41 - CTMs 96 horas após descongelamento. Aumento de 100x.



Fonte: Autoral

Figura 42 - Contagem de células vivas e mortas, tamanho médio e distribuição por tamanho da cultura celular após a quinta passagem.



Fonte: Autoral

4.8. Imunofenotipagem por citometria de fluxo

A citometria de fluxo para seis marcadores de superfície foi realizada para a população celular em estudo.

A faixa denominada como M1 foi utilizada como critério para expressão positiva, tal qual significa que a intensidade de fluorescência mínima para a marcação é de 10^2 (unidades particulares ao software utilizado). A saída de resultados do programa utilizado é disponibilizada na forma de um histograma, ou seja, no eixo vertical, quantifica-se o número de ocorrências correspondente à intensidade de fluorescência (eixo das abcissas).

Ademais, as características relacionadas a cada um dos marcadores utilizados foram reportadas na literatura e algumas delas encontram-se na tabela 4.

Segundo as tabelas 5 e 6, houve marcação positiva para os marcadores CD29 (90,7 %), CD44 (96,82 %) (tabela 5, página 51), CD90 (93,68 %) e CD105 (87,41 %) (tabela 6, página 52) e marcação negativa para CD34 (0,17 %) e CD45 (0,15 %) (tabela 7, página 52) e foram utilizados na literatura para a caracterização CTMs (Dominici et al., 2006).

Não somente, a marcação positiva para CD90 e CD105 e negativa para CD34 e CD45 foram previamente determinados pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) como critérios para a definição de CTMs (Dominici et al., 2006) e foram cumpridos nesta análise.

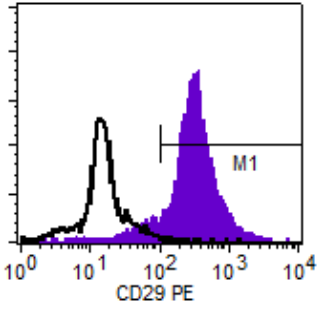
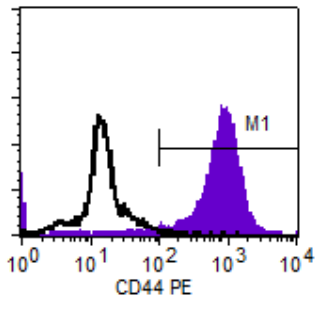
Tabela 4 - Antígenos específicos de superfície, nome alternativo e características.

Identificação	Nome Alternativo	Características
CD29	<i>Integrin Subunit β-1</i>	Adesão celular e formação de ligações entre as proteínas do citoesqueleto (intracelular) e da matriz extracelular (Novus Biologicals, 2019)
CD44	<i>Extracellular matrix receptor II</i>	Receptor multifuncional detectado em áreas de intensa migração e proliferação celular (Naor, 1998)
CD90	<i>Thymocyte differentiation antigen-1</i>	Influência em processos inflamatórios, cicatrização de feridas, adesão celular e crescimento e diferenciação de células-tronco (Kisselbach et al., 2009).
CD105	<i>Endoglin</i>	Componente do complexo <i>Transforming Growth Factor-β</i> , envolvido em processos de proliferação, diferenciação e migração celular (Fonsatti e Maio, 2004).

Tabela 4 - Continuação.

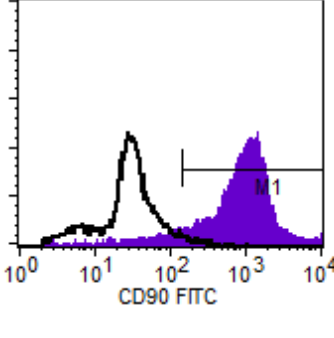
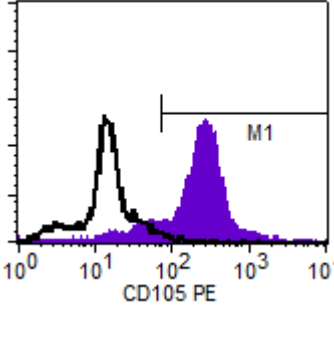
Identificação	Nome Alternativo	Características
CD34	<i>Hematopoietic progenitor cell antigen 1</i>	Antígeno amplamente utilizado na identificação de células-tronco hematopoiéticas (Healy et al., 1995)
CD45	<i>Leukocyte Common Antigen</i>	Glicoproteína transmembrana expressa em todas as células hematopoiéticas nucleadas (Donovan e Koretzky, 1993)

Tabela 5 - Perfil imunofenotípico da população celular para os marcadores CD29 e CD44 (positivos).

Contagem de marcações		
Fração dentro do critério positivo (M1)	90,7 %	96,82 %

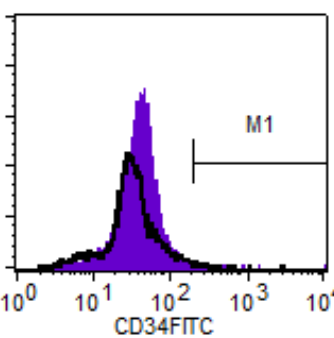
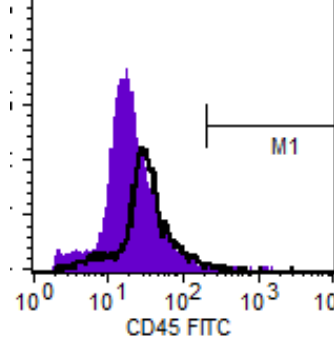
Fonte: Autoral

Tabela 6 - Perfil imunofenotípico da população celular para os marcadores CD90 e CD105 (positivos).

Contagem de marcações		
Fração dentro do critério positivo (M1)	93,68 %	87,41 %

Fonte: Autoral

Tabela 7 - Perfil imunofenotípico da população celular para os marcadores CD34 e CD45 (negativos).

Contagem de marcações		
Fração dentro do critério positivo (M1)	0,17 %	0,15 %

Fonte: Autoral

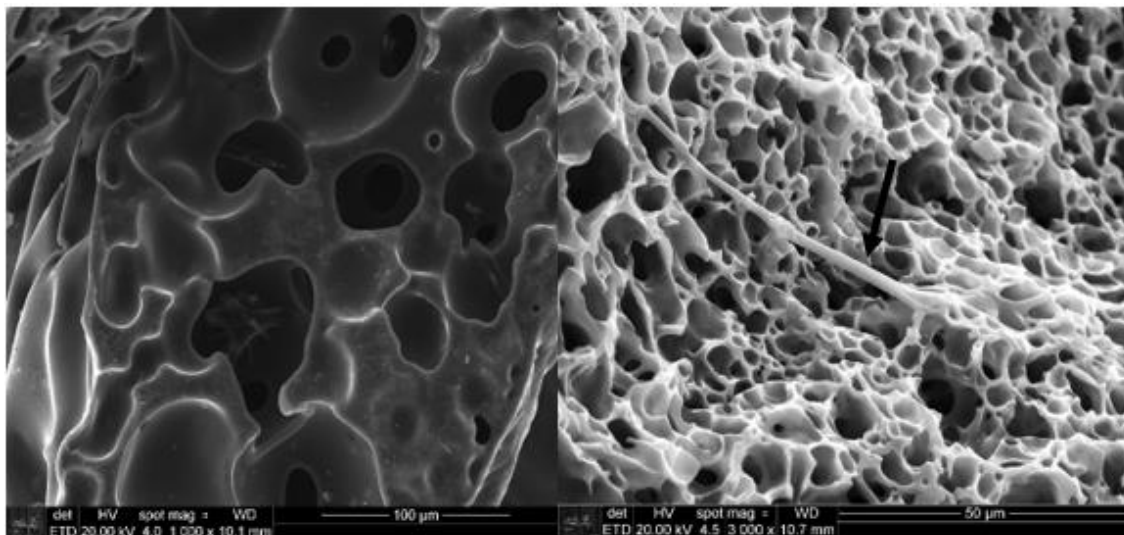
4.9. Adesão Celular

Após a execução do protocolo descrito, foi possível conferir a aderência celular das CTM nos materiais propostos.

Importante destacar que para as amostras denominadas SA-HNO₃, GT-HNO₃ e GT-H₂O₂ não foi possível observar nenhuma célula aderida e, portanto, foram excluídas das etapas seguintes do trabalho. A principal hipótese levantada sobre esta seletividade foi a utilização de vácuo de alta intensidade proveniente do processo de recobrimento a ouro e do MEV sobre as amostras, que por sua vez ofereceria um ambiente desfavorável à permanência das células. Uma alternativa proposta para um momento futuro é a utilização de Microscopia Eletrônica de Varredura Ambiental, que viabiliza a observação de amostras biológicas sem descaracterizá-las (IPT, 2010).

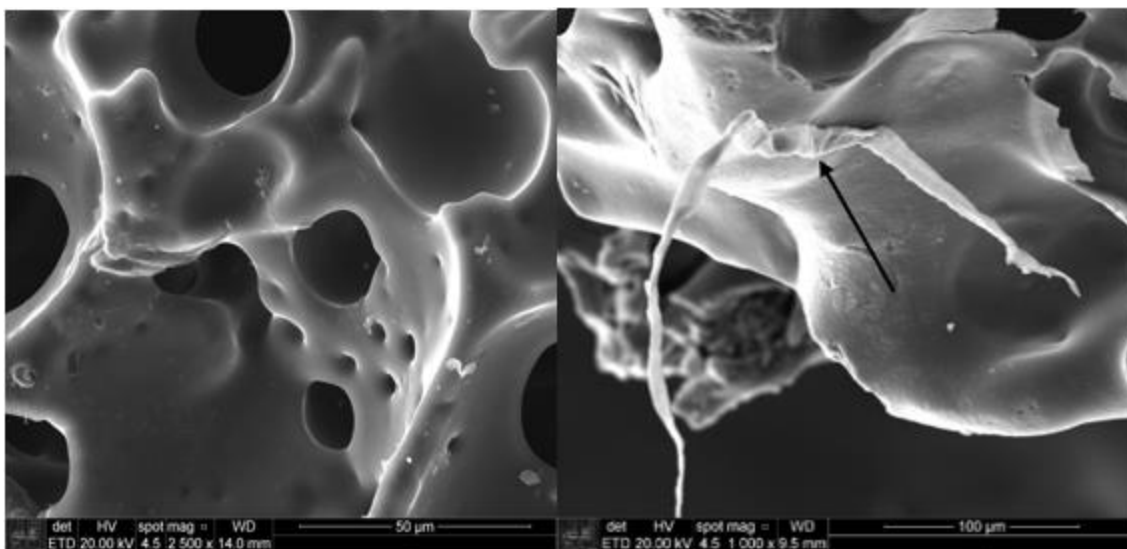
As amostras que apresentaram células aderidas estão dispostas abaixo (figuras 43 a 47, páginas 54 a 56). Visando melhor distinção entre biomaterial e CTM, cada grupo foi exibido ao lado de sua microscopia em momento anterior ao plaqueamento das células e foram inseridas setas para melhor indicação das estruturas celulares.

Figura 43 - Amostra SA-H₂O₂ com CTM aderida à superfície (direita) em comparação com momento anterior ao plaqueamento (esquerda).



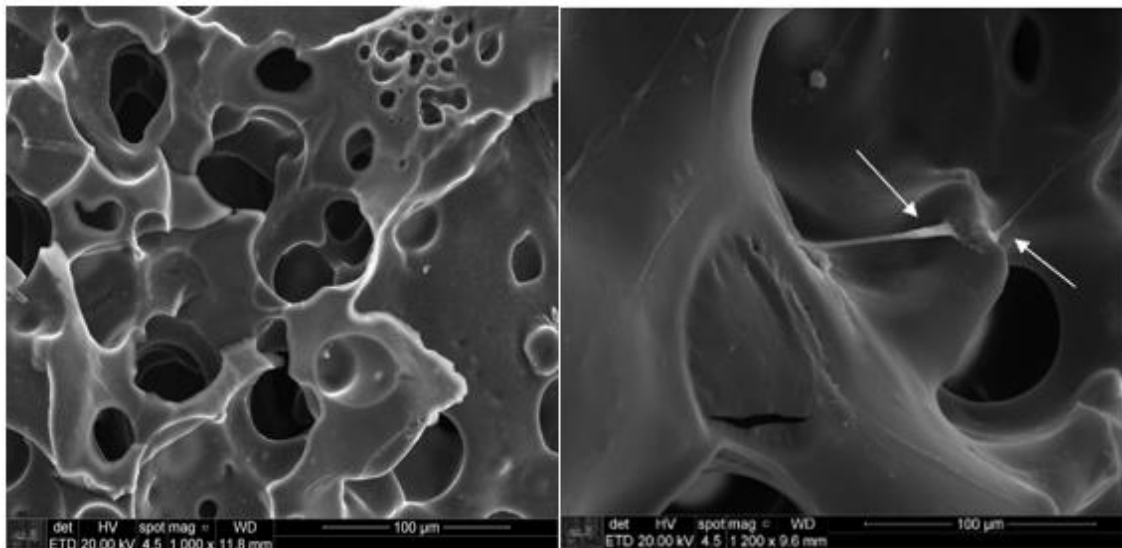
Fonte: Autoral

Figura 44 - Amostra C-H₂O₂ com CTM aderida à superfície (direita) em comparação com momento anterior ao plaqueamento (esquerda).



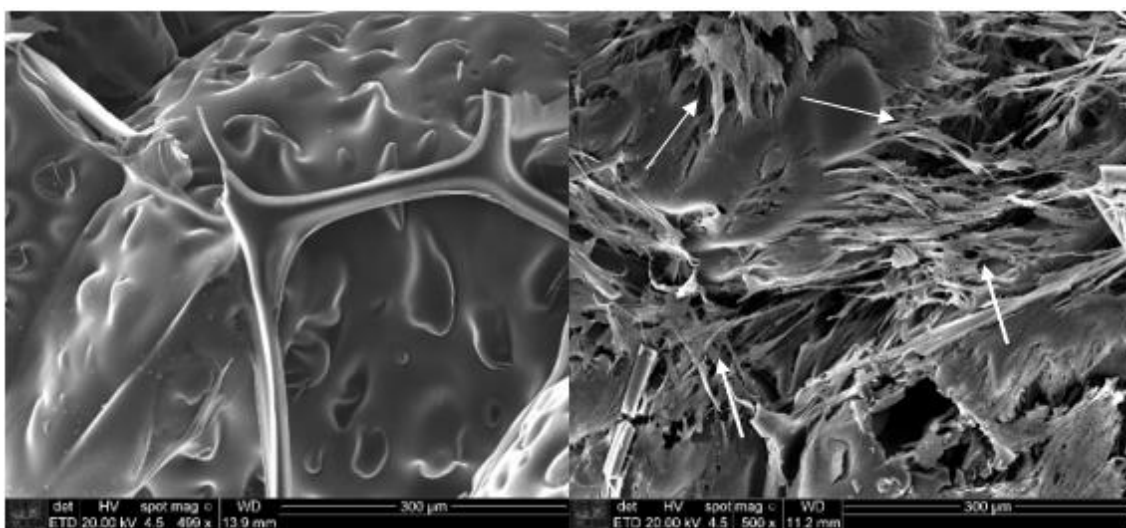
Fonte: Autoral

Figura 45 - Amostra C-HNO₃ com CTMs aderidas à superfície (direita) em comparação com momento anterior ao plaqueamento (esquerda).



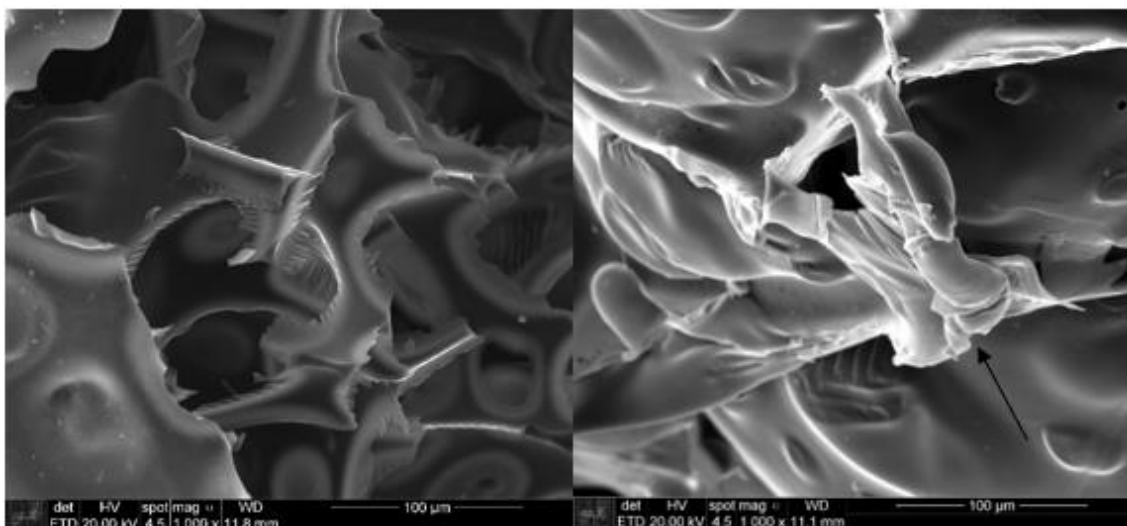
Fonte: Autoral

Figura 46 - Amostra ESP-H₂O₂ com CTMs aderidas à superfície (direita) em comparação com momento anterior ao plaqueamento (esquerda).



Fonte: Autoral

Figura 47 - Amostra ESP-HNO₃ com CTM aderida à superfície (direita) em comparação com momento anterior ao plaqueamento (esquerda).



Fonte: Autoral

Por meio da comparação entre os grupos, é possível notar que houve aderência celular muito mais significativa na utilização das espumas de carbono, especialmente à tratada com H₂O₂.

Assim como previamente mencionado por Bacakova et al. (2009), relata-se que a proliferação celular é otimizada por meio do grau intermediário de achatamento celular e forças de adesão. A inserção excessiva de grupos superficiais que promovam a adesão poderia, portanto, interromper o regime proliferativo e migratório para dar lugar ao de diferenciação. Deduz-se que, como a um primeiro momento deseja-se o máximo de ocupação de CTMs pelo volume do biomaterial, é interessante que seja utilizado um tipo de tratamento que introduza a um nível moderado de grupos químicos promotores de adesão celular.

A diferença de adesão encontrada principalmente entre os dois grupos ESP pode estar relacionado a este fato.

Segundo o trabalho de Takaoka et al. (2007), existe uma diferença de efetividade de oxidação superficial entre os tratamentos com HNO₃ e H₂O₂ para carbono ativado, ao que foi observada uma nítida diferença entre os dois tipos de tratamento comprovada pela razão molar entre oxigênio e carbono, denominado como “poder oxidativo”, na superfície de seus materiais. O uso de HNO₃ por 3 horas

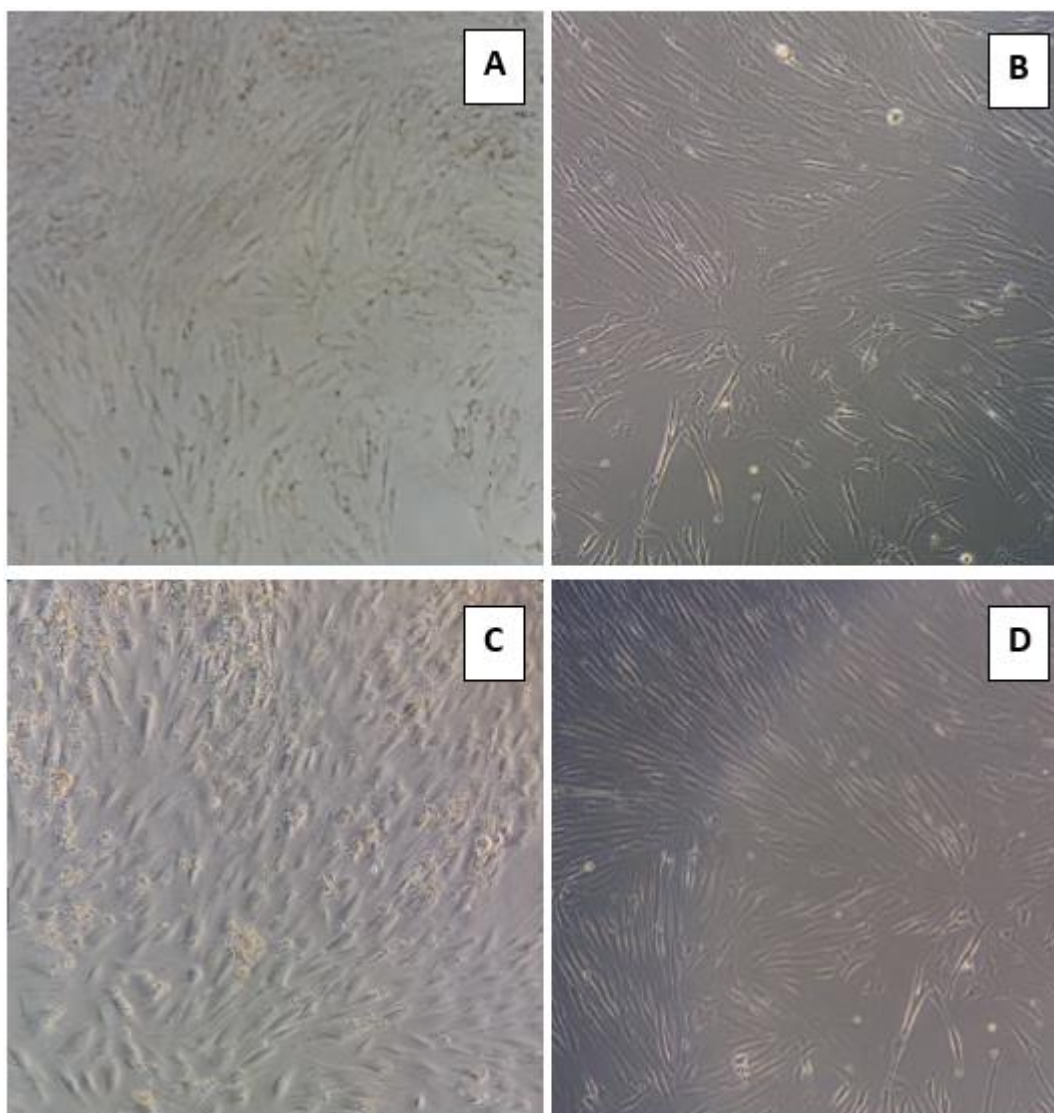
apresentou poder oxidativo cerca de 40 % maior em relação ao uso de H_2O_2 (0,104 e 0,072, respectivamente) e, com a extensão do tratamento para 24 horas, foi observado uma oxidação por HNO_3 170% mais intensa em comparação à obtida por H_2O_2 (0,213 e 0,079, respectivamente).

O conjunto de evidências encontradas com os resultados de adesão celular deste trabalho, em especial aos encontrados para as duas espumas de carbono, e as informações fornecidas tanto por Bacakova et al. e Takaoka et al. dá indícios de que o tratamento com H_2O_2 possui maior efetividade na promoção de adesão celular, em contraste ao uso de HNO_3 . Além disso, a morfologia adquirida pela espuma de carbono também aparenta favorecer a integração com as CTMs. Contudo, para aumentar o nível de evidência sobre a adesão, ainda seria necessária a realização de ensaios de viabilidade celular, tal como o sugerido por Borra et al. (2009), que utilizou o corante celular resazurina.

4.10. Diferenciação Osteogênica

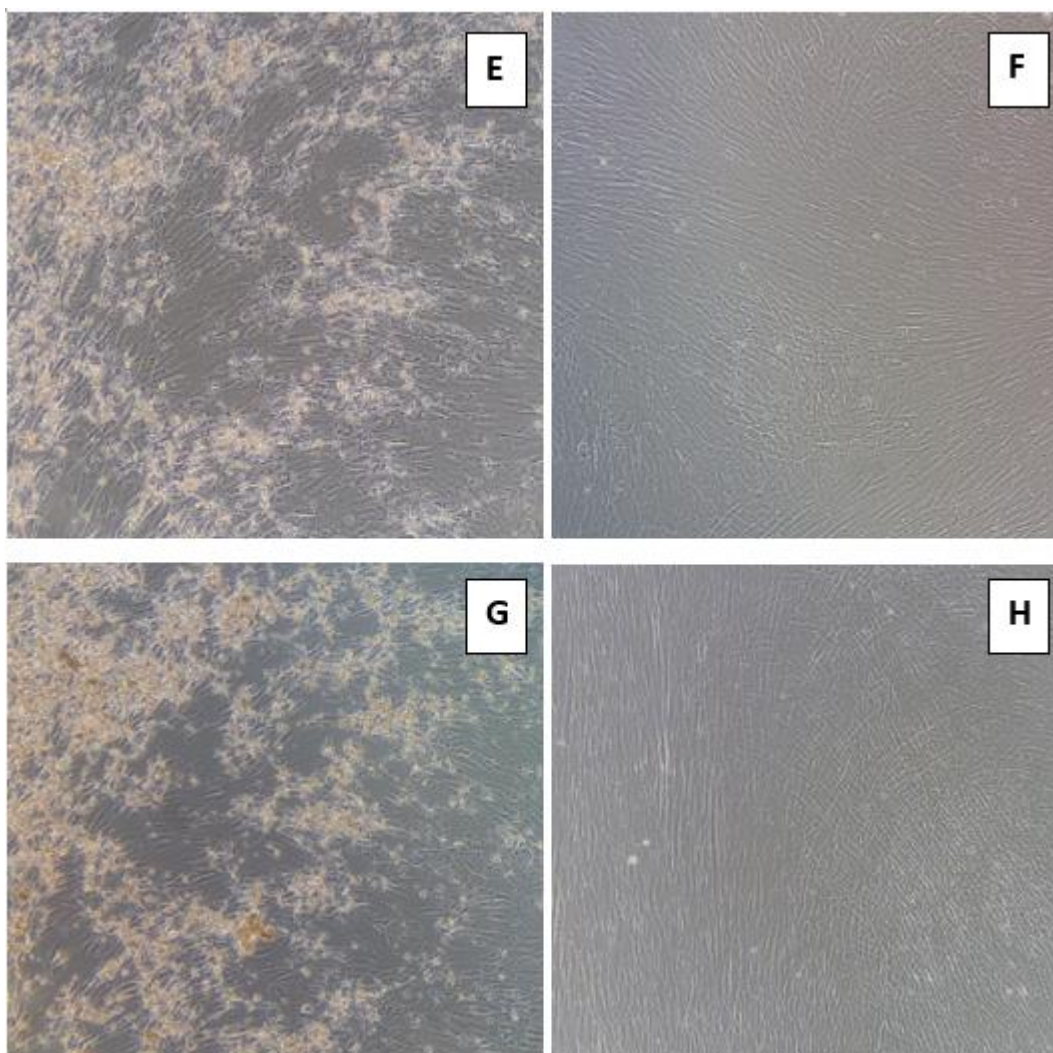
Durante o período de 14 dias, foi feito o acompanhamento por microscopia óptica dos grupos controle CTM + meio de diferenciação e CTM + meio basal. Ao que pode ser observado na figura 48 (páginas 58 e 59), não houve nenhum comportamento anômalo em relação à expectativa sobre os tipos celulares encontrados. Ocorreu a formação gradual de uma matriz nos espaços intercelulares no grupo de células imersas em meio de diferenciação osteogênica e, igualmente importante, não houve a formação dessas estruturas no outro grupo.

Figura 48 - Acompanhamento dos grupos controle ao longo de 14 dias. Todos os registros foram feitos com aumento de 100 x. Legenda: A, C, E e G são os grupos de CTMs + meio de diferenciação a 3, 7, 10 e 14 dias de cultivo, respectivamente. B, D, F e H são os grupos de CTMs + meio basal no mesmo período, respectivamente.



Fonte: Autoral

Figura 48 - Continuação.



Fonte: Autoral

Todos os grupos foram submetidos ao protocolo de quantificação óssea anteriormente apresentado e os resultados da ANOVA estão nos gráficos 4, 5, 6 e 7, com os respectivos anexos.

Por meio da comparação dos grupos SA-H₂O₂D, C-H₂O₂D, C-HNO₃D, ESP-H₂O₂D e ESP-HNO₃D com o grupo controle (CTMs em meio de diferenciação), podemos observar que houve diferença estatística para os valores de absorvância em todos os testes. Com isso, é seguro afirmar que todos os grupos em exceção ao ESP-H₂O₂D apresentaram valores menores de absorvância e, conseqüentemente, menor formação de matriz óssea em relação ao controle positivo (gráfico 4, página 61). Em comparação com as micrografias das microesferas (figuras 43, 44 e 45, páginas 54 e 55), pode-se concluir que, apesar

de existirem evidências à adesão, não foi possível atingir um grau suficiente de proliferação celular no interior do biomaterial.

A respeito do grupo ESP-H₂O₂D, houve melhoria substancial em relação ao controle positivo e indicia a integração entre biomaterial e CTMs. Não somente, este resultado é sustentado pela micrografia correspondente à associação (figura 46, página 55). Contudo, com as informações obtidas pelo gráfico 5 (página 62), não foi possível observar nenhum tipo de estímulo sem o auxílio do meio de diferenciação osteogênico. Sendo assim, deduz-se que a produção mais intensa de matriz óssea da associação ESP-H₂O₂D está atrelada a uma maior proliferação de células no interior do biomaterial.

Curiosamente, enquanto algumas amostras do tipo “B” não apresentaram distinção em relação ao controle negativo, foi observada uma absorvância elevada e estatisticamente significativa da amostra C-HNO₃B, o que poderia indicar uma possível função osteoindutora neste material. Poderia ser incluída, portanto, como passos futuros, uma melhor elaboração do protocolo para a sua síntese e utilização como biomaterial. A formação de matriz óssea em quantidade elevada de grupos sem meio de diferenciação osteogênico poderia indicar uma possível função osteoindutora proveniente do próprio biomaterial, e assim, reduzir ou até dispensar o uso de meio de diferenciação comercial.

Finalmente, a estabilidade dos biomateriais em contato com os meios de diferenciação e basal foi comprovada por meio dos gráficos 6 e 7 (páginas 62 e 63).

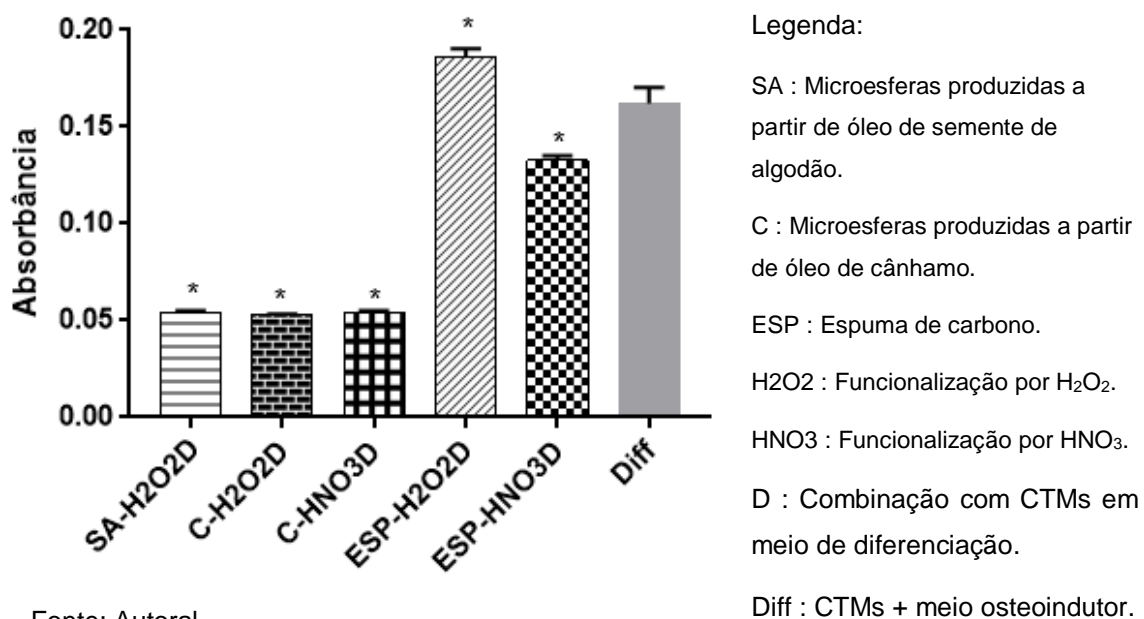
O sinal reduzido das amostras tipo “D-“ em contraste ao controle “Diff” e das amostras tipo “B-“ em relação ao controle “Basal” permitem afirmar que não houve nenhuma reação adversa que viesaria a avaliação do potencial proliferativo e osteoindutor das amostras.

Os resultados encontrados no presente trabalho permitiram a obtenção de ao menos um candidato a biomaterial para a regeneração óssea. Em destaque à espuma de carbono, foram utilizados precursores de baixo custo, tais como a esponja e o açúcar convencionais, para a produção de um ambiente favorável à proliferação celular e diferenciação osteogênica. A perspectiva que surge deste cenário é a possibilidade de reduzir custos para o tratamento de enfermidades

relacionadas ao tecido ósseo, inclusive a FLP, e assim, criar soluções de ampla acessibilidade à população.

Além da melhor padronização de resultados, também é sugerido o aumento do nível de evidência da efetividade desta estratégia por meio de testes *in vivo*, que permitiriam avaliar o seu desempenho em um ambiente sujeito a respostas do organismo.

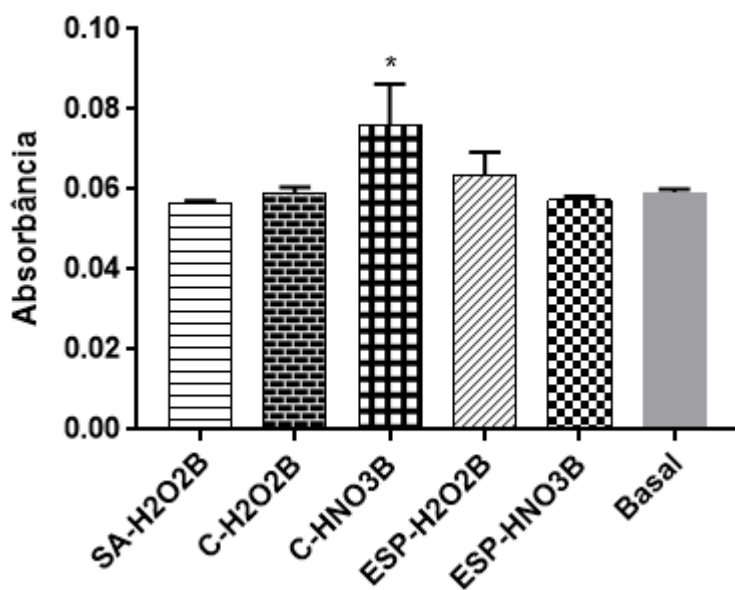
Gráfico 4 - Comparação das associações entre biomaterial, CTMs e meio de diferenciação em relação ao controle positivo "Diff". * p-value < 0.0001 com nível de significância (α) a 5 %. Anexo 11.



Fonte: Autoral

Gráfico 5 - Comparação das associações entre biomaterial, CTMs e meio basal em relação ao controle negativo "Basal". * p-value = 0.005 com nível de significância (α) a 5 %.

Anexo 12.



Fonte: Autoral

Legenda:

SA : Microesferas produzidas a partir de óleo de semente de algodão.

C : Microesferas produzidas a partir de óleo de cânhamo.

ESP : Espuma de carbono.

H2O2 : Funcionalização por H₂O₂.

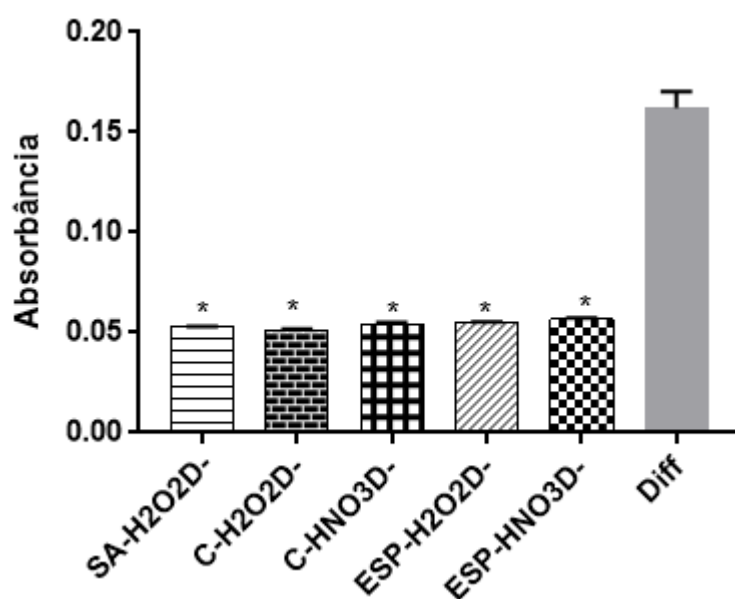
HNO₃ : Funcionalização por HNO₃.

B : Combinação com CTMs em meio basal.

Basal : CTMs + meio Basal.

Gráfico 6 - Comparação das associações de biomaterial e meio de diferenciação em relação ao controle positivo "Diff". * p-value < 0.0001 com nível de significância (α) a 5 %.

Anexo 13.



Fonte: Autoral

Legenda:

SA : Microesferas produzidas a partir de óleo de semente de algodão.

C : Microesferas produzidas a partir de óleo de cânhamo.

ESP : Espuma de carbono.

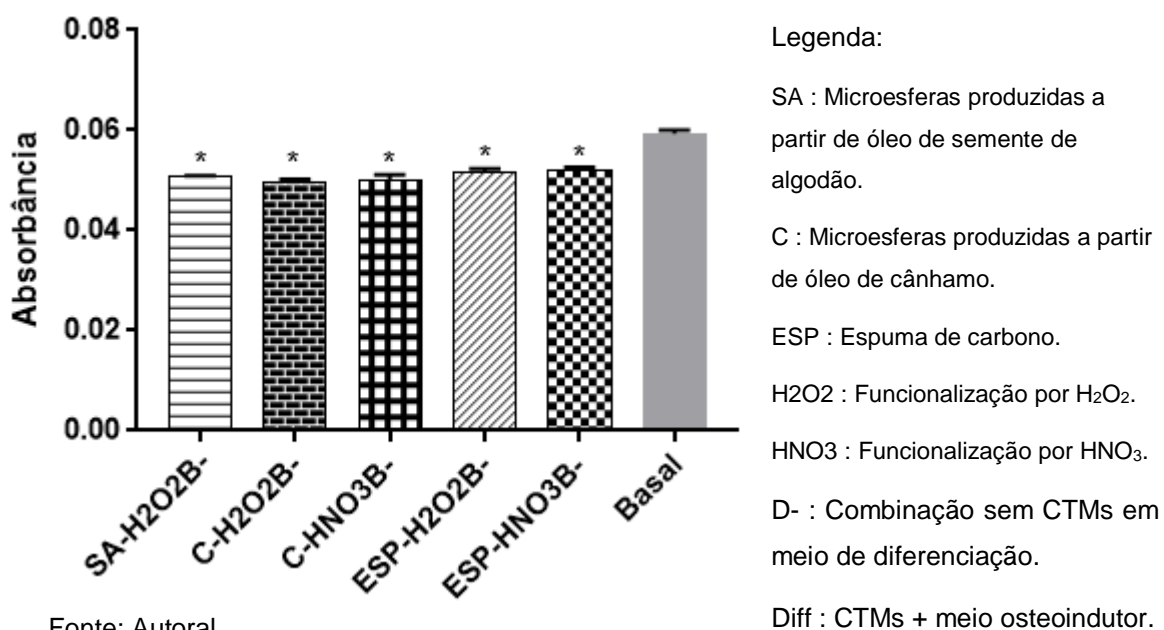
H2O2 : Funcionalização por H₂O₂.

HNO₃ : Funcionalização por HNO₃.

D- : Combinação sem CTMs em meio de diferenciação.

Diff : CTMs + meio osteoindutor.

Gráfico 7 - Comparação das associações de biomaterial e meio basal em relação ao controle negativo "Basal". * p-value < 0.0001 com nível de significância (α) a 5 %. Anexo 14.



5 CONCLUSÕES

Cinco tipos diferentes de materiais carbonosos foram testados para a integração com Células-tronco Mesenquimais derivadas da polpa de dente decíduo.

Tanto as microesferas quanto a espuma de carbono foram submetidas a dois tipos diferentes de funcionalização de superfície e foram avaliadas segundo a microestrutura, composição química, adesão celular e influência sobre a formação de matriz óssea após a execução de protocolo para a diferenciação das CTMs.

Como pôde ser visto, a metodologia apresentada permitiu a síntese de materiais compostos por basicamente carbono e oxigênio, e a organização destes elementos ao longo da microestrutura foi avaliada por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura, Espectroscopia por Energia Dispersiva e Espectroscopia Raman. A combinação de informações provenientes destas três técnicas viabilizou a formulação de interpretações acerca de inúmeros aspectos deste trabalho e demonstrou enorme valor na caracterização de materiais. Não somente, a aplicação de MEV sobre os biomateriais associados às CTMs permitiu a avaliação inicial sobre a integração destes dois elementos em questão.

A partir dos resultados encontrados tanto na observação da adesão celular quanto na formação de matriz óssea, foi possível concluir que a espuma de carbono tratada com H_2O_2 é um potencial candidato a ser incluído no desenvolvimento de soluções em bioengenharia de tecidos. Por mais que não tenha sido comprovado nenhum potencial osteogênico pela utilização somente de biomaterial e CTMs, ainda pode-se dizer que este tipo de material oferece um ambiente tridimensional favorável à proliferação celular.

O presente estudo visou integrar a Engenharia de Materiais às Ciências da Saúde por meio da elaboração de estratégias que utilizassem conhecimentos concernentes às duas áreas. A abordagem conhecida como bioengenharia de tecidos apresenta uma proposta inovadora para o desenvolvimento de tratamentos cada vez mais efetivos e busca a incorporação de diferentes áreas do conhecimento para tanto. Desta maneira, pode-se dizer que há um valor nesta incorporação, e o bom aproveitamento desta união representa uma oportunidade eminente para melhorar a qualidade de vida da população em geral.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARRATEGI, A. et al. Multiwall carbon nanotube scaffolds for tissue engineering purposes. **Biomaterials**. v. 29, n. 1, p. 94-102, 2008.

ANTIBODIES-ONLINE, What is flow cytometry (FACS analysis)?, 2013. Disponível em <<https://www.antibodies-online.com/resources/17/1247/what-is-flow-cytometry-facs-analysis/>>. Acesso em 13 de junho de 2019.

AURREKOETXEA, M. et al. Dental pulp stem cells as a multifaceted tool for bioengineering and the regeneration of craniomaxillofacial tissues. **Front. Physiol.** v. 6, n. 289, 2015.

BACAKOVA, L. et al. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. **Biotechnology Advances**. v. 29, n. 6, p. 739-67, 2011.

BEIRNE, J. C.; BARRY, H. J.; BRADY, F. A., et al. Donor site morbidity of the anterior iliac crest following cancellous bone harvest. **Int J Oral Maxillofac Surg**. v. 25, n. 4, p. 268-71, 1996.

BORRA, R. C. et al. A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. **Bras Oral Res**, v. 23, n. 3, p. 255-62, 2009.

BUENO, D. F. et al. Human Stem Cell Cultures from Cleft Lip/Palate Patients Show Enrichment of Transcripts Involved in Extracellular Matrix Modeling By Comparison to Controls. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 7, n. 2, p. 446–457, 2011.

CHEN C. et al. Carbon foam derived from various precursors. **Carbon**, v. 44, n. 8, p. 1535-1543, 2006.

CREATIVE BIOARRAY, Trypan Blue Staining Assay, 2019. Disponível em <<https://www.creative-bioarray.com/support/trypan-blue-staining-assay.htm>>. Acesso em 26 de junho de 2019.

DEDAVID, B. A.; GOMES C. I. e MACHADO, G. Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores, Porto Alegre: EDIPUCRS, 60 p., 2007.

DE FARIA, D. L. A. Entenda o que é espectroscopia Raman. 01 jul. 2011. Disponível em https://www.crq4.org.br/sms/files/file/Espectroscopia_Raman_4.pdf >. Acesso em 03 de junho de 2019.

DIXON, M. J., MARAZITA, M. L., BEATY, T. H., e MURRAY, J. C. Cleft lip and palate: Understanding genetic and environmental influences. **Nature Review Genetics**, v. 12, n. 3, p. 167–178, 2011.

DONOVAN, J. A. e KORETZKY, G. A. CD45 and the immune response. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 4, n. 4, p. 976-985, 1993.

EPPLEY, B. L., SADOVE, A. M. Management of alveolar cleft bone grafting — State of the art. **Cleft Palate Craniofac J**. v. 37, n. 3, p.229-33, 2000.

FERNANDES, T. L. et al. Human Synovial Mesenchymal Stem Cells Good Manufacturing Practices for Articular Cartilage Regeneration. **Tissue Engineering: Part C**, v. 24, n. 12, p. 709-16, 2018.

FONSATTI, E. e MAIO, M. Highlights on endoglin (CD105): from basic findings towards clinical applications in human cancer. **Journal of Translational Medicine**, v. 2, n. 1, p. 18, 2004.

GE, J.; SHI, J.; CHEN, L. Gelatin-based carbon microspheres with a foam-like core/solid shell structure. **Carbon**, v. 47, p. 1192-95, 2009.

GIMBEL, M. et al. Repair of alveolar cleft defects: reduced morbidity with bone marrow stem cells in a resorbable matrix. **J Craniofac Surg**, v. 18, n. 4, p. 895–901, 2007.

GUMUS, Z. P. et al. Herbal infusions of black seed and wheat germ oil: Their chemical profiles, in vitro bio-investigations and effective formulations as Phyto-Nanoemulsions, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 133, n. 1, p. 73-80, 2015.

HALFON, S. et al. Markers Distinguishing Mesenchymal Stem Cells from Fibroblasts Are Downregulated with Passaging. **Stem Cells and Development**. v. 20, n. 1, p. 53-66, 2011.

HEALY, L. et al. The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 92, n. 26, p. 12240-244, 1995.

HODKIEWICZ, J. Characterizing Carbon Materials with Raman Spectroscopy. **Thermo Fisher Scientific**, Application Note: 51901, 2010. Disponível em <<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Application-Notes/D19504~.pdf>>. Acesso em 11 de junho de 2019.

HOF M., TEPPER G., SEMO B., ARNHART C., WATZEK G. e POMMER B. Patients' perspectives on dental implant and bone graft surgery: questionnaire-based interview survey. **Clinical Oral Implants Research**, v. 25, n. 1, p. 42-45, 2014.

HORIBA. What is Raman Spectroscopy?. Disponível em <https://www.horiba.com/en_en/raman-imaging-and-spectroscopy/>. Acesso em 15 de maio de 2019.

INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS (IPT). Tecnologia em escala nanométrica: Compra de microscópio eletrônico de varredura de alta resolução coloca IPT na rota das pesquisas em nanotecnologia. Fev. 2010. Disponível em <<http://www.ipt.br/noticia/117.htm>>. Acesso em 28 de junho de 2019.

JANA, P.; FIERRO, V.; CELZARD, A. Ultralow cost reticulated carbon foams from household cleaning pad wastes. **Carbon**, v. 62, p. 510-20, 2013.

KAHLON, T. S. Nutritional implications and uses of wheat and oat kernel oil. **Cereal Foods World**, Saint Paul, v.34, n.10, p.872-874, 1989.

KANG, E. S. et al. Guiding osteogenesis of mesenchymal stem cells using carbon-based nanomaterials. **Nano Convergence**, v. 4, n. 2, 2017.

KAUFFMANN, T. H.; KONANYAN N. e FONTANA, M. Use of Stokes and anti-Stokes Raman scattering for new applications. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 50, n. 3, p. 418-24, 2019.

KISSELBACH, L.; MERGES, M.; BOSSIE, A. e BOYD, A. CD90 Expression on human primary cells and elimination of contaminating fibroblasts from cell cultures. **Cytotechnology**, v. 59, n. 1, p. 31-44, 2009.

LANGER R. e VACANTI J. P. Tissue Engineering. **Science**, v. 260, n. May, p. 920-26, 1993.

LASOCKA I. et al. Biocompatibility of pristine graphene monolayer: Scaffold for fibroblasts. **Toxicology in Vitro**, v. 48, p. 276-285, 2018.

MACHADO, R. A. et al. Potential genetic markers for nonsyndromic oral clefts in the Brazilian population: A systematic review and meta-analysis. **Birth Defects Research**. v. 1, n. 10, p. 827-39, 2018.

MARTÍN-DEL-CAMPO, M.; ROSALES-IBAÑEZ, R. E ROJO, L. Biomaterials for Cleft Lip and Palate Regeneration. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 20, n. 9, p. 2176, 2019.

MAXSON, S. et al. Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair. **Stem cells translational medicine**, v. 1, n. 2, p. 142–9, 2012.

Materials Evaluation and Engineering, Inc (MEE). Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (EDS). Disponível em <<https://www.mee-inc.com/hamm/energy-dispersive-x-ray-spectroscopyeds/>>. Acesso em 13 de junho de 2019.

MUÑIZ, G. et al. Synthesis, characterization and performance in arsenic removal of iron-doped activated carbons prepared by impregnation with Fe(III) and Fe(II). **Journal of Hazardous Materials**. v. 165, p. 893-902, 2009.

NAOR, D. CD44. **Encyclopedia of Immunology (Second Edition)**, Elsevier, p. 488-91, 1998.

NOVUS BIOLOGICALS, Integrin Beta 1/CD29 - a cell adhesion and cell signaling protein with diverse functions, 2015. Disponível em <<https://www.novusbio.com/antibody-news/antibodies/integrin-beta-1-cd29-a-cell-adhesion-and-cell-signaling-protein-with-diverse-functions>>. Acesso em 28 de junho de 2019.

PINHEIRO, C. G. C.; DE PINHO, M. C.; FREGNANI, E.; BUENO, D. F. Low laser Therapy: a strategy to promote the osteogenic differentiation of deciduous dental pulp stem cells from Cleft Lip and Palate patients. **Tissue Engineering Part A**. v. 24, n. 7-8, 2018.

POLO-CORRALES L. et al. Scaffold Design for Bone Regeneration. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n. 1, p. 15-56, 2014.

QUILLES-CARRILLO, L. et al. Reactive Toughening of Injection-molded Polylactide Pieces by Maleinized Hemp Seed Oil. **European Polymer Journal**. v. 98, p. 402-10, 2018.

RAPOSO-AMARAL et al. Is bone transplantation the gold standard for repair of alveolar bone defects? **J. Tissue Eng**, v. 5, p. 204173141351935, 2014.

RENISHAW, Raman Bands Explained, 2019. Disponível em <<https://www.renishaw.com.br/pt/raman-bands-explained--25808>>. Acesso em 12 de junho de 2019.

RUDMAN, R. A. Prospective evaluation of morbidity associated with iliac crest harvest for alveolar cleft grafting. **J Oral Maxillofac Surg**. v. 55, n. 3, p. 219-24, 1997

SHAW D. W. Global Strategies to Reduce the Health Care Burden of Craniofacial Anomalies: Report of WHO Meetings on International Collaborative Research on Craniofacial Anomalies. **Cleft Palate-Craniofacial J**, v. 41, n. 3, p. 238–43, 2004.

SZPALSKI C.; WETTERAU M.; BARR J. e WARREN S. M. Bone Tissue Engineering: Current Strategies and Techniques – Part I: Scaffolds. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 18, n. 4, p. 246-257, 2012.

SZUNERITS, S. e BOUKHERROUB, R. Antibacterial activity of graphene-based materials. **Journal of materials chemistry B**, v. 4, n. 43, p. 6892-912, 2016.

TAKAOKA, M.; YOKOKAWA, H. e TAKEDA, N. The effect of treatment of activated carbon by H₂O₂ or HNO₃ on the decomposition of pentachlorobenzene. **Applied Catalysis B: Environmental**. v. 74, n. 3-4, p. 179-186, 2007.

TANAKA, N.; TAKINO, S. e UTSUMI, I. A New Oral Gelatinized Sustained-Release Dosage Form. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 7, p. 664-67, 1963.

VANDELLI, M. A. et al. Microwave-treated gelatin microspheres as drug delivery system. **Journal of Controlled Release**, v. 96, p. 67-84, 2004.

XIE, H.Y. et al., Wheat Germ Agglutinin-Modified Trifunctional Nanospheres for Cell Recognition. **Bioconjugate Chem**. v. 18, n. 6, p. 1749-55, 2007.

7 ANEXOS

Anexo 1 - Análise química semiquantitativa por EDS da espuma de carbono. Figura 21.

Element	Weight %	Atomic %	Net Int.	Error %	Kratio	Z	A	F
C K	88.96	91.52	2820.95	2.58	0.7730	1.0049	0.8648	1.0000
O K	10.89	8.41	102.96	11.75	0.0118	0.9596	0.1131	1.0000
NaK	0.08	0.04	4.00	59.27	0.0003	0.8698	0.4754	1.0013
SiK	0.02	0.01	2.42	62.29	0.0002	0.8694	0.9139	1.0068
S K	0.05	0.02	5.84	54.78	0.0005	0.8508	1.0141	1.0160

Anexo 2 - Análise química semiquantitativa por EDS da espuma de carbono. Figura 22.

Element	Weight %	Atomic %	Net Int.	Error %	Kratio	Z	A	F
C K	93.81	95.31	2628.18	2.06	0.8636	1.0028	0.9180	1.0000
O K	6.06	4.62	45.14	13.34	0.0062	0.9575	0.1069	1.0000
NaK	0.09	0.05	3.91	59.00	0.0004	0.8679	0.4937	1.0014
S K	0.04	0.02	4.11	59.86	0.0004	0.8489	1.0213	1.0169

Anexo 3 - Análise química semiquantitativa por EDS da amostra SA tratada com H₂O₂.

Figura 24.

Element	Weight %	Atomic %	Net Int.	Error %	Kratio	Z	A	F
C K	84.03	89.56	242.07	6.56	0.5098	1.0131	0.5988	1.0000
O K	9.02	7.22	11.23	18.83	0.0099	0.9678	0.1137	1.0000
NaK	3.28	1.83	23.03	12.76	0.0140	0.8776	0.4867	1.0016
AlK	0.25	0.12	3.56	66.92	0.0017	0.8588	0.7803	1.0050
SiK	0.31	0.14	5.01	36.89	0.0025	0.8774	0.8843	1.0079
S K	1.72	0.69	24.77	14.57	0.0149	0.8588	0.9944	1.0133
KK	0.39	0.13	4.35	62.86	0.0034	0.8125	1.0305	1.0391
CaK	0.98	0.31	9.13	25.87	0.0086	0.8272	1.0329	1.0368

Anexo 4 - Análise química semiquantitativa por EDS da amostra GT tratada com H₂O₂.

Figura 26.

Element	Weight %	Atomic %	Net Int.	Error %	Kratio	Z	A	F
C K	80.92	86.05	1298.00	4.86	0.5516	1.0122	0.6734	1.0000
O K	14.53	11.60	96.14	11.86	0.0171	0.9668	0.1218	1.0000
NaK	3.63	2.02	121.77	12.94	0.0149	0.8766	0.4676	1.0012
S K	0.43	0.17	30.52	14.56	0.0037	0.8577	0.9923	1.0141
ClK	0.18	0.07	11.80	30.39	0.0015	0.8157	1.0141	1.0205
KK	0.12	0.04	6.60	43.04	0.0010	0.8114	1.0355	1.0402
CaK	0.19	0.06	9.17	36.13	0.0017	0.8260	1.0382	1.0499

Anexo 5 - Análise química semiquantitativa por EDS da amostra C tratada com H₂O₂.

Figura 28.

Element	Weight %	Atomic %	Net Int.	Error %	Kratio	Z	A	F
C K	89.73	92.13	1233.19	2.70	0.7866	1.0045	0.8727	1.0000
O K	10.15	7.82	41.09	13.41	0.0111	0.9592	0.1144	1.0000
NaK	0.03	0.01	0.63	92.86	0.0001	0.8695	0.4876	1.0014
S K	0.09	0.03	4.18	52.43	0.0008	0.8505	1.0150	1.0161

Anexo 6 - Análise química semiquantitativa por EDS da amostra ES tratada com H₂O₂.

Figura 30.

Element	Weight %	Atomic %	Net Int.	Error %	Kratio	Z	A	F
C K	92.30	94.15	987.61	2.49	0.8339	1.0034	0.9003	1.0000
O K	7.56	5.79	22.68	14.54	0.0083	0.9581	0.1144	1.0000
NaK	0.03	0.01	0.45	98.81	0.0001	0.8685	0.5115	1.0014
SiK	0.03	0.01	1.19	65.96	0.0003	0.8680	0.9294	1.0071
S K	0.08	0.03	2.61	61.49	0.0007	0.8495	1.0174	1.0166

Anexo 7 - Análise química semiquantitativa por EDS da amostra SA tratada com HNO₃.

Figura 32.

Element	Weight %	Atomic %	Net Int.	Error %	Kratio	Z	A	F
C K	87.69	90.97	746.68	3.91	0.6796	1.0069	0.7697	1.0000
O K	10.32	8.04	29.65	15.43	0.0113	0.9616	0.1141	1.0000
NaK	1.37	0.74	21.87	15.90	0.0058	0.8717	0.4816	1.0014
SiK	0.13	0.06	4.99	62.44	0.0011	0.8713	0.9045	1.0070
S K	0.49	0.19	16.34	15.24	0.0042	0.8528	1.0077	1.0142

Anexo 8 - Análise química semiquantitativa por EDS da amostra GT tratada com HNO₃.

Figura 34.

Element	Weight %	Atomic %	Net Int.	Error %	Kratio	Z	A	F
C K	86.03	90.63	962.52	5.09	0.5699	1.0109	0.6553	1.0000
O K	8.33	6.59	36.79	13.82	0.0091	0.9656	0.1136	1.0000
NaK	3.61	1.99	91.19	9.62	0.0156	0.8754	0.4934	1.0014
MgK	0.18	0.10	7.66	33.89	0.0010	0.8900	0.6329	1.0026
AlK	0.16	0.08	8.07	31.93	0.0011	0.8566	0.7799	1.0045
SiK	0.15	0.07	8.66	29.65	0.0012	0.8751	0.8852	1.0071
S K	0.77	0.30	39.33	11.86	0.0066	0.8565	0.9967	1.0142
ClK	0.25	0.09	11.75	26.95	0.0021	0.8146	1.0142	1.0202
CaK	0.50	0.16	16.98	18.98	0.0045	0.8250	1.0381	1.0460

Anexo 9 - Análise química semiquantitativa por EDS da amostra C tratada com HNO₃.

Figura 36.

Element	Weight %	Atomic %	Net Int.	Error %	Kratio	Z	A	F
C K	86.04	89.73	1048.06	4.18	0.6336	1.0079	0.7307	1.0000
O K	11.77	9.21	51.78	13.21	0.0131	0.9625	0.1160	1.0000
NaK	1.29	0.70	30.53	14.75	0.0053	0.8726	0.4755	1.0014
SiK	0.09	0.04	5.18	63.45	0.0007	0.8722	0.9011	1.0073
S K	0.81	0.32	41.11	11.84	0.0071	0.8536	1.0063	1.0134

Anexo 10 - Análise química semiquantitativa por EDS da amostra ES tratada com HNO₃.

Figura 38.

Element	Weight %	Atomic %	Net Int.	Error %	Kratio	Z	A	F
C K	84.15	87.61	385.15	3.66	0.7014	1.0069	0.8279	1.0000
O K	15.85	12.39	23.95	16.17	0.0183	0.9615	0.1201	1.0000

Anexo 11 - Teste de múltiplas comparações de Dunnett da avaliação entre amostras tipo

“D” e controle positivo “Diff” gerada pelo software GraphPad Prism. Gráfico 4.

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Diff vs. SA-H2O2D	0.1078	0.09854 to 0.1171	Yes	****	<0.0001
Diff vs. C-H2O2D	0.1092	0.09997 to 0.1185	Yes	****	<0.0001
Diff vs. C-HNO3D	0.1079	0.09867 to 0.1172	Yes	****	<0.0001
Diff vs. ESP-H2O2D	-0.02427	-0.03353 to -0.015	Yes	****	<0.0001
Diff vs. ESP-HNO3D	0.02927	0.02 to 0.03853	Yes	****	<0.0001

Anexo 12 - Teste de múltiplas comparações de Dunnett da avaliação entre amostras tipo

“B” e controle negativo “Basal” gerada pelo software GraphPad Prism. Gráfico 5.

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Basal vs. SA-H2O2B	0.002933	-0.008549 to 0.01442	No	ns	0.9108
Basal vs. C-H2O2B	-3.333e-005	-0.01152 to 0.01145	No	ns	>0.9999
Basal vs. C-HNO3B	-0.01667	-0.02815 to -0.005185	Yes	**	0.0050
Basal vs. ESP-H2O2B	-0.004433	-0.01592 to 0.007049	No	ns	0.6986
Basal vs. ESP-HNO3B	0.0019	-0.009582 to 0.01338	No	ns	0.9834

Anexo 13 - Teste de múltiplas comparações de Dunnett da avaliação entre amostras tipo "D-" e controle positivo "Diff" gerada pelo software GraphPad Prism. Gráfico 6.

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Diff vs. SA-H2O2D-	0.1093	0.1012 to 0.1174	Yes	****	<0.0001
Diff vs. C-H2O2D-	0.1106	0.1025 to 0.1187	Yes	****	<0.0001
Diff vs. C-HNO3D-	0.1076	0.09948 to 0.1157	Yes	****	<0.0001
Diff vs. ESP-H2O2D-	0.1072	0.09905 to 0.1153	Yes	****	<0.0001
Diff vs. ESP-HNO3D-	0.1053	0.09721 to 0.1135	Yes	****	<0.0001

Anexo 14 - Teste de múltiplas comparações de Dunnett da avaliação entre amostras tipo "B-" e controle negativo "Basal" gerada pelo software GraphPad Prism. Gráfico 7.

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Basal vs. SA-H2O2B-	0.0085	0.007046 to 0.009954	Yes	****	<0.0001
Basal vs. C-H2O2B-	0.009467	0.008013 to 0.01092	Yes	****	<0.0001
Basal vs. C-HNO3B-	0.009033	0.007579 to 0.01049	Yes	****	<0.0001
Basal vs. ESP-H2O2B-	0.007667	0.006213 to 0.009121	Yes	****	<0.0001
Basal vs. ESP-HNO3B-	0.007067	0.005613 to 0.008521	Yes	****	<0.0001