

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

BÁRBARA DE OLIVEIRA

Desenvolvimento e caracterização de biomaterial a base de grafeno para reparo de lesões em nervos periféricos em associação com laser de baixa intensidade

BAURU
2023

BÁRBARA DE OLIVEIRA

Desenvolvimento e caracterização de biomaterial a base de grafeno para reparo de lesões em nervos periféricos em associação com laser de baixa intensidade

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Odontopediatria.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado

BAURU

2023

De Oliveira, Bárbara

Desenvolvimento e caracterização de biomaterial a base de grafeno para reparo de lesões em nervos periféricos em associação com laser de baixa intensidade / Bárbara de Oliveira – Bauru, 2023.

99 p. : il. ; 31 cm.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2023.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:



Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Assistência Técnica Acadêmica
Serviço de Pós-Graduação

FOLHA DE APROVAÇÃO


Tese apresentada e defendida por
BÁRBARA DE OLIVEIRA
e aprovada pela Comissão Julgadora
em 21 de junho de 2023.

Prof.^a Dr.^a **LUCIANA LOURENÇO RIBEIRO VITOR**
UNISAGRADO

Prof. Dr. **LUCIANO CASAGRANDE**
UFRGS

Prof. Dr. **THIAGO CRUVINEL DA SILVA**
FOB-USP

Prof.^a Dr.^a **MARIA APARECIDA DE ANDRADE MOREIRA MACHADO**
Presidente da Banca
FOB - USP


Prof. Dr. Marco Antonio Hungaro Duarte
Presidente da Comissão de Pós-Graduação
FOB-USP



USP
FACULDADE
DE
ODONTOLOGIA
DE
BAURU



Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 | Bauru-SP | CEP 17012-901



www.posgraduacao.fob.usp.br



[posgraduacaofobusp](https://www.facebook.com/posgraduacaofobusp)



[fobuspoficial](https://www.youtube.com/fobuspoficial)



14 3235-8223



posgrad@fob.usp.br



[@posgradfobusp](https://www.instagram.com/@posgradfobusp)



[@FobPos](https://twitter.com/@FobPos)

ERRATA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os pacientes com lesões em nervos periféricos. Que estes estudos sirvam de apoio para o desenvolvimento de novos tratamentos e inovações.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à Prof^a Dr^a Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado pela confiança para desempenhar essa missão. Estar ao seu lado nessa jornada me inspirou a buscar meu lado pesquisador e empreendedor. Espero que possamos compartilhar muitos outros projetos e MBAs.

Agradeço à minha família por estar sempre ao meu lado. Tudo o que sou devo a vocês e este trabalho não teria iniciado e terminado se não fosse por vocês.

À minha companheira de todos os momentos, Fernanda. Palavras não são o suficiente para expressar minha gratidão. Este trabalho é tão meu quanto seu.

Às minhas parceiras queridas, Paulinha, Bianca, Mayara, Belén e Estef. Os dias nos corredores da FOB, e também fora dele, foram infinitamente mais prazerosos com vocês. Vocês carregam minha eterna gratidão pelos momentos que compartilhamos.

Às amadas Professoras Silgia e Sirlene. Muito obrigada por todo o apoio e conhecimento compartilhado no desenvolvimento e execução deste projeto. Espero um dia chegar aos pés das profissionais espetaculares que são.

Agradeço também a todos os demais professores, servidores e alunos da FOB-USP que cruzaram meu caminho durante este período. Levo um pedaço de vocês comigo. Em especial, um agradecimento à Andreia Zaik por sempre ajudar e alegrar meu dia com seu bom-humor.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Todos os esforços tendem a levar a mente humana cada vez mais próxima daquela inteligência, mas que ainda permanecerá sempre infinitamente inatingível”

Laplace (1749-1827)

RESUMO

A medicina regenerativa tem ganhado destaque nos últimos anos com o desenvolvimento de biomateriais e técnicas avançadas de recuperação de tecidos biológicos. Um dos eventos que tem se beneficiado desses estudos são as lesões no sistema nervoso periférico, um tecido altamente complexo e que apresenta processo de regeneração lento e muitas vezes incompleto. A fotobiomodulação surgiu como um método capaz de estimular o processo de regeneração nervosa, uma vez que é capaz de induzir funções celulares por meio da incidência de luz de baixa intensidade. Além dessa técnica, alguns compostos, como a quitosana e o grafeno, apresentam propriedades que podem ser combinadas, formando um biomaterial também com potencial de favorecer a regeneração do tecido nervoso. Assim, este projeto teve o intuito de incorporar óxido de grafeno reduzido em gel de quitosana para o desenvolvimento de um biomaterial capaz de otimizar a ação do laser de baixa intensidade. Para isto, quatro concentrações diferentes de óxido de grafeno reduzido foram utilizadas e os biomateriais foram submetidos a testes físico-químicos de determinação da espessura, microscopia eletrônica de varredura, AFM, dosagem de pH, ensaio de absorção de água e perda de massa, varredura espectrofotométrica e ensaios celulares. A análise dos resultados evidenciou que a dispersão do óxido de grafeno reduzido no gel da quitosana foi levemente heterogênea, porém os biomateriais contendo o composto de carbono absorveram menor quantidade de água. Os ensaios celulares de associação do laser de baixa intensidade com os biomateriais não apresentou variação significativa entre os grupos. Apesar de apresentar resultados promissores com o laser em 780 nm, estudos adicionais testando parâmetros diferentes do laser são necessários para entender o comportamento da associação na estimulação celular nervosa.

Palavras-chave: Terapia com Luz de Baixa Intensidade. Quitosana. Grafeno. Regeneração Nervosa. Materiais Biocompatíveis.

ABSTRACT

Development and characterization of a graphene-based biomaterial for application in peripheral nerve injury repair in association with low-level laser therapy

Regenerative medicine has gained attention in the last years with the development of biomaterials and advanced techniques applied for biological tissue recovery. One of the conditions that has benefited from these advancements is peripheral nerve injury, a highly complex tissue that presents a slow and incomplete regeneration. Photobiomodulation arose as a capable method to improve nerve recovery, since it stimulates cellular function by low-intensity light emission. Some compounds, such as chitosan and graphene, may be associated together and constitute a biomaterial with potential for nerve tissue regeneration as well. Therefore, this project aimed to develop a reduced graphene oxide and chitosan biomaterial able to optimize low-level laser therapy effect. Four different biomaterials, with varying concentrations of rGO, were tested and then submitted to physical-chemical analysis, as thickness determination, MEV, AFM, pH dosage, water absorption, loss of mass, spectrophotometric scan, and cell assays. The results showed the dispersion of the reduced graphene oxide in chitosan gel was slightly heterogenic, but the carbon compound biomaterials absorbed less water. The cell assays with the low-level laser did not present significant statistical variation. Although the combination of techniques seems to be promising at 780 nm, more studies are needed with different parameters of the laser to understand the benefits of the association in nerve cellular stimulation.

Keywords: Low-level light therapy. Chitosan. Graphene. Nerve regeneration. Biocompatible materials.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1 -	Processo de estimulação mitocondrial por meio do laser de baixa intensidade	30
Figura 2 -	Estruturas químicas da quitina e quitosana	34
Figura 3 -	Diferentes apresentações do grafeno e suas nomenclaturas	37
Figura 4 -	Pontos utilizados para verificação da espessura dos biomateriais	48
Figura 5 -	Etapas da análise celular	53
Figura 6 -	Aspecto final dos biomateriais	57
Figura 7 -	Aspecto da superfície dos biomateriais por MEV.....	60
Figura 8 -	Análise da topografia dos biomateriais por AFM	62

GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Comparação da espessura dos biomateriais	59
Gráfico 2 -	Absorção de água em meio ácido	63
Gráfico 3 -	Absorção de água em meio alcalino	64
Gráfico 4 -	Perda de massa em meio ácido	65
Gráfico 5 -	Perda de massa em meio alcalino	65
Gráfico 6 -	Influência do tempo sobre a variação do pH do meio	67
Gráfico 7 -	Espectro de absorção de luz	68
Gráfico 8 -	Análise da proliferação celular após aplicação de laser em 780 nm	70
Gráfico 9 -	Análise da proliferação celular após aplicação de laser em 660 nm	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Proporção de quitosana e grafeno nos diferentes biomateriais	48
Tabela 2 -	Relação dos grupos testados na análise celular	53
Tabela 3 -	Valores da determinação da espessura dos biomateriais	58

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AFM	Microscopia de Força Atômica
EDC	N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
GO	Óxido de Grafeno
LBI	Laser de Baixa Intensidade
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NHS	N-hidroxisuccinamida
rGO	Óxido de Grafeno Reduzido
SNP	Sistema Nervoso Periférico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1 Lesões no Sistema Nervoso.....	27
2.2 Terapia com Laser de Baixa Intensidade.....	29
2.3 Quitosana.....	32
2.4 Grafeno.....	35
3 PROPOSIÇÃO	43
3.1 Objetivos específicos.....	43
4 MÉTODOS	47
4.1 Caracterização físico-química.....	47
4.1.1 Desenvolvimento dos biomateriais.....	47
4.1.2 Determinação da espessura.....	48
4.1.3 Microscopia eletrônica de varredura.....	49
4.1.4 Análise por Microscopia de Força Atômica.....	49
4.1.5 Ensaio de absorção de água e perda de massa.....	49
4.1.6 Determinação de pH.....	51
4.1.7 Espectro de absorção por espectrofotometria.....	51
4.2 Estudos utilizando laser de baixa intensidade.....	52
4.2.1 Ensaio com cultura celular.....	52
4.2.2 Ensaio de viabilidade celular utilizando o método MTT	54
4.3 Análise estatística.....	54
5 RESULTADOS	57
5.1 Desenvolvimento do biomaterial.....	57
5.2 Determinação da espessura e Microscopia eletrônica de varredura.....	57
5.3 Análise por Microscopia de Força Atômica.....	61
5.4 Absorção de água e perda de massa.....	63
5.5 Dosagem de pH.....	66
5.6 Espectro de absorção por espectrofotometria.....	67
5.7 Análise de viabilidade celular pelo MTT.....	69
6 DISCUSSÃO	75
6.1 Limitações.....	83
7 CONCLUSÕES	87

1

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O sistema nervoso compreende um nível de organização do corpo humano voltado para a interpretação de sinais e controle de ações, sendo dividido em sistema nervoso central (encéfalo e medula espinhal) e sistema nervoso periférico (nervos, gânglios e terminações nervosas). Lesões em nervos periféricos são decorrentes de traumas que podem lesar ou romper a estrutura do nervo, levando a deficiências motoras e sensoriais (BARBOSA et al., 2010; AKGUL; GULSOY; GULCUR, 2014). Além de dor, perda dos sentidos e movimento prejudicado (FARONI et al., 2015), muitas vezes os pacientes carecem de longo prazo de hospitalização, resultado de reabilitação ruim, e dependência excessiva de cuidados, provocando impacto social e econômico significativo ao paciente e familiares (CHAN; CATHARINE; FURLAN, 2018). Devido à complexidade do processo de recuperação desse tecido, menos de 25% dos acometidos por lesão no nervo periférico recuperam a função motora, enquanto apenas 3% readquirem a sensibilidade (HOUSHYAR; BHATTACHARYYA; SHANKS, 2019).

Apesar do sistema nervoso periférico (SNP) ser capaz de regenerar axônios lesionados, este processo ocorre lenta e, na maioria das vezes, incompletamente (AKGUL; GULSOY; GULCUR, 2014; BEI et al., 2019). A recuperação do nervo depende da extensão da lesão e de sua localização, bem como de fatores intrínsecos ao paciente (MODRAK et al., 2020). Algumas abordagens envolvem reparação microcirúrgica (BEI et al., 2019) ou a utilização de enxerto de nervo autólogo quando a anastomose não for possível (MODRAK et al., 2020). Contudo, visto que os componentes celulares e moleculares ao redor do nervo também se tornam inviáveis, essas abordagens muitas vezes falham em obter uma recuperação completa e funcional da região (FARONI et al., 2015). Outras abordagens menos

invasivas incluem terapias farmacológicas e celulares, porém, apesar dos avanços, nenhuma se mostrou um tratamento eficaz universal ou livre de efeitos colaterais potentes (MODRAK et al., 2020).

Um dos métodos alternativos de grande destaque utilizado para a regeneração celular é a terapia com laser de baixa intensidade (LBI) ou também chamada de fotobiomodulação. Por meio da excitação de células e tecidos com energia luminosa, o laser é capaz de estimular funções celulares, promover a reparação e regeneração tecidual, além de diminuir a inflamação e aliviar a dor (ANDERS; LANZAFAME; ARANY, 2015; YADAV; GUPTA, 2017). Tendinopatias, osteoartrites e cicatrização de feridas são algumas das afecções que podem se beneficiar com o uso dessa terapia (DOMPE et al., 2020). Em nervos periféricos, auxilia na melhora do suprimento sanguíneo, reprodução celular e síntese de colágeno, além de proporcionar ações analgésicas, anti-inflamatórias e redução de edema (LINS et al., 2010; BUCHAIM et al., 2015).

Recentemente, têm-se demonstrado que a engenharia de tecido, por meio de formulações como *scaffolds*, géis, filmes e fibras, também é capaz de auxiliar o processo de recuperação de células neurais (BEI et al., 2019), por promover a migração, adesão e proliferação celular. Dentre os compostos utilizados para a confecção desses biomateriais, os polímeros naturais se destacam por possuírem boas propriedades, como biodegradabilidade e biocompatibilidade, e fonte de extração mais sustentável que os polímeros sintéticos (FORNASARI et al., 2020). Os mais utilizados para essa prática são ácido hialurônico, colágeno, quitina, quitosana, gelatina e fibrina (FORNASARI et al., 2020).

A quitosana, um polissacarídeo derivado da desacetilação da quitina, é um polímero natural largamente empregado em diversas áreas, como cosmética,

alimentícia e farmacêutica (NITTA; NUMATA, 2013; LAN et al., 2015; LI et al., 2018). Em virtude de suas excelentes propriedades quando no organismo, dentre elas, biocompatibilidade, atividade antimicrobiana, fácil adesão a tecidos e vasos, e biodegradabilidade (CROISIER; JEROME, 2013; LAN et al., 2015; SILVA et al., 2017; LI et al., 2018), a quitosana tem sido amplamente testada na área médica, sendo engenharia de tecido, sistema de liberação e curativo de ferida suas principais aplicações (MOHEBBI et al., 2018). Pode também ser utilizada para a regeneração de inúmeros tecidos, como nervoso, ósseo, cartilaginoso, vascular, pele, tendões e ligamentos (MOHEBBI et al., 2018), já que suas características permitem contato íntimo com o tecido lesionado e auxiliam na promoção de efeitos locais. Na regeneração de tecido nervoso, a quitosana favorece o crescimento de axônios (HAASTERT-TALINI et al., 2013; STENBERG et al., 2016), e os produtos de degradação, como os quito-oligossacarídeos, influenciam positivamente a regeneração do nervo (ZHAO et al., 2017). Ainda, estudos *in vivo* demonstram que é um material com alto potencial para uso na regeneração de tecido nervoso por auxiliar na orientação de células Schwann e diferenciação de células neuronais (NEUBRECH et al., 2016).

Um fator limitante do uso da quitosana como biomaterial é sua baixa resistência mecânica (FORNASARI et al., 2020), característica que pode ser superada com a adição de outros elementos (BOECKER et al., 2019). Um dos materiais utilizados para melhorar as propriedades mecânicas da quitosana é o grafeno (YANG et al., 2021), um composto de carbono que possui boas propriedades físico-químicas e fácil funcionalização. Isolado a partir da esfoliação do grafite (NOVOSELOV et al. 2004), o grafeno é constituído por uma camada planar bidimensional de átomos de carbono, formando ligações imensamente fortes entre si

(NOORDEN, 2011; SHAREENA et al., 2018). Seu tipo de arranjo molecular, em formatos de anéis benzílicos exibindo um padrão que se assemelha à conformação do favo de mel, confere ao material, além de uma fina espessura, uma razão força-peso excepcionalmente alta (NOORDEN, 2011). Ainda, este tipo de formação hexagonal permite conduzir eletricidade com facilidade, oferecendo baixa resistência elétrica e gerando baixa quantidade de calor (NOORDEN, 2011; SHAREENA et al., 2018).

Em consequência da sua estabilidade química e capacidade de conduzir energia elétrica, o grafeno e seus derivados (óxido de grafeno e óxido de grafeno reduzido) têm sido amplamente utilizados na área biomédica (LEE et al., 2018). Alguns trabalhos já relataram o uso deste material como dispositivo condutor capaz de promover a recuperação do tecido nervoso (AKHAVAN et al., 2014; LU et al., 2016; CHEN et al., 2019b), a estimulação de células-tronco neurais (AKHAVAN; GHADERI; SHIRAZIAN, 2015; FANG et al., 2020) e, quando utilizado como *scaffold*, a migração, proliferação e diferenciação de células PC12, uma linhagem estabelecida de células neuroblásticas, derivadas de feocromocitoma da medula adrenal de ratos (WANG et al., 2019; VIJAYAVENKATARAMAN et al., 2019).

Ainda se discute o poder citotóxico e, por consequência, a biocompatibilidade e biodegradabilidade de compostos de carbono, como o grafeno, quando em contato com o organismo. Apesar dos já citados efeitos biológicos, alguns estudos relatam possíveis efeitos tóxicos desse material (EFREMOVA et al., 2015; JIA et al., 2019). Uma revisão recente, entretanto, demonstrou que a conjugação do grafeno com polissacarídeos, dentre eles a quitosana, melhorou as características citotóxicas e biocompatíveis desse composto (MAKVANDI et al., 2020). Em adição, outros estudos verificaram boa biocompatibilidade e adesão celular, além de baixa

toxicidade, quando utilizado como *scaffold*, biossensor ou sistema de liberação de fármacos (REINA et al., 2017; CHEN et al., 2019a; KIM et al., 2020).

Apesar dos avanços da tecnologia e da medicina, ainda é necessário progredir na área de regeneração tecidual, em destaque, na regeneração do tecido nervoso em razão da sua alta complexidade e distinção. Com base nas características de compostos químicos e biológicos e das tecnologias disponíveis, acredita-se que a associação da quitosana com o grafeno possa originar um material capaz de intensificar as propriedades terapêuticas do laser de baixa intensidade, servindo como uma técnica alternativa para regeneração do tecido nervoso. Deste modo, o presente estudo tem o intuito de desenvolver e caracterizar um material bioestimulador a base de grafeno e quitosana que possa vir a ser utilizado no reparo de tecido nervoso em conjunto com o laser de baixa intensidade.

2

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Lesões no Sistema Nervoso

O sistema nervoso compreende um nível de organização do corpo humano voltado para a interpretação de sinais e controle de movimentos, sendo dividido em duas partes: sistema nervoso central (encéfalo e medula espinhal) e sistema nervoso periférico (nervos, gânglios e terminações nervosas). Lesões no sistema nervoso periférico (SNP) são desordens clínicas provocadas por corte, mudanças de temperatura, compressões agudas ou prolongadas, tração mecânica e infecções, que levam a deficiências motoras e sensoriais (BARBOSA et al., 2010; AKGUL; GULSOY; GULCUR, 2014). Além de dor, perda dos sentidos e movimento prejudicado (FARONI et al., 2015), muitas vezes os pacientes carecem de longo prazo de hospitalização, resultado de reabilitação ruim, e dependência excessiva de cuidados, provocando impacto social e econômico significativo ao paciente e familiares (CHAN; CATHARINE; FURLAN, 2018). A dor relativa aos processos neuropáticos pode persistir por meses ou até mesmo anos, impactando a funcionalidade física e, conseqüentemente, a qualidade de vida (MUNIZ, et al., 2021). Dada a complexidade do processo de recuperação do tecido nervoso, menos de 25% dos acometidos por lesão no nervo periférico recuperam a função motora, enquanto apenas 3% readquirem a sensibilidade (HOUSHYAR; BHATTACHARYYA; SHANKS, 2019).

Apesar do SNP ser capaz de regenerar axônios lesionados, este processo ocorre lenta e, na maioria das vezes, incompletamente (AKGUL; GULSOY; GULCUR, 2014; BEI et al., 2019). A recuperação do nervo depende da extensão da lesão e de sua localização, bem como de fatores intrínsecos ao paciente (MODRAK

et al., 2020). Para lesões menores de 3 cm, a estratégia mais comum é a reparação microcirúrgica (BEI et al., 2019), na qual as extremidades lesionadas são conectadas formando uma anastomose, ou por meio de um enxerto de nervo autólogo quando a anastomose não for possível (MODRAK et al., 2020). Contudo, visto que os componentes celulares e moleculares ao redor do nervo também se tornam inviáveis, a abordagem microcirúrgica muitas vezes falha em obter uma recuperação completa e funcional da região (FARONI et al., 2015). Para lesões maiores, o padrão ouro é o enxerto autólogo, o qual evita o estiramento excessivo e reduz a formação de tecido cicatricial no local lesionado. Entretanto, tal técnica requer múltiplas cirurgias e frequentemente a região doadora do nervo apresenta má recuperação funcional (HOUSHYAR; BHATTACHARYYA; SHANKS, 2019). Outras abordagens menos invasivas incluem terapias farmacológicas e celulares, porém, apesar dos avanços, nenhuma se mostrou um tratamento livre de efeitos colaterais potentes (MODRAK et al., 2020).

Como propostas alternativas às técnicas microcirúrgicas, o uso de células-tronco (KUBIAK et al., 2020) e biomateriais, tais como os conduítes (VIJAYAVENKATARAMAN, 2020), têm ganhado visibilidade. Entretanto, embora promissores, são métodos invasivos e ainda não testados de forma clínica. Dentre os métodos não cirúrgicos, destacam-se a estimulação elétrica, a estimulação magnética e a fototerapia com laser. Todavia, a implementação dessas técnicas na prática clínica exige conhecimento maior sobre possíveis efeitos adversos nos tecidos circundantes e eficácia em lesões extensas (>3 cm) (VIJAYAVENKATARAMAN, 2020). A terapia de fotobiomodulação, embora apresente resultados prósperos na regeneração de tecido nervoso (BAREZ et al., 2017; AYAR et al., 2022), ainda carece de estudos que esclareçam as condições

ideais de tempo e potência de aplicação visando extrair o resultado mais promissor dessa técnica (ANDREO et al., 2017).

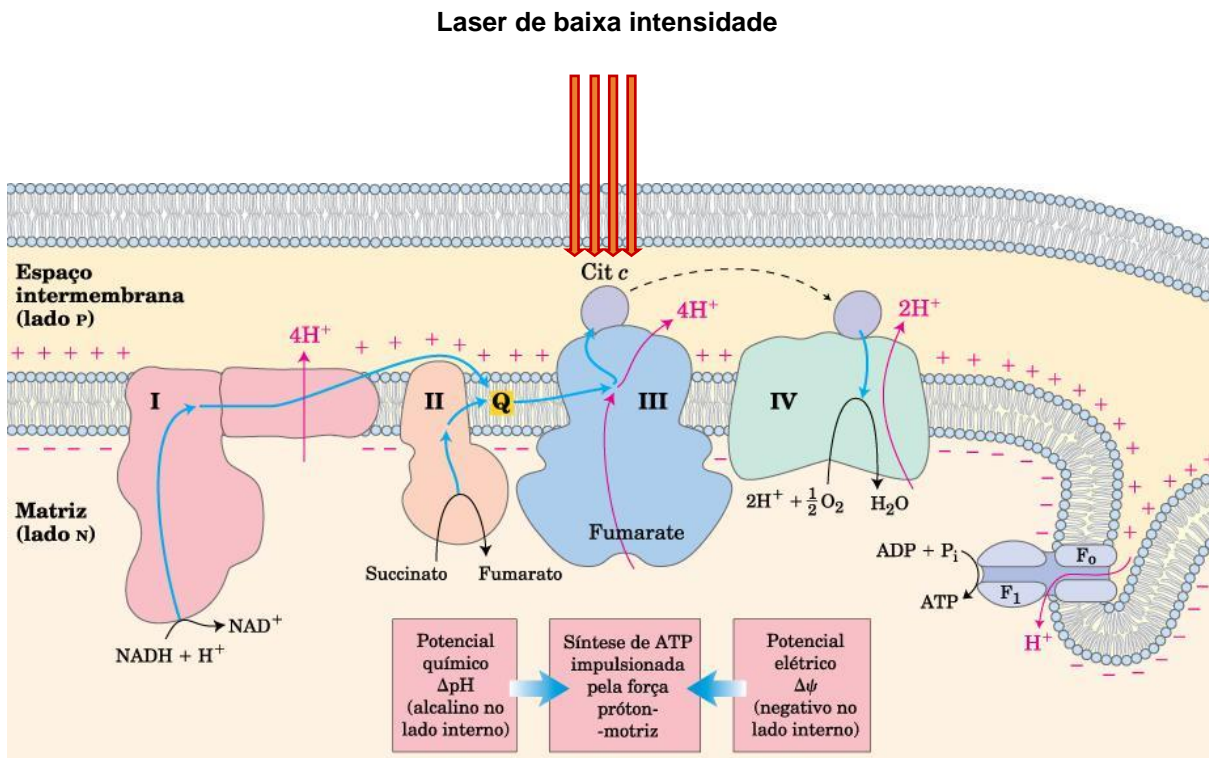
2.2 Terapia com Laser de Baixa Intensidade

Nos últimos anos, a terapia com laser de baixa intensidade (LBI) ganhou destaque devido ao seu efeito terapêutico fotobiomodulador. Por possuir um espectro eletromagnético compreendido entre as regiões do vermelho e infravermelho e baixa densidade energética, o LBI é capaz de penetrar a pele e tecidos moles e promover efeitos biológicos com repercussões físicas e químicas (MUNIZ, et al., 2021).

Embora ainda não bem estabelecido, é comumente aceito que o seu mecanismo de ação envolva a absorção de fótons pelo citocromo c oxidase, uma enzima pertencente à cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, levando ao aumento da síntese de ATP e fornecimento de energia para os processos celulares de regeneração (MUNIZ, et al., 2021; TOPALOGLU; BAKAY, 2022) (Figura 1). Outros estudos apontam para ações mediadas pelo aumento do suprimento sanguíneo e proliferação celular (MUNIZ et al., 2021). Independente do mecanismo de ação, sabe-se que como reação ao processo de estímulo bioquímico ocorre aumento da síntese de DNA, proliferação celular, cicatrização, neurogênese, analgesia, inflamação e estresse oxidativo, para citar alguns dos processos envolvidos durante a fotobiomodulação (TOPALOGLU; BAKAY, 2022). Contudo, apesar de viabilizar a regeneração tecidual, o laser de baixa intensidade não possui efeito de cura direta, mas estimula o organismo nos processos de resposta

inflamatória e reparação tecidual através da excitação celular (SILVA et al., 2007; BARROS et al., 2008; LINS et al., 2010).

Figura1 – Processo de estimulação mitocondrial por meio do laser de baixa intensidade



FONTE: LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica. 3ª Edição. São Paulo: **Sarvier**, 2002.

Tendinopatias, osteoartrites e cicatrização de feridas são algumas das afecções que podem ser tratadas com o uso dessa técnica (DOMPE et al., 2020). Em nervos periféricos, o LBI auxilia na melhora do suprimento sanguíneo, reprodução celular e síntese de colágeno, além de proporcionar ações analgésicas, anti-inflamatórias e redução de edema (LINS et al., 2010; BUCHAIM et al., 2015). Dentre os efeitos que o laser de baixa intensidade é capaz de promover no tecido nervoso periférico pode-se destacar aumento do diâmetro axonal e da bainha de

mielina, aumento no número de células Schwann e dos fatores de crescimento neurotróficos e diminuição do infiltrado inflamatório (ANDREO et al., 2017).

O uso de diferentes modelos de lasers varia de acordo com o comprimento de onda (632-1064 nm), energia, densidade, duração, repetição e tipo da lesão (HASHMI et al., 2010; DOMPE et al., 2020). Devido à diversidade de combinações de parâmetros e à escassez de estudos clínicos, não há uma padronização no tratamento com LBI para regeneração de nervos periféricos. Segundo revisão conduzida por Andreo et al., 2017, a maioria dos estudos realizados *in vivo* utilizam potência de até 50 mW e máximo 15J de energia, com comprimento de onda variando entre 632,8 e 980 nm (ANDREO et al., 2017). Embora os parâmetros utilizados nos estudos sejam dissimilares, o efeito positivo sobre a regeneração de lesões em nervos periféricos é percebido de forma concordante, corroborando a eficácia terapêutica do laser de baixa intensidade para reparo de lesões em nervos.

Em um trabalho que investigou a ação do LBI em pacientes com síndrome do túnel do carpo de leve à moderada (780 nm, 30 mW, onda contínua, 3,4 J/cm²/ponto, 90 seg/ponto), os resultados demonstraram, dentre outros achados, superioridade do laser sobre o placebo com relação à redução da dor e do encurtamento do tempo de latência sensorial e motora (LAZOVIC et al., 2014). Em modelos animais, a aplicação de 660 nm, 60 J/cm², 40mW/cm² melhorou o processo inflamatório em ratos com nervo ciático lesionado (ALCÂNTARA et al., 2013) e levou ao aumento do diâmetro da fibra nervosa e da função motora dos animais em comparação com o laser de 808 nm (MEDALHA et al., 2012).

Apesar da miríade de estudos promissores na área de fotobiomodulação, devido à heterogeneidade dos desenhos clínicos ainda não é possível estabelecer

os parâmetros ótimos de aplicação do laser de baixa intensidade no processo de regeneração de nervos periféricos lesionados. A diversidade de combinação dos parâmetros em conjunto com as características particulares de tecido dificulta o estabelecimento de condições ideais de ação do laser. Assim, é necessário que estudos complementares sejam realizados para que se possa encontrar as melhores condições de eficácia e segurança terapêutica da fotobiomodulação em tecido nervoso.

2.3 Quitosana

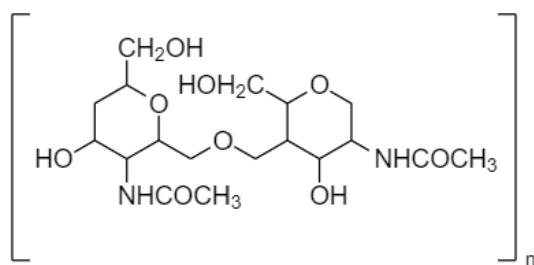
Recentemente, têm-se demonstrado que a engenharia de tecido, por meio de formulações como *scaffolds*, géis, filmes e fibras, também é capaz de auxiliar o processo de recuperação de células neurais (BEI et al., 2019), por promover a migração, adesão e proliferação celular. Dentre os compostos utilizados para a confecção desses biomateriais, os polímeros naturais se destacam por possuírem boas propriedades biológicas, como biodegradabilidade e biocompatibilidade, fonte de extração mais sustentável que os polímeros sintéticos, além de disponibilidade a partir de fontes renováveis, tornando-os financeiramente acessíveis (FORNASARI et al., 2020). Os mais utilizados para essa prática são ácido hialurônico, colágeno, quitina, quitosana, gelatina e fibrina (FORNASARI et al., 2020).

Apesar das inúmeras vantagens, os polímeros naturais apresentam um processo de purificação extenso, o que pode dificultar o processo em larga escala e o aparecimento de variabilidades químicas entre os lotes. Além disso, diferentemente dos sintéticos, os polímeros naturais normalmente possuem fracas propriedades mecânicas (FORNASARI et al., 2020), como baixa resistência

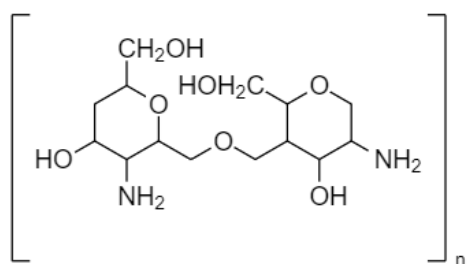
e rigidez, motivo pelo qual sua utilização pode ser preterida. Os biomateriais sintéticos, por sua vez, possuem propriedades mecânicas ajustáveis e fácil produção em larga escala, entretanto, carecem de biocompatibilidade e biodegradabilidade, dificultando a aplicação na prática terapêutica (FORNSARI et al., 2020).

Os principais polímeros naturais utilizados na regeneração de tecido nervoso pertencem ao grupo dos polissacarídeos (ácido hialurônico, quitosana, quitina, alginato), proteínas (colágeno, gelatina, queratina, fibrina) e poliésteres derivados de fontes naturais ([poli (ácido 3-hidroxi-butírico) e poli (ácido 3-hidroxi-butírico-co-3-hidroxi-valérico)]) (FORNASARI et al., 2020). Dentre esses, destaca-se a quitosana, um composto obtido através da desacetilação da quitina, que possui capacidade para formar filmes, biocompatibilidade, biodegradabilidade e fonte abundante e renovável (BARRA et al., 2019) (Figura 2). Suas características permitem a aplicação em diversas áreas, como farmacêutica, cosmética e alimentícia. Estruturalmente é formada por repetições de uma cadeia de N-acetil-D-glucosamina ligado a uma unidade de D-glucosamina, sendo, assim, um polímero solúvel em água em pH baixo devido a protonação do grupamento amino (ALI; AHMED, 2018). Dependendo do método e da fonte de extração, seu peso molecular pode variar de 300 a 1000 kD e o grau de desacetilação, de 30 a 95% (ALI; AHMED, 2018).

Figura 2 – Estruturas químicas da quitina e quitosana



QUITINA



QUITOSANA

Em virtude de suas excelentes propriedades biológicas, dentre elas, atividade antimicrobiana e fácil adesão a tecidos e vasos (CROISIER; JEROME, 2013; LAN et al., 2015; SILVA et al., 2017; LI et al., 2018), a quitosana tem sido amplamente estudada como biomaterial para a regeneração de inúmeros tecidos, como nervoso, ósseo, cartilaginoso, vascular, pele, tendões e ligamentos (MOHEBBI et al., 2018), já

que suas características permitem contato íntimo com o tecido lesionado e auxiliam na promoção de efeitos locais. Na regeneração de tecido nervoso, a quitosana favorece o crescimento de axônios (HAASTERT-TALINI et al., 2013; STENBERG et al., 2016), e seus produtos de degradação, como os quito-oligossacarídeos, influenciam positivamente a regeneração do nervo (ZHAO et al., 2017). Ainda, estudos *in vivo* demonstram que é um material com alto potencial para uso na regeneração de tecido nervoso por auxiliar na orientação de células Schwann e diferenciação de células neuronais (NEUBRECH et al., 2016).

Visto ser um material biocompatível, derivado de fonte renovável e versátil, a quitosana oferece amplas oportunidades para aplicação na área de regeneração de tecido. Entretanto, assim como os demais polímeros naturais, a falta de propriedades mecânicas dificulta o seu emprego, exigindo, para isso, que se faça associações com materiais com boas características biológicas e capazes de melhorar suas qualidades físico-químicas.

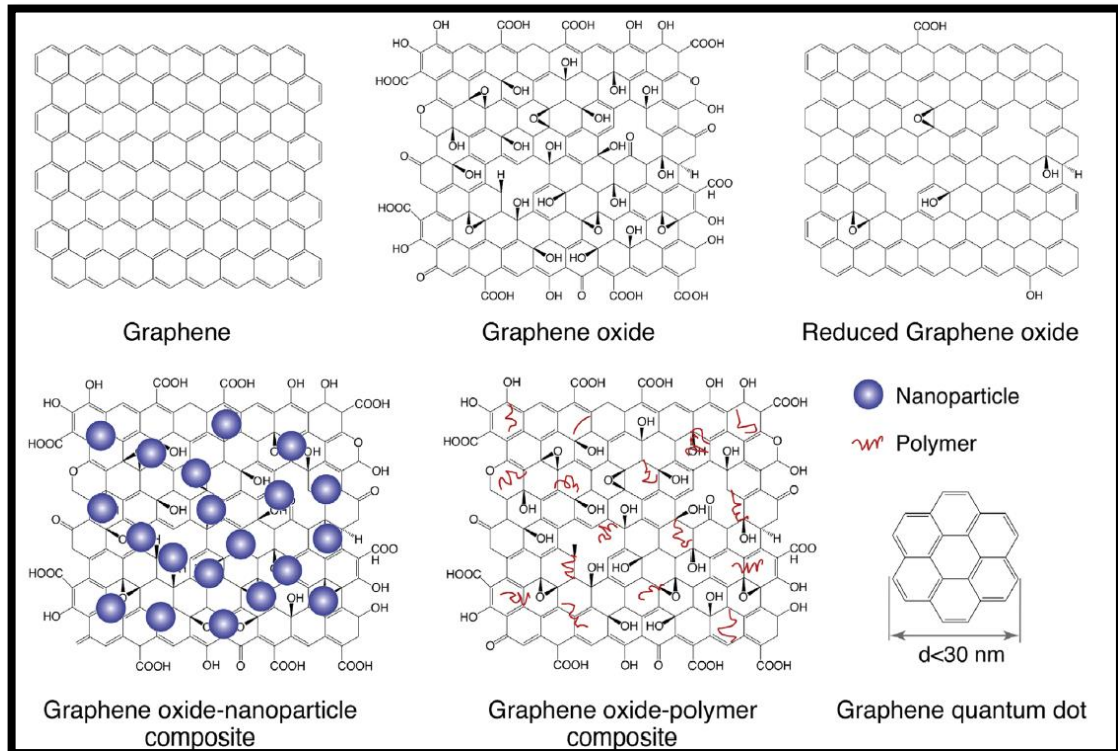
2.4 Grafeno

Nos últimos anos, a aplicação de nanocompostos de carbono foi extensamente explorada devido às características excepcionais desses elementos. Um desses materiais é o grafeno, um composto formado por carbonos hibridizados sp^2 isolado a partir da esfoliação do grafite (NOVOSELOV et al. 2004) e constituído por uma camada planar bidimensional de átomos, que formam ligações imensamente fortes entre si (NOORDEN, 2011; SHAREENA et al., 2018). Seu tipo de arranjo molecular, em formatos de anéis benzílicos que exibem um padrão semelhante à conformação do favo de mel, confere ao material, além de uma fina espessura, uma razão força-peso notavelmente alta (NOORDEN, 2011). Ainda, este

tipo de formação hexagonal permite conduzir eletricidade com facilidade, por oferecer baixa resistência elétrica e gerar baixa quantidade de calor (NOORDEN, 2011; SHAREENA et al., 2018).

O grafeno possui diversas denominações a depender de sua composição, número de camadas, modificação química e dimensões laterais (PATIL; BAHADUR; TIWARI, 2020). As principais formas encontradas desse material são o grafeno monocamada, “few layers”, óxido de grafeno (GO), óxido de grafeno reduzido (rGO) e grafeno quantum dots (GDO) (XIAOLI et al., 2020) (Figura 3). Dentre esses, GO e rGO apresentam grande aplicação na área terapêutica (ANSARI et al., 2019), apesar de apresentarem características distintas entre si. Enquanto o óxido de grafeno reduzido apresenta uma estrutura sp^2 não-oxidada, com alta hidrofobicidade, o GO se mostra como um material oxidado, sp^3 , com alta razão carbono-oxigênio (C/O) e com superfície carregada (PATIL; BAHADUR; TIWARI, 2020; XIAOLI et al., 2020). O grafeno e o rGO são excelentes condutores e o GO possui a vantagem de ser facilmente funcionalizado. Ainda, o grafeno puro é inerte em ambientes biológicos e tem a propensão de agregar em soluções aquosas, enquanto o GO apresenta falta de condutividade (YUE et al., 2012; LEE et al., 2018), mas se solubiliza melhor em meios aquosos (YUE et al., 2012; TIAN et al., 2021).

Figura 3 – Diferentes apresentações do grafeno e suas nomenclaturas



FONTE: XIAOLI, F.; QIYUE, C.; WEIHONG, G.; YAQING, Z.; CHEN, HU.; JUNRONG, W.; LONGQUAN, S. Toxicology data of graphene-family nanomaterials: an update. Archives of Toxicology, v. 94, p. 1915-1939, 2020.

Em razão das características físico-químicas singulares, dentre as quais pode-se citar a grande área superficial, boas propriedades mecânicas, condutividade elétrica e térmica e características topográficas notáveis (WANG et al., 2019), o grafeno e seus derivados têm sido aplicados em diversas áreas, como na engenharia de tecido, desenvolvimento de eletrodos e sensores, *drug delivery* e

terapias para o câncer (ANSARI et al., 2019). Alguns trabalhos relatam o uso deste material como dispositivo condutor capaz de promover a recuperação do tecido nervoso (AKHAVAN et al., 2014; LU et al., 2016; CHEN et al., 2019b), estimular células-tronco neurais (AKHAVAN; GHADERI; SHIRAZIAN, 2015; FANG et al., 2020) e, quando utilizado com *scaffold*, a migração, proliferação e diferenciação de células PC12, uma linhagem estabelecida de células neuroblásticas, derivadas de feocromocitoma da medula adrenal de ratos (WANG et al., 2019; VIJAYAVENKATARAMAN et al., 2019).

Além dos efeitos na regeneração de tecidos, há alguns relatos na literatura da associação do grafeno e seus derivados com laser fotodinâmico ou fotobioestimulador. Pan et al. mostrou que, em associação com laser próximo ao infravermelho, um biomaterial constituído por óxido de grafeno reduzido foi capaz de provocar calor local e gerar espécies reativas de oxigênio, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, e provocar danos físico e químico à bactéria *Staphylococcus aureus* (MRSA), se mostrando como uma possível alternativa para o tratamento de bactérias super-resistentes (PAN et al., 2016). O mesmo efeito pode ser percebido em outros estudos com diferentes bactérias e utilizando laser fotodinâmico (GHOLIBEGLOO et al., 2018; XIA et al., 2019). Além da atividade antimicrobiana, a associação de biomateriais de grafeno com lasers (baixa intensidade, fotodinâmica e fototérmico – nas regiões do vermelho e infra-vermelho) também tem sido promissora para o combate de células cancerosas *in vitro* (JAFARIRAD et al., 2018; WANG et al., 2022). O uso de *scaffolds* de quitosana com nanotubos de carbono em conjunto com fotobiomodulação também comprovou efeito terapêutico na regeneração óssea (SILVA et al., 2022), reforçando o potencial da associação de materiais de carbono em associação com laser terapêutico.

Embora promissor, a capacidade antimicrobiana do grafeno ainda apresenta controvérsias. Alguns autores atribuem isso às diferenças de dosagens, tempo de exposição, cepa bacteriana e condições do meio aos quais os experimentos foram conduzidos (PALMIERI et al., 2017; SEIFI; KAMALI, 2021). Tais achados ressaltam a necessidade de estudos que possam certificar as condições ideais do uso dessa associação em meio biológico.

Devido às suas excelentes características e, conseqüentemente, o avanço no uso desse material em aplicações biomédicas, é necessário compreender os aspectos que podem levar à toxicidade, seja humana, animal ou mesmo ambiental do uso do grafeno. Ainda se discute o poder citotóxico e, por consequência, a biocompatibilidade e biodegradabilidade de compostos de carbono, como o grafeno, quando em contato com o organismo. Apesar dos já citados efeitos biológicos, alguns estudos relatam possíveis efeitos nocivos desse material (EFREMOVA et al., 2015; JIA et al., 2019). É sabido que a toxicidade de um material depende de vários fatores, como suas características físico-químicas, a via de contato com o organismo (oral, dérmica, respiratória) e a frequência e dose de exposição à essa substância. Alguns estudos demonstraram intoxicação respiratória, digestória e até neurotóxica do grafeno. Entretanto, os estudos variam com relação a dose, o tempo de exposição, o tipo do material utilizado (GO, rGO, FLG, QDGO), e funcionalização ou não desse material com outras substâncias (XIAOLI et al., 2020).

Gies e Zou avaliaram a toxicidade do óxido de grafeno em diferentes tipos celulares, diferentes períodos de tempo e tamanho do floco de grafeno, e verificaram uma não linearidade da toxicidade, ou seja, para cada tipo celular foi identificada um padrão de efeito tóxico (GIES; ZOU, 2018). Uma revisão recente, por outro lado,

demonstrou que a conjugação do grafeno com polissacarídeos, dentre eles a quitosana, melhorou as características citotóxicas e biocompatíveis desse composto (MAKVANDI et al., 2020). Em consonância, outros estudos verificaram boa biocompatibilidade e adesão celular, além de baixa toxicidade, quando utilizado como *scaffold*, biossensor ou sistema de liberação de fármacos (REINA et al., 2017; CHEN et al., 2019a; KIM et al., 2020). As grandes variações de resultados encontrados acerca da capacidade tóxica do grafeno demonstram a necessidade de investigar mais a fundo o perfil de segurança desse material, porém também evidenciam a possibilidade de aplicação do grafeno em meio biológico.

Apesar dos avanços da tecnologia e da medicina, ainda é necessário progredir na área de regeneração tecidual, em destaque, na regeneração do tecido nervoso em razão da sua alta complexidade e distinção. Com base nas características de compostos químicos e biológicos e das tecnologias disponíveis, acredita-se que a associação da quitosana com o grafeno possa originar um material capaz de intensificar as propriedades terapêuticas do laser de baixa intensidade, servindo como uma técnica alternativa para regeneração do tecido nervoso. Deste modo, o presente estudo tem o intuito de desenvolver e caracterizar um material bioestimulador a base de grafeno e quitosana que possa ser utilizado em conjunto com o laser de baixa intensidade otimizando o processo de reparo de tecido nervoso.

3

Objetivo/
Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Com base no proposto, esse trabalho tem o objetivo de desenvolver e caracterizar um biomaterial a base de grafeno e quitosana com potencial de otimizar a ação do laser de baixa intensidade no tratamento e reparo de tecido nervoso.

3.1 Objetivos específicos

- Desenvolver biomateriais compostos por quitosana e diferentes concentrações de grafeno utilizando o método de evaporação de solvente;
- Avaliar as características físico-químicas das membranas;
- Verificar a morfologia e a capacidade de absorção de luz dos biomateriais;
- Avaliar a capacidade dos materiais, em associação com o laser de baixa intensidade, em preservar a viabilidade de células PC12.

4 Métodos

4 MÉTODOS

4.1 Caracterização físico-química

4.1.1 Desenvolvimento dos biomateriais

Para o desenvolvimento dos biomateriais, um gel de quitosana (Sigma Aldrich, St. Louis, USA, $\geq 75\%$ de desacetilação) foi preparado dissolvendo 5g em 250 mL de solução de ácido acético 2% (v/v) em temperatura ambiente. Após a suspensão da quitosana em solução ácida, 1% (p/p) de glicerol foi adicionado para conferir plasticidade ao biomaterial final. Em seguida, as membranas foram confeccionadas variando em três concentrações de grafeno: 0,1%, 0,3% e 0,5% (p/p) (Tabela 1). Assim, quantidades equivalentes de óxido de grafeno reduzido foram pesadas e adicionadas ao gel de quitosana, totalizando quantidade suficiente para 4,0 g, e então submetidos a um processo de agitação em agitador magnético por 1 hora e aquecimento à 50°C, a fim de incorporar todo o grafeno no gel. Por fim, a mistura de quitosana e grafeno foi distribuída em placa de petri 60 x 15 mm e solidificado em estufa à aproximadamente 45°C por 24h.

Depois de confeccionados, os biomateriais foram armazenados à temperatura ambiente por 24h.

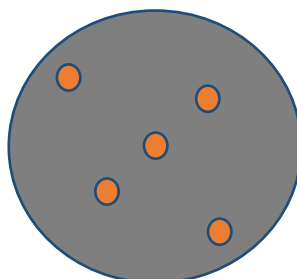
Tabela 1: Proporação de quitosana e grafeno nos diferentes biomateriais

Biomaterial	Massa em gramas de grafeno (g)
Quitosana (controle negativo)	
Quitosana + grafeno 0,1%	0,0040
Quitosana + grafeno 0,3%	0,0120
Quitosana + grafeno 0,5%	0,0200

4.1.2 Determinação da espessura

Após o período de condicionamento em temperatura ambiente, foram efetuadas cinco leituras em pontos distintos para a determinação da espessura de cada biomaterial. Para isso, foi utilizado um micrômetro externo digital capacidade 0-25 mm e resolução 0,001 mm, modelo Digital Coolant Proof 293-230 (Mitutoyo, São Paulo, Brasil). Para a mensuração, foram escolhidos dois pontos mais externos, dois pontos intermediários e um ponto central, conforme ilustrado na figura abaixo (Figura 4):

Figura 4: Pontos utilizados para verificação da espessura dos biomateriais



4.1.3 Microscopia eletrônica de varredura

Para a análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) as amostras foram cortadas em tamanho compatível com a área de análise do microscópio e analisadas nos aumentos 150x, 1000x, 2000x e 5000x utilizando o microscópio eletrônico de varredura Zeiss EVO-LS15.

4.1.4 Análise por Microscopia de Força Atômica

A topografia dos biomateriais também foi avaliada por Microscopia de Força Atômica, uma técnica de caracterização morfológica precisa em escala micro e nanométrica. Para isso, foi utilizado o equipamento Nanosurf CoreAFM.

4.1.5 Ensaio de absorção de água e perda de massa

A fim de simular a capacidade do biomaterial em absorver água e perder massa em ambiente biológico, foram preparadas soluções que simulam o suor humano. Para isso, as soluções foram preparadas em pH 5,5 e 7,8 e preparadas conforme abaixo:

Suor alcalino:

0,5 g de monoclórohidrato de L-histidina

5,0 g de cloreto de sódio

5,0 g de ortofosfato dissódico dodecahidratado

Ao final, foi feito ajuste de pH (7,8) com solução de NaOH 0,1M

Suor ácido:

0,5 g de monoclórohidrato de L-histidina

5,0 g de cloreto de sódio

2,2 g de ortofosfato monossódico dihidratado

Ao final, o ajuste do pH (5,5) foi feito com solução NaOH 0,1M

Para realizar os ensaios de absorção de água e perda de massa, os biomateriais foram cortados, pesado e deixados em estufa à 37°C por 24h, para retirada da umidade, e então imersos em solução de suor à pH levemente básico (7,8) e levemente ácido (5,5), respeitando a proporção de 1 cm²/mL. A escolha do pH está relacionada com a variação de pH encontrado na pele. Uma pele saudável tem pH em torno de 4,1-5,8, porém algumas regiões, como axila, virilha e interdígitos dos pés, exibem valores entre 6,1 e 7,4 (PROKSCH, 2018). Após a imersão nos meios, os frascos com as amostras foram colocados em uma incubadora com agitação à 37°C por 3h, 6h e 24h. Passado o período experimental, foram removidos e pesados novamente. Os valores obtidos foram utilizados para determinar a absorção de água.

O mesmo processo foi realizado para determinar a perda de massa dos biomateriais, porém, após a segunda pesagem, as membranas passaram por um processo de secagem em estufa à 37°C por 24 horas, e pesados uma terceira vez. A absorção de água e a perda de massa foram calculadas conforme as equações a seguir:

$$\text{Absorção de água (\%)} = \left[\frac{M_w - M_i}{M_i} \right] \times 100$$

$$\text{Perda de massa (\%)} = \left[\frac{M_i - M_f}{M_i} \right] \times 100$$

M_i = massa inicial das amostras no início do ensaio;

M_w = massa das amostras após serem removidas da cuba agitadora nos períodos de 3h, 6h e 24h;

M_f = massa final das amostras, após serem removidas do meio solvente e decorridas 24h de secagem.

4.1.6 Determinação de pH

Para a determinação do pH, novamente os biomateriais foram recortados, deixados na estufa por 24 horas à 37°C, e imersos nas soluções de suor respeitando a proporção 1 cm²/mL. Os frascos com as amostras ficaram sob agitação em cuba agitadora, em temperatura ambiente, por 3h, 6h e 24h. Após os períodos, os tubos contendo os biomateriais foram colocados em vórtex para agitação por 30 segundos e, então, as leituras dos meios ácidos e básicos foram realizadas em pHmetro K39-1420A (Kasvi, Paraná, Brasil) previamente calibrado.

4.1.7 Espectro de absorção por espectrofotometria

Utilizando o espectrofotômetro (Beckman Coulter DU 730 UV/Vis), foi realizada uma análise de varredura dos biomateriais nos comprimentos de onda 900 nm – 190 nm. Para isso, as misturas contendo quitosana e diferentes concentrações de grafeno foram adicionados em cubetas de quartzo e feita a análise de varredura. Como a concentração de grafeno no gel de quitosana estava muito alta para realizar

a leitura em espectrofotômetro, a dispersão foi diluída para 0,05% e 0,01% de grafeno.

4.2 Estudos utilizando o laser de baixa intensidade

4.2.1 Ensaios com cultura celular

Para a condução dos ensaios celulares foi realizado o cultivo de células PC12, uma linhagem de células neuroblásticas derivadas de tumor da medula adrenal de ratos. Para isso, as células foram mantidas em meio de cultura (DMEM, suplementado com 15% de soro bovino fetal e 1% de penicilina/estreptomicina) e incubadas em estufa à 37°C e 5% de CO₂ (LU et al., 2020). Foi realizada a troca do meio de cultura a cada 2-3 dias até atingir confluência. As células utilizadas nos ensaios estavam entre a 4^a e 8^a passagem.

As análises celulares foram conduzidas com os quatro grupos (biomaterial de quitosana e biomateriais com quitosana + grafeno nas concentrações 0,1%, 0,3% e 0,5% (p/p)) e para cada grupo foram realizadas verificações em conjunto com a aplicação do laser de baixa intensidade.

Para isso, as células foram plaqueadas em uma placa de 96 poços (1x10⁴ células/poço), mantendo um poço de distância entre cada plaqueamento, e deixadas na estufa por 24h para adesão no fundo do poço. Decorrido o tempo na estufa, os biomateriais, previamente cortados no tamanho do poço da placa de cultura e esterilizados por 15 min em luz UV, foram colocadas sobre o meio de cultura (MOMBINI et al., 2019; LU et al., 2020). Os poços foram estimulados pelo laser de baixa intensidade do tipo InGaAIP (3,75 J/cm², 15mW, onda contínua por 10

segundos) durante 1 semana, em dias intercalados (3 aplicações por semana) (TAKHTFOOLADI et al., 2015; OLIVEIRA; SANTOS-EICHLER; DALE, 2020). Ao final do processo de aplicação do laser os biomateriais eram retirados dos poços e descartados. Além do branco e do controle negativo, foi incluído um grupo de controle positivo, no qual as células foram estimuladas diretamente com o LBI sem a associação de biomateriais. A análise consistiu em, além de avaliar a viabilidade das células após estimulação com LBI em associação com os biomateriais, comparar dois comprimentos de onda de aplicação: um no visível (660 nm) e outro no infravermelho (780 nm). Ao final do período de aplicação, as células foram encubadas por 24 h e, então, realizado o ensaio de viabilidade celular.

Tabela 2 – Relação dos grupos testados na análise celular

Grupo 1	Controle Negativo (sem tratamento)
Grupo 2	Controle Positivo (LBI)
Grupo 3	Qui + LBI
Grupo 4	(Qui e rGO 0,1%) + LBI
Grupo 5	(Qui e rGO 0,3%) + LBI
Grupo 6	(Qui e rGO 0,5%) + LBI

Figura 5 – Etapas da análise celular



4.2.2 Ensaio de viabilidade celular utilizando o método do MTT

Para o ensaio de viabilidade celular foi utilizado o método do MTT ((brometo de 3 (4,5 dimetiltiazol-2-il) - 2,5 difenil tetrazolium)) desenvolvido inicialmente por Mosmann (1983). Ao final do processo de estimulação celular com os tratamentos evidenciados acima e após o intervalo de incubação, o sobrenadante foi descartado e as células lavadas com PBS. Em seguida, 110 μ L da solução de MTT (0,5 mg/mL) foram adicionados em cada poço para incubação por 4h à 37°C ao abrigo da luz. A solução de MTT foi então descartada e os poços lavados com 100 μ L de DMSO para dissolver os cristais azuis. Por fim, a absorbância foi determinada em um espectrofotômetro de placa (Synergy MX, BioTek) utilizando o comprimento de onda de 570 nm (MOMBINI et al., 2019).

4.3 Análise estatística

Os resultados dos testes de caracterização físico-química foram tabulados utilizando o programa estatístico GraphPad Prism[®] e para os ensaios celulares utilizou-se o Jamovi[®]. Todas as análises foram analisadas utilizando o teste One-Way ANOVA, aplicando como análise a posteriori o Teste de Tukey e empregando um nível de significância de 5%.

5

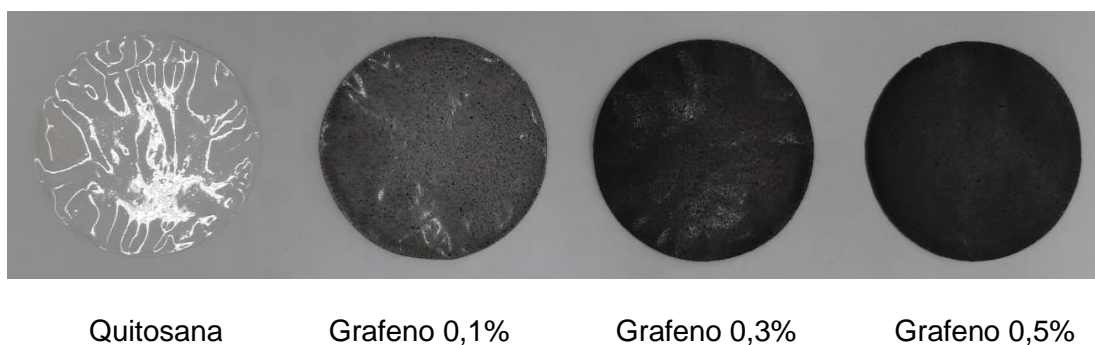
Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Desenvolvimento do biomaterial

A técnica de evaporação de solvente, utilizada para a confecção das membranas, foi eficaz para o desenvolvimento dos biomateriais em todas as concentrações, porém apresentou algumas imprecisões. Apesar de mostrarem boa maleabilidade e resistência mecânica, é possível verificar pontos de concentração de grafeno espalhados pela membrana, principalmente na de maior concentração (rGO 0,5%), conforme pode ser visto na figura abaixo. Devido à quantidade de grafeno adicionado, as membranas ficaram mais escuras e opacas quanto maior foi a quantidade de óxido de grafeno reduzido adicionada, enquanto a de quitosana apresentou um aspecto transparente e brilhante:

Figura 6 – Aspecto final dos biomateriais



5.2 Determinação da espessura e Microscopia eletrônica de varredura

O aspecto pouco homogêneo das membranas com grafeno foi confirmado com as análises de espessura e microscopia eletrônica de varredura. Com relação a espessura, o biomaterial com maior concentração de óxido de grafeno reduzido

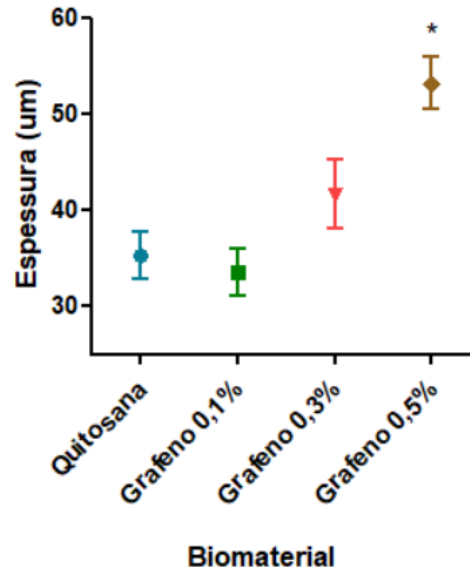
(0,5%) foi o que apresentou maior resultado e variação significativa com relação à membrana de quitosana (gráfico 1). Na tabela 3, é possível verificar que, para as membranas contendo o composto de carbono, as medidas das bordas das membranas exibiram espessura maior, enquanto no centro foi observado espessura menor. Esse resultado indica que uma parte do óxido de grafeno reduzido se concentrou nas laterais do biomaterial de forma proporcional à quantidade de óxido de grafeno reduzido adicionado, ou seja, a membrana de concentração 0,1% apresentou maior homogeneidade, com menor deposição de grafeno nas bordas, e a membrana de concentração 0,5% ($p < 0,001$), a menor homogeneidade e maior quantidade de material depositado nas laterais:

Tabela 3 – Valores da determinação da espessura dos biomateriais

Triplicata/ Região	Quitosana			Grafeno 0,1%			Grafeno 0,3%			Grafeno 0,5%		
	<i>i</i>	<i>ii</i>	<i>iii</i>	<i>i</i>	<i>ii</i>	<i>iii</i>	<i>i</i>	<i>ii</i>	<i>iii</i>	<i>i</i>	<i>ii</i>	<i>iii</i>
C	33	20	25	32	26	22	25	32	29	40	47	52
M1	37	32	29	22	26	33	30	34	41	45	49	43
M2	31	25	27	28	31	24	25	40	32	41	43	52
B1	43	46	52	44	42	52	46	58	71	65	64	72
B2	48	42	38	39	45	37	48	53	60	70	59	56
Média	38,4	33	34,2	33	34	33,6	34,8	43,4	46,6	52,2	52,4	55

Legenda: C = região central, M1 = primeira região mediana, M2 = segunda região mediana, B1 = primeira região das bordas, B2 = segunda região das bordas. Cada coluna corresponde a uma triplicata do ensaio: (i) primeira triplicata; (ii) segunda triplicata; (iii) terceira triplicata.

Gráfico 1 – Comparação da espessura dos biomateriais



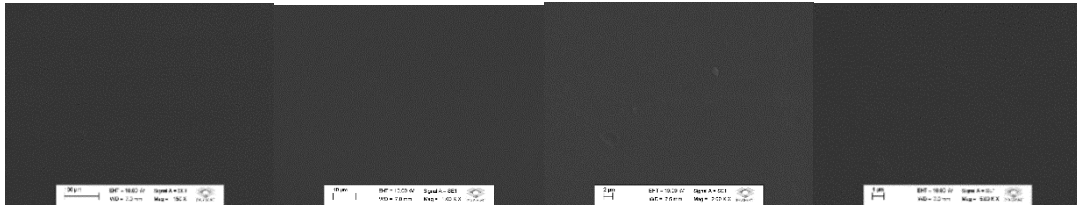
Legenda: Valor médio da espessura dos biomateriais após aferição de 5 pontos distintos. *Resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Com relação às imagens obtidas pelo microscópio eletrônico de varredura, o biomaterial de quitosana exibiu uma superfície lisa e homogênea em toda sua extensão. Já os materiais contendo óxido de grafeno reduzindo mostraram uma superfície mais rugosa e com pequenos grânulos de grafeno, conforme é possível perceber nos maiores aumentos:

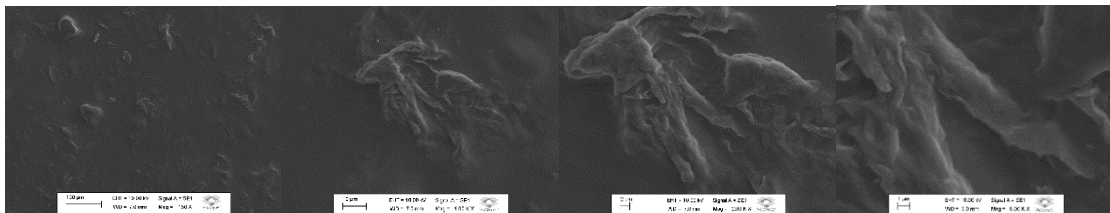
Figura 7 – Aspecto da superfície dos biomateriais por MEV

Aumento 150x 1Kx 2Kx 5Kx

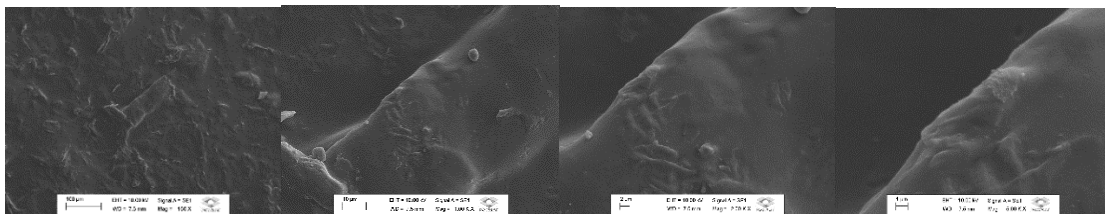
Quitosana



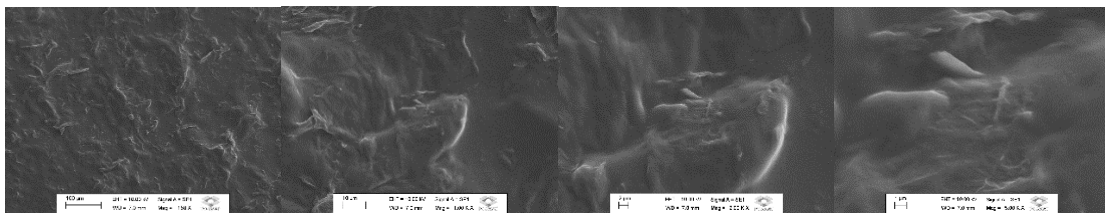
rGO 0,1%



rGO 0,3%



rGO 0,5%



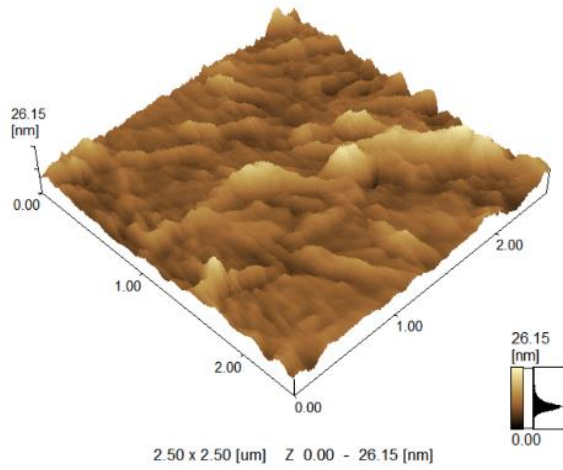
A visualização por microscopia eletrônica de varredura corrobora os achados da análise da espessura, comprovando a baixa dispersão do óxido de grafeno reduzido em quitosana nas condições testadas. Apesar disso, o biomaterial composto pela menor concentrações de rGO apresentou resultados mais semelhantes à membrana de quitosana, evidenciando que a técnica de evaporação de solvente, além de simples e rápida, pode ser indicada para situações de baixa concentração do composto de carbono.

5.3 Análise por Microscopia de Força Atômica

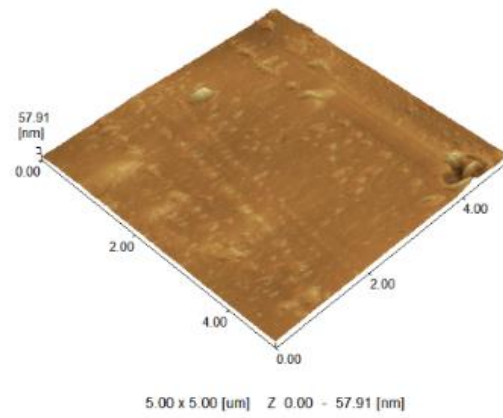
Indo de encontro as imagens obtidas por MEV, a análise por AFM evidenciou maior altura topográfica dos biomateriais contendo óxido de grafeno reduzido. Também é possível verificar que as membranas contendo 0,3% e 0,5% do composto de carbono apresentaram ondulações, enquanto a de quitosana e rGO 0,1%, apesar da rugosidade, são mais planas, não apresentando curvaturas (Figura 8):

Figura 8: Análise da topografia dos biomateriais por AFM

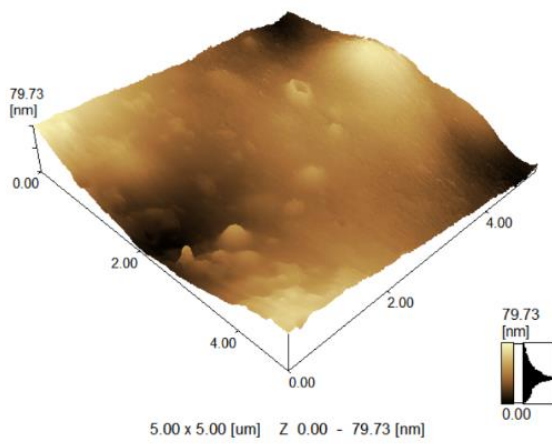
Quitossana



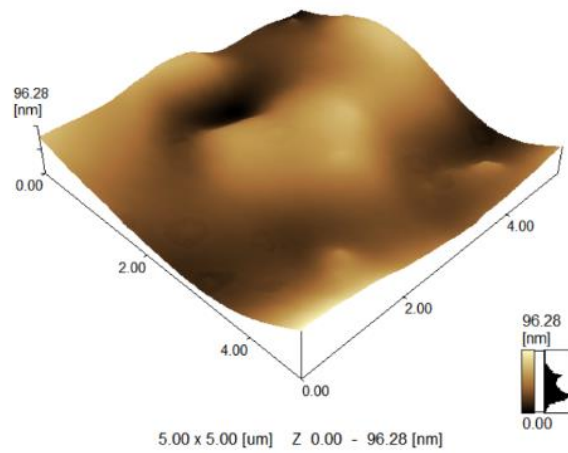
rGO 0,1%



rGO 0,3%



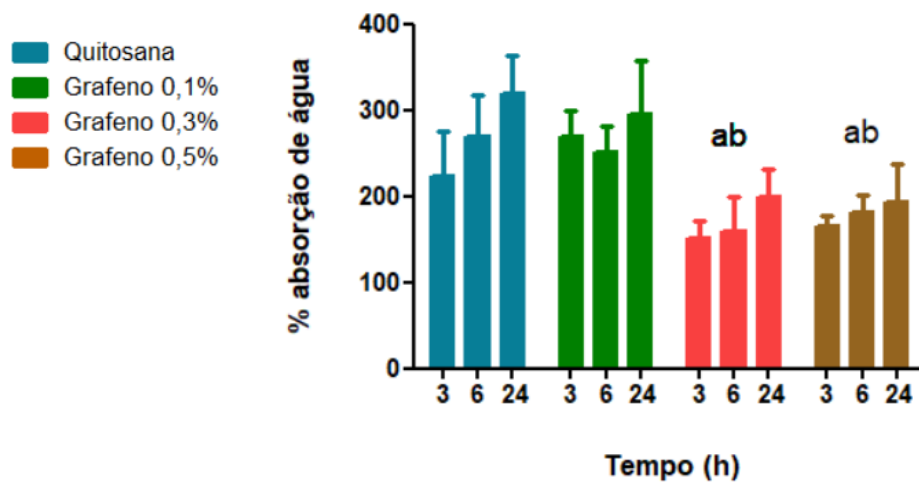
rGO 0,5%



5.4 Absorção de água e perda de massa

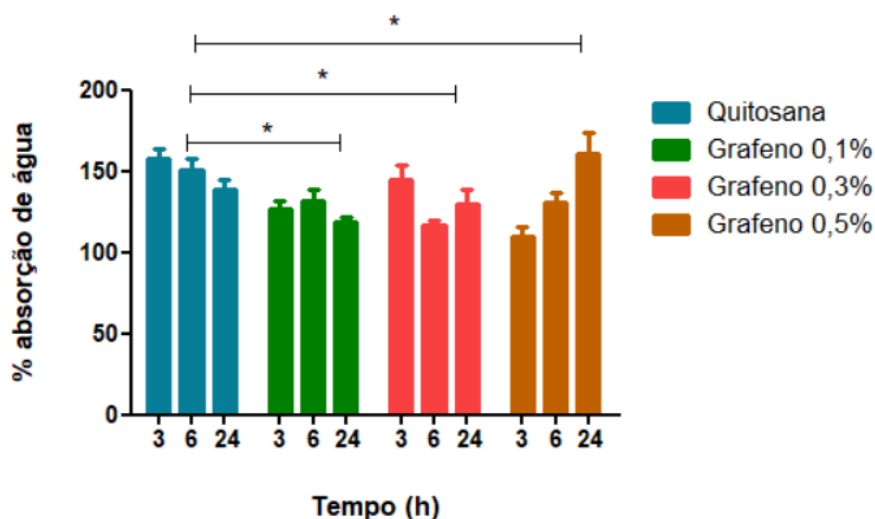
A análise da absorção de água revelou que, para o suor ácido, os biomateriais rGO 0,3% ($p < 0,05$) e 0,5% ($p < 0,05$) absorveram menor quantidade de água com uma variação estatisticamente significativa com relação às membranas de quitosana e rGO 0,1%. Para o suor alcalino, a absorção foi estatisticamente significativa entre todos os grupos contendo óxido de grafeno reduzido e o controle de quitosana:

Gráfico 2 – Absorção de água em meio ácido



Legenda: Gráfico da variação da absorção de água pelo tempo em meio ácido. As médias dos biomateriais foram comparadas utilizando o teste estatístico One-Way ANOVA. ^{a,b}Resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

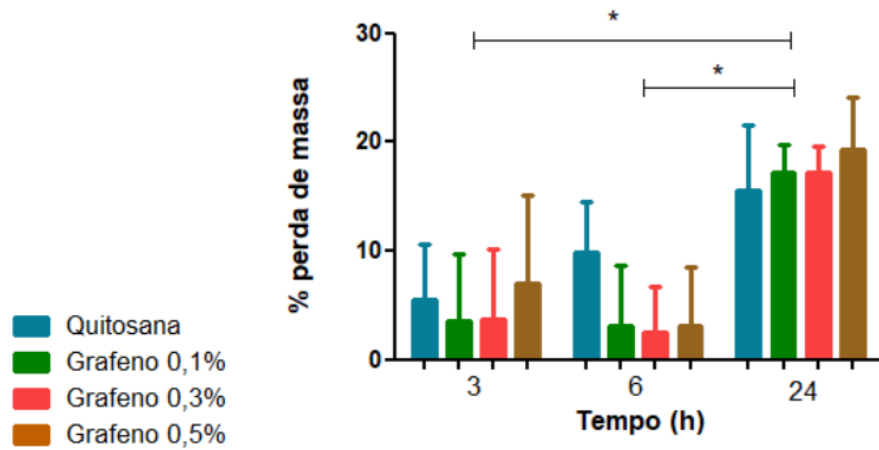
Gráfico 3 – Absorção de água em meio alcalino



Legenda: Gráfico da variação da absorção de água pelo tempo em meio alcalino. As médias dos biomateriais foram comparadas utilizando o teste estatístico One-Way ANOVA. *Resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

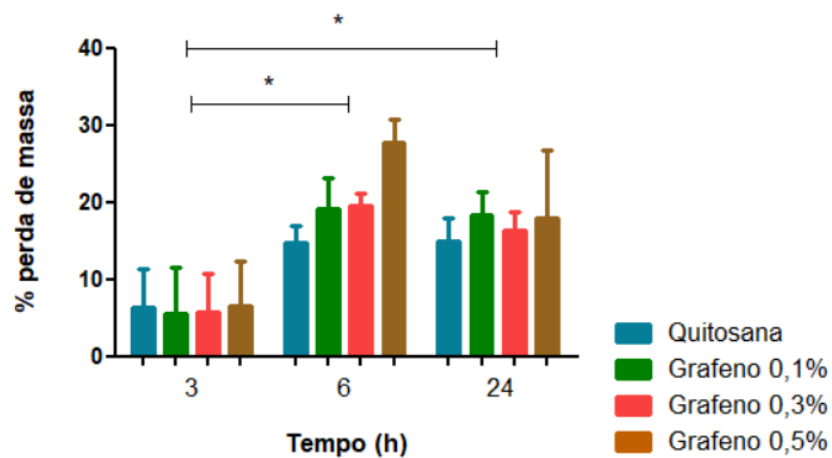
Para a análise de perda de massa, todas as amostras apresentaram variação estatisticamente semelhante, ou seja, não houve diferença entre os grupos. Entretanto, para ambos os meios analisados houve variação significativa entre os tempos de análises. Para o suor ácido (gráfico 4), a diferença foi significativa após 24h de análise para todos os grupos, e para o suor alcalino, a variação ocorre a partir de 6h de análise:

Gráfico 4 – Perda de massa em meio ácido



Legenda: Gráfico da variação da perda de massa pelo tempo em meio ácido. As médias dos biomateriais foram comparadas utilizando o teste estatístico One-Way ANOVA. *Resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Gráfico 5 – Perda de massa em meio alcalino



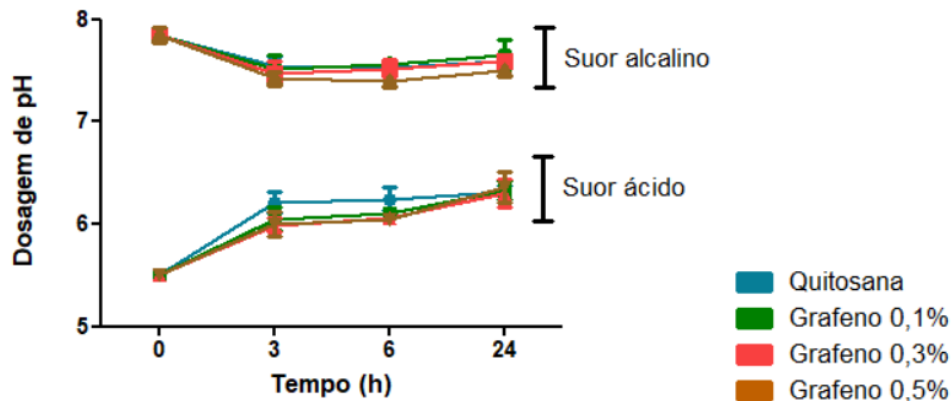
Legenda: Gráfico da variação da perda de massa pelo tempo em meio alcalino. As médias dos biomateriais foram comparadas utilizando o teste estatístico One-Way ANOVA. *Resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Visto que todos os materiais apresentaram variações semelhantes, e dadas as características físico-químicas dos compostos, a variação da perda de massa reflete a baixa solubilização dos mesmos nos meios testados. Por serem substâncias de difícil solubilização em água, a perda de massa é mais expressiva conforme se aumenta os tempo de exposição dos biomateriais no meio. Apesar da maior perda de massa vista para o suor alcalino após 6h de exposição, não houve diferença significativa entre os tempos 6h e 24h, indicando que a perda de massa máxima ocorre a partir de 6h e se mantém após 24h.

5.5 Dosagem de pH

Conforme verificado no gráfico abaixo, nenhum grupo apresentou variação do pH do meio nos tempos analisados para ambos os meios testados. Os achados indicam que, apesar da perda de massa significativa para todos os grupos a partir de 6h (suor alcalino) e 24h (suor ácido), a alteração ocorrida no meio não é forte o suficiente para provocar variação do pH:

Gráfico 6 – Influência do tempo sobre a variação de pH do meio



Legenda: Gráfico da variação do pH pelo tempo nos meios ácido e alcalino. As médias dos biomateriais foram comparadas utilizando o teste estatístico One-Way ANOVA.

Embora de forma intergrupar os grupos não tenham apresentado diferença significativa sobre a variação do pH do meio, quando se observa a variação de forma intragrupo, todos os biomateriais alteraram o pH do meio de forma significativa para ambos os meios a partir do tempo 3h, ou seja, houve variação para os tempos entre o início da análise e após os intervalos 3, 6 e 24h. O perfil semelhante entre os grupos, tanto para o suor ácido quanto para o suor alcalino, sugere que a variação do pH do meio se dá através da solubilização da quitosana no suor, não havendo interferência do óxido de grafeno reduzido.

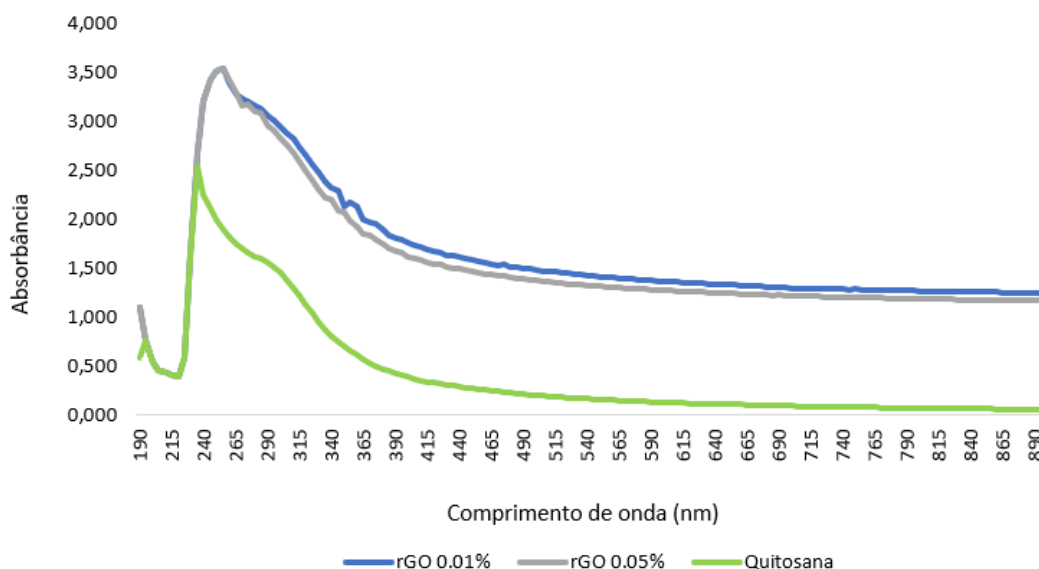
5.6 Espectro de absorção por espectrofotometria

A análise de varredura na região do UV-Vis objetivou verificar os comprimentos de onda de absorção de luz do gel de quitosana e do gel de quitosana

com óxido de grafeno reduzido. Por se tratar de um material escuro, não foi possível verificar a absorção do gel com nenhuma das concentrações de rGO (0,1, 0,3 e 0,5%). Por isso, para obtenção do espectro de absorção, a concentração do grafeno foi reduzida para 0,01% e 0,05% (p/p).

Apesar de maior valor de absorbância ter sido encontrada para as soluções diluídas de rGO, os materiais apresentaram característica de absorção muito semelhantes. Ambos exibem um pico de absorção próximo ao comprimento de onda 260 nm. Observando os valores absolutos, verifica-se que o gel contendo apenas quitosana possui absorção máxima no comprimento de onda próximo ao 235 nm e os géis diluídos contendo quitosana e óxido de grafeno reduzido possuem pico de absorção próximo ao comprimento 255 nm:

Gráfico 7- Espectro de absorção de luz



Legenda: Gráfico do espectro de absorção de luz de géis contendo quitosana e quitosana com óxido de grafeno reduzido nas concentrações 0,01% e 0,05% (p/p).

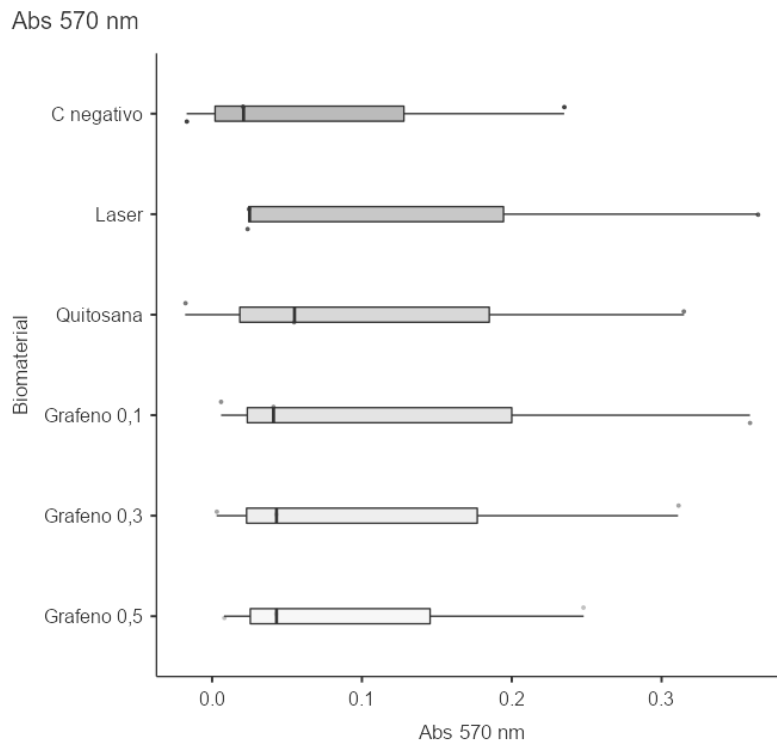
Embora os géis contendo rGO (rGO 0,01% = 3,543 abs e rGO 0,05% = 3,544 abs) tenham sido diluídos e apresentem valor absoluto de absorbância maior que o gel de quitosana (2,540 abs), nenhuma varredura mostrou absorção nos comprimentos de onda próximo do vermelho (aproximadamente 600 nm) ou infravermelho (acima de 780 nm). Apesar da transmitância da quitosana ser maior que dos géis contendo óxido de grafeno reduzido, os resultados evidenciam que os compostos absorvem luz em comprimentos de onda diferentes do comprimento de onda aplicação do laser de baixa intensidade.

5.7 Análise de viabilidade celular pelo método MTT

O ensaio de MTT permitiu verificar que, para ambos os comprimentos de onda testados, nenhum biomaterial foi capaz de otimizar a ação do laser de baixa de forma significativa nas condições testadas.

Em associação com o laser de baixa intensidade no comprimento de onda do infravermelho (780 nm), o gráfico evidencia um comportamento semelhante de efeito entre biomateriais sobre a proliferação celular. Entretanto, as medianas dos resultados para os grupos dos biomateriais foram discretamente maiores que a mediana obtida para o grupo que recebeu apenas o laser de baixa intensidade. Também é possível notar que a absorbância detectada para todos os grupos foi baixa, se concentrando entre 0,0 e 0,2 Abs:

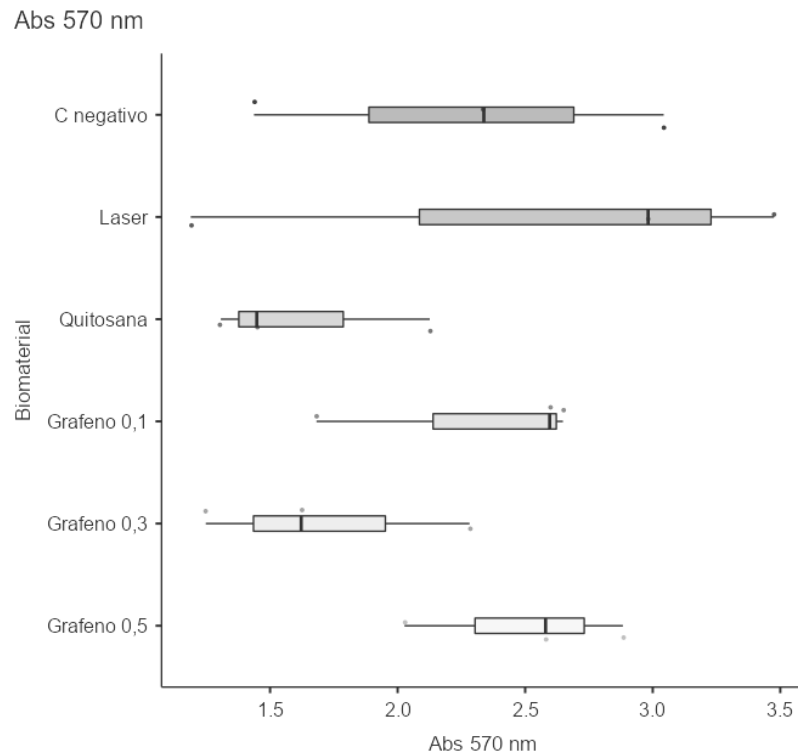
Gráfico 8 – Análise da proliferação celular após aplicação de laser em 780 nm



Legenda: Gráfico da proliferação celular após o protocolo de aplicação do laser de baixa intensidade no comprimento de onda de 780 nm. As médias dos biomateriais foram comparadas utilizando o teste estatístico One-Way ANOVA. Resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Para a análise utilizando o laser no comprimento de onda na região do vermelho (660 nm), os resultados foram mais heterogêneos, com valores de absorvância variando entre 1,5 e 3,0 Abs. Entretanto, nenhum grupo com biomaterial apresentou resultado superior ao grupo com laser:

Gráfico 9 - Análise da proliferação celular após aplicação de laser em 660 nm



Legenda: Gráfico da proliferação celular após o protocolo de aplicação do laser de baixa intensidade no comprimento de onda de 660 nm. As médias dos biomateriais foram comparadas utilizando o teste estatístico One-Way ANOVA. Resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

As análises celulares demonstram que os biomateriais não foram capazes de otimizar a ação do laser de baixa intensidade nas condições testadas para ambos os comprimentos de onda utilizados. Entretanto, para o infravermelho, todos os biomateriais apresentaram mediana superior à mediana dos grupos controle e laser, indicando que possivelmente um efeito positivo na proliferação celular de células nervosas poderia ser verificado quando analisadas utilizando tempo maior de aplicação de laser ou período maior de tratamento.

Com relação aos resultados obtidos para o comprimento de onda do vermelho, as membranas de quitosana e rGO 0,3% apresentaram resultado de absorvância menor que o grupo controle negativo. Embora o resultado não tenha sido significativo, e devido à heterogeneidade dos resultados, outros estudos são necessários para confirmar um potencial tóxico ou de eficácia das membranas quando associado ao LBI no comprimento de onda de 660 nm.

6

Discussão

6 DISCUSSÃO

O processo de regeneração de tecido nervoso periférico, além de longo e doloroso, afeta drasticamente a qualidade de vida do paciente e de seus familiares e provoca impacto social e financeiro. Estima-se que, nos Estados Unidos, a perda econômica provocada por lesões nos nervos periféricos exceda 150 bilhões de dólares anualmente e os custos com tratamento ultrapassa os bilhões de dólares todo ano (LI et al., 2021). Com o aprimoramento da engenharia de tecidos, diversas aplicações envolvendo polímeros naturais obtiveram êxito na regeneração do tecido nervoso, de forma *in vitro* e *in vivo* (ASHRAF et al., 2018; ZHA et al., 2020), e a área ganhou destaque como um campo promissor, mas ainda passível de ser explorado.

No tocante ao desenvolvimento de um biomaterial, é fundamental que sua superfície se apresente uniforme e que as características físicas, químicas e biológicas sejam resguardadas, de forma que o efeito biológico possa ser homogêneo por toda sua extensão. O método escolhido para o desenvolvimento do biomaterial neste projeto foi o *solvent casting* ou evaporação de solvente, no qual o polímero e demais substâncias de interesse são suspensas em uma solução, despejados em um molde e passam por um processo de evaporação do solvente em estufa (ILYAS et al., 2022). A técnica de *solvent casting* é uma das mais comuns e simples dentre as utilizadas para a fabricação de membranas de quitosana (MASI et al., 2019).

Após o desenvolvimento, as características morfológicas da membrana foram avaliadas por meio da determinação da espessura, MEV e AFM. A análise da espessura evidenciou que a membrana de quitosana e de rGO 0,1% apresentaram homogeneidade por toda sua extensão, não havendo pontos de deposição no biomaterial. Além disso, ambas as membranas exibiram resultados muito

semelhantes, não havendo diferença significativa entre si. Já para as membranas rGO 0,3% e rGO 0,5% foi observado maior espessura nas bordas, devido ao acúmulo de grafeno nessa região, além de valores de espessura maiores que a membrana de quitosana em todos os pontos analisados. Entretanto, apenas para a membrana com maior quantidade de grafeno (0,05%) foi verificada uma espessura significativamente maior com relação à membrana de quitosana.

A análise por microscopia eletrônica de varredura corroborou os valores encontrados para a espessura. A membrana de quitosana pura apresentou-se homogênea por toda sua extensão em todos os aumentos. As membranas contendo óxido de grafeno reduzido, por outro lado, apresentaram-se rugosas e com quantidades de rGO dispersados de forma heterogênea pelo biomaterial, conforme pode ser visto no menor aumento. Resultados semelhantes foram encontrados na análise por AFM. Os biomateriais de óxido de grafeno reduzido apresentaram topografia mais elevada e ondulações ao longo da membrana. Já o biomaterial de quitosana, apesar de exibir uma leve rugosidade que se estende por todos os lados, são pontos de baixa altura, o que confere ao material aspecto mais homogêneo e menor espessura. Esses achados evidenciam má incorporação do óxido de grafeno reduzido no gel de quitosana. Além da dispersão, a análise de microscopia eletrônica por varredura permitiu observar que não há formação de poros em nenhuma membrana, ou seja, todas se mostraram íntegras e maciças.

Os resultados de morfologia demonstram que o processo de *solvent casting*, embora rápido e pouco custoso, não foi eficaz para o desenvolvimento de um biomaterial homogêneo em nenhuma concentração de óxido de grafeno reduzido utilizada. Um dos fatores determinantes para a obtenção desses achados acredita-se ser a falta de interação química entre os compostos. Alguns estudos conduzidos

com quitosana e óxido de grafeno utilizaram EDC (N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida) e NHS (N-hidroxisuccinamida) para formar e estabilizar ligações amidas entre a porção -NH₂ da quitosana e a porção -COOH do óxido de grafeno (EMADI et al., 2017; LIU et al., 2017; WANG et al., 2021). Já no método utilizado neste trabalho, o processo de dispersão do óxido de grafeno reduzido em quitosana foi provocado apenas por agitação, utilizando agitador magnético, e temperatura levemente elevada, para proporcionar menor viscosidade ao gel durante o processo de agitação. Além disso, o óxido de grafeno reduzido possui número menor de grupamentos contendo oxigênio que o óxido de grafeno, dificultando a interação química entre os compostos.

Embora nenhum dos materiais tenha apresentado boa homogeneidade e espessura, percebe-se que na menor concentração de rGO a membrana apresentou características mais similares às aquelas encontradas para o filme de quitosana pura, evidenciando que em baixas concentrações de grafeno o método de desenvolvimento por *solvent casting* mostra-se como uma alternativa atrativa, dado seu processo simples e rápido.

Com relação às análises físico-químicas absorção de água, perda de massa e variação do pH, os resultados se apresentaram mais divergentes. Para a análise de pH, todos os grupos contendo óxido de grafeno reduzido exibiram um comportamento semelhante à membrana de quitosana. Para o ensaio no meio ácido, o pH atingiu um nível ápice após 3h de contato do meio com todos os biomateriais, mantendo-se o mesmo após 24h de análise. O mesmo perfil foi observado quando em meio alcalino; o pH alcançou o menor resultado após 3h e se manteve estável até 24h. Ainda, a aferição de pH se manteve a mesma para todos os grupos, ou seja, independente da concentração de óxido de grafeno reduzido,

todos os grupos tiveram o mesmo comportamento e na mesma intensidade. Uma vez que todos os grupos foram similares, a análise permite deduzir que o óxido de grafeno reduzido pouco afeta o pH do meio, seja ácido ou alcalino, indicando que a variação de pH, embora não significativa, ocorra principalmente pela presença da quitosana no biomaterial.

Resultados análogos foram encontrados para a análise de perda de massa. Tanto para o meio alcalino, quanto para o meio ácido, todos os biomateriais contendo rGO tiveram um comportamento semelhante ao da quitosana para os tempos analisados. Assim como no ensaio de variação de pH, apesar de ocorrer perda de massa ao longo dos intervalos, os grupos não apresentaram variação significativa entre si. Isso pode ser explicado pelas características hidrofóbicas do óxido de grafeno reduzido, que pouco interage com meios aquosos, e pela característica impermeável do próprio biomaterial, visualizado pela análise da microscopia eletrônica de varredura. Mandal e colaboradores observaram que quanto maior a porosidade e a interconectividade dos poros, maior é a taxa de degradação para um *scaffold* metálico, demonstrando a importância da presença de poros no processo de degradação de biomateriais (MANDAL et al., 2021). Visto que as membranas não apresentam porosidade e dado o desempenho análogo de todos os grupos, a perda de massa observada justifica-se, novamente, pela presença da quitosana na composição dos biomateriais.

Com a análise de perda de massa, também é possível verificar que, embora o comportamento seja semelhante para ambos os cenários, o pH do meio possui influência no tempo de perda de massa dos biomateriais. Em meio ácido, os biomateriais exibiram variação significativa a partir de 24h de interação com o meio, enquanto que em meio alcalino, a variação significativa ocorreu com 6h de contato.

Entretanto, todos os grupos se apresentaram visualmente intactos após a análise, indicando baixa degradação dos biomateriais em ambas as condições.

Para a análise de absorção de água em suor ácido, os resultados foram mais divergentes. Por ser uma base fraca, a quitosana se torna solúvel em soluções ácidas com pH abaixo do seu pKa (6,3), devido a protonação do grupamento amino (YAMAMURA, 2006). Pela observação dos resultados, acredita-se que esta propriedade esteja envolvida no processo de adsorção de água, verificado pela maior quantidade de água absorvida pelos biomateriais de quitosana e rGO 0,1%. Isso explica-se pelo fato de ocorrer protonação dos grupos amino ($-NH_3^+$) da quitosana em meio ácido levando a maior interação com o líquido (ABREU et al., 2013) e maior capacidade de adsorção de água (LAVANYA et al., 2020). Para os biomateriais com maior concentração de rGO (0,3% e 0,5%), o aspecto hidrofóbico do óxido de grafeno reduzido leva a menor interação com a água e, conseqüentemente, diminuição da absorção de líquido, como verificado no resultado obtido.

Com relação ao suor alcalino, o mesmo pensamento pode ser aplicado. A diferença estatística vista entre a membrana de quitosana e as de rGO justifica-se pela maior hidrofobicidade e menor solubilidade em soluções aquosas do óxido de grafeno reduzido que o polímero natural. A presença de grupamentos $-OH$ e $-NH_2^+$ na estrutura de quitosana favorece a formação de pontes de hidrogênio tornando esse composto mais propenso a adsorção de água, embora de forma menos evidente que em soluções ácidas por não haver protonação dos grupos amino.

Diferentemente do que foi observado nas análises de perda de massa e variação do pH, o tipo do biomaterial foi mais determinante que o tempo de contato com o meio sobre a quantidade de líquido absorvida. Para o suor ácido, os

biomateriais de quitosana e rGO 0,1% apresentaram as maiores variações de absorção de água, sendo estatisticamente significativos com relação às membranas rGO 0,3% e 0,5%. Os resultados dessa análise deixam evidente que quanto maior a concentração de óxido de grafeno reduzido menor é a absorção de água. Em meio de suor básico um efeito semelhante é verificado, com o biomaterial de quitosana absorvendo mais líquido de forma estatisticamente significativa frente às demais membranas.

A análise físico-química evidencia que os biomateriais são resistentes às variações de suor da pele, sendo dependentes da concentração de rGO e quitosana adicionadas. Como também observado em outros estudos (KOSOWSKA et al., 2019; WRÓŃSKA et al., 2020), as análises deste trabalho mostram que a adição de óxido de grafeno reduzido melhorou as características do biomaterial de quitosana, tornando-o mais resistente às variações de perda de massa e à influência da absorção de água.

Visto que pretende-se utilizar o biomaterial em associação com o laser de baixa intensidade para o reparo de lesões em nervos periféricos, entender o comportamento do biomaterial nos comprimentos de onda na região do vermelho e do infravermelho se faz crucial para verificar o comportamento das membranas na presença de luz. Por esse motivo, foi realizada uma varredura espectrofotométrica com o objetivo de verificar a capacidade de absorção de luz dos compostos utilizados.

Conforme apontado por estudos prévios (SANTOS, 2012; EMADI et al., 2017), a quitosana apresenta uma banda de absorção aproximadamente entre 240 nm e 280 nm, enquanto o óxido de grafeno reduzido possui pico de absorção em comprimento de onda próximo à 270 nm, referente às transições π - π^* das ligações

dos anéis aromáticos C=C. Confirmando os achados relatados, neste trabalho os géis contendo óxido de grafeno reduzido diluído e quitosana apresentaram uma banda larga de absorção com pico em 265 nm, enquanto o gel de quitosana puro exibiu absorção na região 235 nm, levemente inferior à relatada na literatura. Os resultados encontrados nesse trabalho confirmam que não há interação entre quitosana e óxido de grafeno reduzido, visto que os valores de absorção são os mesmos encontrados na literatura para os compostos quando analisados de forma independente.

Para o gel de quitosana e óxido de grafeno reduzido a quantidade de rGO teve que ser reduzida para 0,01% e 0,05% (p/p), ou seja, abaixo das concentrações utilizadas para a confecção dos biomateriais, uma vez que acima desses valores a análise de varredura apresentou valores superiores ao limite de detecção do equipamento. A razão para esse comportamento acredita-se ser proveniente da má dispersão do rGO no gel de quitosana, formando pequenos grumos que dificultavam a passagem de luz, como verificado nas imagens obtidas por MEV e análise de espessura. Apesar disso, o gráfico de varredura obtido para o gel contendo óxido de grafeno reduzido se assemelhou ao perfil do gráfico de absorção do gel de quitosana, porém com valores de absorbância mais elevados. Esse resultado demonstra que, apesar de possuírem maior capacidade de absorver luz que o gel de quitosana, os biomateriais de rGO não apresentam pico de absorção nos comprimentos de onda da região do vermelho e infra-vermelho, as quais são utilizadas na aplicação do laser de baixa intensidade.

Além de desenvolver e caracterizar de forma físico-química o biomaterial, esse trabalho tinha como objetivo verificar a ação da membrana de potencializar os efeitos terapêuticos do laser de baixa intensidade. Para isso, foram realizados

ensaios celulares utilizando o reagente MTT, visando verificar a viabilidade e proliferação de células PC12 após o tratamento com LBI e LBI + biomateriais.

O ensaio utilizando o laser no comprimento de onda do infravermelho (780 nm) evidenciou uma ação semelhante entre os grupos que receberam apenas a ação do laser e os grupos estimulados com laser + biomaterial. Embora não tenha sido verificado diferença estatisticamente significativa entre os grupos, a mediana dos resultados das células estimuladas na presença dos biomateriais foi ligeiramente maior que do grupo estimulado apenas com laser, indicando um possível efeito de otimização das membranas. Quando comparado com o controle negativo, nenhum grupo apresentou resultado significativo, apesar da absorção para o grupo controle ter sido menor, o que indica menor proliferação celular. Possivelmente, a razão para esse resultado se deve ao baixo tempo de exposição das células ao laser. Os trabalhos que testaram laser de baixa intensidade em cultura celular utilizaram os mais variados protocolos. De forma geral, os estudos realizam a aplicação de 15 J de energia, com potência até 50 mW, com alguns trabalhos utilizando intensidades maiores e com sessões podendo durar até alguns minutos (ANDREO et al., 2017; MUNIZ et al., 2021). Neste presente trabalho, o protocolo escolhido deixou as células expostas ao laser por um tempo menor e com intensidade de energia mais baixa, o que pode ter influenciado no efeito não significativo observado tanto para o grupo estimulado com laser quanto para os grupos com biomaterial com relação ao controle negativo.

O resultado para o ensaio celular utilizando o LBI no comprimento de onda do vermelho (660 nm) foi mais heterogêneo, embora, novamente, nenhum grupo tenha apresentado resultado significativo com relação ao controle negativo. O fator que mais chamou a atenção nesse ensaio foram os efeitos na proliferação celular

observados para os grupos quitosana e rGO 0,3%. Para estes, a proliferação celular foi menor que a observada até mesmo para o controle negativo. Com base nesses achados, sugere-se que análises químicas dos biomateriais antes e após a ação do laser devam ser realizadas a fim de verificar o efeito do laser sobre as características dos biomateriais, como degradação e solubilização nos meios propostos. Além disso, a condução de ensaios celulares complementares pode acrescentar informações sobre o perfil de eficácia e segurança da associação LBI + biomaterial.

Ainda com relação ao estudo celular utilizando LBI na região do vermelho, nenhum biomaterial apresentou efeito maior que a ação do laser, embora a diferença não seja significativa. Essa observação indica que, diferentemente de quando se utiliza o laser de baixa intensidade na região do infravermelho, no comprimento de onda do vermelho, a associação LBI + biomaterial se mostra menos eficaz que a ação do laser isolado. Entretanto, estudos utilizando protocolos com maior tempo de exposição das células ao laser precisam ser realizados, bem como verificar a ação física e química do laser sobre o biomaterial para examinar possíveis alterações no biomaterial após estimulação.

6.1 Limitações

Este trabalho apresenta como principal limitação a falta de estudos celulares complementares que pudessem contribuir para a análise da eficácia terapêutica dos biomateriais em associação ao laser de baixa intensidade. Ensaio de proliferação utilizando cristal violeta e o teste de migração celular, por exemplo, contribuiriam para a interpretação dos resultados encontrados para o teste do MTT. Além disso, protocolos alternativos poderiam ser testados, variando-se o tempo de aplicação do

laser, a densidade de energia e o número de sessões. Com esses acréscimos, uma visão mais acurada da associação LBI + biomaterial poderia ser visualizada.

Com relação aos estudos físico-químicos, análises químicas, como FTIR, serviriam para verificar a interação química entre a quitosana e o óxido de grafeno reduzido ocasionada pelo método *solvente casting*. Por fim, a avaliação espectrofotométrica dos meios ácidos e básicos após os ensaios de perda de massa e após a aplicação do laser agregaria às observações encontradas sobre a degradação e resistência do biomaterial nos diferentes meios testados.

7

Conclusões

7 CONCLUSÕES

Após a realização do presente trabalho, foi possível verificar que o método *solvente casting* se mostrou uma alternativa viável para o desenvolvimento de um biomaterial composto por quitosana e óxido de grafeno reduzido. Embora as membranas apresentassem heterogeneidade da dispersão do rGO, em baixas concentrações o método se mostrou eficaz.

No que concerne às análises físico-químicas, o óxido de grafeno reduzido melhorou a característica de absorção de água da quitosana, porém com relação aos demais aspectos, o rGO pouco afetou as propriedades da quitosana.

Quanto ao efeito terapêutico da associação laser de baixa intensidade + biomaterial, foi verificada melhora na proliferação celular apenas com o estímulo na região do infravermelho, embora de forma não significativa. Quando sob estímulo do laser na região do vermelho, por outro lado, os biomateriais afetaram negativamente a proliferação celular, mas também de forma não significativa.

Com base nas considerações mencionadas, conclui-se que o desenvolvimento de um biomaterial de quitosana e óxido de grafeno reduzido pelo método *solvente casting* se mostra promissor, com melhora de algumas características com relação ao material contendo apenas quitosana. Porém, no que concerne a eficácia terapêutica da associação laser de baixa intensidade + biomaterial, experimentos complementares precisam ser conduzidos a fim de verificar eficácia significativa e aspectos relacionados ao perfil de segurança da citada associação.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABREU, F. O. M. S.; CAVALCANTE, L. G.; DOUDEMANT, P. V.; CASTRO, A. M.; NASCIMENTO, A. P.; MATOS, J. E. X. Propriedades e características da quitosana obtida a partir do exoesqueleto de caranguejo-uçá utilizando radiação de microondas. **Polímeros**, v. 23 (5), 2013. <https://doi.org/10.4322/polimeros.2013.042>
- ALCÂNTARA, C. C.; GIGO-BENATO, D.; SALVINI, T. F.; OLIVEIRA, A. L. R.; ANDERS, J. J.; RUSSO, T. L. Effect of low-level laser therapy (LLLT) on acute neural recovery and inflammation-related gene expression after crush injury in rat sciatic nerve. **Lasers in Sugery and Medicine**, v. 45, 2013. <https://doi.org/10.1002/lsm.22129>
- ALI, A.; AHMED, S. A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 273-286, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.078>
- ALMEIDA-JUNIOR, L. A.; MARQUES, N. C. T.; PRADO, M. T. O.; OLIVEIRA, T. M.; SAKAI, V. T. Effect of single and multiple dose of low-level laser therapy on viability and proliferation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED). **Laser in Medical Science**, v. 34, p. 1917-1927, 2019.
- AKGUL, T.; GULSOY, M.; GULCUR, H. O. Effects of early and delayed laser application on nerve regenerarion. **Lasers in Medical Science**, v. 29, p. 351-357, 2014.
- AKHAVAN, O.; GHADERI, E.; ABOUEI, E.; HATAMIE, S.; GHASEMI, E. Accelerated differentiation of neural stem cells into neurons on ginseng-reduced graphene oxide sheets. **Carbon**, v. 66, p. 395-406, 2014.
- AKHAVAN, O.; GHADERI, E.; SHIRAZIAN, S. A. Near infrared laser stimulation of human neural stem cells into neurons on graphene nanomesh semiconductors. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 126, p. 313-321, 2015.
- ANDERS, J. J.; LANZAFAME, R. J.; ARANY, P.R. Low-level light/laser therapy versus photobiomodulation therapy. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 33 (4), p.183–184, 2015.
- ANDREO, L.; SOLDERA, C. B.; RIBEIRO, B. G.; MATOS, P. R. V.; BUSSADORI, S. K.; FERNANDES, K. P. S.; MESQUITA-FERRARI, R. A. Effects of photobiomodulation on experimental models of peripheral nerve injury. **Lasers in Medical Science**, v. 32, p. 2155-2165, 2017. [doi:10.1007/s10103-017-2359-7](https://doi.org/10.1007/s10103-017-2359-7)
- ANSARI, M. O.; GAUTHAMAN, K.; ESSA, A.; BENCHERIF, S. A.; MEMIC, A. Graphene and graphene-based materials in biomedical applications. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26(38), p. 6834-6850, 2019. [doi:10.2174/0929867326666190705155854](https://doi.org/10.2174/0929867326666190705155854)
- ASHRAF, R.; SOFI, H. S.; BEIGH, M. A.; MAJEED, S.; ARJAMAND, S.; SHEIKH, F. A. Prospects of natural polymeric scaffolds in peripheral nerve tissue-regeneration. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1077, p. 501-525, 2018. [doi:10.1007/978-981-13-0947-2_27](https://doi.org/10.1007/978-981-13-0947-2_27)

- AYAR, Z.; GHOLAMI, B.; PIRI, S. M.; KAVEH, M.; BAIGI, V.; GHODSI, Z.; HASSANNEJAD, Z.; RAHIMI-MOVAGHAR, V. The effect of low-level laser therapy on pathophysiology and locomotor recovery after traumatic spinal cord injuries: a systematic review and meta-analysis. **Lasers in Medical Science**, v. 37, p. 61-75, 2022. doi: 10.1007/s10103-021-03301-5.
- BARBOSA, R. I.; MARCOLINO, A. M.; GUIRRO, R. R. J.; MAZZER, N.; BARBIERI, C. H.; FONSECA, M. C. R. Comparative effects of wavelengths of low-power laser in regeneration of sciatic nerve in rats following crushing lesion. **Lasers in Medical Science**, v. 25 (3), p. 423-430, 2010.
- BARRA, A.; FERREIRA, N. M.; MARTINS, M. A.; LAZAR, O.; PANTAZI, A.; JDERU, A. A.; NEUMAYER, S. M.; RODRIGUEZ, B. J.; ENACHESCU, M.; FERREIRA, P.; NUNES, C. Eco-friendly preparation of electrically conductive chitosan – reduced graphene oxide flexible bionanocomposites for food packaging and biological application. **Composites Science and Technology**, v. 173, p. 53-60, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2019.01.027>
- BARROS, F. C.; ANTUNES, S. A.; FIGUEREDO, C. M. S.; FISCHER, R. G. Laser de baixa intensidade na cicatrização periodontal. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 7, p.85-89., 2008.
- BAREZ, M. M.; TAJZIEHCHI, M.; HEIDARI, M. H.; BUSHEHRI, A.; MOAYER, F.; MANSOURI, N.; NAINI, N. S.; MOVAFAGH, A. Stimulation effect of low level laser therapy on sciatic nerve regeneration in rat. **Journal of Lasers in Medical Science**, v. 8, p. S32-S37, 2017. doi:10.15171/jlms.2017.s7
- BEI, H. P.; YANG, Y.; ZHANG, Q.; TIAN, Y.; LUO, X.; YANG, M.; ZHAO, X. Graphene-based nanocomposites for neural tissue engineering. **Molecules**, v. 24(4), 2019.
- BOECKER, A.; DAESCHLER, S. C.; KNESER, U.; HARHAUS, L. Relevance and recent developments of chitosan in peripheral nerve surgery. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v.13 (104), 2019. doi:10.3389/fncel.2019.00104
- BUCHAIM, R. L.; AANDREO, J. C.; BARRAVIERA, B.; JUNIOR, R. S. F.; BUCHAIM, D. V.; JUNIOR, G. M. R.; OLIVEIRA, A. L. R.; RODRIGUES, A. C. Effect of low-level laser therapy (LLLT) on peripheral nerve regeneration using fibrin glue derived from snake venom. **Injury**, v. 46, p. 655-660, 2015.
- CHAN, B. C. F.; CATHARINE C. B.; FURLAN, J. C. A Scoping Review on Health Economics in Neurosurgery for Acute Spine Trauma. **Neurosurgical Focus**, v. 44 (5):15, 2018. <https://doi.org/10.3171/2018.2.FOCUS17778>.
- CHANA-JACZMAREK, J.; PACZKOWSKA, M.; OSMAŁEK, T. et al. Pharmaceuticals Hydrogel Delivery System Containing Calendulae Flos Lyophilized Extract with Chitosan as a Supporting Strategy for Wound Healing Applications. **Pharmaceutics**, v. 12 (634), 2020. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12070634>.
- CHEN, X.; FENG, B.; ZHU, D.; CHEN, Y.; JI, W.; JI, T.; LI, F. Characteristics and toxicity assessment of electrospun gelatin/PCL nanofibrous scaffold loaded with graphene in vitro and in vivo. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 3669-3678, 2019a.
- CHEN, X.; LIU, C.; HUANG, Z.; PU, X.; SHANG, L.; YIN, G.; XUE, C. Preparation of carboxylic graphene oxide-composited polypyrrole conduits and their effect on sciatic nerve

repair under electrical stimulation. **Journal of Biomedical Materials Research A**, v. 107(12), p. 2784-2795, 2019b.

CROISIER, F.; JEROME, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. **European Polymer Journal**, v. 49, p. 780-792, 2013.

DAS, S. R.; UZ, M.; DING, S.; LENTNER, M.; HONDRED, J. A.; CARGILL, A. A.; SAKAGUCHI, D. S.; MALLAPRAGADA, S.; CLAUSSEN, J. C. Electrical differentiation of mesenchymal stem cells into schwann-cell-like phenotypes using inkjet-printed graphene circuits. **Advanced Healthcare Materials**, v. 6(7), 2017.

DOMPE, C.; MONCRIEFF, L.; MATTYS, J.; GRZECH-LESNIAK, K. et al. Photodiomodulation-Underlying Mechanism and Clinical Applications. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, 2020. doi:10.3390/jcm9061724

EFREMOVA, L.V.; VASILCHENKO, A.S.; RAKOV, E.G.; DERYABIN, D.G. Toxicity of graphene shells, graphene oxide, and graphene oxide paper evaluated with escherichia coli Biotests. **BioMed Research International**, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/107029>

EMADI, F.; AMINI, A.; GHOLAMI, A.; GHASEMI, Y. Functionalized graphene oxide with chitosan for protein nanocarriers to protect against enzymatic cleavage and retain collagenase activity. **Scientific Reports**, v. 7, 2017. <https://doi.org/10.1038/srep42258>

FANG, Q.; ZHANG, Y.; CHEN, X.; LI, H.; CHENG, L.; ZHU, W.; ZHANG, Z.; TANG, M.; LIU, W.; WANG, H.; WANG, T.; SHEN, T.; CHAI, R. Three-dimensional graphene enhances neural stem cell proliferation through metabolic regulation. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, 2020. DOI:10.3389/fbioe.2019.00436

FARONI, A.; MOBASSERI, S. A.; KINGHAM, P. J.; REID, A. J. Peripheral nerve regeneration: experimental strategies and future perspectives. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 82-83, p. 160-167, 2015.

FORNASARI, B. E.; CARTA, G.; GAMBAROTTA, G., RAIMONDO, S. Natural-Based Biomaterials for Peripheral Nerve Injury Repair. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 2020. doi: 10.3389/fbioe.2020.554257

GIES, V.; ZOU, S. Systematic toxicity investigation of graphene oxide: evaluation of assay selection, cell type, exposure period and flake size. **Toxicology Research**, v. 7, p. 93-101, 2018. DOI: 10.1039/c7tx00278e

GHOLIBEGLOO, E.; KARBASI, A.; POURHAJIBAGHER, M. CHINIFORUSH, N.; RAMAZANI, A.; AKBARI, T.; BAHADOR, A.; KHOOBI, M. Carnosine-graphene oxide conjugates decorated with hydroxyapatite as promising nanocarrier for ICG loading with enhanced antibacterial effects in photodynamic therapy against *Streptococcus mutans*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 181, p. 14-22. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.02.004>

GOENKA, S.; SANT, V.; SANT, S. Graphene-based nanomaterials for drug delivery and tissue engineering. **Journal of Controlled Release**, v. 173, p. 75-88, 2014.

- HAASTERT-TALINI, K., GEUNA, S., DAHLIN, L. B., MEYER, C., STENBERG, L., FREIER, T., et al. Chitosan tubes of varying degrees of acetylation for bridging peripheral nerve defects. **Biomaterials**, v. 34, p.9886–9904, 2013 doi:10.1016/j.biomaterials.2013.08.074
- HAMBLIN, M. R. Photobiomodulation for Traumatic Brain Injury and Stroke. **Journal of Neuroscience Research**, v. 96 (4), p.731–43, 2018. <https://doi.org/10.1002/jnr.24190>.
- HASHMI, J. T.; HUANG, Y. Y.; OSMANI, B. Z.; SHARMA, S. K.; NAESER, M. A.; HAMBLIN, M. R. Role of low-level laser therapy in neurorehabilitation. **American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 2, p. 1-25, 2010.
- HOUSHYAR, S.; BHATTACHARYYA, A.; SHANKS, R. Peripheral nerve conduit: materials and Structures. **ACS Chemical Neuroscience**. 10, 3349–3365, 2019. doi:10.1021/acschemneuro.9b00203
- ILYAS, R. A.; AISYAH, H. A.; NORDIN, A. H.; NGADI, N.; ZUHRI, M. Y. M.; ASYRAF, M. R. M.; SAPUAN, S. M.; ZAINUDIN, E. S.; SHARMA, S.; ABRAL, H.; ASROFI, M.; SYAFRI, E.; SARI, N. H.; RAFIDAH, M.; ZAKARIA, S. Z. S.; RAZMAN, M. R.; MAJID, N. A.; RAMLI, Z.; AZMI, A.; BANGAR, S. P.; IBRAHIM, R. Natural-Fiber-Reinforced Chitosan, Chitosan Blends and Their Nanocomposites for Various Advanced Applications. **Polymers**, v. 14, 874, 2022. <https://doi.org/10.3390/polym14050874>
- JAFARIRAD, S.; TORGHABE, E. H.; RASTA, S. H.; SALEHI, R. A novel non-invasive strategy for low-level laser-induced cancer therapy by using new Ag/ZnO and Nd/ZnO functionalized reduced graphene oxide nanocomposites. **Artificial cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 46, p. 800-816, 2018. DOI: 10.1080/21691401.2018.1470523
- JIA, P.P.; SUN, T.; JUNAID, M.; YANG, L. et al. Nanotoxicity of different sizes of graphene (G) and graphene oxide (GO) in vitro and in vivo. **Environmental Pollution**, v. 247, p. 595–606, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.072>
- JIANG, L.; CHEN, D.; WANG, Z.; ZHANG, Z.; XIA, Y.; XUE, H.; LIU, Y. Preparation of an electrically conductive graphene oxide/chitosan scaffold for cardiac tissue engineering. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2019.
- KIM, Y.; PAGAN-DIAZ, G.; GAPINSKE, L.; KIM, Y.; SUH, Y.; SOLOMON, E.; HARRIS, J. F.; NAM, S.; BASHIR, R. Integration of graphene electrodes with 3D skeletal muscle tissue models. **Advanced Healthcare Materials**, v. 9(4), 2020.
- KOSOWSKA, K.; DOMALIK-PYZIK, P.; KROK-BORKOWICK, M.; CHLOPEK, J. Synthesis and characterization of chitosan/reduced graphene oxide hybrid composites. **Materials (Basel, Switzerland)**, v. 12, 2019. DOI: 10.3390/ma12132077
- KUBIAK, C. A.; GROCHMAL, J.; KUNG, T. A.; CEDERNA, P. S.; MIDHA, R.; KEMP, S. W. P. Stem-cell-based therapies to enhance peripheral nerve regeneration. **Muscle and Nerve**, v. 61, p. 449-459, 2020. <https://doi.org/10.1002/mus.26760>
- LAN, G.; LU, B.; WANG, L.; CHEN, J.; YU, K.; LIU, J.; DAI, F.; WU, D. Chitosan/gelatin composite sponge is an absorbable surgical hemostatic agent. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 136, p. 1026-1034, 2015.
- LAVANYA, K.; CHANDRAN, S. V.; BALAGANGADHARAN, K.; SELVAMURUGAN, N. Temperature- and pH-responsive chitosan-based injectable hydrogels for bone tissue

- engineering. **Materials Science and Engineering: C**, v. 111, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110862>
- LAZOVIC, M.; ILIC-STOJANOVIC, O.; KOCIC, M.; ZIVKOVIC, V.; HRKOVIC, M.; RADOSAVLJEVIC, N. Placebo-controlled investigation of low-level laser therapy to treat carpal tunnel syndrome. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 32(6), 2014. 10.1089/pho.2013.3563
- LEE, S. H.; LEE, H. B.; KIM, Y.; JEONG, J. R.; LEE, M. H.; KANG, K. Neurite guidance on laser-scribed reduced graphene oxide. **Nano Letters**, 2018.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica. 3ª Edição. São Paulo: **Sarvier**, 2002.
- LI, X.; MA, M.; AHN, D. U.; HUANG, X. Preparation and characterization of novel eggshell membrane-chitosan blend films for potential wound-care dressing: From waste to medicinal products. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 123, p. 477-484, 2018.
- LI, Y.; MA, Z.; REN, Y.; LU, D.; LI, T.; LI, W.; WANG, J.; MA, H.; ZHAO, J. Tissue engineering strategies for peripheral nerve regeneration. **Frontiers in Neurology**, v. 16, 2021. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.768267>
- LINS, R. D. A. U.; LUCENA, K. C. R.; GRANVILLE-GARCIA, A. F.; DANTAS, E. M.; CATÃO, M. H. C. V.; NETO, L. G. C. Biostimulation effects of low-level laser therapy in the repair process. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85 (6), p. 849-855, 2010.
- LIU, T.; DAN, W.; DAN, N.; LIU, X.; LIU, X.; PENG, X. A novel graphene oxide-modified collagen-chitosan bio-film for controlled growth factor release in wound healing applications. **Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications**, v. 77, p. 202-211, 2017. DOI: 10.1016/j.msec.2017.03.256
- LU, Y.; LYU, H.; RICHARDSON, A. G.; LUCAS, T. H.; KUZUM, D. Flexible neural electrode array based-on porous graphene for cortical microstimulation and sensing. **Scientific Reports**, v. 6, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep33526>
- LU, X.; HUANG, Y.; QU, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, Z. Integrated transcriptomic and proteomic study on the different molecular mechanisms of PC12 cell growth on chitosan and collagen/chitosan films. **Regenerative Biomaterials**, v. 7(6), p. 553–565, 2020. <https://doi.org/10.1093/rb/rbaa030>
- MANDAL, S.; VIRAJ; NANDI, S. K.; ROY, M. Effects of multiscale porosity and pore interconnectivity on *in vitro* and *in vivo* degradation and biocompatibility of Fe-Mn-Cu scaffolds. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 9, p. 4340-4354, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1039/D1TB00641J>
- MAKVANDI, P.; GHOMI, M.; ASHRAFIZADEH, M.; TAFAZOLI, A.; AGARWAL, T. et al. A review on advances in graphene-derivative/polysaccharide bionanocomposites: therapeutics, pharmacogenomics and toxicity. **Carbohydrated Polymers**, v. 250, 2020.
- MASI, A.; TONAZZINI, I.; MASCIULLO, C.; MEZZENA, R.; CHIPELLINI, F.; PUPPI, D.; CECCHINI, M. Chitosan films for regenerative medicine: fabrication methods and mechanical

characterization of nanostructured chitosan films. **Biophysical Reviews**, v. 11, p. 807-815, 2019.

MEDALHA, C. C.; DI GANGI, G. C.; BARBOSA, C. B.; FERNANDES, M.; AGUIAR, O.; FALOPPA, F.; LEITE, V. M.; RENNO, A. C. M. Low-level laser therapy improves repair following complete resection on the sciatic nerve in rats. **Lasers in Medical Sciences**, v. 27, p. 629-635, 2012.

MODRAK, M.; TALUKDER, M. A. H.; GURGENASHVILI, K.; NOBLE, M.; ELFAR, J. C. Peripheral Nerve Injury and Myelination: Potential Therapeutic Strategies. **Journal of Neuroscience Research**, v. 98(5), p. 780-795, 2020. doi: 10.1002/jnr.24538

MOHEBBI, S.; NEZHAD, M. N.; ZARRINTAJ, P.; JAFARI, S. H.; GHOLIZADEH, S. S.; SAEB, M. R.; MOZAFARI, M. Chitosan in biomedical engineering: a critical review. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 13, p. 1-25, 2018.

MOMBINI, S.; MOHAMMADNEJAD, J.; BAKHSHANDEH, B.; NARMANI, A.; NOURMOHAMMADI, J.; VAHDAT, S.; ZIRAK, S. Chitosan-PVA-CNT nanofibers as electrically conductive scaffolds for cardiovascular tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 140, p. 278-287, 2019.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUNIZ, X. C.; ASSIS, A. C. C.; OLIVEIRA, B. S. A.; FERREIRA, L. F. R.; BILAL, M. IQBAL, H. M. N.; SORIANO, R. N. Efficacy of low-level laser therapy in nerve injury repair – a new era in therapeutics agents and regenerative treatments. **Neurological Sciences**, v. 42, p. 4029-4043, 2021. <https://doi.org/10.1007/s10072-021-05478-7>

NITTA, S. K.; NUMATA, K. Biopolymer-based nanoparticles for drug/gene delivery and tissue engineering. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 1629-1654, 2013.

NEUBRECH, F.; HEIDER, S.; HARHAUS, L.; BICKERT, B.; KNESER, U.; KREMER, T. Chitosan Nerve Tube for Primary Repair of Traumatic Sensory Nerve Lesions of the Hand without a Gap: Study Protocol for a Randomized Controlled Trial. **Trials**, v. 17(1) p.1–8, 2016. <https://doi.org/10.1186/s13063-015-1148-5>.

NOORDEN, R. V. The trials of new carbono. **Nature**, v. 469, p. 14-16, 2011.

NOVOSELOV, K. S.; GEIM, A. K.; MOROZOV, S. V.; JIANG, D.; ZHANG, Y. et al. Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films. **Science**, v. 306, p. 666-669, 2004.

OLIVEIRA, V.R.S.; SANTOS-EICHLER, R.A.; DALE, C.S. Photobiomodulation increases cell viability via AKT activation in an in vitro model of diabetes induced by glucose neurotoxicity. **Lasers in Medical Science**, v.35(1), p.149-156, 2020. doi:10.1007/s10103-019-02808-2.

PALMIERI, V.; LAURIOLA, M. C.; CIASCA, G.; CONTI, C.; SPIRITO, M. PAPI, M. The graphene oxide contradictory effects against human pathogens. **Nanotechnology**, v. 28, 2017. DOI 10.1088/1361-6528/aa6150

- PAN, W.; HUANG, C.; LIN, T.; HU, H.; LIN, W.; LI, M.; SUN, H. Synergistic antibacterial effects of localized heat and oxidative stress caused by hydroxyl radicals mediated by graphene/iron oxide-based nanocomposites. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 12, p. 431-438, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.11.014>
- PATIL, R.; BAHADUR, P.; TIWARI, S. Dispersed graphene materials of biomedical interest and their toxicological consequences. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 275, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102051>
- PROKSCH, E. pH in nature, humans and skin. *The Journal of Dermatology*, 2018. doi: 10.1111/1346-8138.14489
- REINA, G.; GONZALEZ-DOMÍNGUEZ, J. M.; CRIADO, A.; VÁZQUEZ, E.; BIANCO, A.; PRATO, M. Promises, facts and challenges for graphene in biomedical applications. *Chemical Society Review*, v. 46, p. 4400-4416, 2017.
- RYU, S.; KIM, B. S. Culture of neural cells and stem cells on graphene. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 10, p. 39-46, 2013.
- SANTOS, F. A. **Processamento de grafeno oxidado na forma de filmes ultrafinos e aplicações em sensores**. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Materiais) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2012.
- SHAREENA, T. P. D.; McSHAN, D.; DASMAHAPATRA, A. K.; TCHOUNWOU, P. B. A review of graphene-based nanomaterials in biomedical applications and risks in environment and health. *Nano-Micro Letters*, v. 10 (3), p. 1-56, 2018.
- SEIFI, T.; KAMALI, A. R. Anti-pathogenic activity of graphene nanomaterials: A review. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 199, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111509>
- SILVA, E. M.; GOMES, S. P.; ULBRICH, L. M.; GIOVANINI, A. F. Avaliação histológica da laserterapia de baixa intensidade na cicatrização de tecidos epitelial, conjuntivo e ósseo: estudo experimental em ratos. *Revista Sul-Brasileira de Odontologia*, v. 4, p. 29-35, 2007.
- SILVA, M. S.; NETO, N. L.; COSTA, S. A.; COSTA, S. M.; OLIVEIRA, T. M.; OLIVEIRA, R. C.; MACHADO, M. A. A. M. Biophysical and biological characterization of intraoral multilayer membranes as potential carriers: A new drug delivery system for dentistry. *Materials Science and Engineering C*, v. 71, p. 498-503, 2017.
- SILVA, S. K.; PLEPIS, A. M. G.; MARTINS, V. C. A.; HORN, M. M.; BUCHAIM, D. V.; BUCHAIM, R. L.; PELEGRINE, A. A.; SILVA, V. R.; KUDO, M. H. M.; FERNANDES, J. F. R.; NAZARI, F. M.; CUNHA, M. R. Suitability of chitosan scaffolds with carbon nanotubes for bone defects treated with photobiomodulation. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23(12), 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms23126503>
- STENBERG, L., KODAMA, A., LINDWALL-BLOM, C., AND DAHLIN, L. B. Nerve regeneration in chitosan conduits and in autologous nerve grafts in healthy and in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *European Journal of Neuroscience*, v. 43, p. 463–473, 2016 doi:10.1111/ejn.13068

- TAKHTFOOLADI, M. A.; JAHANBAKHS, F.; TAKHTFOOLADI, H. A.; YOUSEFI, K.; ALLAHVERDI, A. Effect of low-level laser therapy (685 nm, 3 J/cm²) on functional recovery of the sciatic nerve in rats following crushing lesion. **Laser Medical in Science**, v. 30(3), p. 1047-1052, 2015.
- TIAN, Y.; GUO, N.; WANG, W.; GENG, W.; JING, L.; WANG, T.; YUAN, X.; ZHU, Z.; MA, Y.; GENG, H. Bilayer and three dimensional conductive network composed by SnCl₂ reduced rGO with CNTs and GO applied in transparent conductive films. **Scientific Reports**, v. 9891, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89305-1>
- TOPALOGLU, N.; BAKAY, E. Mechanistic approaches to the light-induced neural cell differentiation: photobiomodulation vs low-dose photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 37, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102702>
- VIJAYAVENKATARAMAN, S. Nerve guide conduits for peripheral nerve injury repair: A review on design, materials and fabrication methods. **Acta Biomaterialia**, v. 106, p. 54-69, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.02.003>
- VIJAYAVENKATARAMAN, S.; THAHARAH, S.; ZHANG, S.; LU, W. F.; FUH, J. Y. H. 3D-printed PCL/rGO conductive scaffolds for peripheral nerve injury repair. **Artificial Organs**, v. 43, p. 515-523, 2019.
- WANG, J.; CHENG, Y.; CHEN, L.; ZHU, T.; YE, K.; JIA, C.; WANG, H.; ZHU, M.; FAN, C.; MO, X. *In vitro* and *in vivo* studies of electroactive reduced graphene oxide-modified nanofiber scaffolds for peripheral nerve regeneration. **Acta Biomaterialia**, v. 84, p. 98-113, 2019.
- WANG, Y.; LI, J.; LI, X.; SHI, J.; JIANG, Z.; ZHANG, C. Y. Graphene-based nanomaterials for cancer therapy and anti-infectious. **Bioactive Materials**, v. 14, p. 335-349, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.01.045>
- WANG, Y.; LIU, S.; YU, W. Functionalized graphene oxide reinforced chitosan hydrogels as biomimetic dressing for wound healing. **Macromolecular Bioscience**, v. 21, 2021. DOI: 10.1002/mabi.202000432
- WROŃSKA, N. et al. Chitosan-functionalized graphene nanocomposite films: interfacial interplay and biological activity. **Materials (Basel, Switserzland)**, v. 13, 2020. DOI: 10.3390/ma13040998
- XIA, M.; XIE, Y.; YU, C.; CHEN, G.; LI, Y.; ZHANG, T.; QIANG, P.; Graphene-based nanomaterials: the promising active agents for antibiotics-independent antibacterial applications. **Journal of Controlled Release**, v. 307, p. 16-31, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.06.011>
- XIAOLI, F.; QIYUE, C.; WEIHONG, G.; YAQING, Z.; CHEN, HU.; JUNRONG, W.; LONGQUAN, S. Toxicology data of graphene-family nanomaterials: an update. **Archives of Toxicology**, v. 94, p. 1915-1939, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02717-2>
- YADAV, A.; GUPTA, A. Noninvasive red and near-infrared wavelength-induced photobiomodulation: promoting impaired cutaneous wound healing. **Photodermatology**,

Photoimmunology and Photomedicine, v. 33, p. 4-13, 2017. doi: 10.1111/phpp.12282. PMID: 27943458.

YAMAMURA, M. Química viva: a química das quitosana. **Conselho Regional de Química – IV Região**, 2006. Disponível em <https://www.crq4.org.br/quimica_viva__a_quimica_das_quitosanas>

YANG, B.; WANG, P.; MU, N.; MA, K.; WANG, S.; YANG, C. et al. Graphene Oxide-Composited Chitosan Scaffold Contributes to Functional Recovery of Injured Spinal Cord in Rats. **Neural Regeneration Research**, v. 16, p.1829–35, 2021. doi: 10.4103/1673-5374.306095

YUE, H.; WEI, W.; YUE, Z.; WANG, B.; LUO, N.; GAO, Y.; MA, D.; MA, G.; SU, Z. The role of the lateral dimension of graphene oxide in the regulation of cellular responses. **Biomaterials**, v. 33(16), p. 4013-4021, 2012. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.02.021

ZHA, F.; CHEN, W.; ZHANG, L.; YU, D. Electrospun natural polymer and its composite nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. **Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition**, v. 31(4), p. 519-548, 2020. doi:10.1080/09205063.2019.1697170

ZHAO, Y.; WANG, Y.; GONG, J.; YANG, L.; NIU, C.; NI, X., et al. Chitosan degradation products facilitate peripheral nerve regeneration by improving macrophage-constructed microenvironments. **Biomaterials**, v. 134, p. 64–77, 2017. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.02.026