



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

“Preparação de *scaffolds* impregnados com *cabon dots* para aplicação em engenharia de tecidos”.

Janicy Arantes Carvalho

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

RIBEIRÃO PRETO -SP

2022



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

“Preparação de *scaffolds* impregnados com *cabon dots* para aplicação em engenharia de tecidos”

Janicy Arantes Carvalho

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

Orientador: Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco

RIBEIRÃO PRETO -SP

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Carvalho, Janicy Arantes

Preparação de scaffolds impregnados com Carbon dots para aplicação em Engenharia de Tecidos. Ribeirão Preto, 2022.

80 p. : il. ; 30cm

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

Orientador: Tedesco, Antonio Claudio

1. *Scaffolds*. 2. Carbon dots. 3. Gelatina. 4. Hidroxiapatita. 5. Quitosana

FOLHA DE APROVAÇÃO

Janicy Arantes Carvalho

Preparação de scaffolds impregnados com cabon dots para aplicação em engenharia de tecidos.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em

Química para obtenção do título de Mestre

Área de concentração: Química

Orientador: Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

A Deus por ter guiado os meus caminhos, me guardado e abençoado durante a realização
deste trabalho.

Aos meus pais por todo o apoio, incentivo e dedicação quanto à minha educação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar, proteger e iluminar em todos os momentos, me dando força, sabedoria e saúde para superar as dificuldades.

Ao Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco, pela orientação, oportunidade e confiança, assim como pelo apoio, paciência e grande aprendizado científico.

Aos meus pais Antônio Horácio de Carvalho e Elizabeth Vilma Arantes por todos os ensinamentos, dedicação, paciência e amor incondicional. Por nunca terem me deixado desistir mesmo com todas as dificuldades e por sempre me incentivarem e encorajarem a seguir meus sonhos e ideais.

Ao meu irmão Rafael Arantes Carvalho por todo amor, amizade, conselhos, apoio, incentivos e por estar sempre presente em todos os momentos da minha vida.

Ao meu namorado, melhor amigo e companheiro de vida Alexandro da Silva Abreu por todo apoio emocional, amor, carinho, dedicação e fortalecimento quando ambos achávamos que não conseguiríamos mais nada.

A toda a minha família e amigos, por serem meu alicerce e meu porto seguro.

Aos amigos do Laboratório de Fotobiologia e Fotomedicina, pelo dia-a-dia de trabalho e por partilharem seus conhecimentos. Em especial quero agradecer ao Jayme, Henrique, Flávia, Hellen, Luiza e Dani por todo o apoio ao longo do caminho seja durante os experimentos e dúvidas ou no apoio emocional que muitas vezes precisei.

A minha amiga e ex-companheira de laboratório Mary que sempre me estendeu a mão e muitas vezes estava lá para me socorrer.

A Universidade de São Paulo e aos docentes e funcionários da FFCLRP-USP.

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

A FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

“Nenhum trabalho de qualidade pode ser feito sem concentração e auto-sacrifício,
esforço e dúvida.”

Max Beerbohm

RESUMO

Carvalho, J. A. Preparação de scaffolds impregnados com carbon dots para aplicação em engenharia de tecidos. 2022. 80f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

A população idosa vem aumentando ao longo dos anos com consequente incremento das doenças ósseas. Nesse contexto social, uma das estratégias mais promissoras para o tratamento de lesões ósseas é a engenharia de tecidos. Na engenharia de tecido ósseo, os *scaffolds* devem mimetizar as propriedades físicas da matriz extracelular óssea para facilitar o recrutamento, adesão, proliferação e diferenciação das células. Nanomateriais diversas vezes são associados aos *scaffolds* para buscar melhorar a estrutura, bioatividade, estabilidade, adesão celular e/ou compatibilidade. O *Carbon dots* (CDs) são um nanomaterial de carbono fluorescente com o diâmetro abaixo de 10 nm. O objetivo desse trabalho foi desenvolver os *scaffolds* de quitosana-gelatina/hidroxiapatita, assim como os *Carbon dots* desejados para aplicação em Engenharia de Tecidos ósseos. Foram desenvolvidos inicialmente dois tipos de CD diferentes, sendo que um deles apresentou melhor rendimento quântico de fluorescência e citotoxicidade. Os *scaffolds* com e sem CDs preparados apresentaram, como esperado, características importantes para a sua aplicação, como a porosidade e taxa de degradação. Quanto aos testes *in vitro* obteve-se uma taxa de adesão celular excelente, boa citotoxicidade e expressão de fosfatase alcalina. Os testes *in vivo* do *scaffolds* antes da impregnação comprovaram que o material desenvolvido apresente excelente capacidade regenerativa para aplicação em engenharia de tecidos ósseos. Conclui-se, portanto, o material proposto atende as propostas estabelecidas e com resultados promissores.

Palavras-Chave: *Scaffolds*, Engenharia de Tecidos, *Carbon dots*, Gelatina, Hidroxiapatita e Quitosana.

ABSTRACT

Carvalho, J. A. Preparation of scaffolds impregnated with carbon dots for application in tissue engineering. 2022. 80p. Thesis (Master's degree). Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

The elderly population has been increasing over the years with a consequent increase in bone diseases. In this social context, one of the most promising strategies for the treatment of bone injuries is tissue engineering. In bone tissue engineering, scaffolds must mimic the physical properties of bone extracellular matrix to facilitate cell recruitment, adhesion, proliferation and differentiation. Nanomaterials are often associated with scaffolds to improve their structure, bioactivity, stability, cell adhesion and/or compatibility. Carbon dots (CDs) are a fluorescent carbon nanomaterial with a diameter below 10 nm. The objective of this work was to develop the chitosan-gelatin/hydroxyapatite scaffolds, as well as the desired Carbon dots for application in Bone Tissue Engineering. Two different types of CD were initially developed, one of which presented better quantum yield of fluorescence and cytotoxicity. The scaffolds with and without prepared CDs presented, as expected, important characteristics for their application, such as porosity and degradation rate. As for the *in vitro* tests, an excellent cell adhesion rate, good cytotoxicity and alkaline phosphatase expression were obtained. The *in vivo* tests of the scaffolds before impregnation proved that the material developed has excellent regenerative capacity for application in bone tissue engineering. It is concluded, therefore, that the proposed material meets the established proposals and with promising results.

Keywords: Scaffolds, Tissue Engineering, Carbon dots, Gelatin, Hydroxyapatite and Chitosan.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A estrutura hierárquica do osso.	5
Figura 2 - Estrutura do osso cortical e esponjoso, demonstrando a organização das lamelas e ósteons.	6
Figura 3 - Células do Tecido ósseo.	9
Figura 4 - Processos associados a reparação do tecido ósseo.	10
Figura 5 - Estratégia usada em Engenharia de Tecidos.....	11
Figura 6 - Estrutura química da gelatina, quitosana e hidroxiapatita.	18
Figura 7 - Aplicação de nanomateriais à base de carbono na engenharia de tecidos ósseos. .	22
Figura 8 - Carbon dots e suas características.	23
Figura 9 - Abordagens top-down e bottom-up, CDCs indicam pontos quânticos de carbono cristalino e CDDs pontos de carbono desordenados.	24
Figura 10 - Distribuição de tamanhos dos CD, sendo (A) CDA e (B) CDB.....	41
Figura 11 - Espectro de Absorção dos CD preparados, sendo ■ CDA e ■ CDB.	42
Figura 12 - Espectro de fluorescência dos Carbon Dots quando excitados em diferentes comprimentos de onda, entre 300 e 500nm, sendo (A) e (B) para o CDA; (C) e (D) para o CDB.	43
Figura 13 - Espectro excitação e emissão de fluorescência dos CD, sendo ■ excitação CDA, ■ excitação CDB, ■ emissão CDA e ■ emissão CDB.....	44
Figura 14 - Curva de calibração de emissão de fluorescência para o CDA, sendo (A) o gráfico de emissão de fluorescência em diferentes concentrações (0,25 a 2,0 mg/mL) e (B) a reta que relaciona a emissão máxima com a concentração ($R^2 = 0,99638$).	44
Figura 15 - Curva de calibração de emissão de fluorescência para o CDB, sendo (A) o gráfico de emissão de fluorescência em diferentes concentrações (0,25 a 2,0 mg/mL) e (B) a reta que relaciona a emissão máxima com a concentração ($R^2 = 0,99297$).	45
Figura 16 - Difratoograma de Raios-X dos carbon dots sintetizados, sendo ■ CDA e ■ CDB.	46
Figura 17 - Espectros de infravermelho dos CDs preparados, sendo ■ CDA e ■ CDB.....	47
Figura 18 - Fluorescência dos CDs internalizados pelas linhagens hFOB 1.19 e HBMS após até 4 horas de incubação, sendo (A) para o CDA e (B) para CDB.	47
Figura 19 - Ensaio de citotoxicidade dos CDs sob a linhagem hFOB 1.19, sendo (A) o CDA e (B) o CDB. CT é o grupo controle e CTA o controle da água.	48

Figura 20 - Ensaio de citotoxicidade dos CDs sob a linhagem HBMS, sendo (A) o CDA e (B) o CDB. CT é o grupo controle e CTA o controle da água.	48
Figura 21 - Liberação do CDA da estrutura do scaffolds, sendo ■ 1 mg/mL e ■ 5 mg/mL.	49
Figura 22 - MEV dos scaffolds de QG/HA com diferentes ampliações, sendo (A) 100 x e (B) 500 x.	50
Figura 23 - MEV dos scaffolds de QG/HA/CD com diferentes ampliações, sendo (A) 100 x e (B) 1000 x.	51
Figura 24 - FT-IR dos scaffolds e de seus componentes gelatina, quitosana e hidroxiapatita.	52
Figura 25 - Difração de raio-x dos scaffolds e de seus componentes gelatina, quitosana e hidroxiapatita.	53
Figura 26 - Conservação em massa dos scaffolds QG/HA por um período de 21 dias, sendo ■ nas condições da HBMS e ■ nas condições de cultivo da hFOB.	54
Figura 27 - Conservação em massa dos scaffolds QG/HA/CD por um período de 21 dias, sendo ■ nas condições da HBMS e ■ nas condições de cultivo da hFOB.	54
Figura 28 - Adesão celular dos scaffolds sob as linhagens HBMS e hFOB, sendo ■ QG/HA e ■ QG/HA/CD.	55
Figura 29 - Cinética de crescimento para as linhagens (A) hFOB 1.19 e (B) HBMS.	56
Figura 30 - Citotoxicidade indireta dos scaffolds sob a linhagem hFOB 1.19, sendo ■ QG/HA e ■ QG/HA/CD.	57
Figura 31 - Citotoxicidade indireta dos scaffolds sob a linhagem HBMS, sendo ■ QG/HA e ■ QG/HA/CD.	57
Figura 32 - Citotoxicidade direta dos scaffolds sob a linhagem hFOB 1.19, sendo ■ QG/HA e ■ QG/HA/CD.	59
Figura 33 - Citotoxicidade direta dos scaffolds sob a linhagem HBMS, sendo ■ QG/HA e ■ QG/HA/CD.	59
Figura 34 - Atividade de fosfatase alcalina da linhagem hFOB 1.19 durante os períodos de 4, 7, 14 e 21 dias.	60
Figura 35 - Atividade de fosfatase alcalina da linhagem HBMS durante os períodos de 4, 7, 14 e 21 dias.	62
Figura 36 - Microscopia confocal das linhagens hFOB 1.19 e HBMS nos scaffolds de QG/HA, sendo (A) a fluorescência inerente do material quando excitado em verde, (B) as células marcadas com faloidina 633 e (C) a junção das duas imagens anteriores.	63

Figura 37 - Marcação com hematoxilina & eosina (H&E) das linhagens hFOB 1.19 e HBMS na estrutura dos scaffolds.	64
Figura 38 - Ensaio in vivo dos scaffolds QG/HA realizados com camundongos do tipo C57BL/6J.....	65
Figura 39 - Área que não foi regenerada após 14 dias de recuperação.	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Equações e coeficientes lineares obtidos para a quantificação do CDs.	45
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CA	ácido cítrico
CD	<i>Carbon Dot</i>
CDA	<i>carbon dots</i> preparados com 3 horas na mufla
CDB	<i>carbon dots</i> preparados com 4 horas na mufla
CDCs	pontos quânticos de carbono cristalino
CDDs	pontos de carbono desordenados
CEUA-FMRP	Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CT	grupo controle
CTA	grupo controle da água utilizada como solvente para os CDs
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMEM/F12	<i>Ham's F12 Medium e Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
ET	engenharia de tecidos
ETO	engenharia de tecidos ósseos
FA	fosfatase alcalina
FTC	fosfato tricálcico
FT-IR	infravermelho com transformada de Fourier
H&E	hematoxilina e eosina

HA	hidroxiapatita
MEC	matriz extracelular
MEO	matriz extracelular óssea
MTT	sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
nHA	nanohidroxiapatita
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PCL	poli(ϵ -caprolactona)
PEG	poli(etilenoglicol)
PLLA	poli(L-ácido lático)
QG/HA	<i>scaffold</i> quitosana-gelatina/hidroxiapatita
QG/HA/CD	<i>scaffold</i> quitosana-gelatina/hidroxiapatita impregnado com <i>carbon dot</i>
RCE	respostas de corpo estranho
SVF	fração vascular estromal
α -MEM	<i>Alpha Minimum Essential Medium</i>
Φ	rendimento quântico de fluorescência

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Revisão de Literatura	4
2.1. Estrutura óssea e sua regeneração	4
2.2. Engenharia de Tecidos Ósseos e os <i>scaffolds</i>	10
2.3. Biomateriais.....	14
2.3.1. Biocerâmicas	15
2.3.2. Polímeros.....	16
2.3.3. Materiais Compósitos.....	18
2.4. Nanotecnologia e nanomateriais	19
2.5. Carbon dots.....	22
3. Objetivos.....	28
3.1. Objetivos gerais	28
3.2. Objetivos específicos.....	28
4. Materiais e métodos	29
4.1. <i>Carbon dot</i>	29
4.1.1. Preparação dos <i>Carbon dots</i>	29
4.1.2. Análise de diâmetro médio hidrodinâmico do CDs, índice de polidispersidade e potencial zeta.....	29
4.1.3. Análise espectrofotométricas e quantificação dos CDs	29
4.1.4. Rendimento quântico de fluorescência	30
4.1.5. Difração de raio-x e infravermelho dos CDs	30
4.1.6. Cultura Celular	30
4.1.6.1. Linhagem hFOB 1.19	30
4.1.6.2. Linhagem HBMS	31
4.1.7. Estudos de taxa de internalização celular dos CDs (<i>uptake</i>).....	31
4.1.8. Ensaio de citotoxicidade dos CDs.....	32

4.2. <i>Scaffolds</i>	32
4.2.1. Preparação dos <i>scaffolds</i>	32
4.2.2. Preparação e padronização dos <i>scaffolds</i> contendo CDs	33
4.2.3. Caracterização dos <i>scaffolds</i>	33
4.2.4. Absorção de água e perfil de degradação	34
4.2.5. Análise de adesão celular	35
4.2.6. Cinética de crescimento e <i>doubling time</i> das linhagens	35
4.2.7. Avaliação da viabilidade celular dos <i>scaffolds</i>	36
4.2.7.1. Ensaios de citotoxicidade indireta	36
4.2.7.2. Ensaios de citotoxicidade direta	37
4.2.8. Avaliação dos níveis enzimáticos de fosfatase alcalina	37
4.2.9. Microscópio Confocal de Varredura a Laser	38
4.2.10. Histoquímica	38
4.2.11. Estudos <i>in vivo</i>	39
4.2.12. Análise estatística	40
5. Resultados e Discussão	41
5.1. Caracterização dos <i>Carbon Dots</i>	41
5.1.1. Avaliação da distribuição de tamanho e potencial zeta	41
5.1.2. Análises espectrofotométricas	41
5.1.3. Análise por espectroscopia de emissão de fluorescência para quantificação das concentrações de Carbon dots	44
5.1.4. Rendimento quântico de fluorescência (ϕ)	45
5.1.5. Difração de raios-X	46
5.1.6. Análise de Infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)	46
5.1.7. Estudos de taxa de internalização celular dos CDs	47
5.1.8. Ensaio de citotoxicidade dos CDs	48
5.2. <i>Scaffolds</i>	49

5.2.1. Padronização dos <i>scaffolds</i> contendo CDs (estudo de liberação)	49
5.2.2. Microscopia eletrônica de varredura	50
5.2.3. Caracterização da estrutura química dos andaimes	52
5.2.4. Absorção de água e perfil de degradação	53
5.2.5. Adesão celular	55
5.2.6. <i>Doubling time</i>	56
5.2.7. Avaliação da viabilidade celular	56
5.2.8. Atividade da Fosfatase Alcalina.....	60
5.2.9. Microscopia Confocal e Histoquímica.....	62
5.2.10. Estudos <i>in vivo</i>	64
6. Conclusão.....	67
7. Referências.....	68
ANEXO 1	80

1. Introdução

Ao longo dos anos, o aumento da população idosa em todo o mundo levou a um aumento de doenças ósseas e problemas de saúde musculoesqueléticos (por exemplo, fraturas ósseas, traumas e osteoporose) (QASIM et al., 2019). A perda de tecido ósseo e as fraturas limitam a mobilidade e causam incapacidades, representando grandes problemas de saúde pública (FERNANDES et al., 2019; DONNALOJA et al., 2020; MA, et al., 2018). Embora os ossos possam se autocurar, eles não podem se autorreparar na presença de defeitos significativos (>5 cm), portanto, técnicas reconstrutivas e terapias celulares são geralmente necessárias para obter um resultado melhor e mais eficaz (TURNBULL et al., 2018). O aumento contínuo de doenças ósseas tem estimulado o desenvolvimento de materiais que possam substituir materiais fisiológicos (autoenxerto, aloenxerto) de disponibilidade limitada. Nesse contexto, a engenharia de tecidos é uma das estratégias mais promissoras para o tratamento de lesões ósseas (TURNBULL et al., 2018; DU et al., 2018).

A engenharia de tecidos (ET) é um campo interdisciplinar que aplica princípios de engenharia e ciências da vida para desenvolver substitutos biológicos, criando estratégias terapêuticas que podem restaurar, manter ou melhorar as funções dos tecidos (CHRISTY et al., 2020). A engenharia de tecidos ósseos (ETO) visa reparar e promover a regeneração tecidual combinando três componentes principais: suportes de arcabouço (*scaffolds*), células e estímulos físico-químicos. As células podem ser obtidas de fontes autólogas (SÁVIO-SILVA et al., 2020), singênicas (HWANG et al., 2020), alogênicas e xenogênicas (GOYER, et al., 2019), e diversos *scaffolds* feitos de diferentes materiais podem ser utilizados para garantir as propriedades desejadas (WANG & YEUNG, 2017). A estratégia consiste em colher células de humanos ou animais, expandi-las *in vitro* e cultivá-las em certa quantidade empregando um processo via sistemas de biorreatores para expandi-las em uma janela temporal adequada a todo o processo (MENESES et al., 2020) e, eventualmente, diferenciá-las ou iniciar o processo de diferenciação antes da associação com os tecidos de interesse (CHRISTY et al., 2020). As células são semeadas em um sistema *scaffold* otimizado, projetado e desenvolvido para reproduzir as características ósseas *in vivo*, sendo o mesmo posteriormente implantado no local da lesão (CHRISTY et al., 2020).

O *scaffold* deve ser utilizado como suporte celular perfeito para mimetizar as propriedades físicas e biológicas da matriz extracelular (MEC), facilitando assim o recrutamento, adesão, proliferação e diferenciação celular (DONNALOJA et al., 2020). Além disso, para que a regeneração tecidual efetiva seja alcançada, o *scaffold* deve garantir estabilidade dimensional, bioatividade e biodegradabilidade e ser de fácil fabricação e

processamento (DU et al., 2018; MA et al., 2018; COLLINS et al., 2021; KIRILLOVA et al., 2021). Nesse sentido, uma nova matriz capaz de replicar tanto a estrutura óssea nativa quanto suas propriedades mecânicas é desejável. Portanto, o biomaterial empregado para a sua confecção deve obedecer a vários critérios, incluindo biocompatibilidade, esterilidade (para evitar o surgimento de infecções), osteocondutividade (para promover adesão celular e crescimento ósseo), biodegradabilidade, propriedades mecânicas adequadas, ausência de toxicidade, fácil manuseio e possibilidade de processamento em larga escala (DONNALOJA et al., 2020; MA et al., 2018).

As biocerâmicas estão entre os materiais mais estudados na substituição óssea (TURNBULL et al., 2018). Consistem em materiais cerâmicos destinados a obter um comportamento fisiológico específico para a construção de dispositivos protéticos artificiais ou órgãos internos (DU et al., 2018). Dentre os diversos biomateriais existentes, as cerâmicas bioativas, como a hidroxiapatita, que são fortes aliadas nos estudos e desenvolvimento de protocolos em engenharia de tecidos (SARI et al., 2021). Como o osso é composto principalmente de hidroxiapatita, *scaffolds* que contêm essa substância em sua composição têm sido investigados como sistemas potenciais que podem acelerar a regeneração óssea e permitir a osteocondutividade, a bioatividade e a reabsorção *in vivo*. No entanto, tais estruturas apresentam algumas desvantagens pois possuem estrutura frágil e baixa estabilidade mecânica, o que limita seu uso e o seu desenvolvimento num processo mais escalonado de produção (SHAO et al., 2019; DU et al., 2018). Devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e bioatividade, os polímeros de origem sintética (policaprolactona, poliácido láctico, poliuretano e etc) ou naturais (gelatina, quitosana, alginato e etc) também podem ser empregados para a construção de *scaffolds*. No entanto, também apresentam desvantagens, como resistência mecânica reduzida, rejeição imunológica e possível presença de impurezas patogênicas conservadas durante o processo de síntese e isolamento dos mesmos (CHRISTY et al., 2020).

A associação a este processo de um material compósito pode ajudar a superar as limitações dos biomateriais acima mencionadas. Tal material pode ser obtido pela combinação de diferentes materiais e composições, que conferem a este compósito as vantagens inerentes a cada componente, ao mesmo tempo em que apresentam propriedades únicas, distintas daquelas dos componentes individuais e originalmente usado. Dentre as combinações possíveis, destacam-se os compósitos poliméricos e cerâmicos, pois aliam a tenacidade dos polímeros com a força de compressão das cerâmicas (ZOU et al., 2019).

Nanomateriais diversas vezes são associados aos *scaffolds* para implementar a estrutura, bioatividade, estabilidade, adesão celular e/ou compatibilidade (KARRI et al., 2016). Os

Carbon dots (CDs) são um nanomaterial de carbono fluorescente com o diâmetro abaixo de 10 nm que foram descobertos em 2004 durante a purificação eletroforética de nanotubos de carbono (PINTO 2017; MISHRA et al, 2018; RAY et al., 2021). Tais nanomateriais tem se tornado uma alternativa promissora devido à sua composição, boa fotoestabilidade, tamanho de partícula reduzido, baixa citotoxicidade, alta solubilidade em água, biocompatibilidade, facilidade na funcionalização e modificação estrutural, além de apresentarem um processo de síntese de baixo custo. Os CD já foram utilizados como biossensores (RONG et al., 2016; LI et al., 2018), na transmissão gênica (HE et al., 2019), transportadores de drogas (KARRI et al., 2016; MATOS et al., 2018) e sondas de bioimagem (SONG et al., 2019; WANG et al., 2019) devido às suas excelentes propriedades espectroscópicas como a possibilidade de emissão de fluorescência, quando excitado no comprimento de onda adequado, apresentando boa biocompatibilidade e baixa toxicidade (TUERHONG et al., 2017; DEGHANI et al., 2018; RAY et al., 2021). Estes materiais apresentam um grande potencial para aplicação na detecção de pequenas moléculas ativas e no processo de imageamento de estruturas biológicas baseadas nas suas propriedades de fluorescência induzida por fotoprocessos envolvendo um fóton ou dois fótons (TAN et al., 2015; TUERHONG et al., 2017; PINTO, 2017; DEGHANI et al., 2018). Um exemplo de sucesso foi o trabalho de DEGHANI et al. (2018) que impregnaram CD em um sistema *scaffolds* de poli(ácido lático) (PLA) tornando-os luminescentes, frente a excitação com luz permitindo assim a aplicação de microscopia confocal não-invasiva de dois fótons para visualizar a microestrutura do *scaffold* e mapear as estruturas celulares no seu interior.

Sendo assim, a associação dos CDs nos *scaffolds* pode contribuir pra diferentes aplicações. Nesse estudo, essa associação foi realizada buscando melhorar ainda mais a compatibilidade e com o objetivo futuro de ser aplicado no fornecimento de imagens e em fotobioestimulação. A presença dos CDs na estrutura tridimensional podem ajudar no fornecimento de imagens futuras que permitam a rastreabilidade do *scaffolds* após ser aplicado em um tratamento. Além disso, sua capacidade de emissão de fluorescência pode contribuir não somente com fornecimento de imagens, mas também auxiliar na regeneração tecidual a partir dos processos de fotobioestimulação.

6. Conclusão

Os resultados obtidos mostraram que não houve muitas diferenças entre os CDs preparados nas duas condições adotadas. Eles possuem características físico-químicas dentro das esperadas, no entanto o CDA apresentou melhor rendimento quântico de fluorescência e menor citotoxicidade em frente aos testes *in vitro* com as linhagens hFOB 1.19 e HBMS.

Este estudo mostrou que os sistemas *scaffolds* apresentaram poros ideais para adesão celular e posterior vascularização, e diferentes técnicas confirmaram a presença de hidroxiapatita em toda a superfície. Além disso, a estrutura apresentou excelente capacidade de absorção de água e conservação de massa mesmo após 21 dias de exposição às condições de degradação, características que se mantiveram após a adição do CD.

Quanto aos testes *in vitro*, obteve-se uma excelente taxa de adesão celular em ambas as linhagens tanto antes quanto depois da impregnação com CD. Os resultados de citotoxicidade indireta e direta indicaram que os *scaffolds* preparados não são citotóxicos para as células estudada. Além disso, os resultados de FA foram significativos em ambas as matrizes analisadas. Utilizando microscopia confocal e análise de H&E, foi possível comprovar a adesão celular de ambas as linhagens nos *scaffolds*. A adição do CDs nos *scaffolds* não comprometeram suas características, pelo contrário, os resultados *in vitro* do QG/HA/CD foram superiores. Uma vez que os CDs foram adicionados buscando melhorias na compatibilidade pode-se concluir que se alcançou o objetivo esperado. Além disso, o rendimento quântico do CDA e a sua baixa liberação quando associado a estrutura do *scaffold* tornam suas características favoráveis para as futuras aplicações pensadas de imagem e fotobioestimulação.

Já os testes *in vivo* dos *scaffolds* QG/HA mostraram como o material desenvolvido foi eficiente para a regeneração, sendo que a aplicação da matriz semeada com SVF foi responsável por fechar praticamente toda a lesão após um período de 14 dias. Futuramente o mesmo estudo será realizado para o QG/HA/CD para comparar os resultados *in vivo* dos dois sistemas, além de estudar a aplicação de fotobioestimulação *in vitro* e *in vivo*.

Com base nos resultados, pode-se afirmar que os sistemas desenvolvidos nesse estudo têm grande potencial para aplicações na engenharia de tecidos ósseos.

7. Referências

ABBASI, Naghmeh; HAMLET, Stephen; LOVE, Robert M.; NGUYEN, Nam-Trung. Porous scaffolds for bone regeneration. **Journal Of Science: Advanced Materials and Devices**, v. 5, n. 1, p. 1-9, mar. 2020.

AUNE, Ulrike Liisberg; RUIZ, Lauren; KAJIMURA, Shingo. Isolation and Differentiation of Stromal Vascular Cells to Beige/Brite Cells. **Journal Of Visualized Experiments**, n. 73, p. 1-6, 28 mar. 2013.

BLACK, Jonathon Dj.; TADROS, Baha John. Bone structure: from cortical to calcium. **Orthopaedics and Trauma**, v. 34, n. 3, p. 113-119, jun. 2020.

CARBONARO; CORPINO; SALIS; MOCCI; THAKKAR; OLLA; RICCI. On the Emission Properties of Carbon Dots: reviewing data and discussing models. **C — Journal Of Carbon Research**, v. 5, n. 4, p. 60, 2 out. 2019.

CHRISTY, P. Narmatha; BASHA, S. Khaleel; KUMARI, V. Sugantha; BASHIR, A.K.H.; MAAZA, M.; KAVIYARASU, K.; ARASU, Mariadhas Valan; AL-DHABI, Naif Abdullah; IGNACIMUTHU, Savarimuthu. Biopolymeric nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering applications – A review. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 55, p. 101452, fev. 2020.

COLLINS, Maurice N.; REN, Guang; YOUNG, Kieran; PINA, S.; REIS, Rui L.; OLIVEIRA, J. Miguel. Scaffold Fabrication Technologies and Structure/Function Properties in Bone Tissue Engineering. **Advanced Functional Materials**, v. 31, n. 21, p. 2010609, 8 mar. 2021.

DE MELO, M. T. **Preparo, caracterização e aplicação em engenharia de tecidos de suportes de alginato/quitosana, associados a processos fotodinâmicos para fotobioestimulação**. 2019. 219 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

DEHGHANI, Alireza et al. Collagen derived carbon quantum dots for cell imaging in 3D scaffolds via two-photon spectroscopy. **Carbon**, v. 131, p.238-245, maio 2018.

DOMINGOS, Luis Fernando Tonholo. **PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PONTOS DE CARBONO OBTIDOS A PARTIR DE PROTEÍNAS**. 2016. 34 f. TCC

(Graduação) - Curso de Química, Universidade Federal de São João Del-Rei, São João del Rei, 2016.

DONNALOJA, Francesca; JACCHETTI, Emanuela; SONCINI, Monica; RAIMONDI, Manuela T. Natural and Synthetic Polymers for Bone Scaffolds Optimization. **Polymers**, v. 12, n. 4, p. 905, 14 abr. 2020.

DU, Xiaoyu; FU, Shengyang; ZHU, Yufang. 3D printing of ceramic-based scaffolds for bone tissue engineering: an overview. **Journal Of Materials Chemistry B**, v. 6, n. 27, p. 4397-4412, 2018.

EHTESABI, H.; MASSAH, F. Improvement of hydrophilicity and cell attachment of polycaprolactone scaffolds using green synthesized carbon dots. **Materials Today Sustainability**, v. 13, p. 100075, set. 2021.

EIVAZZADEH-KEIHAN, Reza; MALEKI, Ali; LAGUARDIA, Miguel de; BANI, Milad Salimi; CHENAB, Karim Khanmohammadi; PASHAZADEH-PANAHI, Paria; BARADARAN, Behzad; MOKHTARZADEH, Ahad; HAMBLIN, Michael R. Carbon based nanomaterials for tissue engineering of bone: building new bone on small black scaffolds. **Journal Of Advanced Research**, v. 18, p. 185-201, jul. 2019.

FELFEL, R M; POOCZA, Leander; GIMENO-FABRA, Miquel; MILDE, Tobias; HILDEBRAND, Gerhard; AHMED, Ifty; SCOTCHFORD, Colin; SOTTILE, Virginie; GRANT, David M; LIEFEITH, Klaus. In vitro degradation and mechanical properties of PLA-PCL copolymer unit cell scaffolds generated by two-photon polymerization. **Biomedical Materials**, v. 11, n. 1, p. 015011, 2 fev. 2016.

FERNANDES, Margarida M.; CORREIA, Daniela M.; RIBEIRO, Clarisse; CASTRO, Nelson; CORREIA, Vitor; LANCEROS-MENDEZ, Senentxu. Bioinspired Three-Dimensional Magnetoactive Scaffolds for Bone Tissue Engineering. **Acs Applied Materials & Interfaces**, v. 11, n. 48, p. 45265-45275, 4 nov. 2019.

FERY-FORGUES, Suzanne; LAVABRE, Dominique. Are Fluorescence Quantum Yields So Tricky to Measure? A Demonstration Using Familiar Stationery Products. **Journal Of Chemical Education**, v. 76, n. 9, p. 1260, set. 1999.

FILIPPI, Miriam; BORN, Gordian; CHAABAN, Mansoor; SCHERBERICH, Arnaud. Natural Polymeric Scaffolds in Bone Regeneration. **Frontiers In Bioengineering And Biotechnology**, v. 8, p. 1-28, 21 maio 2020.

FLORENCIO-SILVA, Rinaldo; SASSO, Gisela Rodrigues da Silva; SASSO-CERRI, Estela; SIMÕES, Manuel Jesus; CERRI, Paulo Sérgio. Biology of Bone Tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. **Biomed Research International**, v. 2015, p. 1-17, 2015.

FORERO, Juan; ROA, Eduardo; REYES, Juan; ACEVEDO, Cristian; OSSES, Nelson. Development of Useful Biomaterial for Bone Tissue Engineering by Incorporating Nano-Copper-Zinc Alloy (nCuZn) in Chitosan/Gelatin/Nano-Hydroxyapatite (Ch/G/nHAp) Scaffold. **Materials**, v. 10, n. 10, p. 1177, 17 out. 2017.

GOLUB, E. E.; BOESZE-BATTAGLIA, K. The role of alkaline phosphatase in mineralization. **Current opinion in Orthopaedics**, 18, n. 5, p. 444-448, 2007.

GOODYEAR, Simon R.; GIBSON, Iain R.; SKAKLE, Janet M.s.; WELLS, Richard P.K.; ASPDEN, Richard M. A comparison of cortical and trabecular bone from C57 Black 6 mice using Raman spectroscopy. **Bone**, v. 44, n. 5, p. 899-907, maio 2009.

GOYER, Benjamin; LAROUCHE, Danielle; KIM, Dong Hyun; VEILLETTE, Noémie; PRUNEAU, Virgile; BERNIER, Vincent; AUGER, François A.; GERMAIN, Lucie. Immune tolerance of tissue-engineered skin produced with allogeneic or xenogeneic fibroblasts and syngeneic keratinocytes grafted on mice. **Acta Biomaterialia**, v. 90, p. 192-204, maio 2019.

GUO, Baolin; MA, Peter X. Conducting Polymers for Tissue Engineering. **Biomacromolecules**, v. 19, n. 6, p. 1764-1782, 23 abr. 2018.

HAJIALI, Hadi; OUYANG, Liliang; LLOPIS-HERNANDEZ, Virginia; DOBRE, Oana; ROSE, Felicity R. A. J. Review of emerging nanotechnology in bone regeneration: progress, challenges, and perspectives. **Nanoscale**, v. 13, n. 23, p. 10266-10280, 2021.

HAN, Yu; LIAN, Meifei; WU, Qiang; QIAO, Zhiguang; SUN, Binbin; DAI, Kerong. Effect of Pore Size on Cell Behavior Using Melt Electrowritten Scaffolds. **Frontiers In Bioengineering And Biotechnology**, v. 9, p. 1-13, 2 jul. 2021.

HE, XI; CHEN, Ping; ZHANG, Ji; LUO, Tian-Ying; WANG, Hai-Jiao; LIU, Yan-Hong; YU, Xiao-Qi. Cationic polymer-derived carbon dots for enhanced gene delivery and cell imaging. **Biomaterials Science**, v. 7, n. 5, p. 1940-1948, 2019.

HILL, Michael J; QI, Baowen; BAYANIAHANGAR, Rasoul; ARABAN, Vida; BAKHTIARY, Zahra; DOSCHAK, Michael R; GOH, Brian C; SHOKOUHIMEHR, Mohammadreza; VALI, Hojatollah; PRESLEY, John F. Nanomaterials for bone tissue regeneration: updates and future perspectives. **Nanomedicine**, v. 14, n. 22, p. 2987-3006, nov. 2019.

HU, Xiaohua; AN, Xueqin; LI, Lielie. Easy synthesis of highly fluorescent carbon dots from albumin and their photoluminescent mechanism and biological imaging applications. **Materials Science And Engineering: C**, v. 58, p. 730-736, jan. 2016.

HWANG, Jung Won; LEE, Na Kyung; YANG, Je Hoon; SON, Hyo Jin; BANG, Sa Ik; CHANG, Jong Wook; NA, Duk L. A Comparison of Immune Responses Exerted Following Syngeneic, Allogeneic, and Xenogeneic Transplantation of Mesenchymal Stem Cells into the Mouse Brain. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 9, p. 3052, 26 abr. 2020.

IAQUINTA, Maria Rosa; MAZZONI, Elisa; BONONI, Ilaria; ROTONDO, John Charles; MAZZIOTTA, Chiara; MONTESI, Monica; SPRIO, Simone; TAMPIERI, Anna; TOGNON, Mauro; MARTINI, Fernanda. Adult Stem Cells for Bone Regeneration and Repair. **Frontiers In Cell And Developmental Biology**, v. 7, p. 1-15, 12 nov. 2019.

INTERNATIONAL STANDARD ISSO 10993-5. Biological evaluation of medical devices-Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. **Geneva: International Organization for Standardization**, 2009.

ISIKLI, C.; HASIRCI, V.; HASIRCI, N. Development of porous chitosan-gelatin/hydroxyapatite composite scaffolds for hard tissue-engineering applications. **Journal Of Tissue Engineering And Regenerative Medicine**, v. 6, n. 2, p. 135-143, 24 fev. 2011.

JAYME, Cristiano Ceron; PAULA, Leonardo Barcelos de; REZENDE, Nayara; CALORI, Italo Rodrigo; FRANCHI, Leonardo Pereira; TEDESCO, Antonio Claudio. DNA polymeric films as a support for cell growth as a new material for regenerative medicine: compatibility and applicability. **Experimental Cell Research**, v. 360, n. 2, p. 404-412, nov. 2017.

KARRI, Veera Venkata Satyanarayana Reddy; KUPPUSAMY, Gowthamarajan; TALLURI, Siddhartha Venkata; MANNEMALA, Sai Sandeep; KOLLIPARA, Radhakrishna; WADHWANI, Ashish Devidas; MULUKUTLA, Shashank; RAJU, Kalidhindi Rama Satyanarayana; MALAYANDI, Rajkumar. Curcumin loaded chitosan nanoparticles impregnated into collagen-alginate scaffolds for diabetic wound healing. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 1519-1529, dez. 2016

KHAN, Muhammad Umar Aslam; RAZAK, Saiful Izwan Abd; MEHBOOB, Hassan; KADIR, Mohammed Rafiq Abdul; ANAND, T. Joseph Sahaya; INAM, Fawad; SHAH, Saqlain A.; ABDEL-HALIEM, Mahmoud E. F.; AMIN, Rashid. Synthesis and Characterization of Silver-Coated Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering: antibacterial and in vitro evaluation of cytotoxicity and biocompatibility. **Acs Omega**, v. 6, n. 6, p. 4335-4346, 2 fev. 2021.

KIRILLOVA, Alina; YEAZEL, Taylor R.; ASHEGHALI, Darya; PETERSEN, Shannon R.; DORT, Sophia; GALL, Ken; BECKER, Matthew L. Fabrication of Biomedical Scaffolds Using Biodegradable Polymers. **Chemical Reviews**, v. 121, n. 18, p. 11238-11304, 15 abr. 2021.

KOONS, Gerry L.; DIBA, Mani; MIKOS, Antonios G. Materials design for bone-tissue engineering. **Nature Reviews Materials**, v. 5, n. 8, p. 584-603, 8 jun. 2020.

KUMAR, Pawan; SAINI, Meenu; DEHIYA, Brijnandan S.; SINDHU, Anil; KUMAR, Vinod; KUMAR, Ravinder; LAMBERTI, Luciano; PRUNCU, Catalin I.; THAKUR, Rajesh. Comprehensive Survey on Nanobiomaterials for Bone Tissue Engineering Applications. **Nanomaterials**, v. 10, n. 10, p. 2019, 13 out. 2020.

KUNST, Taciana Holanda. **Síntese, Caracterização e Aplicação de Carbon Quantum Dots de papel**. 2018. 76 f. Dissertação (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018.

LAIRD, Noah Z.; ACRI, Timothy M.; CHAKKA, Jaidev L.; QUARTERMAN, Juliana C.; MALKAWI, Walla I.; ELANGO VAN, Satheesh; SALEM, Aliasger K. Applications of nanotechnology in 3D printed tissue engineering scaffolds. **European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, v. 161, p. 15-28, abr. 2021.

LI, Na; LIU, Shi Gang; DONG, Jiang Xue; FAN, Yu Zhu; JU, Yan Jun; LUO, Hong Qun; LI, Nian Bing. Using high-energy phosphate as energy-donor and nucleus growth-inhibitor to prepare carbon dots for hydrogen peroxide related biosensing. **Sensors And Actuators B: Chemical**, v. 262, p. 780-788, jun. 2018.

LI, Zhengwei; DU, Tianming; RUAN, Changshun; NIU, Xufeng. Bioinspired mineralized collagen scaffolds for bone tissue engineering. **Bioactive Materials**, v. 6, n. 5, p. 1491-1511, maio 2021.

LIANG, Qinghua; MA, Wangjing; SHI, Yao; LI, Zhi; YANG, Xinming. Easy synthesis of highly fluorescent carbon quantum dots from gelatin and their luminescent properties and applications. **Carbon**, v. 60, p. 421-428, ago. 2013.

LIU, Yan; LUO, Dan; WANG, Tie. Hierarchical Structures of Bone and Bioinspired Bone Tissue Engineering. **Small**, v. 12, n. 34, p. 4611-4632, 20 jun. 2016.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MA, Hongshi; FENG, Chun; CHANG, Jiang; WU, Chengtie. 3D-printed bioceramic scaffolds: from bone tissue engineering to tumor therapy. **Acta Biomaterialia**, v. 79, p. 37-59, out. 2018.

MACHADO, Laiz Basso. **Avaliação radiográfica da influência do enxerto omental livre autógeno sobre falhas ósseas do terço médio da diáfise do rádio de coelhos**. 2017. 45 f. TCC (Graduação) - Curso de Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

MATOS, Renata Prandini Adum de; CALMON, Marília Freitas; AMANTINO, Camila Fernanda; VILLA, Luisa Lina; PRIMO, Fernando Lucas; TEDESCO, Antonio Claudio; RAHAL, Paula. Effect of Curcumin-Nanoemulsion Associated with Photodynamic Therapy in Cervical Carcinoma Cell Lines. **Biomed Research International**, v. 2018, p. 1-11, 2018.

MEDEIROS, Rebecca Vasconcellos Botelho de. **Avaliação de Moduladores e Biomateriais para Aplicação em Afecções do Tecido Ósseo**. 2021. 229 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado em Ciências, Área de Concentração em Biologia Celular, Departamento

de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2021.

MENESES, João; SILVA, João C.; FERNANDES, Sofia R.; DATTA, Abhishek; FERREIRA, Frederico Castelo; MOURA, Carla; AMADO, Sandra; ALVES, Nuno; PASCOAL-FARIA, Paula. A Multimodal Stimulation Cell Culture Bioreactor for Tissue Engineering: a numerical modelling approach. **Polymers**, v. 12, n. 4, p. 940, 18 abr. 2020.

MISHRA, Vijay; PATIL, Akshay; THAKUR, Sourav; KESHARWANI, Prashant. Carbon dots: emerging theranostic nanoarchitectures. **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 6, p. 1219-1232, jun. 2018.

MITRI, Fabio Franceschini; INGLE, Avinash P. The Bone Biology and the Nanotechnology for Bone Engineering and Bone Diseases. **Nanotechnology In Skin, Soft Tissue, And Bone Infections**, p. 223-244, 2020.

MOHONTA, Sajib Kumar; MARIA, Kazi Hanium; RAHMAN, Sharmin; DAS, Harinarayan; HOQUE, Sheikh Manjura. Synthesis of hydroxyapatite nanoparticle and role of its size in hydroxyapatite/chitosan–gelatin biocomposite for bone grafting. **International Nano Letters**, v. 11, n. 4, p. 381-393, 12 jul. 2021.

MOMBINI, Shabnam; MOHAMMADNEJAD, Javad; BAKHSHANDEH, Behnaz; NARMANI, Asghar; NOURMOHAMMADI, Jhamak; VAHDAT, Sadaf; ZIRAK, Shahrzad. Chitosan-PVA-CNT nanofibers as electrically conductive scaffolds for cardiovascular tissue engineering. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 140, p. 278-287, nov. 2019.

MONDAL, Sudip; NGUYEN, Thanh Phuoc; PHAM, Van Hiep; HOANG, Giang; MANIVASAGAN, Panchanathan; KIM, Myoung Hwan; NAM, Seung Yun; OH, Junghwan. Hydroxyapatite nano bioceramics optimized 3D printed poly lactic acid scaffold for bone tissue engineering application. **Ceramics International**, v. 46, n. 3, p. 3443-3455, fev. 2020.

MORAES, Liz Specian de. **Carbon Dots: Síntese via Carbonização Hidrotérmica a Partir de Fontes Proteicas e sua Interação com Sistemas Biológicos**. 2016. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.

MORRIS, John V.; MAHANEY, Mary A.; HUBER, J. Robert. Fluorescence Quantum Yield Determinations. 9,10-Diphenylanthracene as a Reference Standard in Different Solvents. **The Journal Of Physical Chemistry**, v. 80, n. 9, p. 969-974, 1976.

NOBRE, Rita Maria Lages. **Hidrogéis: Potencial de aplicação em Engenharia de Tecidos**. 2016. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências e Tecnologia Departamento de Química e Farmácia, Universidade do Algarve, Algarve, 2016.

PETER, Mathew; GANESH, Nitya; SELVAMURUGAN, N.; NAIR, S.V.; FURUIKE, T.; TAMURA, H.; JAYAKUMAR, R. Preparation and characterization of chitosan-gelatin/nanohydroxyapatite composite scaffolds for tissue engineering applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 3, p. 687-694, 5 maio 2010.

PINTO, Tarciane da Silva. **FILMES AUTOMONTADOS BASEADOS NOS BIOPOLÍMEROS QUITOSANA E COLÁGENO COM CARBON QUANTUM DOTS COM POTENCIAIS APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS**. 2017. 125 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2017.

PRIYA, Ganesan; MADHAN, Balaraman; NARENDRAKUMAR, Uttamchand; KUMAR, Rayadurgam Venkata Suresh; MANJUBALA, Inderchand. In Vitro and In Vivo Evaluation of Carboxymethyl Cellulose Scaffolds for Bone Tissue Engineering Applications. **Acs Omega**, v. 6, n. 2, p. 1246-1253, 4 jan. 2021.

QASIM, Muhammad; CHAE, Dong Sik; LEE, Nae Yoon. Advancements and frontiers in nano-based 3D and 4D scaffolds for bone and cartilage tissue engineering. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 4333-4351, jun. 2019.

QU, Huawei; FU, Hongya; HAN, Zhenyu; SUN, Yang. Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: a review. **Rsc Advances**, v. 9, n. 45, p. 26252-26262, 2019.

RAHMAN, Sharmin; MARIA, Kazi Hanium; ISHTIAQUE, Mohammad Saif; NAHAR, Arijun; DAS, Harinarayan; HOQUE, Sheikh Manjura. Evaluation of a novel nanocrystalline hydroxyapatite powder and a solid hydroxyapatite/Chitosan-Gelatin bioceramic for scaffold preparation used as a bone substitute material. **Turkish Journal Of Chemistry**, v. 44, n. 4, p. 884-900, 18 ago. 2020.

RAHMATI, Maryam; MILLS, David K.; URBANSKA, Aleksandra M.; SAEB, Mohammad Reza; VENUGOPAL, Jayarama Reddy; RAMAKRISHNA, Seeram; MOZAFARI, Masoud. Electrospinning for tissue engineering applications. **Progress In Materials Science**, v. 117, p. 100721, abr. 2021.

RALSTON, Stuart H. Bone structure and metabolism. **Medicine**, v. 45, n. 9, p. 560-564, set. 2017.

RAY, Priyanka; MOITRA, Parikshit; PAN, Dipanjan. Emerging theranostic applications of carbon dots and its variants. **View**, v. 3, n. 2, p. 20200089, 19 maio 2021.

REN, Jie; WANG, Xuemiao; ZHAO, Lingling; LI, Meng; YANG, Wu. Double Network Gelatin/Chitosan Hydrogel Effective Removal of Dyes from Aqueous Solutions. **Journal Of Polymers And The Environment**, v. 30, n. 5, p. 2007-2021, 11 nov. 2021.

RONG, Ming-Cong; ZHANG, Ke-Xin; WANG, Yi-Ru; CHEN, XI. The synthesis of B, N-carbon dots by a combustion method and the application of fluorescence detection for Cu²⁺. **Chinese Chemical Letters**, v. 28, n. 5, p. 1119-1124, maio 2017.

SARI, Mona; HENING, Puspa; CHOTIMAH; ANA, Ika Dewi; YUSUF, Yusril. Bioceramic hydroxyapatite-based scaffold with a porous structure using honeycomb as a natural polymeric Porogen for bone tissue engineering. **Biomaterials Research**, v. 25, n. 1, p. 1-13, 19 jan. 2021.

SÁVIO-SILVA, Christian; BEYERSTEDT, Stephany; SOINSKI-SOUSA, Poliana E.; CASARO, Expedito B.; BALBY-ROCHA, Maria Theresa A.; SIMPLÍCIO-FILHO, Antônio; ALVES-SILVA, Jamille; RANGEL, Érika B. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Diabetic Kidney Disease: a review of the studies using syngeneic, autologous, allogeneic, and xenogeneic cells. **Stem Cells International**, v. 2020, p. 1-28, 19 nov. 2020.

SHAO, Dan; LU, Mengmeng; XU, Duo; ZHENG, Xiao; PAN, Yue; SONG, Yubin; XU, Jinying; LI, Mingqiang; ZHANG, Ming; LI, Jing. Carbon dots for tracking and promoting the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **Biomaterials Science**, v. 5, n. 9, p. 1820-1827, 2017.

SHAO, Huiping; HE, Jianzhuang; LIN, Tao; ZHANG, Zhinan; ZHANG, Yumeng; LIU, Shuwen. 3D gel-printing of hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering. **Ceramics International**, v. 45, n. 1, p. 1163-1170, jan. 2019.

SHIMODA, Hirofumi; YAGI, Hiroshi; HIGASHI, Hisanobu; TAJIMA, Kazuki; KURODA, Kohei; ABE, Yuta; KITAGO, Minoru; SHINODA, Masahiro; KITAGAWA, Yuko. Decellularized liver scaffolds promote liver regeneration after partial hepatectomy. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 29 ago. 2019.

SIKORA, Mateusz; MARCINKOWSKA, Klaudia; MARYCZ, Krzysztof; WIGLUSZ, Rafał Jakub; ŚMIESZEK, Agnieszka. The Potential Selective Cytotoxicity of Poly (L- Lactic Acid)-Based Scaffolds Functionalized with Nanohydroxyapatite and Europium (III) Ions toward Osteosarcoma Cells. **Materials**, v. 12, n. 22, p. 3779-3799, 18 nov. 2019.

SILLER, A. F.; WHYTE, M. P. Alkaline phosphatase: discovery and naming of our favorite enzyme. **Journal of Bone and Mineral Research**, 33, n. 2, p. 362-364, 2018.

SIQUEIRA-MOURA, M.P. et al. Validated spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for determination of chloroaluminum phthalocyanine in nanocarriers. **Pharmazie**, v. 65, p.9-14, 2010.

SONG, Yukun; LI, Xintong; CONG, Shuang; ZHAO, Haidong; TAN, Mingqian. Nuclear-targeted of TAT peptide-conjugated carbon dots for both one-and two-photon fluorescence imaging. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, v. 180, p. 449-456, ago. 2019.

TAMBURACI, Sedef; TIHMINLIOGLU, Funda. Development of Si doped nano hydroxyapatite reinforced bilayer chitosan nanocomposite barrier membranes for guided bone regeneration. **Materials Science And Engineering: C**, v. 128, p. 112298, set. 2021.

TAN, Mingqian; LI, Xintong; WU, Hao; WANG, Beibei; WU, Jing. N-doped carbon dots derived from bovine serum albumin and formic acid with one- and two-photon fluorescence for live cell nuclear imaging. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, v. 136, p. 141-149, dez. 2015.

THEIN-HAN, W.W.; MISRA, R.D.K. Biomimetic chitosan–nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 4, p. 1182-1197, maio 2009.

TUERHONG, Mhetaer; XU, Yang; YIN, Xue-bo. Review on Carbon Dots and Their Applications. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 45, n. 1, p.139-150, jan. 2017.

TURNBULL, Gareth; CLARKE, Jon; PICARD, Frédéric; RICHES, Philip; JIA, Luanluan; HAN, Fengxuan; LI, Bin; SHU, Wenmiao. 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. **Bioactive Materials**, v. 3, n. 3, p. 278-314, set. 2018.

VAGROPOULOU, Georgia; TRENTSIU, Maria; GEORGOPOULOU, Anthie; PAPACHRISTOU, Eleni; PRYMAK, Oleg; KRITIS, Aristeidis; EPPLE, Matthias; CHATZINIKOLAIDOU, Maria; BAKOPOULOU, Athina; KOIDIS, Petros. Hybrid chitosan/gelatin/nanohydroxyapatite scaffolds promote odontogenic differentiation of dental pulp stem cells and in vitro biomineralization. **Dental Materials**, v. 37, n. 1, p. 23-36, jan. 2021.

VIMALRAJ, S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. **Gene**, 754, p. 144855, 2020.

WANG, Runxia; WANG, Xiufang; SUN, Yimin. One-step synthesis of self-doped carbon dots with highly photoluminescence as multifunctional biosensors for detection of iron ions and pH. **Sensors And Actuators B: Chemical**, v. 241, p. 73-79, mar. 2017.

WANG, Wenhao; YEUNG, Kelvin W.K. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: a review. **Bioactive Materials**, v. 2, n. 4, p. 224-247, dez. 2017.

WANG, Yanqin; XUE, Yanan; WANG, Jinghui; ZHU, Yaping; WANG, Xin; ZHANG, Xuehui; ZHU, Yu; LIAO, Jingwen; LI, Xiaona; WU, Xiaogang. Biocompatible and photoluminescent carbon dots/hydroxyapatite/PVA dual-network composite hydrogel scaffold and their properties. **Journal Of Polymer Research**, v. 26, n. 11, p. 1-6, 15 out. 2019.

WEAR, Keith A. Mechanisms of Interaction of Ultrasound With Cancellous Bone: a review. **Ieee Transactions On Ultrasonics, Ferroelectrics, And Frequency Control**, v. 67, n. 3, p. 454-482, mar. 2020.

WU, Dan; ISAKSSON, Per; FERGUSON, Stephen J.; PERSSON, Cecilia. Young's modulus of trabecular bone at the tissue level: a review. **Acta Biomaterialia**, v. 78, p. 1-12, set. 2018.

YLINEN, Pekka. **APPLICATIONS OF CORALLINE HYDROXYAPATITE WITH BIOABSORBABLE CONTAINMENT AND REINFORCEMENT AS BONE GRAFT SUBSTITUTE**. 2006. 114 f. Dissertação (Mestrado), Department Of Orthopaedics And Traumatology, University Of Helsinki, Helsinki, 2006.

ZHANG, Wentao; WANG, Naiguo; YANG, Ming; SUN, Tianze; ZHANG, Jing; ZHAO, Yantao; HUO, Na; LI, Zhonghai. Periosteum and development of the tissue-engineered periosteum for guided bone regeneration. **Journal Of Orthopaedic Translation**, v. 33, p. 41-54, mar. 2022.

ZHANG, Yajie; CHEN, Hong; ZHANG, Tingting; ZAN, Yue; NI, Tianyu; CAO, Yi; WANG, Jine; LIU, Min; PEI, Renjun. Injectable hydrogels from enzyme-catalyzed crosslinking as BMSCs-laden scaffold for bone repair and regeneration. **Materials Science And Engineering: C**, v. 96, p. 841-849, mar. 2019.

ZHU, Jingjing; KONG, Qian; ZHENG, Shuangshuang; WANG, Yiwei; JIAO, Zeren; NIE, Yi; LIU, Tianqing; SONG, Kedong. Toxicological evaluation of ionic liquid in a biological functional tissue construct model based on nano-hydroxyapatite/chitosan/gelatin hybrid scaffolds. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 158, p. 800-810, set. 2020.

ZHU, Jingjing; KONG, Qian; ZHENG, Shuangshuang; WANG, Yiwei; JIAO, Zeren; NIE, Yi; LIU, Tianqing; SONG, Kedong. Toxicological evaluation of ionic liquid in a biological functional tissue construct model based on nano-hydroxyapatite/chitosan/gelatin hybrid scaffolds. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 158, p. 800-810, set. 2020.

ZOU, Lin; ZHANG, Yujue; LIU, Xiaocui; CHEN, Jingdi; ZHANG, Qiqing. Biomimetic mineralization on natural and synthetic polymers prepares hybrid scaffolds for bone tissue engineering. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 178, p. 222-229, jun. 2019.