

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

Lorena Costa Rosa de Souza Lima

**Hidrogel de quitosana contendo nanomaterial polimérico e
cerâmico aplicado ao reparo ósseo**

DISSERTAÇÃO

JUIZ DE FORA

2025

Lorena Costa Rosa de Souza Lima

**Hidrogel de quitosana contendo nanomaterial polimérico e
cerâmico aplicado ao reparo ósseo**

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

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

JUIZ DE FORA

2025

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

Souza Lima, Lorena Costa Rosa de.

Hidrogel de quitosana contendo nanomaterial polimérico e cerâmico aplicado ao reparo ósseo / Lorena Costa Rosa de Souza Lima. -- 2025.

120 p. : il.

Orientadora: Michele Munk Pereira

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2025.

1. Reparo ósseo. 2. Nanomateriais. 3. Citocompatibilidade. I. Pereira, Michele Munk, orient. II. Título.

Lorena Costa Rosa de Souza Lima

**Hidrogel de quitosana contendo nanomaterial polimérico e
cerâmico aplicado ao reparo ósseo**

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

Aprovada em 14 de novembro de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Michele Munk Pereira - Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora

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

Prof^a. Dr^a. Danielle Luciana Aurora Soares do Amaral
Bio Bureau Biotecnologia - CCS

Juiz de Fora, 14/10/2025.



Documento assinado eletronicamente por **Michele Munk Pereira, Professor(a)**, em 14/11/2025, às 15:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Magno da Costa Maranduba, Professor(a)**, em 14/11/2025, às 15:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Danielle Luciana Aurora Soares do Amaral, Usuário Externo**, em 17/11/2025, às 09:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **2683605** e o código CRC **E4EF98FD**.

“As mulheres que mudaram o mundo nunca precisaram mostrar nada
além de sua inteligência” - Rita Levi-Montalcini

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de expressar minha gratidão à minha orientadora Michele Munk Pereira por acreditar no meu potencial desde o início e me orientar com paciência durante todo o processo. Cada conversa foi de muita importância não somente para o desenvolvimento desse trabalho, mas também para meu crescimento pessoal e como profissional em uma nova fase da vida.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, em especial à Clarissa, Milena, Carlos e Yuri, que tornaram os dias de longos experimentos mais leves e divertidos. Vocês se tornaram casa dentro de um espaço pequeno, e construíram um lugar muito especial na minha vida, muito além do profissional. Juntos, construímos não apenas resultados científicos, mas memórias que levarei comigo para sempre. À Eduarda, Rebecca, Carol e Geovana, meu grande agradecimento pelo companheirismo, ensinamentos e momentos engrandecedores compartilhados. Dividir o laboratório com vocês me fez crescer. Vocês merecem o mundo.

Sou imensamente grata à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG processos APQ-01855-23 e RED00081-23) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq processo nº. 305109/2024-3) por todo o suporte financeiro que permitiu a realização deste projeto.

À minha família, sou profundamente grata por todo amor, incentivo e apoio que me permitiram chegar até aqui. À minha mãe, Cristiane, por ser meu maior exemplo de força, paciência e resiliência, e por ser a pessoa que manteve sempre uma confiança inabalável em meu potencial. Obrigada por me ensinar a nunca desistir diante dos maiores desafios e por sempre estar ao meu lado nos momentos onde eu chorei, ri e resolvi seguir em frente. Ao meu pai, Langliberds, por acreditar em mim desde sempre, por me lembrar todos os dias que o estudo é a melhor forma de crescer e de conquistar o mundo; obrigada por me incentivar a sempre pegar um livro pra ler, a me fazer acreditar sempre no dia seguinte e me mostrar que a busca por conhecimento é nosso maior super poder. Você é meu espelho e minha inspiração diária. Ao meu padrasto, Rodrigo, por seu apoio constante, conselhos sábios e por se mostrar presente nessa fase tão desafiadora da minha vida. Estaremos juntos sempre. À minha avó, Leda, por seu carinho e por torcer por mim de todas as formas possíveis; sua oração nunca falhou, vó. E à minha prima,

Camila, por sua amizade, compreensão e incentivo, tornando os meus dias mais leves e alegres, mesmo nos períodos de maior pressão acadêmica. Cada um de vocês contribuiu de forma única para que eu pudesse seguir adiante, e sou eternamente grata por tê-los como parte desta etapa.

Aos meus amigos, meu muito obrigada por caminharem ao meu lado nesta jornada, mesmo nos momentos em que meus compromissos acadêmicos me afastaram fisicamente. Em especial, agradeço aos amigos que me acompanham desde o primeiro período da faculdade, Luan e Pablo, por compartilharem comigo tantas experiências de vida, aprendizados e por todos desafios que passamos e superamos ao longo de todos esses anos; à minha amiga de infância, Laura, por sua presença constante, carinho e incentivo, que atravessaram décadas e se mantêm firmes até hoje; e ao Matheus, que me trouxe alegria ao aparecer em minha vida, de forma tão espontânea. Aos demais, obrigada por compreenderem minhas ausências, por ouvirem meus desabafos, por comemorarem minhas pequenas e grandes conquistas e por me fazerem companhia nos dias mais cansativos. Cada conversa, cada conselho, cada momento de descontração trouxe tranquilidade e equilíbrio à minha vida durante esta fase intensa. A amizade de vocês foi e continua sendo um porto seguro, uma fonte de energia, motivação e carinho que levarei comigo para sempre.

Às minhas companheiras de quatro patas, Flora e Nega, que estiveram sempre por perto para garantir pausas obrigatórias de carinho, brincadeiras e algumas bagunças extremamente importantes nos momentos mais intensos dessa escrita.

E, é claro, ao meu querido avô, Gentil, que infelizmente não está mais entre nós, mas cuja presença sinto em cada novo passo da minha vida e em cada dia que passa. Sei que, de algum lugar, você está orgulhoso das minhas conquistas e me acompanhando com aquele carinho que sempre me transmitiu força, nos dias mais cansativos e nos meus momentos mais fracos. Suas lições, histórias e amor continuam guiando meus caminhos e inspirando-me a dar o meu melhor, e este trabalho também é uma forma de honrar sua memória e tudo o que me ensinou. A “Pipim” cresceu.

RESUMO

O tecido ósseo apresenta capacidade de auto regeneração, mas lesões graves ou condições diversas como o envelhecimento podem demandar de terapias alternativas às cirurgias convencionais para a reestruturação óssea. Hidrogéis à base de quitosana (QTS) são promissores para o reparo do tecido ósseo por sua biocompatibilidade e biodegradabilidade e semelhança com a matriz extracelular, embora apresentem limitações mecânicas. A associação da QTS com nanofibras de celulose (NFC), que conferem reforço estrutural, e nanopartículas de titanato de bário (NPTB), que possuem propriedades piezoelétricas, surge como estratégia para superar tais restrições. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar hidrogéis de QTS associados a NFC e NPTB a fim de conhecer suas características morfológicas para adaptação celular, avaliando sua citocompatibilidade, bioatividade osteogênica *in vitro* com células SHED e desempenho *in vivo* em modelos murinos de calvária em seguida. Foram sintetizados quatro grupos experimentais (QTS, QTS/NFC, QTS/NPTB e QTS/NFC/NPTB), sendo o grupo QTS determinado como controle 3D. Os hidrogéis foram submetidos a análises físico-químicas (MEV, FTIR, Raman, degradação e molhabilidade), ensaios de citotoxicidade e osteogênese (MTT, Alamar Blue e ALP), além de testes *in vivo* em modelo de calvária de camundongos Swiss. Os resultados mostraram que a incorporação dos nanomateriais resultou em microestrutura porosa, perfil hidrofílico (ângulos de contato $<90^\circ$) e taxa de degradação progressiva ao longo de 21 dias. Nos ensaios *in vitro*, os grupos contendo nanomateriais apresentaram maior viabilidade celular (medida pelo teste de MTT e Alamar Blue) e níveis mais elevados de atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP) em comparação ao controle (QTS). Esses resultados demonstram que a presença dos nanomateriais aumentou a viabilidade celular e a atividade ALP nos ensaios *in vitro*, sugerindo um potencial efeito estimulante desses nanomateriais nas células, quando comparados ao controle (QTS). Nos testes *in vivo*, o compósito QTS/NFC/NPTB promoveu epitelização mais rápida (tempo médio de 9 dias) e apresentou maior formação de tecido ósseo/volume de matriz mineralizada, enquanto a presença de NPTB, isolado ou combinado, esteve associada a menor taxa de degradação e maior intensidade de resposta inflamatória inicial. Futuramente, análises quantitativas tridimensionais de deposição óssea e ensaios de coloração para verificar o possível potencial de

mineralização e consequente aplicabilidade na engenharia tecidual óssea serão de suma importância para prosseguimento do estudo.

Palavras-chave: biomateriais, citocompatibilidade, nanomateriais, osteogênese, polímeros.

ABSTRACT

Bone tissue has an intrinsic self-regeneration capacity; however, extensive injuries or conditions such as aging may require alternative therapies to conventional surgeries. Chitosan (QTS)-based hydrogels are promising for bone repair due to their biocompatibility, biodegradability, and similarity to the extracellular matrix, although they exhibit mechanical limitations. The association of QTS with cellulose nanofibers (NFC), which provide structural reinforcement, and barium titanate nanoparticles (NPTB), which possess piezoelectric properties, emerges as a strategy to overcome such constraints. This study aimed to develop and characterize QTS-based hydrogels combined with NFC and NPTB, evaluating their cytocompatibility, in vitro osteogenic bioactivity using SHED cells, and in vivo performance in bone repair. Four experimental groups were synthesized (QTS, QTS/NFC, QTS/NPTB, and QTS/NFC/NPTB), with QTS defined as the 3D control. The hydrogels were subjected to physicochemical analyses (SEM, FTIR, Raman, degradation, and wettability), cytotoxicity and osteogenesis assays (MTT, Alamar Blue, and ALP), as well as in vivo tests using a Swiss mouse calvaria model. The results showed that the incorporation of nanomaterials led to a porous microstructure, hydrophilic profile (contact angles $<90^\circ$), and progressive degradation over 21 days. In vitro, groups containing nanomaterials exhibited higher cell viability (measured by MTT and Alamar Blue assays) and increased alkaline phosphatase (ALP) activity compared to the control (QTS). In vivo, the QTS/NFC/NPTB composite promoted faster epithelialization (average of 9 days) and greater bone tissue formation/mineralized matrix volume, whereas the presence of NPTB, alone or combined, was associated with a lower degradation rate and higher initial inflammatory response. Future three-dimensional quantitative analyses and staining assays will be essential to verify the potential mineralization capacity and consequent applicability of this material in bone tissue engineering.

Keywords: biomaterials, cytocompatibility, nanomaterials, osteogenesis, polymers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração da composição óssea.....	4
Figura 2. Representação visual das células que compõem o tecido ósseo.....	7
Figura 3. Ilustração etapas celulares do reparo ósseo.....	9
Figura 4. Modelos disponíveis para a regeneração e remodelamento ósseo.....	14
Figura 5. Propriedades essenciais para a aplicação de <i>scaffolds</i> na engenharia de tecido ósseo.....	20
Figura 6. Ilustração dos modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> utilizados para o estudo.....	29
Figura 7. Desenho experimental.....	32
Figura 8. Fluxograma esquemático representativo do ensaio de degradação <i>in vitro</i>	36
Figura 9. Representação esquemática do ensaio de ângulo de contato.....	37
Figura 10. Ilustração representativa do ensaio de MTT.....	38
Figura 11. Ilustração representativa do ensaio de Alamar Blue.....	39
Figura 12. Procedimento cirúrgico.....	41
Figura 13. Hidrogel de quitosana liofilizado.....	44
Figura 14. Imagens representativas obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) mostrando a microestrutura dos diferentes grupos experimentais de hidrogéis.....	46
Figura 15. Gráfico representativo da média dos tamanhos dos poros mensurados para cada grupo experimental (n = 10).....	47
Figura 16. Análise dos grupos experimentais dos hidrogéis por FTIR e Raman	49
Figura 17. Variação do peso (g) dos diferentes materiais nos tempos experimentais (D0, D7, D14 e D21).....	50

Figura 18. Imagens representativas do teste de molhabilidade dos hidrogéis correspondentes aos diferentes grupos experimentais, com medição do ângulo de contato da gota de água depositada sobre as superfícies dos hidrogéis.....	52
Figura 19. Valores médios dos ângulos de contato obtidos no ensaio de molhabilidade dos diferentes grupos experimentais de hidrogéis.....	53
Figura 20. Viabilidade celular avaliada pelo ensaio de MTT em células cultivadas sobre diferentes composições de hidrogéis de quitosana (QTS) ao longo de 7, 14 e 21 dias.....	54
Figura 21. Viabilidade celular avaliada pelo ensaio Alamar Blue em células cultivadas sobre diferentes composições de hidrogéis de quitosana (QTS) ao longo de 7, 14 e 21 dias.....	55
Figura 22. Atividade de fosfatase alcalina (ALP) em células cultivadas sobre diferentes composições de hidrogéis de quitosana (QTS) ao longo de 7, 14 e 21 dias.....	56
Figura 23. Avaliação macroscópica do reparo de pele dos camundongos em períodos de 9 e 16 dias após a cirurgia.....	58
Figura 24. Imagens representativas de cortes coronais obtidos a partir do centro da lesão das calvárias de camundongos Swiss, corados com Hematoxilina e Eosina, 28 dias pós-lesão.....	60
Figura 25. Imagens representativas de cortes coronais obtidos a partir do centro da lesão de calvárias de camundongos Swiss corados com hematoxilina e eosina 56 dias após a lesão.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Legenda do score utilizado para avaliar semi-quantitativamente os parâmetros histológicos.....	43
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

QTS	Quitosana
NFCs	Nanofibras de Celulose
NPTBs	Nanopartículas de Titanato de Bário
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
ALP	Fosfatase Alcalina
SHED	Células-tronco de Dentes Decíduos Esfoliados Humanos
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
ECM	Matriz Extracelular
3D	Tridimensional
MSCs	Células-tronco Mesenquimais
RANKL	Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa B
OPG	Osteoprotegerina
PLGA	Poli(ácido láctico-co-glicólico)
PGA	Poli(ácido glicólico)
PCL	Policaprolactona
PLLA	Poli(ácido L-lático)
DPSCs	Células-tronco da Polpa Dentária Adulta

TPP	Tripolifosfato de Sódio
PBS	Tampão Fosfato Salino
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio brometo
DMEM/F-12 Mixture F-12)	Meio de cultura (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12)
SFB	Soro Fetal Bovino
BCIP/NBT para ALP)	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/nitro blue tetrazolium (substrato para ALP)
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
UFSJ	Universidade Federal de São João del-Rei
NUCAL	Núcleo de Criação de Animais de Laboratório
HE	Hematoxilina e Eosina
ANOVA	Análise de Variância
FDA	U.S. Food and Drug Administration
NPs	Nanopartículas
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Dano
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
IFN-gamma	Interferon gama
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
TNF-alpha	Fator de Necrose Tumoral Alfa

Treg	Células T Reguladoras
Th2	Linfócitos T helper 2
micro-CT	Microtomografía Computadorizada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	2
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. O Tecido Ósseo: Fisiologia, Reparo e Desafios Clínicos.....	3
2.1.1 Composição e Arquitetura Óssea.....	3
2.1.1.1 <i>Fração orgânica e inorgânica.....</i>	4
2.1.2 Tipos Celulares	
2.1.2.1 Osteoclastos.....	5
2.1.2.2 <i>Osteoblastos.....</i>	5
2.1.2.3 <i>Osteócitos.....</i>	6
2.1.3 Proteínas Não Colagênicas.....	7
2.1.3.1 <i>Osteocalcina.....</i>	8
2.1.3.2 <i>Osteonectina.....</i>	8
2.1.3.3 <i>Osteopontina.....</i>	8
2.2 O Processo Fisiológico de Reparo Ósseo.....	8
2.2.1 Etapas do Reparo Ósseo.....	9
2.2.1.1 <i>Fase Inflamatória.....</i>	10
2.2.1.2 <i>Fase de Reparo.....</i>	10
2.2.1.3 <i>Fase de Remodelação.....</i>	11
2.2.2 Ausência de Reparo Ósseo Efetivo.....	11
2.2.2.1 <i>Falha Hipertrófica.....</i>	11
2.2.2.2 <i>Falha Atrófica.....</i>	12
2.2.3 Enxertos autólogos.....	13
2.2.4 Enxertos alogênicos.....	13
2.3 Engenharia Tecidual Óssea: Princípios e Estratégias.....	14
2.3.1 Scaffolds.....	15
2.3.1.1 <i>Polímeros sintéticos.....</i>	16
2.3.1.2 <i>Polímeros naturais.....</i>	17
2.3.2 Células.....	18
2.4 Hidrogéis como Scaffolds para a Engenharia de Tecidos.....	19
2.4.1 Quitosana.....	20
2.5 Nanocompósitos Híbridos: Estratégias para Funcionalização de Hidrogéis..	21
2.5.1 Reforço Estrutural com Nanocelulose.....	21
2.5.2 Estímulos Bioelétricos na Osteogênese.....	23
2.6 A Resposta do Hospedeiro a Biomateriais.....	24
2.6.1 Inflamação Aguda vs. Crônica na Interface Material-Tecido.....	24
2.6.1.1 <i>Inflamação aguda pró-inflamatória.....</i>	25
2.6.1.2 <i>Inflamação crônica.....</i>	26
2.7 Modelos Experimentais in vitro e in vivo para Avaliação de Biomateriais Ósseos.....	27
2.7.1 Células-tronco de Dentes Decíduos Esfoliados (SHEDs).....	27

2.7.2 O Modelo de Defeito Crítico em Calvária.....	28
3 HIPÓTESE.....	30
4 OBJETIVOS.....	31
4.1 Objetivo Geral.....	31
4.2 Objetivos Específicos.....	31
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
5.1 Síntese do hidrogel nanocompósito.....	33
5.2 Caracterização físico-química do hidrogel nanocompósito.....	34
5.2.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	34
5.2.2 Espectroscopia Raman e Infravermelho.....	34
5.2.3 Ensaio de degradação.....	35
5.2.4 Teste de molhabilidade.....	36
5.3 Avaliação da citocompatibilidade in vitro.....	37
5.3.1 MTT.....	37
5.3.2 Alamar Blue.....	38
5.3.3 Quantificação da atividade da fosfatase alcalina intracelular.....	39
5.4 Avaliação da bioatividade in vivo.....	40
5.4.1 Animais e grupos experimentais.....	40
5.4.2 Procedimento cirúrgico.....	40
5.4.3 Descalcificação por EDTA.....	42
5.4.4 Processamento Histológico.....	42
5.4.5 Análise morfométrica em microscopia de luz.....	42
5.5 Análises Estatísticas.....	43
6 RESULTADOS.....	44
6.1 Desenvolvimento do hidrogel.....	44
6.2 Caracterização físico-química.....	45
6.2.1 MEV.....	45
6.2.2 Espectroscopias.....	47
6.2.3 Ensaio de degradação.....	49
6.2.4 Molhabilidade.....	50
6.2.5 Citocompatibilidade in vitro.....	54
6.2.5.1 MTT.....	54
6.2.5.2 Alamar Blue.....	55
6.2.5.3 Fosfatase Alcalina.....	56
6.3. Análise Histológica do Reparo Ósseo In Vivo.....	57
6.3.1 Resposta Tecidual e Biocompatibilidade dos Hidrogéis.....	57
6.3.2 Potencial Regenerativo dos Hidrogéis.....	58
7 DISCUSSÃO.....	65
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo constitui uma estrutura tridimensional rígida, fundamental para a homeostase do organismo, desempenhando funções biológicas essenciais como a proteção de órgãos vitais e a participação nos processos de locomoção. Além de suas propriedades mecânicas, os ossos apresentam capacidade intrínseca de auto-regeneração. No entanto, fatores como o aumento da expectativa de vida e, consequentemente, da população idosa, a maior incidência de lesões esportivas, a obesidade, malformações congênitas e doenças degenerativas, como a osteoporose, podem comprometer significativamente o processo de regeneração óssea, demandando intervenções clínicas mais complexas (Zhang *et al.*, 2025; Yu *et al.*, 2020). Entre as terapias utilizadas, destacam-se os autoenxertos, limitados pela morbidade do sítio doador e pela quantidade restrita de tecido disponível, e os aloenxertos, que apresentam risco de resposta imune e de transmissão de doenças (Zhouyu *et al.*, 2024). Nesse contexto, torna-se interessante a pesquisa por novas estratégias terapêuticas para o reparo ósseo.

A engenharia tecidual surge como uma abordagem promissora para superar essas limitações, explorando princípios biológicos e de biomateriais no desenvolvimento de substitutos teciduais. Essa área é tradicionalmente estruturada na tríade constituída por *scaffolds*, células e fatores de sinalização. Dentre esses componentes, os *scaffolds* atuam como arcabouços tridimensionais que mimetizam a matriz extracelular (MEC) óssea e fornecem suporte físico-químico para adesão, proliferação e diferenciação celular (Lavanya *et al.*, 2020; Bharadwaz & Jayasuriya, 2020).

Entre os diferentes tipos de *scaffolds*, os hidrogéis destacam-se por suas propriedades únicas. Estes biomateriais apresentam elevada hidratação, estrutura porosa interconectada e potencial de serem aplicados de forma injetável, características que os tornam adequados para preencher defeitos ósseos irregulares de maneira minimamente invasiva (Yue *et al.*, 2020). Além disso, possuem natureza hidrofílica e capacidade de atuar como carreadores de células, medicamentos e moléculas bioativas, criando um microambiente favorável para o reparo tecidual (Vo, Tabata & Mikos, 2016; Shi *et al.*, 2019). Dentre os biopolímeros empregados na formulação de hidrogéis, a quitosana (QTS) destaca-se por ser

biocompatível, biodegradável, não tóxica e apresentar atividade antimicrobiana (Zou *et al.*, 2018; Ghorbani *et al.*, 2020.). Contudo, apesar de suas propriedades biológicas favoráveis, a quitosana isolada apresenta limitações mecânicas, como baixa resistência e flexibilidade, o que restringe sua aplicação biomédica em casos de reparo ósseo.

Uma estratégia promissora para superar essas limitações consiste na associação da quitosana a nanomateriais, originando hidrogéis nanocompósitos com propriedades reforçadas. As nanofibras de celulose (NFCs) têm se destacado como reforço polimérico, pois apresentam alta resistência mecânica, módulo elástico elevado, biocompatibilidade e biodegradabilidade (Amorim *et al.*, 2020; Maharjan *et al.*, 2021). Além disso, sua organização fibrilar mimetiza o papel estrutural do colágeno na MEC óssea, contribuindo para maior estabilidade estrutural e adesão celular (Ding *et al.*, 2019; Tamo *et al.*, 2022). Em acréscimo, nanopartículas cerâmicas bioativas, como o titanato de bário (NPTB), oferecem propriedades osteoindutoras, sendo capazes de estimular diretamente a diferenciação osteogênica por meio da liberação de íons e características de superfície (Tandon, Blaker & Cartmell, 2018; Medrado *et al.*, 2020). Além disso, seu comportamento piezoelétrico confere potencial adicional para favorecer o processo de reparo ósseo, visto que o tecido ósseo nativo também responde a estímulos elétricos. Dessa forma, a associação entre NFCs e NPTB em hidrogéis de quitosana configura uma abordagem inovadora e biomimética para o desenvolvimento de substitutos ósseos.

Embora os efeitos individuais da quitosana, das nanofibras de celulose e das nanopartículas de titanato de bário já tenham sido descritos na literatura, a combinação sinérgica desses componentes em uma única matriz ainda é pouco explorada. Em especial, faltam investigações sobre sua interação com células-tronco mesenquimais de relevância clínica, como as derivadas de dentes decíduos esfoliados (SHED), bem como estudos em modelos animais que avaliem sua eficácia no reparo ósseo. Assim, o presente trabalho propõe o desenvolvimento de um hidrogel de quitosana associado a NFCs e NPTB, visando potencializar propriedades estruturais e bioativas para aplicações em engenharia tecidual óssea.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O Tecido Ósseo: Fisiologia, Reparo e Desafios Clínicos

O tecido ósseo constitui um órgão dinâmico e altamente especializado, responsável por desempenhar diversas funções fisiológicas importantes no organismo. Além de garantir a sustentação mecânica do corpo e possibilitar a realização de movimentos, também atua como um protetor para os órgãos vitais. Adicionalmente, participa no processo de hematopoiese e exerce papel crucial como reservatório de minerais, especialmente cálcio e fósforo, essenciais para o metabolismo celular e para a manutenção do equilíbrio iônico do organismo (Chang & Liu, 2022).

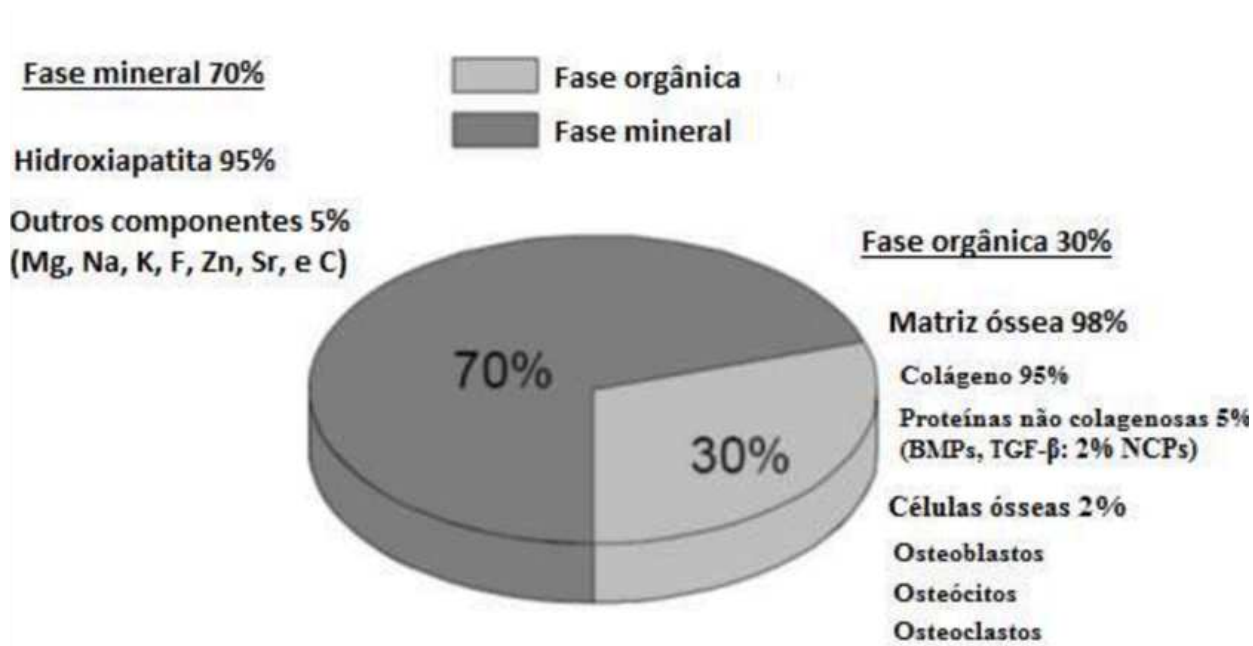
2.1.1 Composição e Arquitetura Óssea

O osso pode ser dividido em duas principais estruturas: o osso cortical (compacto) e o osso trabecular (esponjoso) (Morgan *et al.*, 2019). O osso cortical constitui a maior parte da estrutura do tecido, conferindo resistência mecânica e rigidez, fundamentais para a sustentação do corpo (Chang & Liu, 2022). Já o osso trabecular, caracterizado por uma microarquitetura porosa, é capaz de suportar deformações compressivas (Morgan *et al.*, 2019). Essa organização estrutural é essencial para a remodelação adaptativa, permitindo que o tecido responda de maneira eficiente a estímulos mecânicos e a processos de reparo (Figura 1).

O tecido ósseo apresenta uma estrutura mineralizada altamente organizada, composta por diferentes tipos celulares especializados - osteoblastos, osteócitos e osteoclastos - e por uma matriz extracelular (MEC) complexa. Essa combinação confere não apenas resistência mecânica, mas também a capacidade de remodelação contínua, além de desempenhar papel central nas atividades metabólicas e no suporte ao crescimento celular (Wittig, 2022). Sua composição inclui componentes orgânicos, como o colágeno, água e minerais inorgânicos, com destaque para a hidroxiapatita (Sromova, 2023).

As interações entre colágeno, hidroxiapatita e os demais componentes orgânicos e inorgânicos resultam em uma organização que determina propriedades mecânicas típicas do osso, como resistência à compressão, tenacidade à fratura e resistência à tração, características que distinguem o tecido ósseo de outros materiais biológicos (Dwived *et al.*, 2019).

Figura 1 - Ilustração da composição óssea.



Fonte: Pinto, 2016.

2.1.1.1 Fração orgânica e inorgânica

A fração orgânica do tecido ósseo é constituída predominantemente por fibras de colágeno, que conferem flexibilidade e resistência à tração. Dentre os diferentes tipos de colágeno presentes na matriz óssea, o colágeno tipo I é o mais abundante, contribuindo para a resistência e integridade estrutural do tecido e fornecendo suporte estrutural. O colágeno tipo III também está presente, conferindo elasticidade extra, enquanto o colágeno tipo V atua na regulação e organização das fibras colágenas na matriz extracelular (Sromova *et al.*, 2023).

A fração inorgânica do tecido ósseo é composta predominantemente por minerais que formam cristais de hidroxiapatita (fórmula molecular: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), integrando-se à matriz colagênica de maneira organizada (Ramesh *et al.*, 2018). Dentre esses minerais, destacam-se cálcio e fósforo, que são os principais responsáveis não apenas pela manutenção da resistência e rigidez óssea, mas também pela estabilidade estrutural do tecido, além de participarem diretamente de processos fundamentais como osteoindução, mecanismo biológico que induz a formação de novo tecido ósseo por meio da ativação e diferenciação celular, e osteocondução, processo pelo qual células osteogênicas migram e colonizam estruturas preexistentes, promovendo a neoformação óssea.

O tecido ósseo também abriga diversas proteínas não colagênicas que desempenham funções essenciais em processos biológicos como remodelação óssea, sinalização celular e mineralização (Zhou *et al.*, 2021; Wittig *et al.*, 2022). Além disso, a formação e manutenção do tecido ósseo provêm da interação entre três tipos celulares distintos, mas de extrema importância: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, que atuam de maneira interdependente para a remodelação óssea, cada um com origens celulares específicas e funções complementares essenciais à homeostase do sistema esquelético (Sromova *et al.*, 2023).

2.1.2 Tipos Celulares

2.1.2.1 Osteoclastos

Os osteoclastos são células multinucleadas, diretamente envolvidas no processo de reabsorção do tecido ósseo, sendo predominantemente encontrados em áreas de reabsorção localizadas em cavidades da matriz óssea conhecidas como lacunas de Howship (Maciel *et al.*, 2023). Além de seu papel central na remodelação óssea, os osteoclastos também participam da manutenção da função endócrina do tecido ósseo, contribuindo para a ativação da proteína não colagênica osteocalcina, a qual está relacionada à regulação do metabolismo energético e à modulação da secreção de insulina (Rossi *et al.*, 2019).

Os osteoclastos possuem origem hematopoiética, diferenciando-se a partir da linhagem de monócitos/macrófagos sob estímulo de citocinas produzidas por osteoblastos e osteócitos, em particular o fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) e o ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL) (Kodama; Kaito, 2020). O eixo RANK/RANKL/OPG (osteoprotegerina) é um dos principais mecanismos regulatórios do equilíbrio entre reabsorção e formação óssea, e constitui alvo frequente de pesquisas clínicas sobre doenças osteometabólicas, como a osteoporose (Kim *et al.*, 2020).

2.1.2.2 Osteoblastos

Os osteoblastos, por sua vez, são células responsáveis pela formação óssea, um processo mediado pela deposição de camadas de matriz extracelular, composta principalmente por colágeno tipo I, que é posteriormente mineralizada com fosfato de cálcio na forma de hidroxapatita. Estima-se que essas células correspondam a aproximadamente 46% do total das células ósseas, exercendo papel fundamental

na liberação de citocinas, como RANKL e osteoprotegerina (OPG), que regulam a diferenciação e atividade dos osteoclastos, assegurando assim o equilíbrio dinâmico entre formação e reabsorção óssea (Zhou *et al.*, 2021; Maciel *et al.*, 2023).

Além disso, os osteoblastos são responsáveis pela produção de proteínas da matriz extracelular, incluindo osteocalcina, fosfatase alcalina e colágeno tipo I, sendo este último o principal componente da matriz óssea, representando mais de 90% da fração orgânica da matriz (Kim *et al.*, 2020).

A origem dos osteoblastos está nas células-tronco mesenquimais (MSCs), que se diferenciam sob influência de múltiplos estímulos, incluindo fatores de transcrição intracelulares, fatores de crescimento e citocinas. Além desses sinais, fatores extracelulares também modulam a diferenciação osteoblástica, como hipóxia, radiação, uso de fármacos, prática de atividades físicas e dieta (Almuraikhi, 2025).

Morfologicamente, os osteoblastos apresentam um complexo de Golgi bem desenvolvido, retículo endoplasmático rugoso abundante e núcleos ricos em eucromatina, indicando elevada atividade secretora, importante para a síntese e deposição eficiente da matriz óssea (Maciel, 2023). Ao término da fase ativa de formação, os osteoblastos podem seguir três destinos distintos: sofrer apoptose, diferenciar-se em osteócitos ou permanecer como células de revestimento na superfície óssea (bone-lining cells) (Kim *et al.*, 2020).

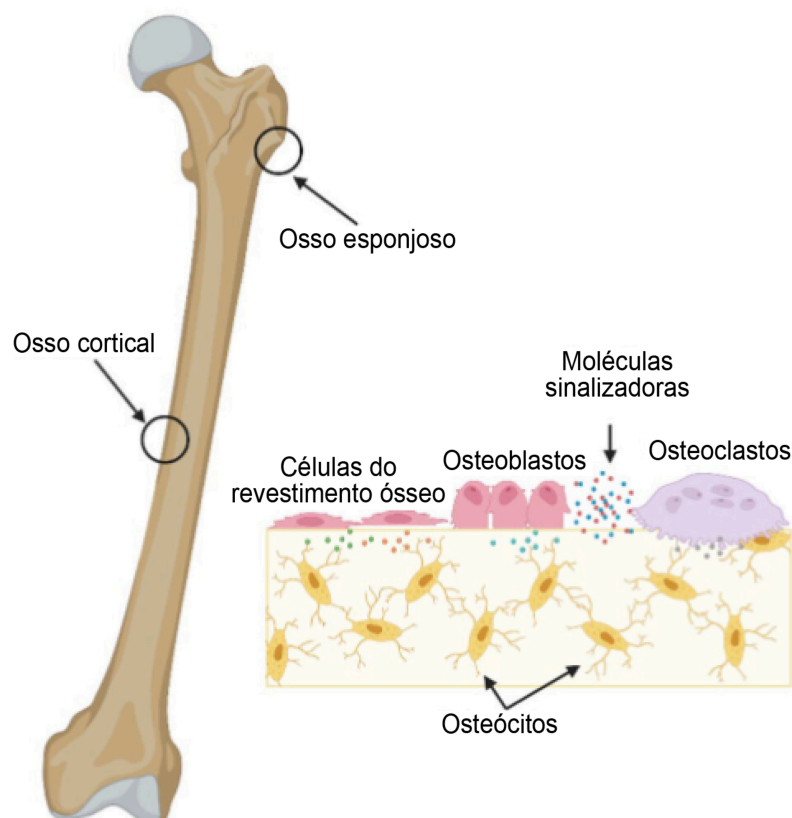
2.1.2.3 Osteócitos

Os osteócitos são células originárias dos osteoblastos e representam as mais abundantes no tecido ósseo mineralizado, correspondendo a cerca de 90–95% da composição celular do osso. A diferenciação dessas células ocorre quando parte dos osteoblastos se incorpora à matriz óssea ao término do processo de formação do tecido (Sromova *et al.*, 2023).

Durante essa transição, os osteócitos adquirem morfologia dendrítica, caracterizada pelo desenvolvimento de prolongamentos citoplasmáticos longos, que lhes permitem estabelecer conexões com outras células ósseas e com vasos sanguíneos por meio de junções gap (Moorer *et al.*, 2017). Essa rede de comunicação viabiliza o transporte eficiente de nutrientes e a remoção de resíduos metabólicos com o meio extracelular (Lin *et al.*, 2020).

Além disso, essas conexões intercelulares permitem aos osteócitos detectar e responder a cargas mecânicas aplicadas ao tecido ósseo adjacente, contribuindo para a regulação adaptativa da remodelação óssea (Buck; Stains, 2024) (Figura 2).

Figura 2 - Representação visual das células que compõem o tecido ósseo.



Fonte: Qianli *et al.*, 2023 (adaptado).

2.1.3 Proteínas Não Colagênicas

2.1.3.1 Osteocalcina

A osteocalcina é uma proteína reconhecida por sua atuação na regulação da formação óssea, além de desempenhar funções hormonais relevantes em outros sistemas do organismo. Estudos recentes demonstram que a forma não carboxilada da osteocalcina está envolvida no metabolismo da insulina, aumentando tanto a secreção quanto a sensibilidade à mesma, além de mediar a secreção de testosterona (Smith *et al.*, 2024; Sromova, 2023; Karsenty, 2023).

2.1.3.2 Osteonectina

A osteonectina, por sua vez, está diretamente envolvida na modulação de fatores de crescimento e contribui para a mineralização e deposição de hidroxiapatita, desempenhando também papel importante na adesão e comunicação celular (Zhu *et al.*, 2023).

2.1.3.3 Osteopontina

Outro exemplo relevante é a osteopontina, que, além de atuar na mineralização e regulação da formação óssea, facilita a migração e adesão de células osteogênicas por meio de interações com integrinas e íons cálcio, desempenhando papel essencial no remodelamento ósseo (Lin *et al.*, 2021).

Dessa forma, as células ósseas - osteoblastos, osteoclastos e osteócitos - atuam de maneira coordenada para manter a homeostase do tecido ósseo, por meio do controle integrado dos processos de formação, reabsorção e sinalização celular. Além disso, as proteínas não colagênicas presentes na matriz óssea exercem funções importantes não apenas na estrutura e mineralização do tecido, mas também na regulação das atividades celulares envolvidas na remodelação e regeneração óssea, sendo alvos promissores para o desenvolvimento de terapias inovadoras voltadas à reparação tecidual e à engenharia de biomateriais aplicados à medicina regenerativa.

2.2 O Processo Fisiológico de Reparo Ósseo

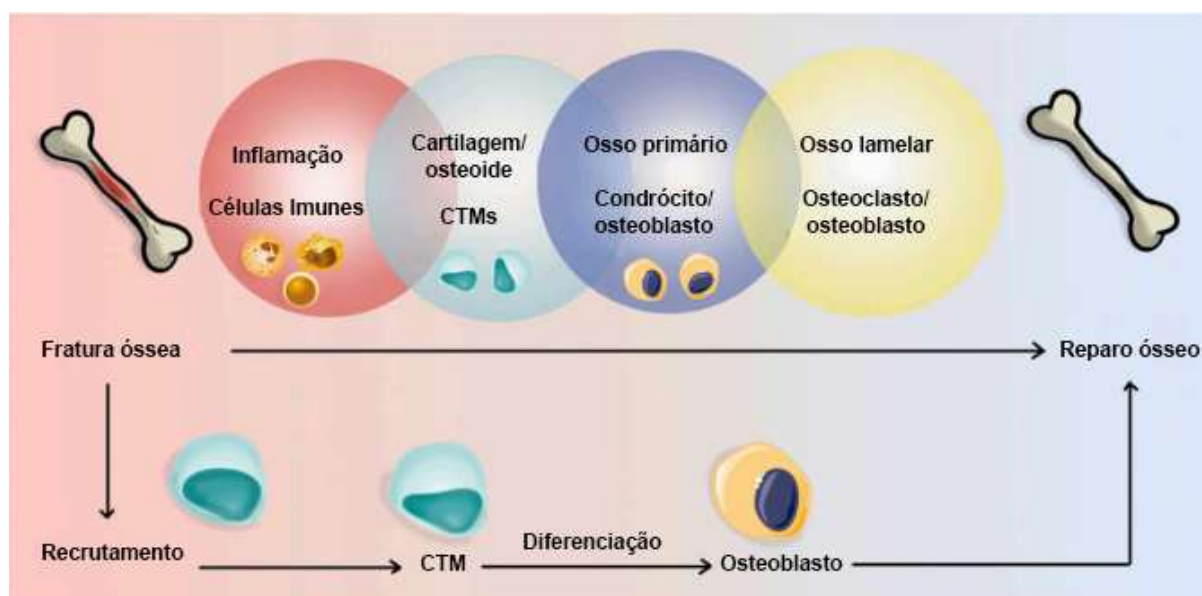
O processo de reparação óssea ainda representa um desafio significativo na prática clínica, devido à sua complexidade estrutural e celular do tecido. O osso é um tecido altamente vascularizado e dinâmico, capaz de passar por constantes processos de remodelação ao longo da vida. Essa capacidade adaptativa permite não apenas a restauração de sua estrutura morfológica, mas também a recuperação integral de suas funções mecânicas. No entanto, na presença de defeitos críticos, o tecido ósseo apresenta limitações em regenerar, de forma espontânea, sua morfologia original completa e suas propriedades físico-mecânicas. Essa limitação ressalta a complexidade do reparo ósseo e evidencia a necessidade crescente do desenvolvimento e aplicação de terapias alternativas capazes de promover uma regeneração óssea eficaz e funcional.

2.2.1 Etapas do Reparo Ósseo

Quando o osso é submetido a um trauma ou fratura grave, ocorre uma resposta imediata de células próprias do tecido ósseo, como os osteócitos e osteoblastos, que iniciam a sinalização celular assim que identificam o dano. A partir desse estímulo inicial, essas células liberam citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e mediadores vasoativos, cujo objetivo é induzir a vasodilatação e, conseqüentemente, aumentar a permeabilidade vascular. Esse processo desencadeia uma cascata inflamatória que, ao final, ativa células-tronco mesenquimais e dá início ao processo de regeneração tecidual (Goodman *et al.*, 2019).

Após a lesão, a cicatrização óssea ocorre em três etapas sobrepostas e de caráter altamente complexo. Inicialmente, a fase inflamatória é caracterizada pela formação do hematoma e pelo recrutamento de células inflamatórias para a região lesionada. Em seguida, ocorre a fase de reparo, marcada pela formação de um calo mole que, progressivamente, sofre mineralização. Por fim, na fase de remodelação, esse calo é substituído integralmente por tecido ósseo maduro, devidamente organizado e funcional (Maruyama *et al.*, 2020; Bacevich *et al.*, 2023) (Figura 3).

Figura 3 - Ilustração etapas celulares do reparo ósseo.



Fonte: Zhan *et al.*, 2022 (adaptado).

2.2.1.1 Fase Inflamatória

A fase inicial do reparo ósseo, conhecida como fase inflamatória, ocorre imediatamente após a lesão. A fratura provoca a ruptura dos vasos sanguíneos no interior e ao redor do local afetado, levando à coagulação e, consequentemente, à formação de um hematoma. Esse hematoma estabelece um microambiente inicial marcado por hipóxia local, funcionando como matriz temporária para a concentração de citocinas e células inflamatórias que desencadeiam a cascata inflamatória (Walters *et al.*, 2018).

Além disso, a idade exerce influência crítica nessa fase. Em indivíduos idosos, a resposta inflamatória a uma fratura pode apresentar-se desregulada e retardada, evoluindo para um quadro de inflamação crônica que compromete a cicatrização e favorece a deterioração progressiva do tecido ósseo (Goodman *et al.*, 2019).

2.2.1.2 Fase de Reparo

Na fase de reparo, inicia-se a formação do calo ósseo por meio da deposição de uma matriz colagenosa, facilitada pela invasão de novos vasos sanguíneos. O calo inicial, conhecido como calo mole, é constituído principalmente por tecido cartilaginoso e matriz colagenosa, sendo mais flexível que o osso maduro (Kenkre *et al.*, 2018). Essa estrutura provisória exerce papel essencial ao estabilizar a fratura e permitir a continuidade do processo de cicatrização.

A formação do calo envolve dois mecanismos de ossificação, que podem ocorrer de forma concomitante em diferentes regiões do local fraturado:

- **Ossificação intramembranosa:** ocorre no perióstio, quando células-tronco mesenquimais (MSCs) se diferenciam em células osteoprogenitoras, que se proliferam e dão origem aos osteoblastos. Estes, por sua vez, promovem a formação direta de calo ósseo duro, ainda imaturo (Kenkre *et al.*, 2018).
- **Ossificação endocondral:** ocorre no endóstio e na medula óssea. Nessa etapa, as MSCs da medula diferenciam-se em condrócitos, que secretam matriz cartilaginosa. Essa matriz sofre mineralização e origina um calo cartilaginoso. Posteriormente, a apoptose dos condrócitos permite a invasão vascular e a migração de osteoblastos, que substituem a matriz cartilaginosa por matriz óssea mineralizada (Kenkre *et al.*, 2018).

2.2.1.3 Fase de Remodelação

O processo de remodelação corresponde à terceira e última etapa da regeneração óssea, sendo caracterizado pela substituição gradual do calo inicial e pela restauração da morfologia, da estrutura e das propriedades mecânicas originais do tecido ósseo (Duda *et al.*, 2023).

Nessa fase, o osso lamelar, mais resistente e organizado do que o tecido imaturo do calo duro, é depositado. A remodelação é regulada pelo equilíbrio dinâmico entre osteoblastos (células formadoras de osso) e osteoclastos (células responsáveis pela reabsorção óssea). A interação dessas células assegura tanto a deposição de osso lamelar quanto a reabsorção do tecido excedente, promovendo o restabelecimento funcional e estrutural do osso (Kenkre *et al.*, 2018; Maruyama *et al.*, 2020).

2.2.2 Ausência de Reparo Ósseo Efetivo

De acordo com a U.S. Food and Drug Administration (FDA), considera-se não união óssea a fratura que não apresenta consolidação após um período mínimo de 9 meses, associado à ausência de sinais radiográficos de progresso cicatricial por pelo menos 3 meses consecutivos (FDA, 2023).

A falha na união pode ser classificada radiologicamente em hipertrófica ou atrófica, conforme a presença ou ausência de resposta biológica no foco da fratura (Toosi *et al.*, 2018).

2.2.2.1 Falha Hipertrófica

A falha hipertrófica, também denominada pseudoartrose hipertrófica, caracteriza-se por uma fratura que não completa o processo de cicatrização. Nos exames radiográficos, observa-se a presença de um calo ósseo exuberante ao redor da fratura, mas sem a formação do “calo de união” típico em pelo menos três corticais. Esse achado indica a interrupção do processo espontâneo de cicatrização, exigindo intervenção terapêutica (Maruyama *et al.*, 2020; Burska *et al.*, 2020).

Essa condição ocorre, principalmente, quando há mobilidade excessiva do foco de fratura, comprometendo a vascularização e o aporte de nutrientes, ambos indispensáveis à regeneração óssea (Schlunt *et al.*, 2018).

2.2.2.2 Falha Atrófica

Na pseudoartrose atrófica, o osso apresenta capacidade reduzida de cicatrização, com mínima formação de calo ósseo e atraso expressivo na consolidação. Tradicionalmente, essa condição é descrita como avascular; contudo, ainda persiste debate acerca do grau de vascularização residual do tecido do calo.

Nessa situação, observa-se o fechamento da cavidade medular dos fragmentos ósseos, dificultando o suprimento sanguíneo. Como consequência, as regiões mais distantes da fratura recebem irrigação insuficiente, prejudicando a neoformação óssea (Maruyama *et al.*, 2020; Wildemann *et al.*, 2021). Além disso, a pseudoartrose atrófica pode estar associada à fixação excessivamente rígida, que inibe a formação do calo ósseo (Claes, 2021).

Além dos fatores mecânicos e biológicos que contribuem para a falha na consolidação, justifica-se a necessidade de intervenções terapêuticas eficazes para estimular a regeneração e o reparo ósseo. A complexidade dos mecanismos envolvidos na cicatrização, somada às limitações naturais do organismo em casos críticos, reforça a importância do desenvolvimento de abordagens que promovam a formação óssea e restabeleçam a integridade estrutural do osso lesado.

Nesse contexto, os enxertos ósseos despontam como uma das principais estratégias clínicas para o tratamento de defeitos irregulares ou críticos. Esses enxertos oferecem suporte mecânico e propriedades biológicas essenciais - como osteoindução e osteocondução - que favorecem a reparação. Conforme sua origem, podem ser classificados em autólogos ou alogênicos, cada qual apresentando vantagens específicas e limitações que influenciam sua aplicabilidade clínica.

2.2.3 Enxertos autólogos

Os enxertos ósseos autólogos são amplamente reconhecidos como o “padrão-ouro” na regeneração óssea, em razão de suas propriedades únicas de osteoindução, osteocondução e osteointegração, que possibilitam a restauração quase completa das funções mecânicas e estruturais do osso lesionado (Zhu *et al.*, 2021). Essas propriedades derivam não apenas da presença de fatores de crescimento e células osteoprogenitoras, mas também da matriz tridimensional (3D) intrínseca ao tecido, que favorece a adesão e a diferenciação celular.

Esse procedimento consiste na remoção de fragmentos ósseos do próprio paciente e sua transferência para o local da fratura, o que garante elevada histocompatibilidade e reduz substancialmente o risco de rejeição imunológica (DE Witte *et al.*, 2018). Entretanto, apesar de sua eficácia clínica, os enxertos autólogos apresentam limitações importantes, como a necessidade de cirurgia adicional para obtenção do tecido doador, o aumento do tempo operatório e a restrição quanto à quantidade de material disponível para transplante (Sheehy *et al.*, 2019).

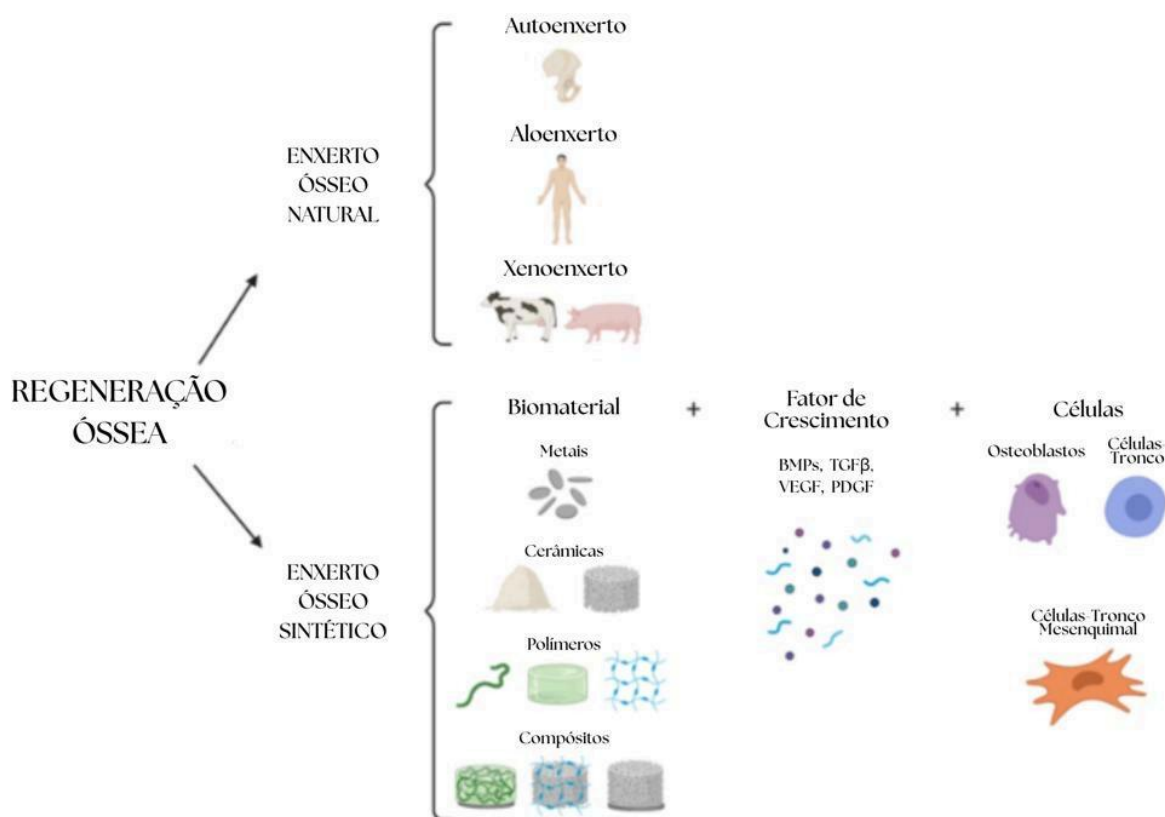
2.2.4 Enxertos alogênicos

Os enxertos alogênicos, obtidos a partir de doadores vivos ou cadáveres, representam uma alternativa viável quando não há disponibilidade de enxerto autólogo em quantidade suficiente. Esses enxertos podem apresentar propriedades osteoindutoras e osteocondutivas, embora de forma mais limitada, devido à desvitalização tecidual necessária nos processos de preparo e esterilização, o que compromete parte de sua viabilidade biológica e mecânica (Sheehy *et al.*, 2019; Ciszynski *et al.*, 2023).

As características biológicas e funcionais variam de acordo com o tipo histológico do tecido e o método de preservação empregado, podendo ser classificados como frescos, congelados ou liofilizados, e compostos por tecido esponjoso, cortical ou uma combinação de ambos. Apesar de sua disponibilidade e ampla utilização, os enxertos alogênicos apresentam maior risco de transmissão de doenças, reações imunológicas e possível rejeição (Ciszynski *et al.*, 2023).

Assim, embora esses enxertos desempenhem um papel relevante em transplantes ósseos, ainda enfrentam limitações consideráveis quanto à eficácia na regeneração e reparo ósseo, o que reforça a busca por alternativas terapêuticas mais seguras e eficientes (Figura 4).

Figura 4 - Modelos disponíveis para a regeneração e remodelamento ósseo.



Fonte: Battafarano *et al.*, 2021 (adaptado).

2.3 Engenharia Tecidual Óssea: Princípios e Estratégias

A engenharia tecidual constitui uma abordagem multidisciplinar e integrativa, que utiliza a combinação de tecnologias avançadas, fatores físico-químicos e biológicos, além de diferentes classes de biomateriais, com o objetivo de restaurar, substituir ou otimizar a função de tecidos biológicos (Abdelaziz *et al.*, 2023).

Essa estratégia tem ganhado destaque como uma alternativa promissora aos enxertos tradicionais, superando limitações associadas à disponibilidade restrita de tecido doador, ao risco imunológico e à necessidade de procedimentos cirúrgicos adicionais.

No contexto específico da regeneração óssea, a engenharia tecidual óssea consolidou-se como uma solução inovadora e em constante evolução para a reconstrução de defeitos críticos do tecido, buscando não apenas a recuperação estrutural, mas também a restauração das funções biomecânicas e fisiológicas do osso.

2.3.1 Scaffolds

Os *scaffolds* são considerados estruturas de referência que fornecem suporte à regeneração tridimensional (3D) de tecidos (Filip *et al.*, 2022). Essas estruturas biomiméticas são desenvolvidas para reproduzir, de forma funcional, as características do tecido original, proporcionando um ambiente propício à adesão, proliferação e diferenciação celular, além de favorecer a formação de um novo tecido funcionalmente integrado ao organismo (Abdelaziz *et al.*, 2023).

Para que um *scaffold* seja considerado adequado na engenharia tecidual óssea, o material precisa reunir algumas características fundamentais, como ser biodegradável, não causar rejeição no organismo (biocompatível), estimular a formação de osso (osteoindutivo), permitir o crescimento do tecido ósseo ao seu redor (osteocondutivo), ser biologicamente ativo (bioativo) e apresentar propriedades físico-químicas específicas, como nível controlado de porosidade e rugosidade (Qu *et al.*, 2019; Babilotte *et al.*, 2019).

Os *scaffolds* atuam como matriz temporária para o crescimento e a diferenciação celular, mimetizando a matriz extracelular (MEC) tanto em sua morfologia quanto em seus fatores bioquímicos. Dessa forma, fornecem suporte mecânico e facilitam os processos de adesão, proliferação e diferenciação celular (Farazin & Darghiasi, 2025; Morwood *et al.*, 2023).

Além disso, é necessário que os *scaffolds* incentivem a vascularização e se desintegrem em uma taxa compatível com a formação do tecido ósseo recém-gerado, sendo eventualmente substituídos pelo osso natural (Darghiasi *et al.*, 2024).

Por fim, os polímeros aplicados na engenharia tecidual óssea podem ser classificados em três categorias principais: polímeros sintéticos, polímeros naturais e *scaffolds* compósitos (Al-Allaq *et al.*, 2024).

2.3.1.1 Polímeros sintéticos

Os polímeros sintéticos têm sido amplamente empregados na fabricação de scaffolds devido à possibilidade de modulação de suas propriedades mecânicas, físicas, químicas e de degradação durante o processo de produção (Shao *et al.*, 2023; Nemati *et al.*, 2019). Essa versatilidade na síntese e no processamento permite a obtenção de materiais com características ajustáveis de acordo com a aplicação desejada em engenharia tecidual.

Entre os mais utilizados, destacam-se os poliésteres e seus copolímeros, como o poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), o poli(ácido glicólico) (PGA), a policaprolactona (PCL) e o poli(ácido L-láctico) (PLLA). Esses polímeros são amplamente reconhecidos por sua elevada biocompatibilidade, baixa imunogenicidade e potencial de degradação controlável (Donnaloja *et al.*, 2020; Collins *et al.*, 2021; Schulze *et al.*, 2023).

No entanto, apesar das vantagens relacionadas à resistência mecânica e estabilidade inicial, esses polímeros apresentam limitações importantes. Sua característica hidrofóbica intrínseca pode dificultar a adesão e a proliferação celular, exigindo modificações de superfície ou a incorporação de biomoléculas bioativas para otimizar a integração celular (Khouri *et al.*, 2024). Além disso, os produtos de degradação ácida, especialmente no caso de PLGA, PGA e PLA, podem induzir um microambiente acidótico local, afetando negativamente o metabolismo celular e comprometendo a regeneração tecidual (Farjaminejad *et al.*, 2024; Farazin & Darghiasi, 2025).

Essas limitações têm impulsionado o desenvolvimento de estratégias híbridas, como a associação de polímeros sintéticos com materiais naturais ou cerâmicos, visando não apenas superar os desafios citados, mas também potencializar propriedades osteocondutivas e osteoindutivas, ampliando seu uso em engenharia tecidual óssea (Donate *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2021).

2.3.1.2 Polímeros naturais

Os polímeros naturais têm ganhado destaque na engenharia tecidual devido à sua excelente biocompatibilidade, bioatividade intrínseca e semelhança estrutural com a matriz extracelular (MEC) dos tecidos biológicos (Filippi *et al.*, 2020). Essas características fazem com que sejam considerados materiais promissores na regeneração tecidual, principalmente em aplicações onde a integração biológica é de suma importância.

Por serem derivados de fontes biológicas, como animais, vegetais ou microrganismos, esses materiais apresentam maior afinidade celular e menor risco de toxicidade ou resposta imune indesejada. Entre os mais utilizados estão a gelatina, colágeno, alginato, quitosana, fibrina e ácido hialurônico, compostos que promovem adesão, proliferação e diferenciação celular, além de estimular a regeneração óssea (Guo *et al.*, 2021; Farjaminejad *et al.*, 2024; Rico-Llhanos *et al.*, 2021). Por exemplo, a quitosana tem sido amplamente estudada devido à sua ação antimicrobiana e potencial de mineralização, enquanto o colágeno, principal componente da MEC, é valorizado por mimetizar a estrutura natural do tecido ósseo e promover adesão e proliferação celular (Tao *et al.*, 2020; Kai-Ling *et al.*, 2021; Guillén-Carvajal *et al.*, 2023).

Apesar de suas propriedades biológicas vantajosas, os polímeros naturais costumam apresentar limitações quanto à resistência mecânica, e sua degradação pode ser difícil de controlar, o que compromete sua aplicação isolada em defeitos ósseos de grande porte (Zhang *et al.*, 2023). Essas restrições explicam por que, na prática clínica, raramente são utilizados de forma isolada.

Para superar essas limitações, os polímeros naturais podem ser combinados com polímeros sintéticos ou materiais cerâmicos, resultando em scaffolds híbridos capazes de otimizar a performance estrutural e biológica (Feng *et al.*, 2023). Esse tipo de associação é particularmente relevante na engenharia tecidual óssea, pois permite aliar a bioatividade dos polímeros naturais à resistência mecânica e propriedades osteogênicas conferidas por outros materiais.

Além disso, os scaffolds à base de polímeros naturais podem contribuir para a formação óssea no organismo por meio da diferenciação de células em linhagem osteogênica ou pela liberação de fatores que atuam como sinais biológicos (Abdelaziz *et al.*, 2023). Dessa forma, não funcionam apenas como suportes

estruturais, mas também como materiais bioativos capazes de modular o microambiente celular (Tylek *et al.*, 2020).

Estudos na área frequentemente utilizam células com aplicação consolidada na engenharia de tecidos, como células-tronco adultas (retiradas da medula óssea, gordura e sangue), células-tronco embrionárias, células-tronco induzidas (iPSCs) e células geneticamente modificadas. A integração entre polímeros naturais e células-tronco representa, portanto, uma das estratégias mais promissoras para a ampliação nas pesquisas relacionadas à regeneração óssea.

2.3.2 Células

As células desempenham um papel central no processo de regeneração óssea, atuando não apenas como elementos formadores de tecido, mas também como reguladores do microambiente celular, em combinação com os scaffolds.

Dentre as principais células utilizadas em estratégias de engenharia tecidual, destacam-se as células-tronco mesenquimais (CTMs), com ênfase naquelas derivadas da polpa dentária, como as células-tronco da polpa dentária adulta (DPSCs) e as células-tronco de dentes decíduos esfoliados (SHED) (Namjoynik *et al.*, 2023). A escolha por células derivadas da polpa dentária deve-se ao seu fácil acesso, menor invasividade no processo de coleta e ao elevado potencial de diferenciação celular (Lee *et al.*, 2019).

As células SHED são amplamente utilizadas na regeneração óssea por apresentarem características de autorrenovação e capacidade de se diferenciar em diversas linhagens celulares, como osteoblastos, condrócitos e adipócitos (Yazdanpanah *et al.*, 2022; Kargozar *et al.*, 2019). Além disso, apresentam alta taxa de proliferação, bom potencial osteogênico e propriedades imunomodulatórias, características essenciais para o sucesso da regeneração (Yamakawa *et al.*, 2020).

Os scaffolds desempenham papel essencial ao fornecerem suporte mecânico e estrutural que favorece a incorporação e manutenção das células-tronco, etapa indispensável para a regeneração tecidual. Nesse microambiente, as SHED exibem notável habilidade de aderência, deslocamento, multiplicação celular e especialização, favorecendo não apenas a formação de tecido ósseo, mas também a modulação de respostas inflamatórias locais (Erkal & Pekozer, 2020).

Assim, a seleção adequada da fonte celular, associada ao scaffold apropriado e à presença de fatores bioativos, configura-se como um dos pilares fundamentais para o sucesso das estratégias de engenharia tecidual aplicadas à regeneração óssea. Esses três fatores – células, scaffolds e fatores bioativos – devem ser equilibrados em conjunto para que o processo de regeneração seja eficaz e funcional.

2.4 Hidrogéis como Scaffolds para a Engenharia de Tecidos

Os hidrogéis são redes tridimensionais formadas por polímeros hidrofílicos, que vêm ganhando destaque significativo na engenharia de tecidos ósseos, principalmente por sua elevada capacidade de absorção de água sem perda de sua integridade estrutural, além de apresentarem propriedades físico-químicas que mimetizam a matriz extracelular (MEC) dos tecidos biológicos (Hwang & Lee, 2023). Esses biomateriais oferecem vantagens importantes, como a habilidade de adaptar-se às características específicas do tecido lesionado e ao estágio do processo de cicatrização (Tavakoli & Klar, 2020).

Os hidrogéis atendem a diversos requisitos considerados essenciais para o desenvolvimento de curativos avançados (Vasile *et al.*, 2020). Sua estrutura altamente porosa e hidratada proporciona um ambiente propício para a adesão, proliferação e diferenciação de células-tronco, permitindo ainda a difusão eficiente de nutrientes, gases e metabólitos. Esses sistemas também favorecem a absorção de exsudatos, o controle da morfologia celular e a comunicação entre o tecido neoformado e o tecido hospedeiro (Vasile *et al.*, 2020; Yue *et al.*, 2020; Sood *et al.*, 2022) (Figura 5).

Adicionalmente, os hidrogéis podem apresentar propriedades antibacterianas, facilidade de remoção da superfície da ferida, simplicidade no manuseio clínico, além de características viscoelásticas adequadas. Eles também apresentam resistência mecânica, incluindo resistência à tração e módulo de armazenamento compatíveis com o tecido biológico. Outro ponto favorável é a possibilidade de esterilização por métodos simples e eficazes (Vasile *et al.*, 2020; Brumberg *et al.*, 2021). Essas características tornam os hidrogéis especialmente adequados para a formulação de sistemas capazes de criar um microambiente favorável à regeneração óssea (Abdollahiyan *et al.*, 2020).

Figura 5 - Propriedades essenciais para a aplicação de scaffolds na engenharia de tecido ósseo.



Fonte: Sukpaita *et al.*, 2021 (adaptado).

2.4.1 Quitosana

A quitosana (QTS) é um biopolímero considerado promissor para aplicações na engenharia de tecido, principalmente por sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, apresentando grupos funcionais ativos, como grupos amino e hidroxila, devido à sua composição estrutural (Sabourian *et al.*, 2020). É um polímero que pode ser utilizado em diversas formas de aplicação em processos industriais e no cotidiano, como filmes, nanomateriais e hidrogéis (Dubey *et al.*, 2022).

A quitosana oferece inúmeras vantagens para a aplicabilidade na medicina regenerativa, incluindo baixo custo, fácil obtenção na natureza, e a interação com moléculas hidrofílicas por meio de ligações de hidrogênio (Tian & Liu, 2023). Adicionalmente, a quitosana apresenta propriedades antibacterianas e boa capacidade de adesão celular que dependem de fatores importantes, como grau de desacetilação, cristalinidade, grau de modificação e peso molecular (Nguyen *et al.*, 2023; Tian & Liu, 2023).

Embora a QTS induza uma resposta inflamatória após a implantação, esta resposta é geralmente leve e transitória. Tal reação é considerada pró-regenerativa, pois contribui para a ativação de vias celulares relacionadas à cicatrização e ao remodelamento tecidual. Este comportamento faz da QTS uma plataforma valiosa para o desenvolvimento de scaffolds bioativos.

Entretanto, apesar das vantagens biológicas, a principal limitação da quitosana permanece sendo sua baixa resistência mecânica, especialmente em meio úmido. Essa limitação compromete seu uso isolado em aplicações que exigem suporte estrutural significativo, como no reparo ósseo. Assim, torna-se necessário o desenvolvimento de compósitos com reforços poliméricos e/ou cerâmicos para superar essas deficiências, tema abordado na seção seguinte.

2.5 Nanocompósitos Híbridos: Estratégias para Funcionalização de Hidrogéis

Conforme mencionado anteriormente, os hidrogéis constituídos somente por quitosana apresentam limitações mecânicas, sendo necessário o uso de materiais complementares para superar essa restrição. Com isso, a incorporação de nanomateriais na produção de hidrogéis tornou-se uma estratégia de interesse para o desenvolvimento de scaffolds bioativos com propriedades mecânicas e biológicas otimizadas (Janmohammadi *et al.*, 2022).

No presente trabalho, a associação de nanofibras de celulose (NFCs) e partículas cerâmicas piezoelétricas foi explorada com o intuito de combinar reforço estrutural e estímulo bioelétrico em um único compósito. A seguir, discute-se a fundamentação científica para a escolha desses nanomateriais, suas propriedades-chave e os mecanismos envolvidos na modulação da resposta celular e tecidual.

2.5.1 Reforço Estrutural com Nanocelulose

A nanocelulose é um nanomaterial natural presente na parede celular de plantas que apresenta excelentes propriedades mecânicas, além de elevada biodegradabilidade, tornando-a foco de estudos para aplicação como reforço estrutural em hidrogéis (Zhang *et al.*, 2025). Dentre os tipos de nanocelulose, destacam-se as nanofibras de celulose (NFCs), que podem ser extraídas mais comumente de fontes vegetais, como madeira ou algodão, ou através da

biossíntese bacteriana (*Acetobacter xylinum*) (Li *et al.*, 2021). Essas fibras apresentam elevada área superficial, alto módulo de elasticidade, elevado grau de cristalinidade, diâmetros na faixa nanométrica (~5–20 nm), hidrofiliabilidade e demais características que as tornam fortes candidatas ao reforço de matrizes poliméricas (Guan *et al.*, 2021; Guan *et al.*, 2020).

A incorporação desse material em um hidrogel polimérico forma uma estrutura 3D e uma malha interligada que facilita a propagação uniforme da tensão mecânica ao longo do material, resultando em uma melhoria expressiva das propriedades mecânicas e estabilidade do hidrogel, além de apresentar boa capacidade de retenção de água, característica importante na manutenção da morfologia do hidrogel e na difusão de solutos através da rede polimérica (Yuan *et al.*, 2025; Li *et al.*, 2022).

Além disso, os hidrogéis acrescidos de nanocelulose apresentam um aumento em sua elasticidade e resistência, sendo capazes de resistir à deformação e compressão. Essas características aumentam a tenacidade do material, que absorve e dissipa a energia por meio de deformações quando submetido a forças externas, evitando o rompimento do hidrogel e o aparecimento de trincas, além de facilitar a autorreparação do material por meio da rápida reorganização de suas ligações intermoleculares (Liang *et al.*, 2024; Liu *et al.*, 2024; Shu *et al.*, 2023).

Diversos estudos têm demonstrado que a incorporação de NFCs a hidrogéis de quitosana ou outros polímeros naturais resulta em aumento significativo das propriedades mecânicas do hidrogel; um exemplo de trabalho foi realizado por Li *et al.*, que demonstraram que hidrogéis contendo QTS associado a NFCs apresentavam desempenho mecânico superior se comparados a hidrogéis constituídos somente por QTS (Li *et al.*, 2024).

Além disso, em estudos anteriores do grupo de pesquisa, também foi possível observar que a adição de NFCs a um filme de quitosana proporcionou a diferenciação osteogênica em células-tronco, sugerindo uma interação favorável entre o nanomaterial e o microambiente celular osteogênico. Assim, as NFCs de algodão apresentam potencial para uso na área biomédica, em função de sua capacidade de produção de nanocompósitos como indutores de diferenciação osteogênica aplicados à terapia celular e à regeneração tecidual (Zanetti *et al.*, 2021).

2.5.2 Estímulos Bioelétricos na Osteogênese

O osso é um tecido ativo, dinâmico e em constante remodelação, capaz de se adaptar a diferentes tipos de esforço por meio de processos celulares, biológicos e fisiológicos. A Lei de Wolff, formulada no século XIX, explica que o osso se remodela conforme a pressão ou força que recebe. Segundo esse princípio, áreas do osso que são pouco utilizadas ou submetidas a baixa carga tendem a ficar mais frágeis, aumentando o risco de fraturas. Por outro lado, regiões sujeitas a maior esforço e pressão tornam-se progressivamente mais resistentes e densas ao longo do tempo (Giorgio *et al.*, 2023).

Dentre os mecanismos envolvidos no processo de regeneração óssea, destaca-se a piezoelectricidade, fenômeno no qual certos materiais, como a matriz colágena do osso, geram cargas elétricas locais quando submetidos a deformações mecânicas ou à pressão (Yang *et al.*, 2022). Esses sinais elétricos atuam como estímulos bioelétricos que regulam o comportamento celular, promovendo a diferenciação osteogênica, a mineralização da matriz, a remodelação óssea e a cicatrização de fraturas (Kapat *et al.*, 2020; Samadi *et al.*, 2022). Nesse contexto, o desenvolvimento de biomateriais capazes de gerar ou reforçar esses sinais elétricos naturais configura-se como uma estratégia promissora para a engenharia de tecidos. Entre os materiais piezoelétricos, o titanato de bário (BaTiO_3) se destaca por seu elevado desempenho na adesão e proliferação celular (Tandon, Blaker & Cartmell, 2018).

A dispersão de nanopartículas de titanato de bário em hidrogéis ou matrizes poliméricas atua como um condutor adicional para a transmissão de elétrons, aumentando o desempenho elétrico do compósito hidrogel-polímero (Hou *et al.*, 2025). Além disso, essas nanopartículas podem gerar sinais elétricos que regulam o comportamento de macrófagos, influenciando sua migração, atividade fagocítica e produção de citocinas inflamatórias (Kong *et al.*, 2021).

Desde a descoberta das propriedades bioelétricas do osso, terapias de eletroestimulação clínica têm demonstrado favorecer a cicatrização óssea. O estudo de Mobini *et al.* evidenciou o efeito positivo da eletroestimulação na proliferação, migração e diferenciação de células ósseas, incluindo células-tronco mesenquimais e osteoblastos (Mobini *et al.*, 2017).

Apesar de as cerâmicas piezoelétricas apresentarem elevado potencial terapêutico, é importante compreender a resposta imunológica provocada por

nanopartículas cerâmicas em sistemas biológicos, considerando que o uso desses materiais na medicina regenerativa ainda é relativamente recente (Marino, Bargeró & Ciofani, 2024). Estudos *in vivo* que comprovem ou reforcem a biocompatibilidade, a segurança a longo prazo, a capacidade de degradação e o perfil de biodistribuição dos nanomateriais piezoelétricos são necessários, uma vez que reações imunes podem desencadear processos inflamatórios, quadros de hipersensibilidade, ativação da produção de mediadores pró-inflamatórios pelas células ou respostas autoimunes induzidas pelas nanopartículas. Além disso, a regulação da resposta imune pode influenciar de maneira expressiva a eficácia dessa estratégia terapêutica, impactando diretamente a formação óssea e a integração do biomaterial aos tecidos (Xuan *et al.*, 2023; Marino, Bargeró & Ciofani, 2024).

2.6 A Resposta do Hospedeiro a Biomateriais

2.6.1 Inflamação Aguda vs. Crônica na Interface Material-Tecido

Apesar dos efeitos benéficos associados à aplicação de nanomateriais na medicina, a interação das nanopartículas (NPs) com o organismo pode gerar respostas adversas. Entre os principais fatores que influenciam a resposta biológica a esses materiais estão: tamanho, formato, área superficial, dispersibilidade e composição química das partículas (Xuan *et al.*, 2023; Carnovale *et al.*, 2019).

A inflamação é um mecanismo de defesa do sistema imunológico, desencadeado por estímulos nocivos, como patógenos, infecções, substâncias tóxicas ou lesões teciduais, com o objetivo de conter o dano e restabelecer a homeostase (Klonowska *et al.*, 2018). Os sinais clássicos de inflamação incluem desconforto, calor, vermelhidão, edema e, frequentemente, perda da função tecidual (Li *et al.*, 2023). Entre os principais eventos do processo inflamatório estão o acúmulo de leucócitos, alterações na permeabilidade vascular e a liberação de mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas (Li *et al.*, 2022). Após um dano ou intervenção tecidual, essas respostas são mediadas por padrões moleculares associados a dano (DAMPs) ou a patógenos (PAMPs) (Huber-Lang, Lambris & Ward, 2018).

O microambiente inflamatório pode evoluir de maneira sequencial em duas fases principais para restaurar a arquitetura tecidual: a fase aguda pró-inflamatória, que surge imediatamente após a lesão, e a fase crônica, que pode perdurar por

semanas ou meses caso a inflamação inicial não seja adequadamente resolvida (Pahwa, Goyal & Jialal, 2023; Mata *et al.*, 2021). A distinção entre essas fases é fundamental, pois define se o biomaterial será integrado ao tecido ou desencadeará uma possível resposta de rejeição.

2.6.1.1 Inflamação aguda pró-inflamatória

A fase aguda inflamatória representa uma resposta imediata à introdução de um biomaterial, visando restabelecer a homeostase do organismo. Essa etapa é marcada pelo recrutamento de células de defesa, como macrófagos e neutrófilos, pelo sistema imune inato, desencadeando a cascata inflamatória (Mata *et al.*, 2021). Durante esse período, essas células removem detritos celulares por fagocitose e promovem a limpeza do microambiente da lesão. Além disso, essa resposta inicial favorece a infiltração de células imunes e a liberação de citocinas e fatores de crescimento, essenciais para o reparo tecidual (Strang *et al.*, 2020; Julier *et al.*, 2017).

Os monócitos presentes nesse microambiente diferenciam-se em macrófagos M1 pró-inflamatórios, ativados por quimiocinas como o interferon gama (IFN- γ). Estudos em modelos murinos de fratura indicam que a população desses macrófagos aumenta nos primeiros sete dias após a lesão (McCauley *et al.*, 2020). Eles contribuem para um microambiente pró-inflamatório, enriquecido com citocinas como interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Huang *et al.*, 2017).

Em seguida, ocorre a transição da resposta imune pró-inflamatória para uma resposta pró-regenerativa, reduzindo a inflamação e iniciando o remodelamento tecidual (Raziyeva *et al.*, 2021). No contexto da cicatrização óssea, estudos mostram que a resolução da inflamação é mediada principalmente por macrófagos M2 alternadamente ativados, células T reguladoras (Treg) e linfócitos T helper 2 (Th2), sendo os M2 os mais estudados (Chen *et al.*, 2021; Schlundt *et al.*, 2019). Esse equilíbrio dinâmico entre macrófagos M1 e M2 é crucial para a integração do biomaterial, pois a persistência do perfil M1 pode comprometer a regeneração tecidual.

Quando a inflamação aguda não é adequadamente controlada ou ocorre de forma excessiva, pode evoluir para um estado de inflamação crônica e sistêmica,

prejudicando a regeneração tecidual e favorecendo o desenvolvimento de fibrose e encapsulamento do material.

2.6.1.2 Inflamação crônica

A inflamação crônica caracteriza-se pela presença prolongada de macrófagos, neutrófilos e monócitos no sistema biológico por semanas ou até meses após o evento inicial de lesão (Raziyeva *et al.*, 2021). Diferente da inflamação aguda, que é transitória e voltada à limpeza inicial do tecido lesionado, a presença contínua de células pró-inflamatórias mantém um microambiente inflamatório persistentemente ativo, dificultando a regeneração, comprometendo a consolidação de fraturas e atrasando o processo de cicatrização (Newman, Shih & Varghese, 2021). Além disso, a inflamação crônica frequentemente leva à deposição exacerbada de matriz extracelular e ao desenvolvimento de fibrose.

Traumas graves, como fraturas complexas isoladas ou politraumas, desencadeiam respostas inflamatórias agudas exacerbadas que podem progredir para um perfil crônico caso não sejam resolvidas adequadamente, comprometendo a cicatrização óssea (Karlani *et al.*, apud Newman, Shih & Varghese, 2021). De modo semelhante, condições associadas à inflamação crônica, como envelhecimento fisiológico, diabetes e artrite reumatoide, também prejudicam a consolidação de fraturas (Clark *et al.*, 2017).

Embora exista distinção entre inflamação aguda excessiva e crônica, ambas compartilham características, como elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α . Considerando que os níveis de TNF- α aumentam em diversas condições inflamatórias crônicas, bloquear sua atividade representa uma estratégia promissora para reduzir a inflamação e favorecer a regeneração tecidual. Outros mediadores inflamatórios também podem desempenhar papéis importantes na resolução da inflamação, como IL-10 e TGF- β , que apresentam funções anti-inflamatórias e imunorreguladoras, apontando para um possível direcionamento terapêutico no controle da resposta crônica.

2.7 Modelos Experimentais *in vitro* e *in vivo* para Avaliação de Biomateriais Ósseos

Dentro do campo da bioengenharia tecidual, com enfoque na engenharia de tecido ósseo, um dos grupos celulares mais amplamente utilizados nos estudos de avaliação de biomateriais são as células-tronco mesenquimais (MSCs) (Mengning *et al.*, 2023). Esse conjunto de células é caracterizado como multipotente, com capacidade de autorrenovação e diferenciação em múltiplas linhagens, além de poderem ser moduladas por células do sistema imune para se deslocarem e se especializarem. Adicionalmente, as MSCs exibem propriedades imunorreguladoras relevantes, influenciando o equilíbrio entre inflamação e regeneração, aspecto crucial na integração de biomateriais (Liu *et al.*, 2018).

2.7.1 Células-tronco de Dentes Decíduos Esfoliados (SHEDs)

Um tipo de célula-tronco mesenquimal são as células-tronco de dentes decíduos humanos esfoliados (SHEDs), que representam uma fonte promissora, de fácil obtenção e não invasiva de células-tronco para regeneração tecidual, apresentando mínimo risco ao organismo, elevada plasticidade e expressiva capacidade regenerativa (Lee *et al.*, 2019; Taguchi *et al.*, 2019). Esse tipo celular apresenta boa capacidade de produzir e liberar proteínas, característica que favorece a criação de um ambiente propício à reparação e regeneração do tecido (Chen *et al.*, 2022). Além disso, outro fator que corrobora para o desenvolvimento de um microambiente favorável ao reparo é o ácido L-ascórbico, que estimula a produção e o depósito da matriz extracelular (ECM) e acelera a proliferação celular (Yang *et al.*, 2019; Timoty *et al.*, 2019).

A regeneração óssea utilizando células-tronco e scaffolds tem sido amplamente estudada. Um estudo realizado por Gao *et al.* (2018) demonstrou que a utilização de células SHED em um modelo murino de periodontite promoveu a regeneração óssea, além de suprimir a resposta inflamatória e modular a resposta imune. Os autores sugeriram que os efeitos terapêuticos das SHED estavam relacionados à polarização de macrófagos M2 (Gao *et al.*, 2018). Estudos anteriores indicam que as SHED modulam o sistema imunológico ao regular a proliferação e diferenciação de células imunes e ao ajustar a expressão de mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios (Mahdavi-Jouribari *et al.*, 2023).

Além disso, pesquisas pré-clínicas mostram que essas células podem ser aplicadas em contextos de regeneração óssea e em intervenções clínicas com necessidade de enxertos, abrangendo inclusive a reparação de fraturas (Yamakawa *et al.*, 2020). Demais pesquisas demonstraram que a combinação de scaffolds com células SHED aumenta significativamente a regeneração óssea (Namjoynik *et al.*, 2023) e que esse grupo celular promove a formação de novo tecido ósseo *in vivo* ao recrutar células osteoprogenitoras (Aydin & Sahin, 2019).

Portanto, as SHEDs destacam-se como uma fonte celular altamente promissora para estratégias de engenharia tecidual óssea, não apenas pela facilidade de obtenção, mas também por seu papel imunomodulador e capacidade de interagir dinamicamente com scaffolds.

2.7.2 O Modelo de Defeito Crítico em Calvária

A utilização de modelos animais na ciência contribui para o entendimento de processos biológicos que ocorrem durante diferentes procedimentos de interesse científico e de aplicação em diversas áreas da saúde, como a testagem de fármacos, vacinas e técnicas cirúrgicas (Andersen & Winter, 2019).

A seleção da espécie varia de acordo com a finalidade e hipótese de cada estudo, levando em conta as proximidades biológicas, anatômicas, funcionais e genéticas em relação ao ser humano (Juaréz-Portilla *et al.*, 2019). Assim, os modelos animais atuam como ferramentas capazes de simular mecanismos fisiológicos e patológicos comparáveis aos que ocorrem no organismo humano (Swearengen, 2018).

Dois indicadores importantes da atividade óssea são o tamanho e a velocidade do remodelamento tecidual, que diferem de acordo com a espécie, idade, tipo de osso e região específica do tecido ósseo (Taguchi & Lopez, 2020). Outro tópico relevante para seleção de modelos animais é a capacidade de maturação óssea. Diferentemente dos humanos, mamíferos menores, como ratos e camundongos, possuem mínima remodelação óssea quando adultos (SIMMONS *et al.* apud Taguchi & Lopez, 2020).

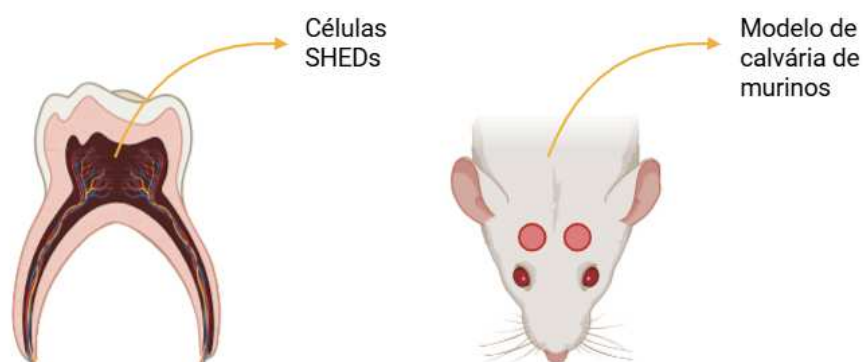
Os defeitos ósseos são tipos incomuns de fraturas, caracterizados pela perda óssea ocasionada por trauma ou intervenção cirúrgica. Essa forma de lesão é bastante utilizada dentro de modelos animais a fim de avaliar a capacidade regenerativa de biomateriais (McGovern *et al.*, 2020). Esse tipo de defeito ósseo é

considerado mais simples de ser realizado e evita a influência do efeito compensatório do osso adjacente sobre o experimento (McGovern *et al.*, 2020). Nesse contexto, o modelo de defeito crítico é definido como aquele em que a área óssea lesada não é capaz de se regenerar espontaneamente durante a vida do animal, podendo, então, ser empregado para testes de biomateriais osteo-regenerativos.

Considerando esse tipo de intervenção, o modelo de camundongos é bastante utilizado em estudos biomédicos por serem de boa tolerância cirúrgica, alta resistência a infecções e custo relativamente baixo (Gao *et al.*, 2023). Os ossos da calvária são geralmente selecionados para a indução de um defeito ósseo por serem ossos planos, que não sustentam cargas. Por isso, não necessitam de estabilizadores após a indução da fratura, além de apresentarem ossificação intramembranosa conservada entre espécies, tornando-os adequados para a aplicação de biomateriais de preenchimento (Gao *et al.*, 2023). Para a indução de um defeito ósseo circular em calvárias de camundongos, pesquisadores optam pela utilização de uma broca estéril de baixa rotação, sem afetar a dura-máter (Salamanca *et al.*, 2018; Gao *et al.*, 2023).

Dessa forma, a associação entre modelos *in vitro*, como o uso de células SHEDs, e modelos *in vivo*, como o defeito crítico em calvária, constitui uma estratégia de suma importância para o avanço das pesquisas que envolvem a engenharia tecidual óssea (Figura 6). Assim, a integração dessas abordagens gera uma base sólida para levar os resultados experimentais à prática clínica, favorecendo o desenvolvimento de terapias regenerativas mais seguras e eficazes.

Figura 6 - Ilustração dos modelos *in vitro* e *in vivo* utilizados para o estudo.



Fonte: Elaborado pelo autor (Criado com: BioRender.com).

3 HIPÓTESE

A incorporação de NFCs e NPTBs ao hidrogel de QTS altera suas propriedades físico-químicas, influenciando porosidade, molhabilidade e comportamento de degradação. Essas alterações estruturais modulam a citocompatibilidade e a resposta osteogênica de células SHED. As diferentes formulações do hidrogel influenciam o reparo ósseo em defeitos críticos na calvária de camundongos.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar um hidrogel à base de quitosana (QTS) combinado com nanofibras de celulose (NFCs) e nanopartículas de titanato de bário (NPTB), e avaliar sua citocompatibilidade *in vitro*, assim como sua biocompatibilidade e a possibilidade de promoção do reparo ósseo em modelo animal.

4.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar os hidrogéis de QTS contendo NFCs e NPTBs quanto às propriedades físicas, químicas e morfológicas;
- Avaliar a viabilidade das células-tronco derivadas de dentes decíduos esfoliados humanos (SHEDs) cultivadas *in vitro* nos hidrogéis nanocompósitos por meio do teste de MTT e Alamar Blue;
- Investigar a biocompatibilidade e a capacidade de reparo ósseo dos hidrogéis nanocompósitos em modelo *in vivo* de defeito crítico em calvária.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Os grupos experimentais foram definidos da seguinte forma: (i) hidrogel de quitosana (QTS) puro (Grupo 1 – QTS); (ii) QTS com 100 µg/mL de nanofibras de celulose (NFC) (Grupo 2 – QTS/100NFC); (iii) QTS com 1000 µg/mL de nanopartículas de titanato de bário (NPTB) (Grupo 3 – QTS/1000NPTB); e (iv) QTS com 100 µg/mL de NFC e 1000 µg/mL de NPTB (Grupo 4 – QTS/100NFC/1000NPTB). As concentrações dos nanomateriais foram definidas com base em estudos prévios do grupo de pesquisa (AMARAL et al., 2019; ZANETTE et al., 2019, 2023). As etapas experimentais foram realizadas de forma sequencial, permitindo avaliar progressivamente as propriedades físico-químicas, biológicas e osteogênicas dos hidrogéis, como mostrado na Figura 7.

Figura 7 - Desenho experimental.



Fonte: Elaborado pela autora.

5.1 Síntese do hidrogel nanocompósito

A formulação do hidrogel foi inicialmente definida com base na solubilidade e facilidade de manuseio de diferentes concentrações de quitosana (QTS). O polímero (baixo peso molecular, grau de desacetilação 75–85%; Sigma-Aldrich, EUA; CAS 9012-76-4) foi dissolvido em solução de ácido acético a 1% (v/v) diluída em água destilada autoclavada, testando-se concentrações finais de 3% e 2% (p/v), comumente utilizadas na produção de hidrogéis de quitosana (HAMDI et al., 2020; ZHAO et al., 2021). A solução foi submetida à agitação magnética constante por 24 horas para garantir dissolução completa. A concentração de 2% apresentou maior estabilidade e facilidade de manipulação, em comparação à solução de 3%, que mostrou viscosidade excessiva, dificultando a reticulação. Por isso, essa concentração foi selecionada para o prosseguimento dos ensaios e síntese do hidrogel.

Para a preparação dos nanocompósitos, as nanofibras de celulose (NFC) foram previamente dispersas em 5 mL de água destilada sob ultrassonicação (Cristófoli, 50/60 Hz) por 20 minutos, garantindo suspensão homogênea, e incorporadas à solução de QTS, resultando em concentração final de 0,01% (p/v), equivalente a 100 µg/mL. As nanopartículas de titanato de bário (NPTB) foram dispersas da mesma forma e adicionadas à solução de QTS/NFC, alcançando concentração final de 0,1% (p/v), equivalente a 1000 µg/mL.

Como agente reticulante, utilizou-se solução aquosa de tripolifosfato de sódio (TPP) a 1% (p/v), ajustada para pH 5,3–5,48. A adição inicial sob agitação magnética resultou na formação de agregados e gel instável, possivelmente devido à rápida criação de ligações intermoleculares. A substituição da agitação magnética pela homogeneização via vórtex em tubo cônico (agitação máxima), seguida da adição lenta de TPP (1,5 mL para 3 mL de QTS/nanomateriais) e centrifugação (2500–559 ×g, 3–5 min, raio 8 cm), promoveu rede mais estável, homogênea e manipulável, evitando agregados sólidos.

Após a centrifugação, os hidrogéis foram ressuspensos em 1 mL de água destilada autoclavada para remoção de ácido acético residual e excesso de TPP, com agitação suave por 2 minutos, repetida duas vezes. Por fim, as amostras foram transferidas para placas de 24 poços (800 µL/poço) sob capela de fluxo laminar, armazenadas a –80 °C e posteriormente liofilizadas em liofilizador Alpha 1-2 LD

Plus por 24 h, preparando-as para análises morfológicas, físico-químicas e ensaios de bioatividade.

5.2 Caracterização físico-química do hidrogel nanocompósito

5.2.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram obtidas em microscópio de bancada Tabletop TM3000 (Hitachi, Japão), com ampliações de 50× a 30.000×. As análises foram realizadas com tensão de aceleração de 5 kV e 15 kV, utilizando detector de elétrons retroespalhados (BSE) com semicondutor de alta sensibilidade e bomba de vácuo turbomolecular.

As amostras liofilizadas foram fixadas diretamente sobre fita de carbono condutora, sem recobrimento metálico, para preservar suas características morfológicas originais. Os ensaios foram conduzidos no laboratório do Núcleo de Espectroscopia e Estrutura Molecular (NEEM), Departamento de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), com apoio técnico do Prof. Dr. Luiz Fernando Cappa de Oliveira.

Após a análise por MEV, duas imagens representativas de cada grupo foram selecionadas. A partir dessas imagens, 10 poros foram escolhidos aleatoriamente para medição do tamanho utilizando o software ImageJ (National Institutes of Health, EUA, versão 1.54r). Este teste permite avaliar a capacidade do hidrogel em possibilitar a troca de nutrientes entre os meios intra e extracelular, além de favorecer a infiltração celular e a formação de tecido.

5.2.2 Espectroscopia Raman e Infravermelho

Os espectros Raman foram obtidos em espectrômetro interferométrico MultiRam (Bruker, Alemanha), com laser de excitação em 1064 nm e detector de germânio refrigerado com nitrogênio líquido. As análises foram realizadas com potência mínima necessária para preservar a integridade das amostras, 1024 aquisições, resolução de 4 cm⁻¹ e faixa espectral de 4000–50 cm⁻¹. Cada amostra foi analisada em duplicata, permitindo avaliar a reprodutibilidade e eventuais alterações estruturais.

A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi conduzida em espectrômetro Vertex 70 (Bruker, Alemanha), equipado com acessório de reflectância total atenuada (ATR) com cristal de diamante. Os espectros foram

adquiridos na faixa de 4000–400 cm^{-1} , com 128 acumulações e resolução de 4 cm^{-1} . As amostras foram analisadas diretamente, sem tratamento prévio.

Todas as medidas foram realizadas no Núcleo de Espectroscopia e Estrutura Molecular (NEEM), Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), com apoio técnico do Prof. Dr. Luiz Fernando Cappa de Oliveira.

5.2.3 Ensaio de degradação

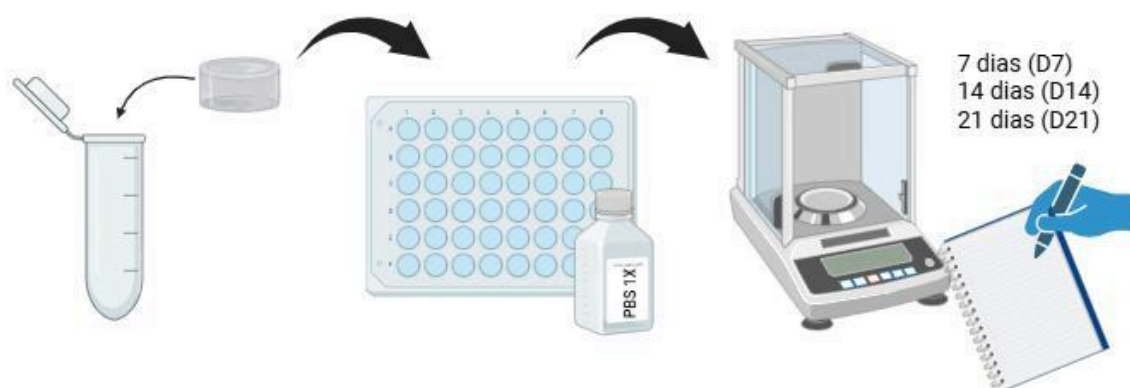
Para avaliar a degradação da matriz polimérica das amostras de hidrogéis em meio fisiológico, verificou-se a perda de peso de cada grupo experimental. As amostras foram inicialmente liofilizadas (FreeZone, Labconco, EUA) e pesadas em balança analítica (AB204-S, Mettler Toledo, EUA) para determinação do peso inicial. Em seguida, cada amostra foi imersa em 0,8 mL de tampão fosfato salino (PBS 1X, pH 7,4; Gibco, EUA) e incubada a 37 °C em estufa microbiológica (Forma Series 3 Water Jacketed CO₂ Incubator, Thermo Scientific, EUA) por até 21 dias, com renovação do PBS a cada 3 dias para evitar saturação do meio por subprodutos da degradação.

Nos tempos experimentais de 7 (D7), 14 (D14) e 21 dias (D21), as amostras foram retiradas, lavadas duas vezes com água destilada estéril, liofilizadas por 24 h e pesadas para obtenção do peso final (Figura 8). Os experimentos foram realizados em triplicata independente (n = 3).

A perda de massa foi calculada segundo a equação de Purohit et al. (2019):

$$\text{Taxa de degradação (\%)} = \frac{(\text{peso inicial} - \text{peso final})}{\text{peso inicial}} \times 100$$

Figura 8 – Fluxograma esquemático representativo do ensaio de degradação in vitro. As amostras liofilizadas foram pesadas, hidratadas em PBS e incubadas a 37°C. Em cada período (7, 14 e 21 dias), as amostras foram lavadas em água destilada estéril, novamente liofilizadas e pesadas para a determinação da taxa de degradação.



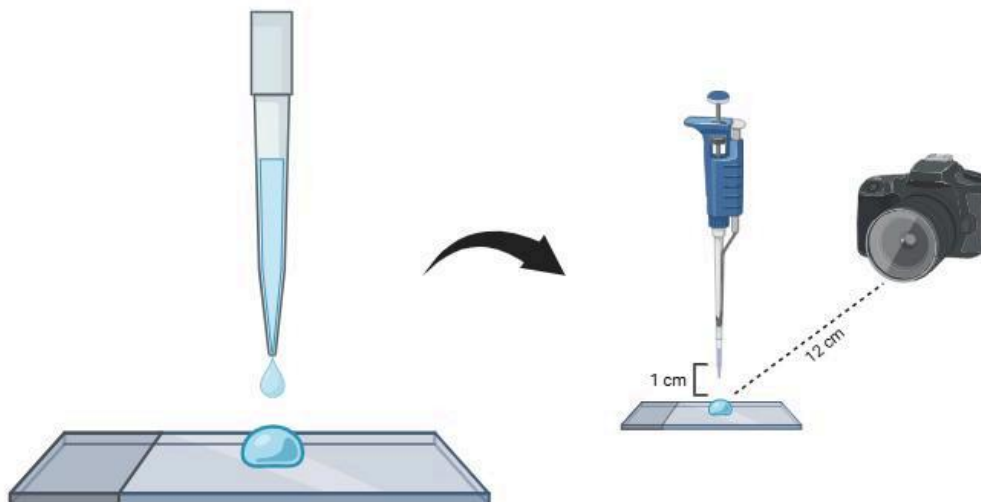
Fonte: Elaborado pela autora (Criado com BioRender.com).

5.2.4 Teste de molhabilidade

A molhabilidade das amostras foi avaliada pelo ensaio de ângulo de contato em análise estática. Os hidrogéis foram depositados sobre lâminas de vidro e secos em estufa a 60 °C por 2 h. Em seguida, uma gota de 10 µL de PBS 1X foi dispensada a partir de 1 cm de altura, utilizando micropipeta de 20 µL em suporte fixo. A imagem da gota em contato com a superfície foi capturada por câmera fotográfica (Sony Cybershot DSC-HX100V), posicionada a 12 cm de distância (Figura 9).

A captura da imagem ocorreu imediatamente após o contato da gota com a superfície, caracterizando análise estática do ângulo de contato. Para cada grupo experimental, foram preparadas três amostras independentes (n = 3), e em cada amostra o ângulo foi medido em pelo menos 10 pontos distintos, totalizando no mínimo 30 medições por grupo. A determinação do ângulo de contato foi realizada no software ImageJ (National Institutes of Health, EUA, versão 1.54r), utilizando o plugin "Contact Angle".

Figura 9 – Representação esquemática do ensaio de ângulo de contato. Uma gota de PBS 1X foi dispensada sobre a superfície do hidrogel seco, e a imagem do ângulo de contato foi capturada por uma câmera fotográfica posicionada a 12 cm de distância.



Criado com: BioRender.com (2025).

5.3 Avaliação da citocompatibilidade *in vitro*

5.3.1 MTT

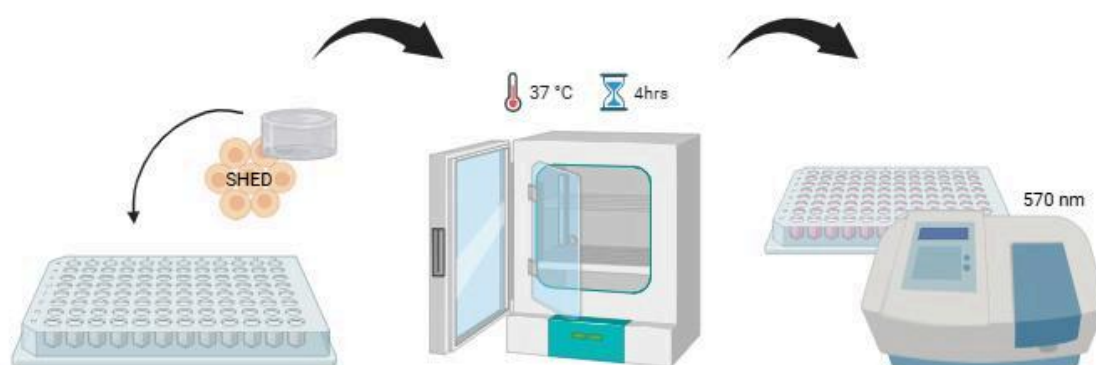
As células SHED (5×10^3) foram semeadas sobre 80 μL dos hidrogéis QTS, QTS/100NFC, QTS/1000NPTB e QTS/100NFC/1000NPTB, previamente distribuídos em placas de 96 poços contendo meio DMEM/F-12 fresco suplementado com 1% (v/v) de solução antibiótica (estreptomicina 100 $\mu\text{g/mL}$, LGC Biotecnologia, Brasil; penicilina 100 UI/mL, Sigma-Aldrich, EUA) e 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB). As células foram incubadas a 37 °C em incubadora de CO₂ (Forma Series 3 Water Jacketed CO₂ Incubator, Thermo Scientific, EUA), sob atmosfera umidificada com 5% de CO₂.

A viabilidade celular das células SHED foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio brometo; Sigma-Aldrich, EUA) nos dias 7, 14 e 21 de cultura, seguindo o protocolo do fabricante. Para cada poço, 200 μL de meio contendo 10% (v/v) da solução de MTT (5 mg/mL) foram adicionados e incubados por 4 h a 37 °C em 5% de CO₂. Em seguida, o meio foi removido e 200 μL de álcool isopropílico ácido (HCl 0,04 M em isopropanol) foram

adicionados para solubilização dos cristais de formazan, com incubação adicional de 16 h a 37 °C. As soluções resultantes foram transferidas para novas placas de 96 poços, e a absorbância foi medida a 570 nm em leitor de microplacas (Varioskan Flash Multimode Reader, Thermo Fisher Scientific, EUA), conforme ilustrado na Figura 10.

Os dados obtidos foram analisados por ANOVA a um fator, seguida de teste post-hoc de Tukey, adotando-se $p < 0,05$ como nível de significância.

Figura 10 - Ilustração representativa do ensaio de MTT.



Criado com Biorender.com (2025).

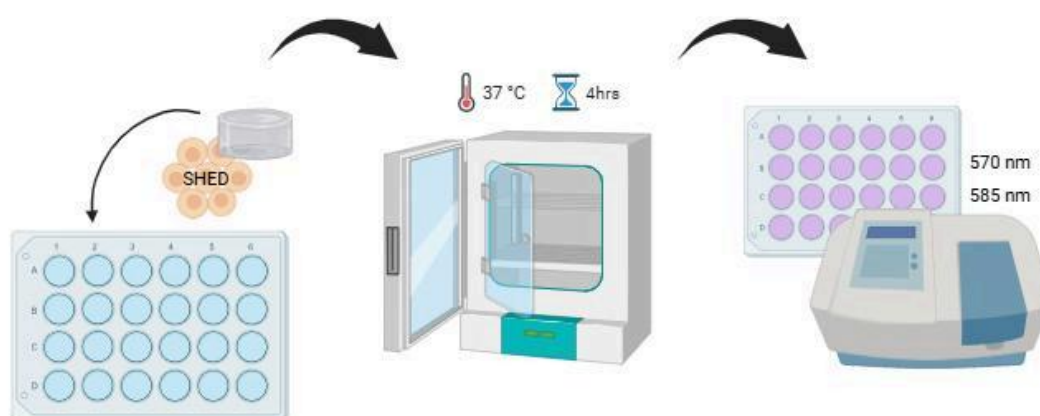
5.3.2 Alamar Blue

As células SHED (6×10^3 por poço, em placas de 24 poços) foram cultivadas sobre os hidrogéis QTS, QTS/100NFC, QTS/1000NPTB e QTS/100NFC/1000NPTB por 7, 14 e 21 dias. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio Alamar Blue (resazurina) nos diferentes tempos experimentais.

Nos dias 7, 14 e 21, o meio sobrenadante foi removido e as células lavadas duas vezes com PBS 1X. Em seguida, adicionou-se solução de Alamar Blue a 0,1% (v/v) em 800 μ L de meio DMEM/F-12 (Sigma-Aldrich), sem suplementação. As culturas foram incubadas a 37 °C, em atmosfera umidificada com 5% de CO₂, por 4 h, protegidas da luz. Células metabolicamente ativas reduziram a resazurina (azul, não fluorescente) em resorufina (rosa/vermelho, fluorescente).

Após a incubação, o sobrenadante foi transferido para placas de 96 poços, e a fluorescência foi medida em espectrofotômetro Varioskan (excitação: 570 nm; emissão: 585 nm), conforme ilustrado na Figura 11. Os dados obtidos foram analisados por ANOVA a um fator, seguida de teste post-hoc de Tukey, adotando-se $p < 0,05$ como nível de significância.

Figura 11 - Ilustração representativa do ensaio de Alamar Blue.



Criado com Biorender.com (2025).

5.3.3 Quantificação da atividade da fosfatase alcalina intracelular

A atividade da fosfatase alcalina (ALP), marcador precoce de diferenciação osteoblástica, foi avaliada nos dias 7, 14 e 21 após o cultivo das células SHED sobre os diferentes hidrogéis. Para isso, células SHED (6×10^3 células/poço) foram cultivadas sobre os hidrogéis QTS, QTS/100NFC, QTS/1000NPTB e QTS/100NFC/1000NPTB em placas de 24 poços contendo meio DMEM/F-12 (Sigma-Aldrich). Grupos controle contendo apenas células (sem hidrogel) foram incluídos.

Ao final de cada período experimental, as amostras foram lavadas duas vezes com PBS 1X. Em seguida, adicionaram-se 200 μ L da solução de BCIP/NBT recém-preparada (Thermo Scientific, EUA) a cada poço. A solução foi obtida pela adição de 66 μ L de NBT (50 mg/mL) e 33 μ L de BCIP (50 mg/mL) a 10 mL de

tampão de reação (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, pH 9,5). As placas foram incubadas por 2 h a 37 °C.

A reação foi interrompida pelo descarte do substrato, seguido da adição de 350 µL de SDS 5% (p/v) para lise celular e solubilização do precipitado de formazan roxo. As placas permaneceram em incubação a 37 °C overnight. Após homogeneização, 100 µL de cada amostra foram transferidos para placas de 96 poços, e a absorbância foi medida a 595 nm em espectrofotômetro (Varioskan Flash, Thermo Fisher Scientific, EUA).

Os dados obtidos foram analisados por ANOVA a um fator, seguida de teste post-hoc de Tukey, considerando $p < 0,05$ como nível de significância.

5.4 Avaliação da bioatividade *in vivo*

5.4.1 Animais e grupos experimentais

Foram utilizados 70 camundongos Swiss machos, com 9–10 semanas de idade, distribuídos aleatoriamente em cinco grupos experimentais ($n = 14$). Os animais foram obtidos do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ) – Núcleo de Criação de Animais de Laboratório (NUCAL) – e mantidos no Biotério Setorial de Animais Experimentais do Campus Dom Bosco (Departamento de Ciências Naturais, Bloco B, laboratório B1.11).

Durante todo o período experimental, os animais receberam ração padrão para camundongos (Nuvilab CR-1, Nuvital Nutrientes S/A, São Paulo, Brasil) e água *ad libitum*. Todos os procedimentos foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSJ, sob o protocolo nº 6822081122.

Para a realização da cirurgia, foram estabelecidos 5 grupos experimentais: 1) Salina, que não recebeu nenhum biomaterial no momento da cirurgia; 2) QTS, 3) QTS/100NFC, 4) QTS/1000NPTB e 5) QTS/100NFC/1000NPTB.

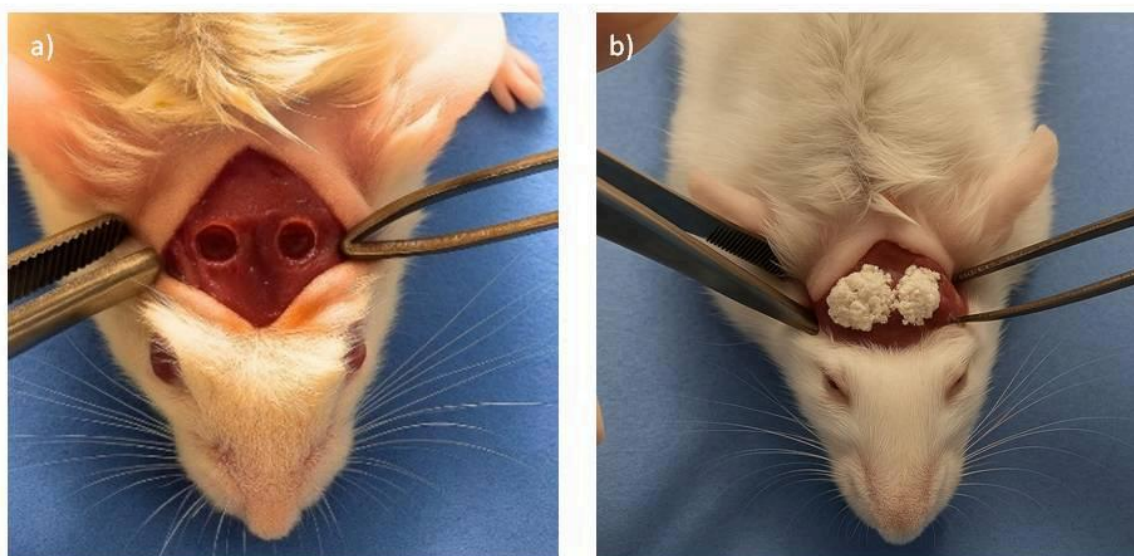
5.4.2 Procedimento cirúrgico

Para o procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados com uma associação de xilazina (1 mg/kg) e cetamina (1 mg/kg), administrada por via intraperitoneal (i.p.). Em seguida, realizou-se tricotomia e assepsia da região cirúrgica com solução de iodopovidona a 10%. Uma incisão longitudinal retilínea de aproximadamente 1,5 cm foi feita na região sagital da calvária, utilizando lâmina de bisturi estéril.

Após a exposição da calvária, foram criados dois defeitos ósseos, localizados lateralmente à sutura sagital, nos ossos parietais direito e esquerdo, utilizando broca trefina de 2 mm. Durante todo o procedimento, realizou-se irrigação contínua com soro fisiológico estéril, resfriado, para minimizar o aquecimento ósseo e manter a umidade dos tecidos (Figura 12a).

O biomaterial foi cuidadosamente posicionado nos defeitos de acordo com os grupos experimentais: QTS, QTS/100NFC, QTS/1000NPTB e QTS/100NFC/1000NPTB (Figura 12b). Um grupo adicional, no qual os defeitos foram deixados vazios, serviu como controle negativo. Posteriormente, a pele foi suturada com fio de náilon 4-0 não absorvível e realizou-se nova assepsia local com solução de iodopovidona a 10% (SAMSONRAJ et al., 2017).

Figura 12 - Procedimento cirúrgico. a) Defeitos ósseos com aproximadamente 2mm criados na calvária do camundongo Swiss; b) Biomateriais cortados e implantados no local da lesão.



Fonte: Arquivo pessoal.

Após a cirurgia, os animais receberam injeção subcutânea de enrofloxacina, diluída em solução salina de NaCl (0,2 mL/animal, proporção 1:9). Durante os três dias subsequentes, a enrofloxacina foi administrada adicionalmente na água dos bebedouros, na proporção de 5 mL para cada 0,5 L de água. Paralelamente, cada animal recebeu uma dose oral de analgésico (dipirona sódica), uma vez ao dia.

Ao final dos períodos experimentais de 28 e 56 dias, os animais foram eutanasiados por sobredose anestésica de pentobarbital sódico (150 mg/kg, i.p.), seguindo as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), garantindo um procedimento humanitário e indolor.

5.4.3 Descalcificação por EDTA

Após a eutanásia, a calvária de cinco espécimes representativos de cada grupo foi seccionada ao meio na região do tecido lesionado. Apenas uma das metades foi fixada e incluída para análises posteriores.

As calvárias foram então submetidas à descalcificação em solução de EDTA 10% (pH 7,2), trocada a cada 3 dias, por um período de cerca de 3 semanas. Após a descalcificação completa, as amostras foram lavadas em água corrente por 1 hora, garantindo a remoção total do EDTA.

5.4.4 Processamento Histológico

As calvárias foram seccionadas ao meio na região lesionada, sendo que apenas uma das metades foi fixada e incluída para análise.

O tecido foi desidratado em concentrações crescentes de álcool etílico (70% a 100%), com duração de 30 minutos em cada concentração. Em seguida, realizou-se a diafanização em três banhos de xilol (20 minutos cada), seguida da infiltração em parafina em três banhos, em plano coronal.

Após a confecção dos blocos de parafina, foram obtidos cortes coronais a partir da região central da lesão. As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) e analisadas por histomorfologia.

5.4.5 Análise morfométrica em microscopia de luz

A análise histológica foi realizada por um observador experiente, de forma cega, ou seja, sem conhecimento prévio dos grupos experimentais. As imagens foram obtidas com um microscópio óptico (Olympus BX51) acoplado ao sistema de captura MOTICAM 2000 (2,0 Mpixel). As medições foram realizadas utilizando o software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij>).

Realizou-se análise semiquantitativa de parâmetros relacionados à regeneração óssea, utilizando o sistema de escores descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Legenda do score utilizado para avaliar semi-quantitativamente os parâmetros histológicos.

Score	Mineralização	Centros de ossificação primária	Infiltrado de células inflamatórias	Infiltrado de hemácias	Neoformação de vasos sanguíneos
—	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
+	Mínima	Mínima	Mínima	Mínima	Mínima
++	Pouca	Pouca	Pouca	Pouca	Pouca
+++	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada
++++	Elevada	Elevada	Elevada	Elevada	Elevada
+++++	Defeito ósseo regenerado	Exacerbado	Exacerbado	Exacerbado	Exacerbado

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

5.5 Análises Estatísticas

Os dados foram inicialmente avaliados por meio de Análise de Variância (ANOVA). Quando os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias foram atendidos, aplicou-se o teste post hoc de comparações múltiplas de Tukey. Para dados que não atenderam aos pressupostos paramétricos, utilizou-se a ANOVA de um fator não paramétrico (teste de Kruskal-Wallis), seguida do teste post hoc de Dunn.

As análises estatísticas foram realizadas nos softwares Jamovi (The Jamovi Project) e Python, adotando-se nível de significância de $p < 0,05$. Os resultados in vivo foram analisados utilizando ANOVA one-way com teste post hoc de Tukey.

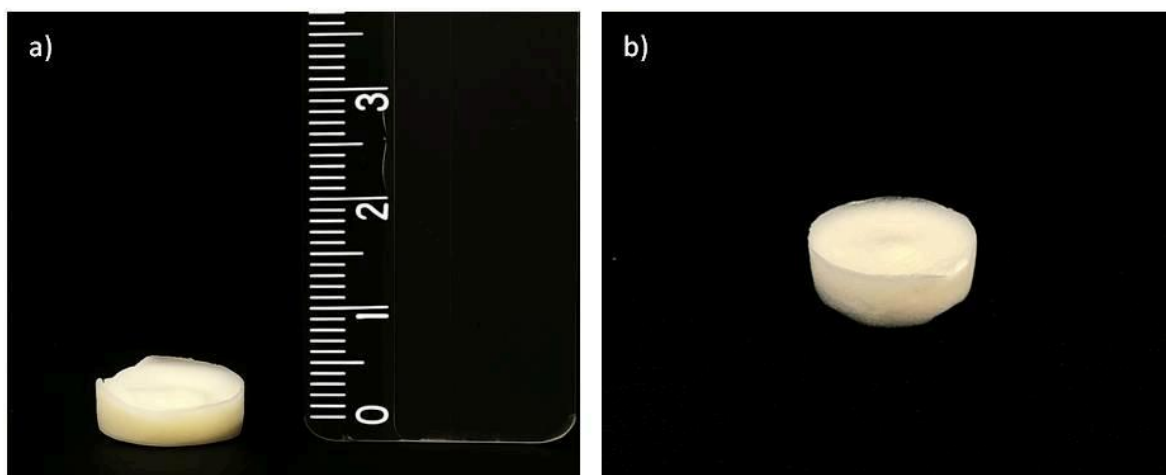
6 RESULTADOS

6.1 Desenvolvimento do hidrogel

A síntese do hidrogel de quitosana foi realizada com o objetivo de obter uma matriz tridimensional adequada para aplicações biomédicas, de fácil preparo e manipulação. Após a formação, os hidrogéis foram liofilizados para remoção completa da água, etapa essencial para a caracterização morfológica em estado seco.

As Figuras 13a e 13b apresentam os hidrogéis liofilizados, evidenciando a manutenção de sua forma e dimensões após o processo de liofilização, sugerindo estabilidade estrutural do material. Os scaffolds possuem aproximadamente 50 mm de altura (0,5 cm), fornecendo uma medida quantitativa que complementa a observação visual.

Figura 13 – Hidrogel de quitosana liofilizado. a) Vista frontal mostrando a altura do hidrogel com régua em milímetros para referência de tamanho. b) Vista superior do hidrogel para mostrar a área do material liofilizado.



Fonte: Acervo pessoal.

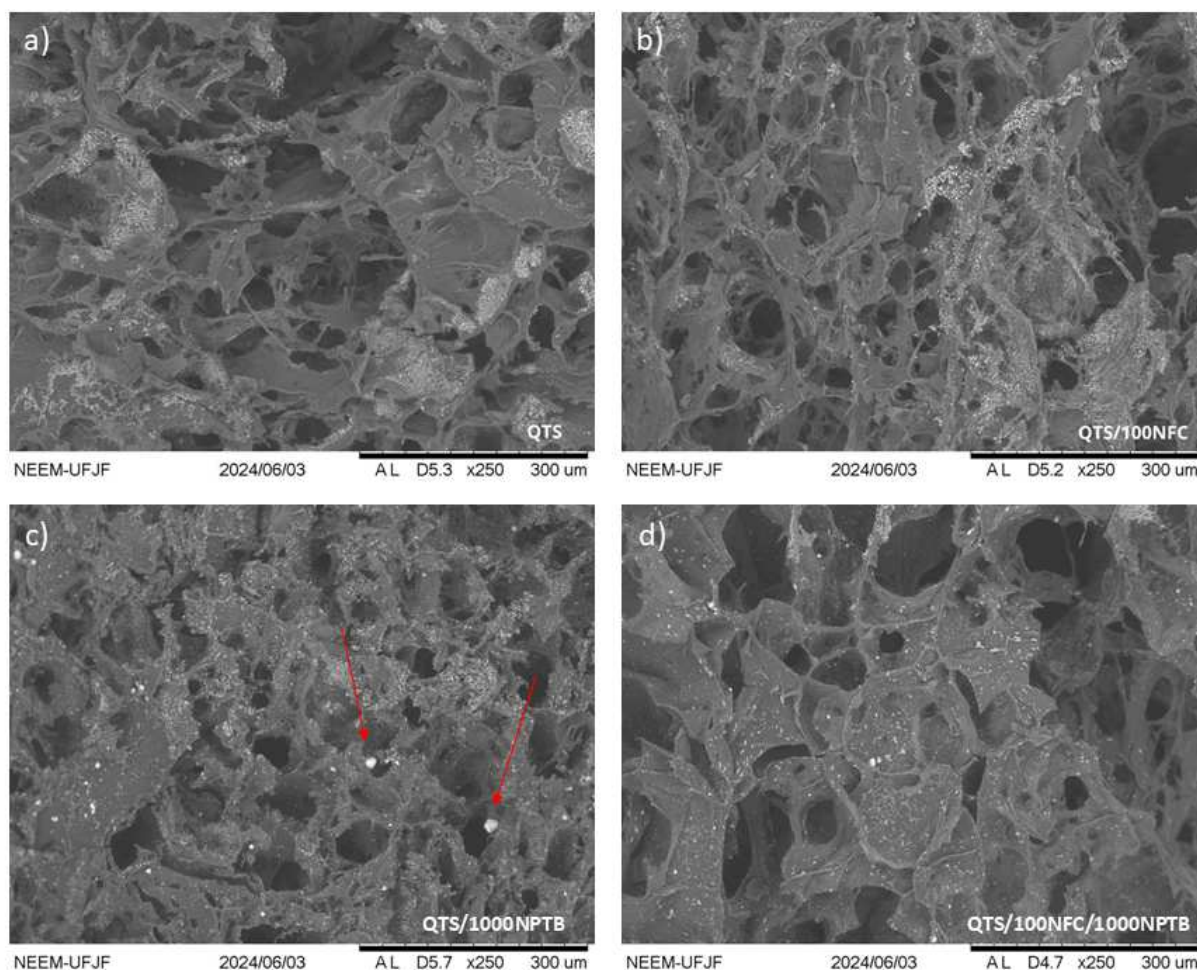
6.2 Caracterização físico-química

6.2.1 MEV

A análise morfológica dos hidrogéis foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), com o objetivo de investigar a microestrutura após a liofilização. As imagens obtidas (Figura 14) evidenciaram a presença de poros em todos os grupos, característica essencial para scaffolds em engenharia tecidual, pois favorecem a adesão e proliferação celular.

A incorporação de NFC e NPTB à matriz de quitosana resultou em uma microestrutura heterogênea, fator desejável para a proliferação celular, apresentando poros de diferentes tamanhos e formatos (Figura 14d). Na amostra QTS/1000NPTB, foram observados possíveis aglomerados de nanomateriais, destacados pelas setas vermelhas na Figura 14c.

Figura 14 – Imagens representativas obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) mostrando a microestrutura dos diferentes grupos experimentais de hidrogéis: (a) QTS (quitosana pura); (b) QTS/100NFC (quitosana com 100 µg/mL de nanofibras de celulose); (c) QTS/1000NPTB (quitosana com 1000 µg/mL de nanopartículas de titanato de bário); (d) QTS/100NFC/1000NPTB (quitosana com 100 µg/mL de nanofibras de celulose e 1000 µg/mL de nanopartículas de titanato de bário). Setas vermelhas indicam possíveis aglomerados de NPTB.

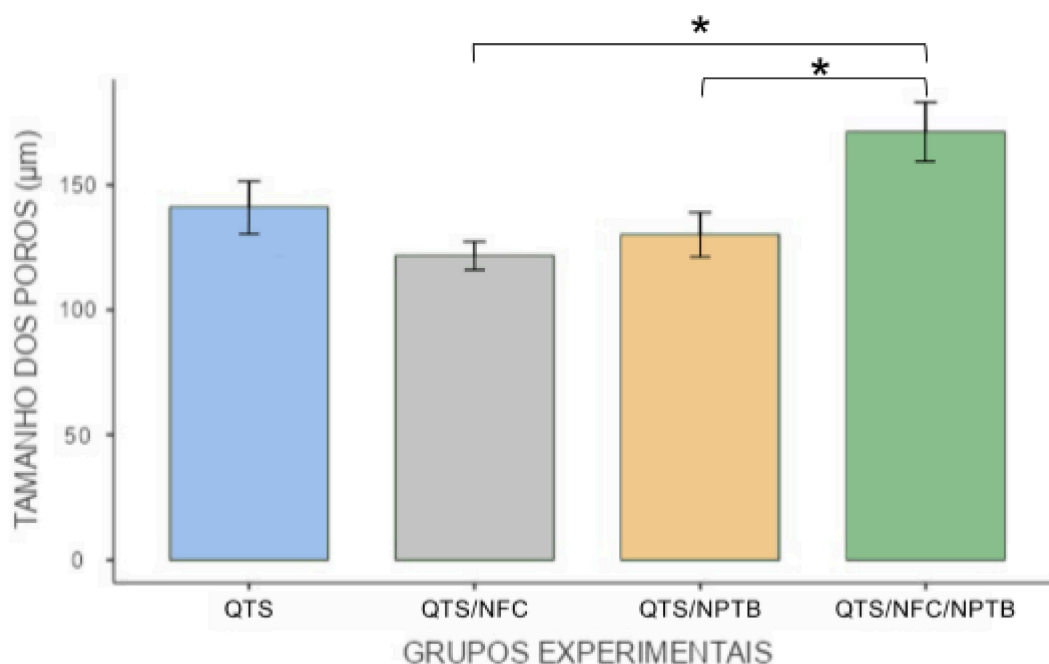


Fonte: Acervo pessoal.

O teste ANOVA indicou diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto ao tamanho médio dos poros ($p = 0,013$). Os pressupostos de normalidade ($p = 0,098$) e homogeneidade das variâncias ($p = 0,217$) foram atendidos, conforme os testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Os poros apresentaram dimensões variando entre 92,8 µm e 232,1 µm.

O teste post hoc de Tukey revelou que o grupo QTS/100NFC/1000NPTB apresentou poros significativamente maiores em comparação aos grupos QTS/100NFC ($p = 0,004$) e QTS/1000NPTB ($p = 0,021$). Não foram observadas diferenças significativas entre os demais pares de grupos ($p > 0,05$) (Figura 15).

Figura 15 – Gráfico representativo da média dos tamanhos dos poros mensurados para cada grupo experimental ($n = 10$).



Fonte: Elaborado pela autora.

6.2.2 Espectroscopias

A caracterização molecular dos hidrogéis foi realizada por FTIR e espectroscopia Raman, com o objetivo de identificar interações químicas e confirmar a incorporação dos nanomateriais na matriz de quitosana.

Na análise de FTIR (Figura 16a), foram observadas bandas características da QTS, NFC e NPTB, indicando a presença de seus respectivos grupos funcionais. A banda em 1645 cm^{-1} corresponde ao estiramento $\text{C}=\text{O}$ do grupo amina (NH_2) da QTS, enquanto as bandas em 1571 cm^{-1} e 1486 cm^{-1} foram atribuídas ao estiramento assimétrico da ligação NH_2 e à deformação axial da ligação $\text{C}-\text{H}$ da QTS, respectivamente (PROKHOROV et al., 2020). A banda em 1373 cm^{-1} pode refletir deformações $\text{O}-\text{H}$ e $\text{C}-\text{H}$ da celulose, também associada à QTS (CELEBI &

KURT, 2015), (SATYAMURTHY, & VIGNESHWARAN, 2013). Outras bandas da NFC incluíram 1253 cm^{-1} e 894 cm^{-1} , relacionadas à estrutura glicosídica e ligações C–O–C da celulose (JOHAR et al., 2012; FUENTES et al., 2023). A interação entre a QTS e o TPP foi evidenciada pela banda em 1149 cm^{-1} , atribuída ao estiramento da ligação P=O (PROKHOROV et al., 2020; ZANETTE et al., 2023). Destaca-se ainda a presença de uma banda exclusiva em 2362 cm^{-1} no grupo QTS/100NFC/1000NPTB, sugerindo interações específicas entre os três componentes ou possível aprisionamento de CO_2 (ROY et al., 2022). A banda em 1027 cm^{-1} indicou a presença da estrutura polissacarídica comum à QTS e NFC (SIERRA, 2018; JOHAR et al., 2012).

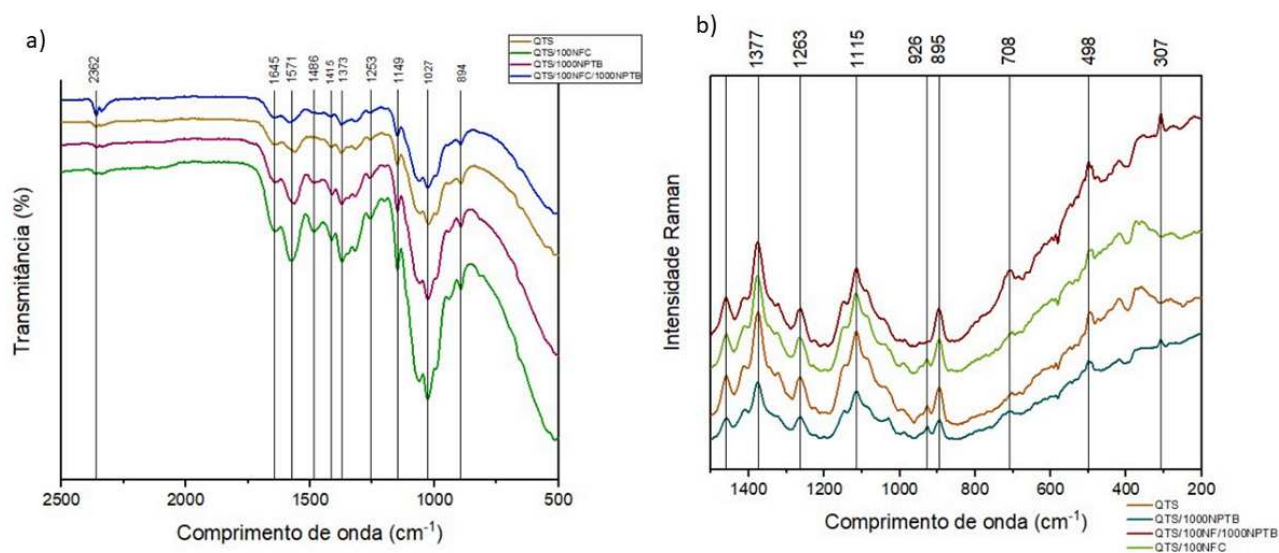
Na espectroscopia Raman (Figura 16b), todas as amostras apresentaram bandas em 1377 cm^{-1} e 1263 cm^{-1} , correspondentes às vibrações dos grupos metila ($-\text{CH}_3$) da QTS (CAI & KIM, 2010, ZHANG et al., 2011). A banda em 1115 cm^{-1} refletiu o estiramento C–O–C da estrutura glicosídica, enquanto a banda em 926 cm^{-1} apresentou maior intensidade nas amostras contendo NPTB, indicando interação com a matriz de QTS (FUENTES et al., 2023; JOHAR et al., 2012; SIERRA, 2018). A presença de NFC foi confirmada pelas bandas em 895 cm^{-1} e 708 cm^{-1} (JOHAR et al., 2012; FUENTES et al., 2023). Por fim, a banda em 307 cm^{-1} , atribuída às vibrações B1 e E (TO + LO) do NPTB, confirmou sua incorporação nas amostras QTS/1000NPTB e QTS/100NFC/1000NPTB (SIERRA, 2018, MEDRADO, et al., 2021).

Figura 16 – Análise dos grupos experimentais dos hidrogéis por FTIR (a) e Raman (b):

QTS (quitosana pura); QTS/100NFC (quitosana com 100 µg/mL de nanofibras de celulose);

QTS/1000NPTB (quitosana com 1000 µg/mL de nanopartículas de titanato de bário);

QTS/100NFC/1000NPTB (quitosana com 100 µg/mL de nanofibras de celulose e 1000 µg/mL de nanopartículas de titanato de bário).



Fonte: Elaborada pela autora.

6.2.3 Ensaio de degradação

Para determinar a perda de massa dos hidrogéis ao longo do tempo, os espécimes foram inicialmente pesados para obtenção da massa inicial seca (M_i). Em seguida, foram imersos na solução simulada conforme o protocolo experimental e retirados nos tempos previamente estabelecidos (7, 14 e 21 dias). Após a remoção, cada amostra foi cuidadosamente enxugada com papel absorvente para retirar o excesso de solução e, em seguida, novamente pesada para obtenção da massa final (M_f) correspondente a cada tempo.

A perda de massa (%) foi calculada segundo a equação:

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

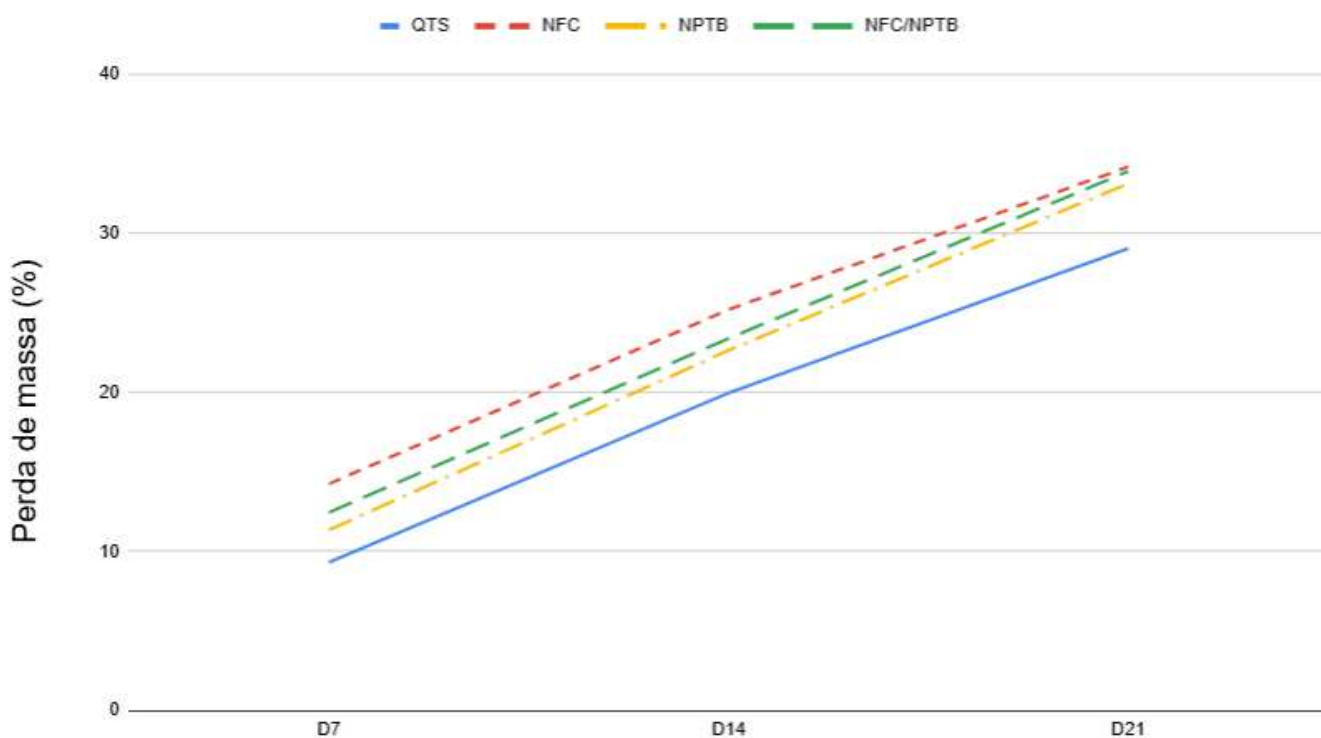
Na equação, M_i é referente à massa inicial da amostra antes da imersão e M_f é a massa após o tempo de incubação.

Para cada grupo experimental (QTS, NFC, NPTB e NFC/NPTB) e para cada tempo avaliado (7, 14 e 21 dias), as determinações foram realizadas em triplicata, e os valores obtidos foram expressos em porcentagem.

Os resultados foram organizados em tabelas e representados graficamente em gráficos de linhas no Excel, com os valores médios de perda de massa (%) no eixo Y e os diferentes grupos no eixo X. Os gráficos foram configurados para apresentar intervalos regulares no eixo Y para melhor visualização dos dados.

Figura 17 – Perda de massa (%) dos diferentes hidrogéis após incubação em PBS nos tempos de 7, 14 e 21 dias.

Taxa de degradação vs tempo.



Fonte: Elaborado pela autora.

6.2.4 Molhabilidade

Com o objetivo de investigar as propriedades hidrofílicas de superfície dos hidrogéis, foi realizado o ensaio de molhabilidade, que permite avaliar a hidrofiliabilidade do material, característica relevante para a interação do biomaterial com células e fluidos corporais. A Figura 18 apresenta imagens representativas das gotas depositadas na superfície de cada amostra, enquanto a Figura 19 exhibe o

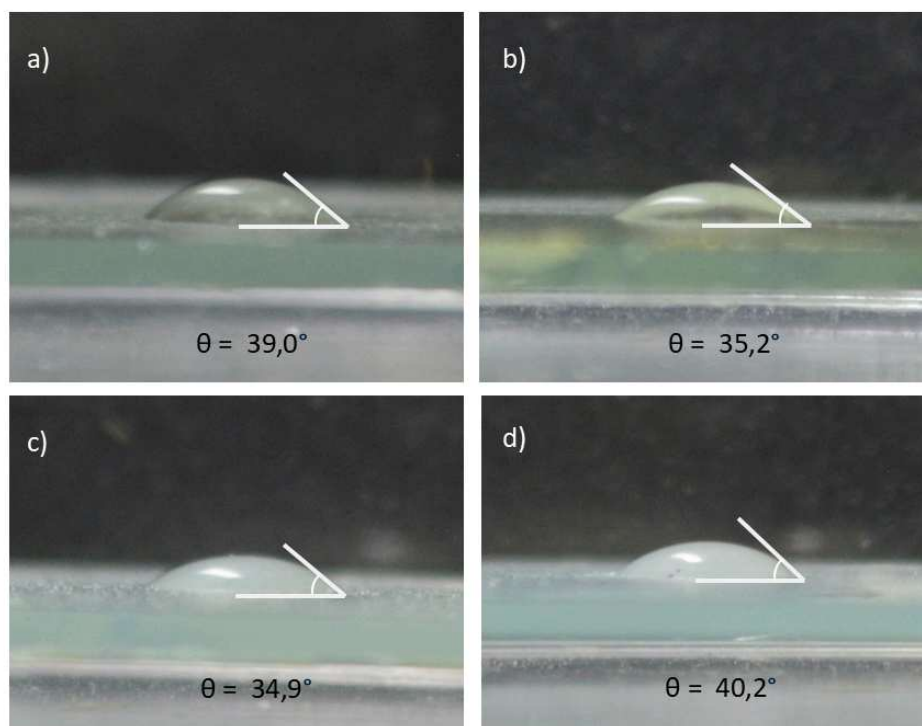
gráfico com as médias dos ângulos de contato correspondentes a cada grupo experimental.

A partir da averiguação visual do ângulo de contato, podemos observar que todos os materiais apresentaram ângulos inferiores a 90° , o que os caracteriza como hidrofílicos. A gota do grupo QTS puro apresentou forma moderadamente achatada, indicando boa molhabilidade da superfície (Figura 18a). A adição de NFC reduziu ligeiramente o ângulo de contato, sugerindo aumento da hidrofiliidade (Figura 18b). De forma semelhante, a presença de NPTB também favoreceu a molhabilidade, com o menor ângulo entre os grupos analisados (Figura 18c). A combinação de ambos os nanomateriais resultou em um leve aumento do ângulo de contato, indicando redução da molhabilidade em comparação aos grupos contendo apenas um nanomaterial (Figura 18d).

A análise quantitativa (Figura 19) revelou que a incorporação de NFC ($\theta = 35,2^\circ$) e NPTB ($\theta = 34,9^\circ$) apresentou um menor ângulo de contato em comparação com a matriz de quitosana pura ($\theta = 39,0^\circ$), embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Curiosamente, a combinação de ambos os nanomateriais no grupo QTS/NFC/NPTB ($\theta = 40,2^\circ$) resultou em uma superfície significativamente menos hidrofílica em comparação tanto com o grupo QTS/NFC ($p = 0,002$) quanto com o grupo QTS/NPTB ($p = 0,009$).

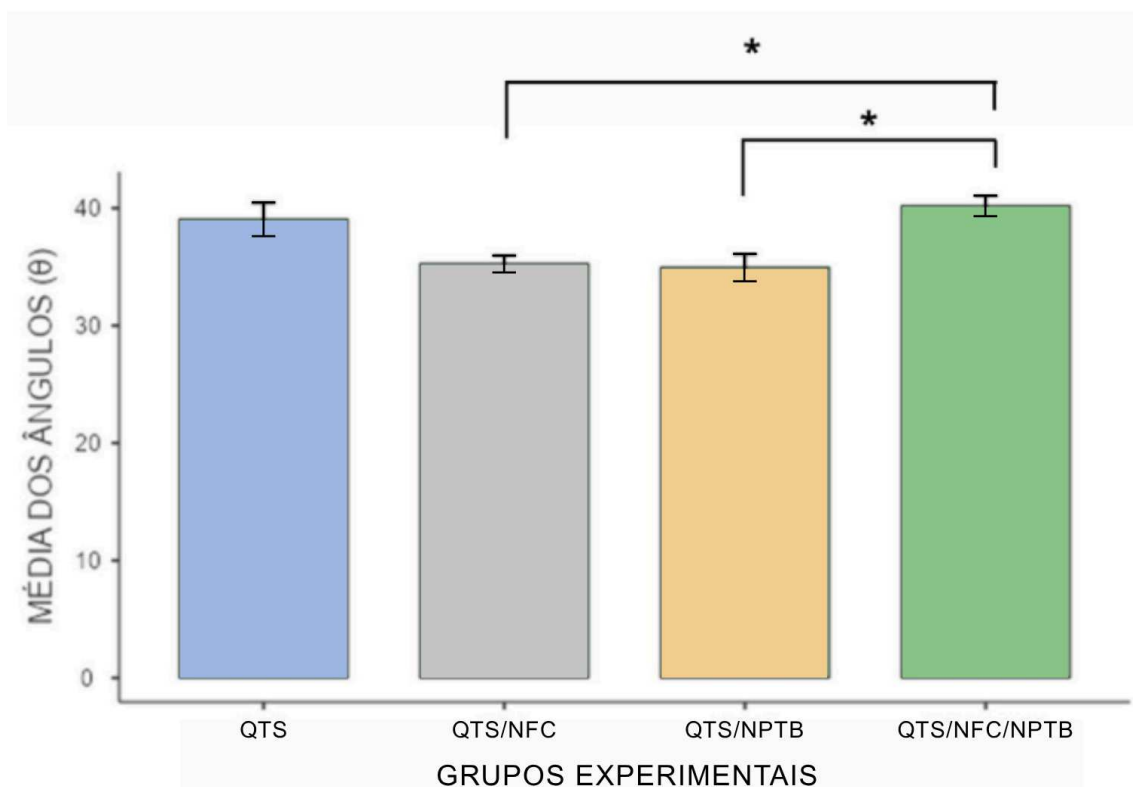
Essa análise visual inicial sugere que a incorporação dos nanomateriais à matriz de QTS altera as propriedades de hidrofiliidade do hidrogel, possivelmente refletindo modificações nas interações moleculares, aspecto importante para a adesão celular e outras aplicações biomédicas.

Figura 18 – Imagens representativas do teste de molhabilidade dos hidrogéis correspondentes aos diferentes grupos experimentais, com medição do ângulo de contato da gota de água depositada sobre as superfícies dos hidrogéis. (a) Grupo 1 – Quitosana pura (QTS); (b) Grupo 2 – Quitosana com 100 µg/mL de nanofibras de celulose (QTS/100NFC); (c) Grupo 3 – Quitosana com 1000 µg/mL de nanopartículas de titanato de bário (QTS/1000NPTB); (d) Grupo 4 – Quitosana com a combinação de 100 µg/mL de nanofibras de celulose e 1000 µg/mL de nanopartículas de titanato de bário (QTS/100NFC/1000NPTB).



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 19 – Valores médios dos ângulos de contato obtidos no ensaio de molhabilidade dos diferentes grupos experimentais de hidrogéis. QTS, QTS/NFC, QTS/NPTB e QTS/NFC/NPTB. Foram realizadas medições de 10 gotas para cada grupo. O experimento foi conduzido em triplicata, e os dados foram analisados pelo teste ANOVA. Foi realizado o teste post-hoc de Games-Howell para identificação das diferenças entre os grupos. Os resultados indicaram que há diferença estatisticamente significativa entre NFC e NFC/NPTB ($p = 0.002$), e entre NFC/NPTB e NPTB ($p = 0.009$). As demais comparações não apresentaram diferenças significativas ($p > 0.05$).



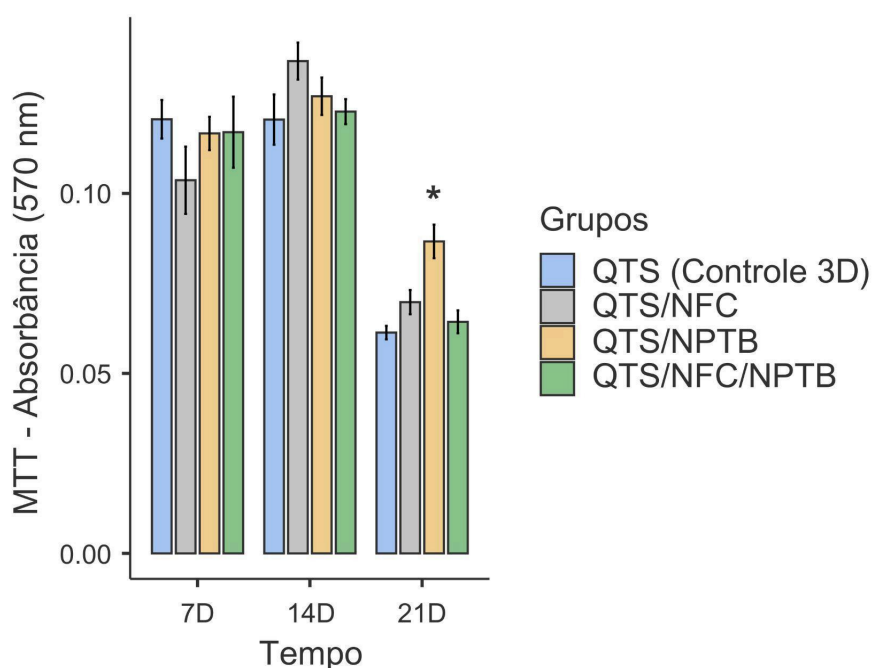
Fonte: Elaborado pela autora.

6.2.5 Citocompatibilidade *in vitro*

6.2.5.1 MTT

No dia 7, não foram observadas diferenças significativas entre o grupo controle (QTS) e os grupos contendo NFC (QTS/NFC), NPTB (QTS/NPTB) ou a combinação de ambos (QTS/NFC/NPTB), com p-valores de 0,361; 0,977 e 0,982, respectivamente. De forma semelhante, no dia 14, todos os grupos tratados mantiveram valores de viabilidade celular comparáveis ao controle ($p > 0,05$), indicando citocompatibilidade preservada nos períodos iniciais e intermediários. Após 21 dias, o grupo QTS/NPTB apresentou aumento significativo da viabilidade celular em relação ao controle ($p = 0,004$), enquanto os grupos QTS/NFC ($p = 0,350$) e QTS/NFC/NPTB ($p = 0,643$) não mostraram diferenças significativas (Figura 20).

Figura 20 - Viabilidade celular avaliada pelo ensaio de MTT em células cultivadas sobre diferentes composições de hidrogéis de quitosana (QTS) ao longo de 7, 14 e 21 dias, medida por absorvância a 570 nm. Os grupos testados foram: QTS (controle 3D), QTS/NFC, QTS/NPTB e QTS/NFC/NPTB. Os valores são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n = 9$). Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle no mesmo período experimental: * $p < 0,05$.

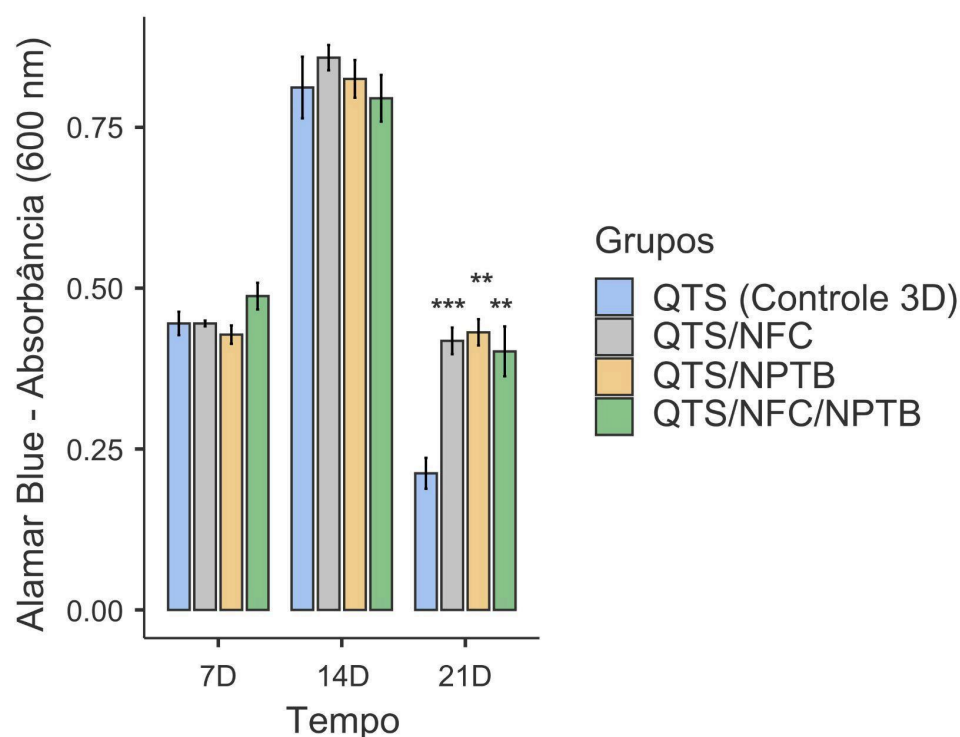


Fonte: Elaborado pela autora.

6.2.5.2 Alamar Blue

No dia 7, não foram observadas diferenças significativas entre o grupo controle (QTS) e os grupos QTS/NFC, QTS/NPTB ou QTS/NFC/NPTB, com p-valores de 1,000; 0,845 e 0,229, respectivamente. Após 14 dias, todos os grupos tratados mantiveram-se comparáveis ao controle (QTS), apresentando p-valores superiores a 0,05 (QTS/NFC: $p = 0,751$; QTS/NPTB: $p = 0,991$; QTS/NFC/NPTB: $p = 0,987$). Aos 21 dias, todos os grupos contendo nanocompósitos exibiram aumento significativo da viabilidade/metabolismo celular em relação ao controle: QTS/NFC ($p < 0,001$), QTS/NPTB ($p = 0,004$) e QTS/NFC/NPTB ($p = 0,004$) (Figura 21).

Figura 21 - Viabilidade celular avaliada pelo ensaio Alamar Blue em células cultivadas sobre diferentes composições de hidrogéis de quitosana (QTS) ao longo de 7, 14 e 21 dias, medida por absorbância a 600 nm. Os grupos testados foram: QTS (controle 3D), QTS/NFC, QTS/NPTB e QTS/NFC/NPTB. Os valores representam média $\pm$ desvio padrão ($n = X$). Diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle no mesmo período experimental: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

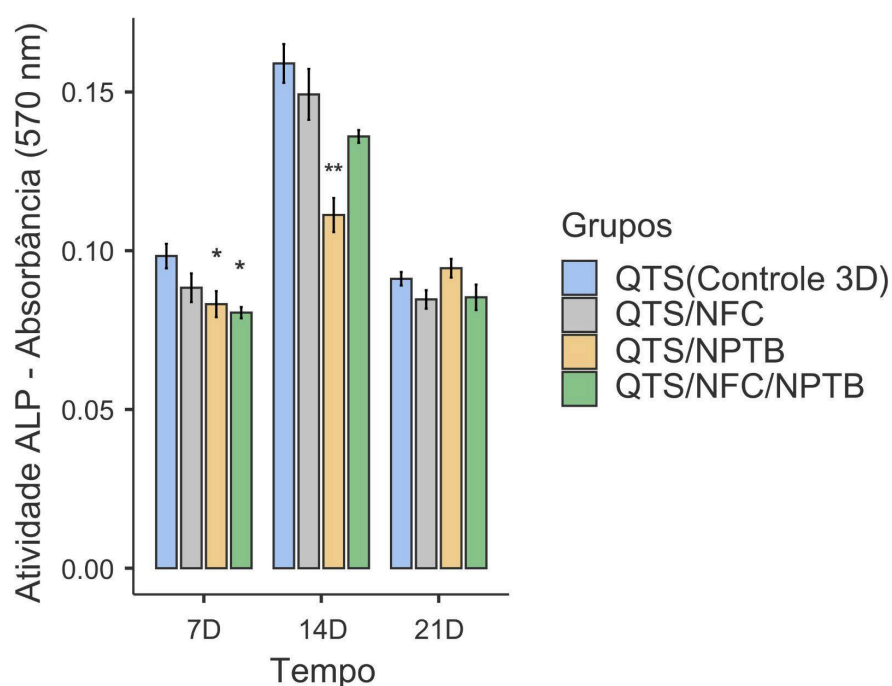


Fonte: Elaborado pela autora.

6.2.5.3 Fosfatase Alcalina

No dia 7, o grupo QTS/NFC não apresentou diferença significativa em relação ao controle (QTS) ($p = 0,257$). Em contraste, os grupos contendo NPTB, isoladamente (QTS/NPTB: $p = 0,041$) ou em combinação com NFC (QTS/NFC/NPTB: $p = 0,014$), apresentaram redução significativa da atividade de ALP. Após 14 dias, o grupo QTS/NPTB manteve a redução significativa da atividade enzimática em relação ao controle ($p = 0,001$), enquanto os grupos QTS/NFC e QTS/NFC/NPTB não diferiram significativamente ($p = 0,697$ e $p = 0,212$, respectivamente). Aos 21 dias, nenhum dos grupos apresentou diferenças significativas em comparação ao controle (QTS/NFC: $p = 0,455$; QTS/NPTB: $p = 0,867$; QTS/NFC/NPTB: $p = 0,544$) (Figura 22).

Figura 22 - Atividade de fosfatase alcalina (ALP) em células cultivadas sobre diferentes composições de hidrogéis de quitosana (QTS) ao longo de 7, 14 e 21 dias.



Fonte: Elaborado pela autora.

6.3. Análise Histológica do Reparo Ósseo *In Vivo*

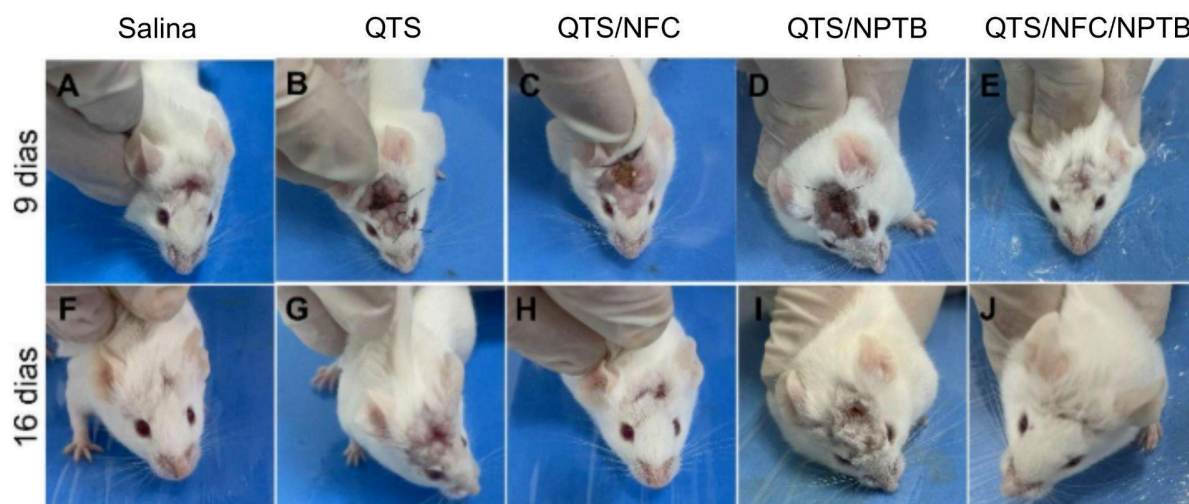
6.3.1 Resposta Tecidual e Biocompatibilidade dos Hidrogéis

Os ensaios *in vivo* foram importantes para estudar a eficácia e a biocompatibilidade dos biomateriais elaborados em condições fisiológicas reais, permitindo a análise das respostas biológicas ao hidrogel, como inflamação, regeneração e interação com tecidos adjacentes. Por isso, considerando que os scaffolds posicionados na calvária também podem influenciar a resposta tecidual na pele adjacente à incisão cirúrgica, foi realizada uma avaliação macroscópica do processo de reparo cutâneo nos períodos de 9 e 16 dias pós-operatórios.

No 9º dia, foi possível observar a presença acentuada de crostas cicatriciais nos animais dos grupos QTS, QTS/NFC e QTS/NPTB (Figuras 23b, 23c e 23d), indicando um estágio ainda ativo do processo inflamatório. Em contraste, os grupos controle e QTS/NFC/NPTB apresentaram menor formação de crostas, ou mesmo ausência destas (Figuras 23a e 23e). Destaca-se que os animais do grupo QTS/NFC/NPTB exibiram sinais mais avançados de epitelização e menores indícios de inflamação local (exsudato, crostas), em comparação ao grupo controle.

No 16º dia, os grupos QTS, QTS/NFC e QTS/NPTB ainda apresentavam sinais de retardo no processo de cicatrização, como crostas remanescentes e persistência da lesão (Figuras 23f, 23g e 23h). Por outro lado, os animais dos grupos controle e QTS/NFC/NPTB exibiram estágio mais avançado de regeneração tecidual, com recobrimento completo da área por pelos, sem sinais visíveis de inflamação (Figuras 23i e 23j).

Figura 23 - Avaliação macroscópica do reparo de pele dos camundongos em períodos de 9 e 16 dias após a cirurgia.



Fonte: Acervo pessoal.

6.3.2 Potencial Regenerativo dos Hidrogéis

A análise histológica foi realizada com o objetivo de avaliar a organização tecidual e a resposta celular na região da lesão óssea, permitindo investigar a regeneração tecidual e os processos inflamatórios em ensaios in vivo.

Os cortes histológicos evidenciaram presença de matriz mineralizada nas extremidades da lesão, interligadas por matriz de tecido conjuntivo (Figura 24a, e, i, m, q). A observação de núcleos celulares com morfologias variadas, imersos na matriz de tecido conjuntivo, sugere a formação de tecido de granulação (Figura 24b-d, f-h, j-l, n-p, r-t).

Aos 28 dias, observou-se hipertrofia do tecido conjuntivo na região central da lesão em todos os grupos contendo biomateriais (QTS, QTS/NFC, QTS/NPTB e QTS/NFC/NPTB; Figuras 24a, e, i, m, q), sem diferença estatisticamente significativa entre eles (Painel U). Os grupos controle e QTS/NFC apresentaram resultados semelhantes aos demais. Adicionalmente, os scaffolds contendo titanato, presentes nos grupos QTS/NPTB e QTS/NFC/NPTB, exibiram maior quantidade de células com núcleos arredondados, característica típica de infiltrado inflamatório (Figura 24b-d, f-h, j-l, n-p, r-u).

Resquícios não degradados dos scaffolds, visualizados como regiões hipercoreadas de vermelho na matriz de tecido conjuntivo, foram mais frequentes nos

grupos QTS/NPTB e QTS/NFC/NPTB, tanto em aumentos de 40× (Figura 23m, q) quanto de 400× (Figura 24n, o, s, t), quando comparados aos demais grupos. Em contraste, os grupos QTS e QTS/NFC apresentaram maior degradabilidade, evidenciada pela presença de poucos fragmentos de scaffolds envolvidos pela matriz de tecido conjuntivo (Figura 24g, j).

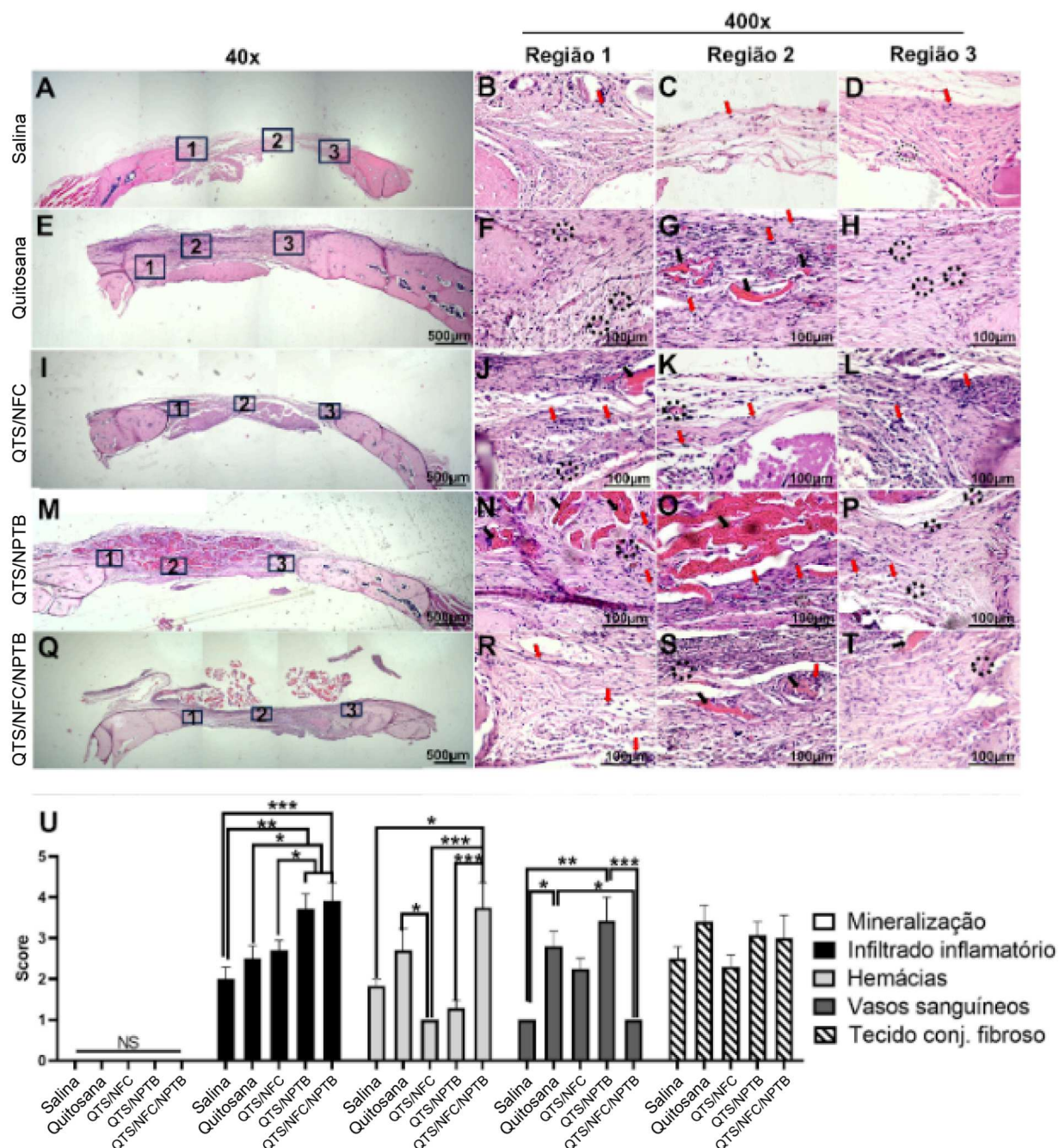
Observou-se que o grupo QTS/NFC apresentou efeito hemostático, com redução da presença de hemácias na região da lesão em comparação ao grupo controle (Salina), evidenciando menor ocorrência de hemorragia (Figura 24b–d, f–h, j–l, n–p, r–u). Em contraste, os grupos contendo NPTB (QTS/NPTB e QTS/NFC/NPTB) apresentaram maior presença de hemácias do que o controle, indicando piora do quadro hemorrágico.

Em relação à neoformação vascular, o grupo QTS/NFC apresentou a maior e mais significativa neovascularização entre todos os tratamentos, sugerindo melhor suprimento de nutrientes e oxigênio para a área lesada. Os grupos com NPTB, por outro lado, apresentaram vascularização reduzida.

Aos 28 dias, os parâmetros histológicos avaliados apresentaram perfis distintos entre os grupos (Figura 24u). Primordialmente, não foram observadas diferenças estatísticas significativas na mineralização entre os grupos avaliados ($p > 0,05$). Em contrapartida, o infiltrado inflamatório apresentou aumento significativo nos murinos tratados com Quitosana associada aos nanomateriais isolados ou combinados, sendo mais evidente nos grupos QTS/NFC ($p < 0,05$), QTS/NPTB ($p < 0,01$) e QTS/NFC/NPTB ($p < 0,001$) em especial, quando comparados ao grupo Salina. A presença de hemácias também foi superior nos grupos QTS/NPTB ($p < 0,05$) e QTS/NFC/NPTB ($p < 0,001$), indicando maior extravasamento sanguíneo nesses tratamentos. A neoformação vascular mostrou-se aumentada nos grupos tratados com Quitosana e nanomateriais, com destaque para QTS/NFC/NPTB ($p < 0,01$). Por fim, não foram verificadas diferenças significativas na quantidade de tecido conjuntivo fibroso entre os grupos ($p > 0,05$).

Esses achados indicam que a incorporação de nanomateriais modificou os padrões de mineralização, resposta inflamatória, presença de hemácias e vascularização, mas não alterou significativamente o escore de tecido conjuntivo fibroso aos 28 dias.

Figura 24 – Imagens representativas de cortes coronais obtidos a partir do centro da lesão das calvárias de camundongos Swiss, corados com Hematoxilina e Eosina, 28 dias pós-lesão. (A, E, I, M, Q) Secções coronais das lesões da calvária visualizadas em aumento de 40x. Os quadrantes numerados indicam as regiões de interesse que foram ampliadas (barra de escala = 500 μ m; n = 6). (B, F, J, N, R) Região 1, correspondente à margem esquerda do defeito, ampliada em 400x. (C, G, K, O, S) Região 2, correspondente à área entre as margens do defeito, ampliada em 400x. (D, H, L, P, T) Região 3, correspondente à margem direita do defeito, ampliada em 400x. As setas vermelhas indicam o infiltrado de células com núcleos arredondados; as setas pretas indicam resquícios de biomaterial não degradado; e os círculos pontilhados delimitam áreas de neoformação de vasos. Avaliação semi-quantitativa dos parâmetros histopatológicos nos diferentes grupos experimentais (U) em 28 dias. O gráfico representa a média do score (Eixo Y) dos parâmetros histopatológicos (mineralização, infiltrado inflamatório, hemácias, vasos sanguíneos e tecido conjuntivo fibroso) nos cinco grupos de tratamento (Eixo X).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Aos 56 dias pós-cirúrgicos, nos grupos QTS/NPTB e QTS/NFC/NPTB, observou-se maior infiltrado de células com núcleos arredondados, morfologicamente compatíveis com macrófagos, indicando a manutenção de um processo inflamatório exacerbado, mesmo em um período tardio de análise (Figura 25 o, s, t).

Conforme evidenciado na Figura 25 (m, o, q, r, s, t), os grupos QTS/NPTB e QTS/NFC/NPTB apresentaram quantidade elevada de fragmentos de scaffolds não degradados, localizados em regiões hipercoradas de vermelho no centro da lesão. No grupo QTS/NFC/NPTB, destacou-se o acúmulo de biomaterial não degradado, encapsulado por matriz de tecido conjuntivo na região superior da lesão (Figura 25 q), sugerindo biodegradabilidade ainda mais reduzida em comparação ao grupo QTS/NPTB.

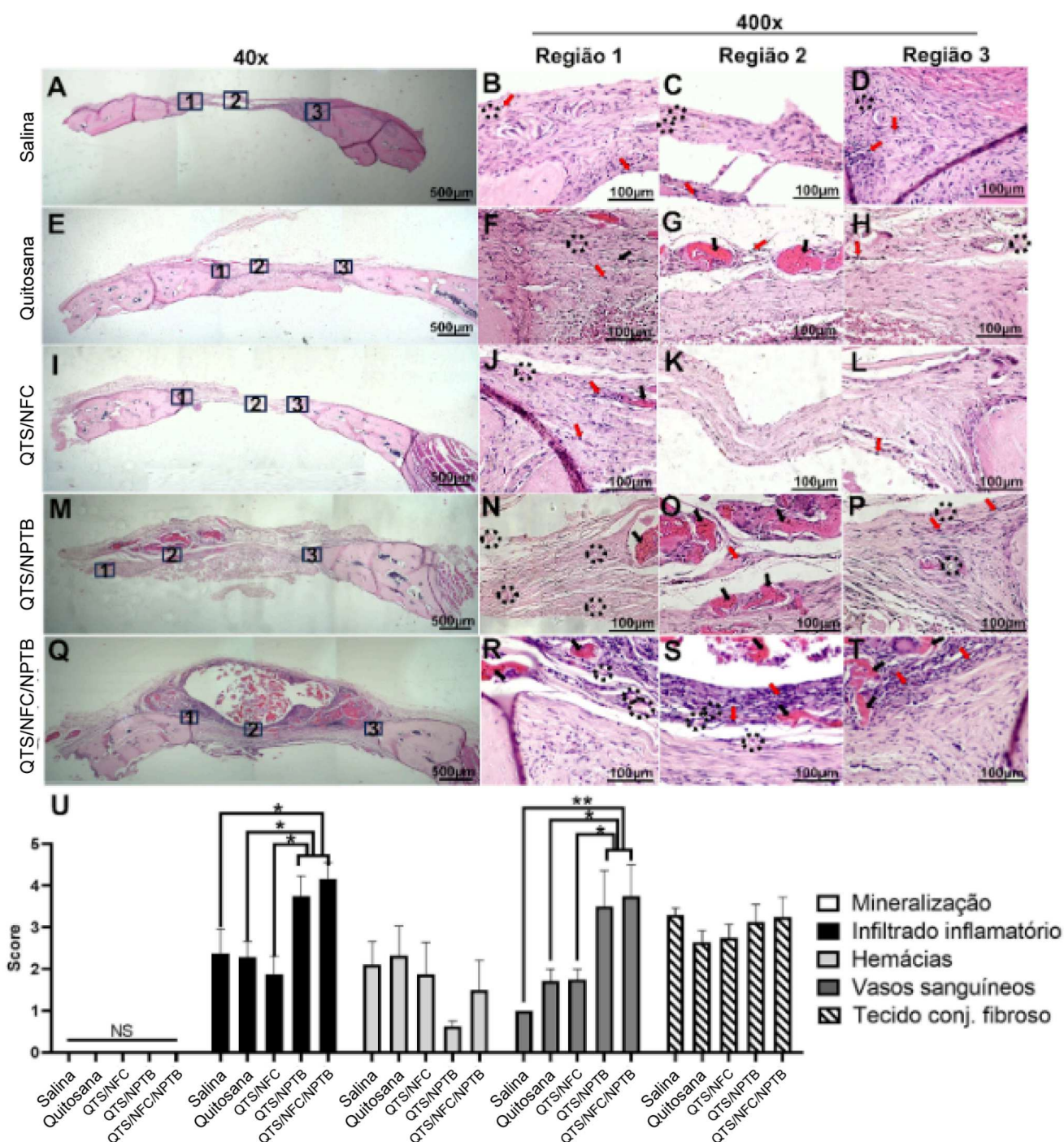
De modo semelhante ao observado aos 28 dias, os resultados obtidos aos 56 dias pós-cirúrgicos mostraram resultados similares com a baixa degradabilidade dos scaffolds dos grupos QTS/NPTB e QTS/NFC/NPTB e a persistência de inflamação crônica e prolongada. Em contraste, os animais tratados com scaffolds do grupo QTS/NFC apresentaram fragmentos de biomaterial praticamente imperceptíveis, evidenciando excelente capacidade de biodegradação. Igualmente similar aos 28 dias, nos 56 dias pós-cirúrgicos o reparo ósseo apresentou novamente matriz mineralizada nas extremidades da lesão, com presença de matriz de tecido conjuntivo na região central (Figura 25 a, e, i, m, q).

Além disso, os grupos QTS e QTS/NFC exibiram morfologia do tecido conjuntivo semelhante ao grupo controle, com discreto espessamento da matriz na região central da lesão e reduzido número de células inflamatórias, indicando boa biocompatibilidade.

As análises semiquantitativas histológicas (Figura 25u) demonstraram ausência de diferenças estatísticas entre os grupos experimentais em relação à mineralização, presença de hemácias e tecido conjuntivo fibroso, com scores semelhantes entre os grupos controle e os tratamentos ($p > 0.05$).

Por outro lado, foi possível observar aumento significativo do infiltrado inflamatório nos grupos tratados com nanomateriais quando comparados ao grupo Salina e QTS isoladamente ($p < 0.05$). O grupo QTS/NPTB apresentou valores maiores, seguido pelos demais grupos com nanomateriais associados à QTS (QTS/NFC e QTS/NFC/NPTB), o que pode indicar uma maior resposta inflamatória associada à presença dos nanocompósitos. Em relação à formação de vasos sanguíneos, observou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0.01$). O grupo QTS/NFC/NPTB apresentou valores maiores de vascularização, enquanto os grupos controle (Salina e Quitosana) apresentaram scores reduzidos.

Figura 25 - Imagens representativas de cortes coronais obtidos a partir do centro da lesão de calvárias de camundongos Swiss corados com hematoxilina e eosina 56 dias após a lesão. (A, E, I, M, Q) Secções coronais de lesões da calvária visualizadas em aumento de 40X, quadrantes numerados indicam regiões de interesse a serem ampliadas (barra de escala = 500 μ m, n = 6). B, F, J, N, R) Região 1, representando a margem esquerda do defeito ampliada em 400X. C, G, K, O, S) Região 2, representando área de interesse entre as margens do defeito ampliada em 400X. (D, H, L, P, T) Região 3, representando a margem direita do defeito ampliada em 400X (barra de setas vermelhas apontam para infiltrado de células de núcleo arredondado, setas pretas indicam resquício de biomaterial não degradado e círculos pontilhados delimitam neoformação de vaso. Avaliação semi-quantitativa dos parâmetros histopatológicos nos diferentes grupos experimentais (U) em 56 dias. O gráfico representa a média do score (Eixo Y) dos parâmetros histopatológicos (mineralização, infiltrado inflamatório, hemácias, vasos sanguíneos e tecido conjuntivo fibroso) nos cinco grupos de tratamento (Eixo X).



Fonte: Elaborado pelo autor

Para complementar esta visão celular e qualitativa, análises quantitativas por microtomografia computadorizada (micro-CT) estão em andamento. Embora os dados ainda não tenham sido finalizados, observações preliminares sugerem que os biomateriais, em especial o compósito QTS/NFC/NPTB, podem ter induzido um volume de tecido mineralizado superior ao que a análise histológica 2D aparenta.

Esta aparente discrepância pode ser explicada pelo fato de o micro-CT ser capaz de quantificar todo o mineral depositado no volume tridimensional do defeito, enquanto a histologia destaca a resposta inflamatória concomitante, que pode coexistir com a osteogênese em diferentes regiões do scaffold.

7 DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que os hidrogéis de quitosana associados a NFC e NPTB apresentaram desempenho promissor nos ensaios *in vitro*, mas desencadearam uma resposta inflamatória aumentada nos ensaios *in vivo*.

Embora a incorporação de nanopartículas de titanato de bário (NPTB) ao hidrogel de quitosana (QTS) favoreça a proliferação celular *in vitro*, ela resulta em baixa biocompatibilidade e falha na regeneração óssea *in vivo*. Em contraste, a formulação contendo apenas nanofibras de celulose (QTS/NFC) apresentou desempenho mais equilibrado, mantendo biocompatibilidade, degradação controlada e propriedades favoráveis à adesão e crescimento celular, posicionando-se como o candidato mais promissor para aplicações em engenharia tecidual óssea.

Esses resultados indicam que o desempenho de biomateriais híbridos não pode ser avaliado apenas por ensaios *in vitro*. A presença de NPTB, isolado ou combinado, pode ter gerado uma resposta inflamatória mais intensa e retardou a degradação do scaffold, fatores que provavelmente comprometeram a formação óssea. Em contrapartida, as NFCs parecem atuar como moduladoras positivas, equilibrando a degradação do biomaterial e a resposta tecidual, sugerindo que o sucesso de scaffolds híbridos depende mais do ajuste entre bioatividade, degradação e resposta inflamatória do que do simples acréscimo de componentes bioativos.

Após a padronização do processo de reticulação do hidrogel de QTS, foram estabelecidos os grupos experimentais incorporando nanomateriais para a produção dos hidrogéis nanocompósitos. A escolha das concentrações de NFC e NPTB baseou-se em evidências experimentais do grupo de pesquisa, os quais demonstraram resultados promissores na interação e modificação das propriedades de filmes poliméricos finos de QTS e hidrogéis de alginato (Zanette *et al.* 2023; AMARAL *et al.* 2019). A introdução desses nanomateriais no hidrogel de QTS visou aprimorar suas propriedades mecânicas e biológicas, tornando-o mais adequado

para aplicações em engenharia de tecidos e outras áreas biomédicas. Conforme apresentado nos estudos de Nguyen *et al.*, 2023, hidrogéis de quitosana podem apresentar propriedades mecânicas inferiores, e, por isso, pode-se combinar sistemas nanocompósitos ou outros materiais para suprir essa limitação.

Com a nanoestruturação e reticulação dos hidrogéis, envolvendo posterior liofilização, avançou-se, então, para a etapa de caracterização. Os nanomateriais exibem propriedades distintas em comparação com suas estruturas em escala micro e macrométrica, como alta reatividade e bioatividade (Li *et al.*, 2021). Assim, a realização de testes de caracterização é fundamental para compreender as características morfológicas, estruturais e composicionais desses nanomateriais (Jiang *et al.*, 2022), especialmente quando são incorporados a uma matriz polimérica para a formação de hidrogéis.

A análise morfológica realizada por MEV permitiu uma avaliação qualitativa da estrutura dos hidrogéis obtidos após o processo de liofilização. As imagens obtidas revelaram a presença de estruturas porosas em todos os grupos avaliados, uma característica que é desejável para scaffolds aplicados à engenharia tecidual. A porosidade é um fator importante para biomateriais utilizados para aplicações na engenharia de tecido, pois favorece a adesão, migração, proliferação e diferenciação celular, além de permitir a difusão de nutrientes, oxigênio e fatores de crescimento, que são pontos consideráveis para o desenvolvimento e também manutenção do novo tecido formado.

A presença de NFC e NPTB na matriz de quitosana promoveu alterações na arquitetura dos hidrogéis, especialmente no grupo contendo ambos os nanomateriais (QTS/NFC/NPTB), onde foi possível observar uma estrutura mais heterogênea, com poros de tamanhos e formas distintas. Essa variação morfológica pode indicar a formação de uma matriz com maior interconectividade, o que é desejável em materiais destinados à regeneração óssea, uma vez que pode facilitar a infiltração celular e a vascularização do implante, contribuindo para a osteogênese e integração tecidual (Griveau *et al.*, 2022; Ellermann *et al.*, 2023).

Na amostra QTS/NPTB (Figura 7c), foram observados possíveis aglomerados de nanopartículas de titanato de bário, indicados por setas vermelhas, o que sugere que essas partículas não estão distribuídas de forma homogênea na matriz polimérica. Esse resultado pode estar relacionado a limitações no processo de dispersão durante a preparação do hidrogel. A formação desses aglomerados

pode comprometer a uniformidade da rede polimérica, influenciar as propriedades mecânicas locais e gerar regiões que se degradam mais lentamente. Essa degradação irregular, somada à presença dos aglomerados, pode favorecer uma resposta inflamatória prolongada e até pequenos focos de hemorragia, como observado in vivo nos grupos contendo NPTB. Por outro lado, a adição de NFC pode ajudar a estabilizar o hidrogel, distribuindo melhor as partículas e promovendo uma degradação mais gradual, o que tende a reduzir esses efeitos.

O bom desempenho in vivo do grupo experimental QTS/NFC pode ser explicado pela combinação equilibrada de suas propriedades físico-químicas. O tamanho dos poros favorece a difusão de nutrientes, oxigênio e a migração celular, criando um ambiente mais favorável à regeneração tecidual. Além disso, a taxa de degradação permite que o material mantenha suporte mecânico inicial ao tecido em reparo, ao mesmo tempo em que se degrada de forma gradual, evitando acúmulo de subprodutos que poderiam induzir inflamação. A maior molhabilidade do QTS/NFC contribui para melhor interação com fluidos biológicos e células, aumentando a adesão celular e estimulando processos de neoformação vascular. Em conjunto, essas características proporcionam um microambiente mais estável e favorável para o reparo tecidual, justificando o melhor desempenho observado in vivo.

No entanto, a presença de agregados das nanopartículas de NPTB nesse sistema pode ter contribuído para a resposta hemorrágica e para a presença de infiltrado inflamatório observados nos ensaios in vivo. Esses agregados podem ter atuado como pontos de descontinuidade no material, potencializando a ativação exacerbada da resposta inflamatória local.

Todos os grupos apresentaram poros com dimensões médias variando entre 92,8 μm e 232,1 μm e esse resultado corrobora com diversos estudos que trazem evidências experimentais que indicam que poros com diâmetro superior a 100 μm devem ser priorizados para permitir o transporte eficiente de nutrientes nos meios intra e extracelular, também possibilitando a migração de células ao longo da estrutura do scaffold (Farazin *et al.*, 2023; Lutzweiler *et al.*, 2020). De acordo com os estudos de Shahin-Shamsabadi *et al.* 2018, os osteoblastos são mais adeptos a poros maiores (100-200 μm) durante a regeneração do osso mineralizado após a implantação, por serem medidas favoráveis à infiltração de macrófagos e à entrada de fatores de crescimento celular. O trabalho de Mukasheva *et al.*, 2024 relata que

scaffolds com tamanhos de poros inferiores a estes apresentam dados experimentais ainda muito restritos.

Esses achados indicam que a combinação de nanofibras de celulose (NFC) com nanopartículas poliméricas (NPTB) teve um efeito combinatório sobre a estrutura do hidrogel, promovendo uma matriz mais porosa. As NFCs, por sua estrutura composta por fibras alongadas, podem contribuir para a formação de redes mais espaçosas, enquanto as NPTBs podem ter funcionado como espaçadores na estrutura, evitando que as cadeias do hidrogel ficassem muito compactas.

Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas entre os demais grupos - NFC $\times$ NPTB ($p = 0,924$), NFC $\times$ QTS ($p = 0,484$), NFC/NPTB $\times$ QTS ($p = 0,133$) e NPTB $\times$ QTS ($p = 0,846$), sugerindo que as modificações isoladas com NFC, NPTB ou QTS não foram suficientes para provocar mudanças expressivas na porosidade sob as condições experimentais utilizadas.

Na análise de caracterização química, a espectroscopia Raman confirmou a presença e a integridade estrutural dos componentes do hidrogel. A banda em 1377 cm^{-1} , relacionada à cadeia principal da quitosana (Cai & Kim, 2010), foi identificada em todas as amostras, assim como as bandas associadas às estruturas do NPTB (307 , 502 e 715 cm^{-1}), indicando a incorporação bem-sucedida do material cerâmico. A banda em 895 cm^{-1} indicou interações entre a quitosana e as NFCs, sugerindo integração eficiente entre os componentes poliméricos. A presença simultânea dessas bandas corrobora a formação de um hidrogel funcionalizado com materiais de natureza distinta, cada qual contribuindo com propriedades específicas, como a bioatividade da nanocelulose e o potencial piezoelétrico do titanato de bário (Medrado *et al.*, 2021; Fuentes *et al.*, 2023).

Além disso, a banda em 895 cm^{-1} observada no espectro Raman sugere interações entre a QTS e as NFC, indicando que esse nanomaterial também foi incorporado na estrutura do hidrogel (Johar *et al.*, 2012; Fuentes *et al.*, 2023). A presença do NPTB foi confirmada também pela banda em 307 cm^{-1} , que está relacionada às vibrações B1 e E (TO + LO) do titanato de bário, demonstrando a formação de um hidrogel nanoestruturado contendo NPTB e NFC.

Posteriormente, foi realizado o teste de degradação com o objetivo de avaliar a estabilidade estrutural dos hidrogéis ao longo do tempo. A variação de massa

indicou que a maioria das amostras apresentou perda gradual nos períodos de 7, 14 e 21 dias.

Hidrogéis voltados à aplicação biomédica são projetados para se degradarem sob condições fisiológicas, por meio de mecanismos como hidrólise ou digestão enzimática (Correa *et al.*, 2021). Tal característica é desejável, pois favorece a substituição do material pelo novo tecido formado *in vivo* (Zhao *et al.*, 2023). Metters (apud Correa, 2021) destaca que hidrogéis hidrofílicos frequentemente apresentam degradação em massa, ou seja, de forma relativamente homogênea em todo o volume do material.

Conforme demonstrado por Hama *et al.* (2023), a análise de biodegradação em períodos prolongados é fundamental para prever o comportamento *in vivo* dos hidrogéis. Neste estudo, a incorporação de NFCs promoveu leve aumento da estabilidade, possivelmente devido à formação de redes de hidrogênio entre as fibras e a quitosana, conferindo maior integridade à matriz.

Já o grupo contendo apenas nanopartículas cerâmicas de titanato de bário (QTS/NPTB) apresentou menor degradação, possivelmente em função da maior densidade conferida à matriz e da interação físico-química com a superfície das NPTB. O grupo com os dois nanomateriais combinados (QTS/NFC/NPTB) demonstrou um perfil intermediário de degradação, sugerindo uma reorganização estrutural que reduziu parcialmente o efeito estabilizante individual dos aditivos.

Esses achados indicam que a presença e o tipo de nanomaterial influenciam diretamente a degradação do hidrogel, como também observado em trabalhos anteriores do nosso grupo (Zanette *et al.*, 2023). Por fim, a degradação registrada nos hidrogéis de quitosana está de acordo com a literatura, que aponta este polímero como biodegradável e bioabsorvível (Yu *et al.*, 2022).

Nos ensaios *in vitro*, foram obtidos resultados realizados a partir dos testes de MTT, Alamar Blue e Fosfatase Alcalina.

O ensaio de MTT demonstrou que todos os biomateriais avaliados foram citocompatíveis ao longo de 21 dias de cultivo com células SHED, uma vez que não houve diferenças significativas em relação ao controle (QTS) nos períodos de 7 e 14 dias. Esses achados corroboram estudos prévios que reportam a boa biocompatibilidade da quitosana e de seus compostos, incluindo hidrogéis associados a NFCs e NPTBs. O estudo de Fan *et al.*, 2020 mostrou que hidrogéis reforçados com NPTBs aumentam a proliferação celular em comparação ao grupo

controle. De forma semelhante, Rudich *et al.*, 2023 observaram o potencial proliferativo de hidrogéis acrescidos de NFCs.

No período de 21 dias, observou-se um aumento significativo da viabilidade celular no grupo QTS/NPTB em relação ao controle. Esse resultado sugere que as nanopartículas de titanato de bário podem exercer papel bioativo não apenas no estímulo à diferenciação osteogênica, mas também na manutenção da atividade metabólica celular a longo prazo. O trabalho de Zhang *et al.*, 2025 demonstrou, em ensaios *in vitro* e *in vivo*, que hidrogéis com propriedades piezoelétricas estimulam a osteogênese e também favorecem a formação de vasos sanguíneos, auxiliando no processo de cicatrização óssea.

Os resultados do ensaio Alamar Blue corroboram parcialmente os achados do ensaio de MTT, reforçando a citocompatibilidade dos biomateriais com células SHEDs. Nos períodos de 7 e 14 dias, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados e o controle, indicando que a presença de NFC ou NPTB de formas isoladas ou combinadas, não comprometeu a viabilidade nem o metabolismo celular.

No período de 21 dias, todos os grupos contendo nanomateriais apresentaram aumento significativo da viabilidade e do metabolismo celular em relação ao controle, sugerindo que tanto NFC quanto NPTB exercem efeitos benéficos na atividade metabólica celular em longo prazo. Esses achados complementam os resultados do MTT, no qual apenas o grupo QTS/NPTB havia apresentado aumento significativo.

O aumento de viabilidade observado em sistemas contendo NPTB pode ser atribuído ao seu comportamento piezoelétrico. O titanato de bário gera cargas elétricas em resposta a estímulos mecânicos, mimetizando a piezoelectricidade natural do tecido ósseo. Essa propriedade é descrita como indutora da adesão, proliferação e diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Zhang *et al.*, 2025). Entretanto, o bom desempenho observado em placas de cultura não se traduziu diretamente em resultados positivos *in vivo*. No organismo, o material está exposto a fatores ausentes nos ensaios 2D, como células imunes, fluxo sanguíneo, degradação enzimática e remodelação tecidual, que podem alterar sua degradação, liberar resíduos e induzir respostas inflamatórias. Assim, embora o estímulo elétrico gerado pelas nanopartículas possa ter favorecido a manutenção da viabilidade celular em cultura, esses efeitos não

foram suficientes para superar as complexidades do ambiente *in vivo*, resultando em reparo ósseo limitado.

Já a melhora observada no grupo QTS/NFC sugere que a nanocelulose, além de atuar como reforço mecânico, promove um ambiente altamente hidratado, poroso e semelhante à matriz extracelular, favorecendo trocas metabólicas, difusão de nutrientes e remoção de resíduos. Estudos prévios apontam que NFCs incorporadas a hidrogéis podem melhorar a bioatividade, mineralização e a atividade osteogênica (Cui *et al.*, 2023).

O grupo QTS/NFC/NPTB apresentou comportamento semelhante aos contendo NFC ou NPTB isoladamente, com aumento significativo da viabilidade aos 21 dias. Esse achado sugere um efeito aditivo das duas nanopartículas, no qual a nanocelulose contribui para a estabilidade estrutural e suporte físico, enquanto o titanato de bário confere bioatividade elétrica, criando um microambiente propício à manutenção da viabilidade celular em longo prazo.

Assim, em conjunto, os resultados do Alamar Blue indicam que os materiais nanoestruturados testados são biocompatíveis e que a adição de NFC e NPTB não apenas mantém, mas potencializa a viabilidade e o metabolismo celular em períodos prolongados, característica altamente desejável em aplicações de regeneração óssea, nas quais a integração do biomaterial e a manutenção da atividade celular são essenciais para o sucesso do processo reparativo.

A atividade da fosfatase alcalina (ALP) é um marcador da diferenciação osteoblástica, estando associada à fase inicial de maturação celular e deposição de matriz mineralizada. No período de 7 dias, foi possível observar que a incorporação de NFC à QTS não alterou significativamente a atividade da ALP em comparação ao controle (QTS), sugerindo que a presença desse nanomaterial não comprometeu o início do processo de diferenciação osteoblástica. Em contrapartida, os grupos contendo NPTB (QTS/NPTB e QTS/NFC/NPTB) apresentaram redução da atividade enzimática, indicando que a introdução de NPTBs pode modular negativamente a expressão de ALP em curto tempo.

Após 14 dias, verificou-se a manutenção da redução de atividade de ALP apenas no grupo QTS/NPTB, reforçando a hipótese de que o NPTB isolado exerce um efeito modulador mais evidente sobre a fase intermediária de diferenciação. Por outro lado, a combinação do NPTB com NFC (QTS/NFC/NPTB) não apresentou diferença significativa em relação ao controle, o que pode indicar um possível efeito

compensatório da NFC. Esse resultado sugere uma interação entre os componentes poliméricos e cerâmicos, contribuindo para um microambiente mais equilibrado e permissivo à diferenciação celular.

No tempo de 21 dias, todos os grupos testados apresentaram níveis de atividade de ALP semelhantes ao controle, demonstrando que, a longo prazo, os diferentes biomateriais não comprometeram a progressão do processo de diferenciação osteoblástica. Essa ausência de diferenças pode estar relacionada ao fato de que a ALP é um marcador predominantemente precoce, tendendo a apresentar redução em fases mais tardias de ensaio, quando outros marcadores, como níveis de osteocalcina e deposição de matriz mineral, tornam-se mais relevantes para a avaliação da maturação osteoblástica.

Dessa forma, os resultados apontam que, embora o NPTB de forma isolada possa exercer um efeito inicial de redução da atividade de ALP, tal característica é atenuada ao longo do tempo e pode ser modulada pela associação com NFC. Esses resultados reforçam a importância de avaliar os efeitos imediatos e a evolução temporal da resposta celular em sua aplicação em biomateriais nanoestruturados, uma vez que o comportamento inicial pode não refletir o potencial osteogênico em estágios mais avançados de diferenciação.

Os resultados obtidos na avaliação *in vivo* evidenciam o potencial do hidrogel QTS/NFC/NPTB na modulação da resposta tecidual referente ao reparo cutâneo. A presença de crostas cicatriciais acentuadas nos grupos QTS, QTS/NFC e QTS/NPTB no 9º dia pós-operatório indica que, nesses grupos experimentais, o processo inflamatório ainda estava ocorrendo, caracterizando um retardo da fase de cicatrização. Em contraste, os grupos controle e o grupo QTS/NFC/NPTB mais expressivamente, apresentaram menor formação de crostas e sinais de epitelização mais avançada, sugerindo uma aceleração no processo de reparo e uma resposta inflamatória local menos intensa.

A análise histológica permitiu a observação de diferenças entre os biomateriais quanto à organização tecidual, degradação e resposta celular. Em todos os grupos experimentais foi possível identificar matriz mineralizada nas extremidades da lesão, caracterizando o avanço do processo de reparo ósseo. A presença de núcleos celulares distintos indica a formação de tecido de granulação, componente importante para a regeneração tecidual, representando uma fase altamente celular e com grande presença de fatores de angiogênese, citocinas,

fatores de crescimento e interleucinas (Allhaj & Goyal, 2022). Além disso, o tecido de granulação é composto por matriz extracelular, ácido hialurônico, colágeno e elastina (Allhaj & Goyal, 2022).

Os achados macroscópicos sugerem que o hidrogel composto de QTS/NFC/NPTB pode ter contribuído para um ambiente mais favorável à regeneração cutânea, especialmente nos períodos de 9 e 16 dias. Embora essas observações indiquem um potencial benefício do material no reparo de tecidos moles, elas devem ser interpretadas de forma preliminar e complementar, considerando que o foco principal deste estudo é a regeneração óssea. Dessa forma, o material composto se apresenta como candidato promissor para aplicações em engenharia tecidual óssea, enquanto efeitos observados na pele fornecem indicações iniciais que podem orientar investigações futuras em reparo de tecidos moles.

Entretanto, diferenças relevantes emergiram na comparação entre os biomateriais. Os grupos QTS, QTS/NPTB e QTS/NFC/NPTB apresentaram maior hipertrofia do tecido conjuntivo no centro da lesão, sugerindo uma resposta celular mais intensa. Nos grupos contendo NPTB, verificou-se a presença de infiltrado inflamatório, evidenciado por núcleos arredondados em maior quantidade, bem como resquícios não degradados dos scaffolds. Esses achados sugerem que a presença do NPTB, apesar de sua reconhecida bioatividade piezoelétrica (Zhang *et al.*, 2025), pode ter contribuído para um atraso na degradação do biomaterial e estimulado uma resposta inflamatória exacerbada em curto prazo. A retenção de fragmentos não degradados também pode estar associada à menor taxa de remodelação tecidual, o que limita a integração progressiva do biomaterial com o tecido ósseo a ser remodelado, o que corrobora com o trabalho de Ball *et al.*, 2013, que diz que inflamações significativas podem inibir a cicatrização de um local de lesão. Esses achados sugerem que o titanato, quando associado à quitosana e/ou à nanofibra de celulose, pode exercer um efeito pró-inflamatório.

Em contraste, os grupos QTS e QTS/NFC apresentaram melhor perfil de degradação dos scaffolds, com menor quantidade de resíduos envolvidos por tecido conjuntivo, favorecendo um ambiente mais permissivo à formação tecidual. Esse comportamento pode estar relacionado à natureza hidratada e porosa da nanocelulose, que, além de reforço estrutural, confere maior permeabilidade e facilita as trocas metabólicas (Cui *et al.*, 2023). Portanto, a associação de NFC à

quitosana parece modular de forma positiva o equilíbrio entre degradação do biomaterial e regeneração óssea.

Em conjunto, os achados sugerem que os scaffolds do grupo QTS/NPTB exercem efeito pró-inflamatório, com aumento ainda mais pronunciado da inflamação nos animais tratados com QTS/NFC/NPTB durante o processo de reparo ósseo aos 28 dias pós-cirúrgico. Esses resultados reforçam que a presença de NPTB, isolado ou em combinação, exerce influência no processo de regeneração, por outro lado, este nanomaterial pode prolongar a degradação do scaffold, induzir resposta inflamatória mais intensa e comprometer a vascularização. Já os sistemas contendo NFC mostraram boa degradabilidade e integração tecidual, o que os torna promissores para aplicações em engenharia tecidual óssea.

A análise histológica representa um corte bidimensional de um processo de reparo que é intrinsecamente tridimensional. A avaliação de uma única secção central do defeito pode não capturar a totalidade da neoformação óssea que ocorre em todo o volume do defeito.

A principal perspectiva futura deste trabalho será a conclusão da análise quantitativa dos dados de micro-CT para determinar o volume ósseo neoformado, a conectividade e a microarquitetura do novo tecido. A correlação final entre os achados quantitativos do micro-CT e os achados celulares da histologia permitirá uma compreensão da performance dos biomateriais, elucidando se a resposta inflamatória inicial observada é uma fase transitória que precede a regeneração ou se, a longo prazo, poderia comprometer a qualidade do osso formado.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo revelou que o hidrogel de quitosana associado a NPTB, apesar de promissor em ensaios *in vitro*, não manteve o mesmo desempenho em modelos *in vivo*. Embora os testes em cultura celular tenham mostrado boa compatibilidade e sinais de bioatividade, a presença de NPTB nos ensaios *in vivo*, isolado ou combinado com NFCs, resultou em degradação do scaffold a longo prazo e em uma resposta inflamatória visível através da histologia. Esses efeitos provavelmente comprometeram o reparo ósseo no modelo animal, evidenciando que a eficácia observada em ensaios bidimensionais nem sempre se traduz em resultados biológicos reais. Essa discrepância ressalta a necessidade de avaliar biomateriais em sistemas tridimensionais e em modelos *in vivo* antes de tirar conclusões sobre seu potencial clínico.

Em contrapartida, o hidrogel contendo apenas quitosana e nanofibras de celulose (QTS/NFC) demonstrou desempenho mais equilibrado, preservando biocompatibilidade e degradação. Esses achados indicam que o sucesso de scaffolds para aplicabilidade no reparo ósseo depende mais do equilíbrio entre bioatividade, degradação e resposta inflamatória do que do acréscimo de componentes bioativos. Além disso, os resultados fornecem direções para possível otimização futura, incluindo ajustes de formulação, monitoramento da deposição mineral e análises estruturais avançadas, como micro-CT, reforçando a relevância do estudo para a engenharia tecidual e potenciais aplicações clínicas.

Assim, este trabalho contribui para o entendimento do papel de nanocompósitos híbridos na regeneração óssea e abre perspectivas para estudos futuros que consolidem sua aplicabilidade, com foco em ajustes de formulação, avaliação reológica e testes de coloração Von Kossa e Alizarin Red para averiguar a presença ou ausência de deposição mineral induzida pelo scaffold.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELAZIZ, A. G. et al. A review of 3D polymeric scaffolds for bone tissue engineering: principles, fabrication techniques, immunomodulatory roles, and challenges. **Bioengineering**, v. 10, 204, 2023. DOI: 10.3390/bioengineering10020204. Acesso em: Julho/2025.

ABDOLLAHIYAN, P. et al. Hydrogel-Based 3D bioprinting for bone and cartilage tissue engineering. **Biotechnology Journal**, v. 15, n. 12, p. e2000095, 2020. DOI: 10.1002/biot.202000095. Acesso em: Julho/2025.

AL-ALLAQ, A. A.; KASHAN, J. S.; ABDUL-KAREEM, F. M. In vivo investigations of polymers in bone tissue engineering: a review study. **International Journal of Polymer Materials and Polymer Biomaterials**, v. 73, p. 1664–1684, 2024. DOI:10.1080/00914037.2024.2305227. Acesso em: Julho/2025.

ALMURAIKHI, N. Molecular signaling pathways governing osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. **Journal of Clinical Medical Imaging**, v. 8, n. 7, p. 1–8, 2025.

AMINE, S., et al. Controlled Polyelectrolyte Association of Chitosan and Carboxylated Nano-Fibrillated Cellulose by Desalting. **Polymers**, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/polym13122023>. Acesso em: Agosto/2025.

AMORIM, J. D. P., et al. Plant and bacterial nanocellulose: production, properties and applications in medicine, food, cosmetics, electronics and engineering: A review. **Environmental Chemistry Letters**, p. 851-869, 2020. DOI:10.1007/s10311-020-00989-9. Acesso em: Julho/2025.

ANDERSEN, M. L.; WINTER, L. M. F. Animal models in biological and biomedical research—Experimental and ethical concerns. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, e20170238, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720170238>. Acesso em: Agosto/2025.

AYDIN, S.; ŞAHİN, F. Stem cells derived from dental tissues. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1144, p. 123–132, 2019. DOI: 10.1007/5584_2018_333. Acesso em: Julho/2025.

BACEVICH, B. M. et al. Advances with platelet-rich plasma for bone healing. **Biologics: Targets and Therapy**, v. 18, p. 29–59, 2024. DOI: 10.2147/BTT.S290341. Acesso em: Maio/2025.

BATTAFARANO, G., et al. Strategies for Bone Regeneration: From Graft to Tissue Engineering. International. **Journal of Molecular Sciences**, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22031128>. Acesso em: Agosto/2025.

BHARADWAZ, A., JAYASURIYA, A. C. Recent trends in the application of widely used natural and synthetic polymer nanocomposites in bone tissue regeneration, **Materials Science and Engineering: C**, v. 110, 2020. DOI: 10.1016/j.msec.2020.110698. Acesso em: Julho/2025.

BI, M., et al. Cell-based mechanisms and strategies of co-culture system both in vivo and in vitro for bone tissue engineering. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 169, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115097>. Acesso em: Agosto/2025.

BRUMBERG, V. et al. Modern Wound Dressings: Hydrogel Dressings. **Biomedicines**, v. 9, p. 1235, 2021. DOI: 10.3390/biomedicines9091235. Acesso em: Setembro/2025.

BUCK, H. V.; STAINS, J. P. Osteocyte-mediated mechanical response controls osteoblast differentiation and function. **Frontiers in Physiology**, v. 15, 2024. DOI: 10.3389/fphys.2024.1364694. Acesso em: Setembro/2025.

BURSKA, A. N. et al. Dynamics of early signalling events during fracture healing and potential serum biomarkers of fracture non-union in humans. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 2, 492, 2020. DOI: 10.3390/jcm9020492. Acesso em: Agosto/2025.

CAI, J., KIM, J. Characterization of cellulose fibers in Raman spectroscopy. **Macromolecular Research**, v. 18, n.4, p. 315-320, 2010. Acesso em: Abril/2025.

CARNOVALE, C., et al. Identifying trends in gold nanoparticle toxicity and uptake: size, shape, capping ligand, and biological corona. **ACS Omega**, v. 4, p. 242–256, 2019. DOI: 10.1021/acsomega.8b03227. Acesso em: Outubro/2025.

CELEBI, H., KURT, A. Effects of Processing on the Properties of Chitosan/Cellulose Nanocrystal Films. **Carbohydrate Polymers**, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.007>. Acesso em: Agosto/2025.

CHANG, B.; LIU, X. Osteon: structure, turnover, and regeneration. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 28, n. 2, p. 261–278, 2022. DOI: 10.1089/ten.TEB.2020.0322. Acesso em: Julho/2025.

CHEN, H., et al. Janus fibre/sponge composite combined with IOPNs promotes haemostasis and efficient reconstruction in oral guided bone regeneration. **Materials & Design**, v. 222, 111083, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2022.111083>. Acesso em: Julho/2025.

CISZYŃSKI, M. et al. Allogenic bone graft in dentistry: a review of current trends and developments. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, 16598, 2023. DOI: 10.3390/ijms242316598. Acesso em: Agosto/2025.

CLAES, L. Improvement of clinical fracture healing — what can be learned from mechano-biological research? **Journal of Biomechanics**, v. 115, 110148, 2021. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2020.110148. Acesso em: Julho/2025.

CLARK, D.; NAKAMURA, M.; MICLAU, T. et al. Effects of aging on fracture healing. **Current Osteoporosis Reports**, v. 15, p. 601–608, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11914-017-0413-9>. Acesso em: Setembro/2025.

DARGHIASI, S. F.; FARAZIN, A.; GHAZALI, H. S. Design of bone scaffolds with calcium phosphate and its derivatives by 3D printing: a review. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 151, 106391, 2024. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2024.106391. Acesso em: Outubro/2025.

DE WITTE, T. M. et al. Bone tissue engineering via growth factor delivery: from scaffolds to complex matrices. **Regenerative Biomaterials**, v. 5, n. 4, p. 197–211, ago. 2018. DOI: 10.1093/rb/rby013. Acesso em: Agosto/2025.

DONATE, R.; MONZÓN, M.; ALEMÁN-DOMÍNGUEZ, M. E. Additive manufacturing of PLA-based scaffolds intended for bone regeneration and strategies to improve their biological properties. **e-Polymers**, v. 20, p. 571–599, 2020. DOI: 10.1515/epoly-2020-0046. Acesso em Julho/2025.

DONNALOJA, F. et al. Natural and synthetic polymers for bone scaffolds optimization. **Polymers**, v. 12, 905, 2020. DOI: 10.3390/polym12040905. Acesso em: Julho/2025.

DUBEY, S. K. et al. Application of chitosan modified nanocarriers in breast cancer. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 194, 2021. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.11.095. Acesso em: Agosto/2025.

DWIVEDI, R. et al. Polycaprolactone as biomaterial for bone scaffolds: review of literature. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 10, n. 1, p. 381–388, jan.–mar. 2020. DOI: 10.1016/j.jobcr.2019.10.003. Acesso em: Agosto/2025.

ELLERMANN, E. et al. In vitro angiogenesis in response to biomaterial properties for bone tissue engineering: a review of the state of the art. **Regenerative biomaterials**, v. 10, 2023. DOI: 10.1093/rb/rbad027. Acesso em: Setembro/2025.

ERCAL, P.; PEKOZER, G. G. A current overview of scaffold-based bone regeneration strategies with dental stem cells. In: TURKSEN, K. (ed.). **Cell Biology and Translational Medicine**. Volume 9: Stem Cell-Based Therapeutic Approaches in Disease. Cham: Springer, 2020. p. 61–85. DOI: 10.1007/5584_2020_505. Acesso em: Setembro/2025.

FARAZIN, A.; DARGHIASI, S. F. Advanced polymeric scaffolds for bone tissue regeneration. **Exploratory Biomaterials-X**, v. 2, 101340, 2025. DOI: <https://doi.org/10.37349/ebmx.2025.101340>. Acesso em: Setembro/2025.

FARJAMINEJAD, S. et al. Advances and challenges in polymer-based scaffolds for bone tissue engineering: a path towards personalized regenerative medicine. **Polymers**, v. 16, n. 23, 3303, 2024. DOI: 10.3390/polym16233303. Acesso em: Setembro/2025.

FENG, Y. et al. The collagen-based scaffolds for bone regeneration: a journey through electrospun composites integrated with organic and inorganic additives. **Processes**, v. 11, p. 2105, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/pr11072105>. Acesso em: Outubro/2025.

FILIP, N. et al. Biomaterials in orthopedic devices: current issues and future perspectives. **Coatings**, v. 12, 1544, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/coatings12101544>. Acesso em: Julho/2025.

FILIPPI, M.; BORN, G.; CHAABAN, M.; SCHERBERICH, A. Natural polymeric scaffolds in bone regeneration. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 474, 2020. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00474. Acesso em: Julho/2025.

FUENTES, S. et al. Structural characterization, stability, and cytocompatibility study of chitosan BaTiO₃@ ZnO: Er heterostructures. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2023. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.123796. Acesso em: Agosto/2025.

GAO, H., et al. Advances in animal models for studying bone fracture healing. **Bioengineering**, v. 10, 201, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/bioengineering10020201>. Acesso em: Setembro/2025.

GAO, X. et al. Immunomodulatory role of stem cells from human exfoliated deciduous teeth on periodontal regeneration. **Tissue Engineering**, v. 24, p. 1341–1353, 2018. DOI: 10.1089/ten.TEA.2018.0016. Acesso em: Agosto/2025.

GHORBANI, M., et al. Electrospun chitosan/nanocrystalline cellulose-graft-poly(*N*-vinylcaprolactam) nanofibers as the reinforced scaffold for tissue engineering. **Journal of Materials Science**, v. 55, p. 2176-2185. DOI:10.1007/s10853-019-04115-1. Acesso em: Julho/2025.

GIORGIO, I., et al. An orthotropic continuum model with substructure evolution for describing bone remodeling: an interpretation of the primary mechanism behind Wolff's law. **Biomechanics and Modeling in Mechanobiology**, v. 22, p. 2135–2152, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10237-023-01755-w>. Acesso em: Outubro/2025.

GOODMAN, S. B. et al. Inflammation and bone repair: from particle disease to tissue regeneration. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, 230, 2019.

DOI: 10.3389/fbioe.2019.00230. Acesso em: Julho/2025.

GRIVEAU, L. et al. Design and characterization of an in vivo injectable hydrogel with effervescently generated porosity for regenerative medicine applications. **Acta biomaterialia**, v. 140, p. 324-337, 2022. DOI: 10.1016/j.actbio.2021.11.036. Acesso em: Agosto/2025.

GUAN, Q. F. et al. Sustainable wood-based hierarchical solar steam generator: a biomimetic design with reduced vaporization enthalpy of water. **Nano Letters**, v. 20, n. 8, p. 5699–5704, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01088>. Acesso em: Agosto/2025.

GUO, L. et al. The role of natural polymers in bone tissue engineering. **Journal of Controlled Release**, v. 338, p. 571–582, 2021. DOI: 10.1016/j.jconrel.2021.08.055. Acesso em: Agosto/2025.

HAMA, R., et al., Recent Developments in Biopolymer-Based Hydrogels for Tissue Engineering **Applications. Biomolecules**, v. 13, n. 2, p. 280, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom13020280>. Acesso em: Setembro/2025.

HAMDI, M. et al. A novel blue crab chitosan/protein composite hydrogel enriched with carotenoids endowed with distinguished wound healing capability: In vitro characterization and in vivo assessment. **Materials science & engineering: C, Materials for biological applications**, v. 113, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110978>. Acesso em: Agosto/2025.

HUBER-LANG, M.; LAMBRIS, J. D.; WARD, P. A. Innate immune responses to trauma. **Nature Immunology**, v. 19, n. 4, p. 327–341, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0064-8>. Acesso em: Julho/2025.

HOU, R. et al. Piezoelectric-triboelectric hybrid nanogenerator based on tough, stretchable BaTiO₃ doped antibacterial hydrogel for self-powered sensors. **Supramolecular Materials**, v. 4, 100096, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.supmat.2025.100096>. Acesso em Outubro/2025.

HUANG, C.; SUN, M.; YANG, Y. et al. Titanium dioxide nanoparticles prime a specific activation state of macrophages. **Nanotoxicology**, v. 11, n. 6, p. 737–750, 2017.

DOI: 10.1080/17435390.2017.1349202. Acesso em: Setembro/2025.

JANMOHAMMADI, M. et al. Cellulose-based composite scaffolds for bone tissue engineering and localized drug delivery. **Bioactive Materials**, v. 20, p. 137-163, 2022. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2022.05.018. Acesso em: Setembro/2025.

J&J MED TECH. **Bone Science & Functions | DePuy Synthes | J&J MedTech IN**. Disponível em: <https://www.jnjmedtech.com/en-IN/your-health-journey-bone-science>. Acesso em: Setembro/2025.

JOHAR, N., AHMAD, I., DUFRESNE, A. Extraction, preparation and characterization of cellulose fibres and nanocrystals from rice husk. **Industrial Crops and Products**, v. 37, n. 1, p. 93-99, 2012. DOI:10.1016/j.indcrop.2011.12.016. Acesso em: Julho/2025.

JUÁREZ-PORTILLA, C., et al. El uso de los animales en la investigación y en la enseñanza: lineamientos y directrices para su manejo. **Revista Eduscientia**. Divulgación de Ciencias en la Educación, v. 2, p. 4–19, 2019. Disponível em: <https://eduscientia.com/index.php/journal/article/view/52>. Acesso em: Setembro/2025.

JULIER, Z., et al. Promoting tissue regeneration by modulating the immune system. **Acta Biomaterialia**, v. 53, p. 13-28, 2017. DOI: 10.1016/j.actbio.2017.01.056. Acesso em: Outubro/2025.

KAPAT, K., et al. Piezoelectric nano-biomaterials for biomedicine and tissue regeneration. **Advanced Functional Materials**, v. 30, n. 1909045, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/adfm.201909045>. Acesso em: Setembro/2025.

KARGOZAR, S. et al. Bone tissue engineering using human cells: a comprehensive review on recent trends, current prospects, and recommendations. **Applied Sciences**, v. 9, p. 174, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/app9010174>. Acesso em: Julho/2025.

KARLADANI, A., et al. The influence of fracture etiology and type on fracture healing: a review of 104 consecutive tibial shaft fractures. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, v. 121, p. 325–328, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1007/s004020000252>. Acesso em: Agosto/2025.

KARSENTY, G. Osteocalcin: A Multifaceted Bone-Derived Hormone. **Annual Review of Nutrition**, v. 43, p. 55-71, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-061121-091348>. Acesso em: Setembro/2025.

KENKRE, J. S.; BASSETT, J. The bone remodelling cycle. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 55, p. 308–327, 2018. DOI: 10.1177/0004563218759371. Acesso em: Outubro/2025.

KHOURI, N. G. et al. Polylactic acid (PLA): properties, synthesis, and biomedical applications – a review of the literature. **Journal of Molecular Structure**, v. 1309, 138243, 2024. DOI: 10.1016/j.molstruc.2024.138243. Acesso em: Setembro/2025.

KIM, J. M. et al. Osteoblast-osteoclast communication and bone homeostasis. **Cells**, v. 9, n. 9, p. 2073, 2020. DOI: 10.3390/cells9092073. Acesso em: Agosto/2025.

KLONOWSKA, J., et al. New cytokines in the pathogenesis of atopic dermatitis—new therapeutic targets. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, 3086, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms19103086>. Acesso em: Agosto/2025.

KODAMA, J.; KAITO, T. Osteoclast multinucleation: review of current literature. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 16, p. 1–35, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21165685>. Acesso em: Julho/2025.

KONG, Y., et al. Wireless localized electrical stimulation generated by an ultrasound-driven piezoelectric discharge regulates proinflammatory macrophage polarization. **Advanced Science**, v. 8, n. 13, 2100962, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/advs.202100962>. Acesso em: Outubro/2025.

LAVANYA, S. et al. Temperature- and pH-responsive chitosan-based injectable hydrogels for bone tissue engineering, **Materials Science and Engineering: C**, v. 111, 2020. DOI: 10.1016/j.msec.2020.110862. Acesso em: Agosto/2025.

LEE, Y. C., et al. Comparing the osteogenic potentials and bone regeneration capacities of bone marrow and dental pulp mesenchymal stem cells in a rabbit calvarial bone defect model. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 20, 5015, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20205015>. Acesso em: Setembro/2025.

LI, K., et al. Alignment of cellulose nanofibers: harnessing nanoscale properties to macroscale benefits. **ACS Nano**, v. 15, n. 3, p. 3646-3673, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c07613>. Acesso em: Agosto/2025.

LI, T.; CHEN, C.; BROZENA, A. H. et al. Developing fibrillated cellulose as a sustainable technological material. **Nature**, v. 590, p. 47–56, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03167-7>. Acesso em: Outubro/2025.

LI, X.; LI, C.; ZHANG, W. et al. Inflammation and aging: signaling pathways and intervention therapies. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 8, 239, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01502-8>. Acesso em: Outubro/2025.

LIN, C. et al. Increased expression of osteopontin in subchondral bone promotes bone turnover and remodeling, and accelerates the progression of OA in a mouse model. **Aging**, v. 14, p. 253-271, 2022. DOI: <https://doi.org/10.18632/aging.203707>. Acesso em: Agosto/2025.

LIN, X., et al.. The bone extracellular matrix in bone formation and regeneration. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00757>. Acesso em: Agosto/2025.

LIU, H.; LI, D.; ZHANG, Y. et al. Inflammation, mesenchymal stem cells and bone regeneration. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 149, p. 393–404, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1643-3>. Acesso em: Julho/2025.

MACIEL, G. B. M.; MACIEL, R. M.; DANESI, C. C. Bone cells and their role in physiological remodeling. **Molecular Biology Reports**, v. 50, p. 2857–2863, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11033-022-08190-7>. Acesso em: Julho/2025.

MAHARJAN, B., et al. Regenerated cellulose nanofiber reinforced chitosan hydrogel scaffolds for bone tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, v. 251, 2021. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.117023. Acesso em: Agosto/2025.

MAHDAVI-JOUIBARI, F., et al. Hopes and opportunities of stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) in cartilage tissue regeneration. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 11, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1021024>. Acesso em: Setembro/2025.

MARINO, A.; BARGER, A.; CIOFANI, G. Piezoelectric nanomaterials: latest applications in biomedicine and challenges in clinical translation. **Nanomedicine**, v. 19, n. 12, p. 1029–1034, 2024. DOI: <https://doi.org/10.2217/nnm-2024-0080>. Acesso em: Outubro/2025.

MARUYAMA, M. et al. Modulation of the inflammatory response and bone healing. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, 386, 2020. DOI: 10.3389/fendo.2020.00386. Acesso em: Agosto/2025.

MCCAULEY, J.; BITSAKTSIS, C.; COTTRELL, J. Macrophage subtype and cytokine expression characterization during the acute inflammatory phase of mouse bone fracture repair. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 38, p. 1693–1702, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/jor.24603>. Acesso em: Julho/2025.

MCGOVERN, J. A.; GRIFFIN, M.; HUTMACHER, D. W. Animal models for bone tissue engineering and modelling disease. **Disease Models & Mechanisms**, v. 11, 2018. DOI: 10.1242/dmm.033084. Acesso em: Setembro/2025.

MEDRADO, N. **Desenvolvimento de biogel osteoindutor com nanopartículas piezoelétricas**. 2020. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2020. Acesso em: Agosto/2025.

MOBINI, S., et al. In vitro effect of direct current electrical stimulation on rat mesenchymal stem cells. **PeerJ**, v. 5, e2821, 2017. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.2821>. Acesso em: Julho/2025.

MOORER, M. C. et al. Defective signaling, osteoblastogenesis and bone remodeling in a mouse model of connexin 43 C-terminal truncation. **Journal of Cell Science**, v. 130, n. 3, p. 531–540, 2017. DOI: 10.1242/jcs.197285. Acesso em: Julho/2025.

MORGAN, E. F.; UNNIKRISSAN, G. U.; HUSSEIN, A. I. Bone mechanical properties in healthy and diseased states. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 20, p. 119–143, 2018. DOI: 10.1146/annurev-bioeng-062117-121139. Acesso em: Agosto/2025.

MORWOOD, A. J. et al. The role of extracellular matrix (ECM) adhesion motifs in functionalised hydrogels. **Molecules**, v. 28, 4616, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules28124616>. Acesso em: Setembro/2025.

NAMJOYNIK, A.; ISLAM, M. A.; ISLAM, M. Evaluating the efficacy of human dental pulp stem cells and scaffold combination for bone regeneration in animal models: a systematic review and meta-analysis. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 14, p. 132, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13287-023-03357-w>. Acesso em: Agosto/2025.

NEMATI, S. et al. Current progress in application of polymeric nanofibers to tissue engineering. **Nano Convergence**, v. 6, 36, 2019. DOI: 10.1186/s40580-019-0209-y. Acesso em: Julho/2025.

NEWMAN, H.; SHIH, Y. V.; VARGHESE, S. Resolution of inflammation in bone regeneration: from understandings to therapeutic applications. **Biomaterials**, v. 277, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.121139>. Acesso em: Setembro/2025.

NGUYEN, D. D. et al. Amination-mediated nano eye-drops with enhanced corneal permeability and effective burst release for acute glaucoma treatment. **Chemical Engineering Journal**, v. 451, 2023.

PAHWA, R.; GOYAL, A.; JIALAL, I. Chronic inflammation. **Treasure Island (FL): StatPearls Publishing**, 2025 Jan—. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493173/>. Acesso em: Agosto/2025.

PROKHOROV, E., et al. Chitosan-BaTiO₃ nanostructured piezopolymer for tissue engineering. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2020. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2020.111296. Acesso em: Agosto/2025.

PUROHIT, S. D. et al. Development of a nanocomposite scaffold of gelatin–alginate–graphene oxide for bone tissue engineering. **International journal of biological macromolecules**, v. 133, p. 592-602, 2019. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.04.113. Acesso em: Setembro/2025.

QIANLI, M., et al. Significance of mechanical loading in bone fracture healing, bone regeneration, and vascularization. **Journal of Tissue Engineering**, 2023. DOI: 10.1177/20417314231172573. Acesso em: Setembro/2025.

QU, H.; FU, H.; HAN, Z.; SUN, Y. Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: a review. **RSC Advances**, v. 9, p. 26252–26262, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1039/C9RA05214C>. Acesso em: Agosto/2025.

RAMESH, N et al. Hydroxyapatite-polymer biocomposites for bone regeneration: a review of current trends. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 106, p. 2046–2057, 2018. DOI: 10.1002/jbm.b.33950. Acesso em: Julho/2025.

RANI, M., et al.. The dynamic inflammatory tissue microenvironment: signality and disease therapy by biomaterials. **Research**, v. 2021, 2021. DOI: 10.34133/2021/4189516. Acesso em: Setembro/2025.

RAZIYEVA, K., et al.. Immunology of acute and chronic wound healing. **Biomolecules**, v. 11, 700, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom11050700>. Acesso em: Agosto/2025.

RICO-LLANOS, G. A. et al. Collagen type I biomaterials as scaffolds for bone tissue engineering. **Polymers**, v. 13, 599, 2021. DOI: 10.3390/polym13040599. Acesso em: Setembro/2025.

ROSSI, M. et al. The endocrine function of osteocalcin regulated by bone resorption: a lesson from reduced and increased bone mass diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 4502, 2019. DOI: 10.3390/ijms20184502.

Acesso em: Julho/2025.

ROY, A. et al., Antibacterial and Dye Degradation Activity of Green Synthesized Iron Nanoparticles. **Journal of Nanomaterials**, 2022. DOI:

<https://doi.org/10.1155/2022/3636481>. Acesso em: Agosto/2025.

SABOURIAN, P., et al. Stimuli-responsive chitosan as an advantageous platform for efficient delivery of bioactive agents. **Journal of Controlled Release**, v. 317, p. 216-231, 2020. DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.11.029. Acesso em: Agosto/2025.

SALAMANCA, E.; HSU, C. C.; HUANG, H. M.; et al. Bone regeneration using a porcine bone substitute collagen composite in vitro and in vivo. **Scientific Reports**, v. 8, 984, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19629-y>. Acesso em: Julho/2025.

SAMADI, A., et al. Comparative review of piezoelectric biomaterials approach for bone tissue engineering. **Journal of Biomaterials Science**, Polymer Edition, v. 33, n. 12, p. 1555–1594, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1080/09205063.2022.2065409>. Acesso em: Setembro/2025.

SATYAMURTHY, P., & VIGNESHWARAN, N. A novel process for synthesis of spherical 23 nanocellulose by controlled hydrolysis of microcrystalline cellulose using anaerobic microbial 24 consortium. **Enzyme and Microbial Technology**, 2013. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2012.09.002. Acesso em: Julho/2025.

SCHLUNDT, C. et al. Clinical and research approaches to treat non-union fracture. **Current Osteoporosis Reports**, v. 16, p. 155–168, 2018. DOI: 10.1007/s11914-018-0432-1. Acesso em: Outubro/2025.

SCHLUNDT, C., et al. Macrophages in bone fracture healing: their essential role in endochondral ossification. **Bone**, v. 106, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.11.012>. Acesso em: Agosto/2025.

SCHULZE, F. et al. Scaffold guided bone regeneration for the treatment of large segmental defects in long bones. **Biomedicines**, v. 11, n. 2, 325, 2023. DOI: 10.3390/biomedicines11020325. Acesso em: Agosto/2025.

SHAO, J. et al. Printable personalized drug delivery patch for the topical therapy of skin diseases. **Matter**, v. 6, p. 158–174, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matt.2022.09.018>. Acesso em: Julho/2025.

SHEEHY, E. J.; KELLY, D. J.; O'BRIEN, F. J. Biomaterial-based endochondral bone regeneration: a shift from traditional tissue engineering paradigms to developmentally inspired strategies. **Materials Today Bio**, v. 3, 100009, mai. 2019. DOI: 10.1016/j.mtbio.2019.100009. Acesso em: Agosto/2025.

SHI, L. et al., Self-Healing Polymeric Hydrogel Formed by Metal–Ligand Coordination Assembly: Design, Fabrication, and Biomedical Applications. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 40, n.7, 2019. DOI: 10.1002/marc.201800837. Acesso em: Agosto/2025.

SIERRA, G. et al. Flexible Piezoelectric Chitosan and Barium Titanate Biocomposite Films for Sensor Applications. **European Journal of Inorganic Chemistry**, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/ejic.202000938>. Acesso em: Julho/2025.

SIMMONS, T.; GOODBURN, B.; SINGHRAO, S. K. Decision tree analysis as a supplementary tool to enhance histomorphological differentiation when distinguishing human from non-human cranial bone in both burnt and unburnt states: a feasibility study. **Medicine, Science and the Law**, v. 56, p. 36–45, 2016. DOI: 10.1177/0025802415589776. Acesso em: Julho/2025.

SMITH, C. et al. The role of bone in energy metabolism: A focus on osteocalcin. **Bone**, v. 188, 2024. DOI: 10.1016/j.bone.2024.117238. Acesso em: Julho/2025.

SOOD, A. et al. Advances in Hydrogel-Based Microfluidic Blood-Brain-Barrier Models in Oncology Research. **Pharmaceutics**, v. 14, p. 993, 2022. DOI: 10.3390/pharmaceutics14050993. Acesso em: Outubro/2025.

ŠROMOVÁ, V.; SOBOLA, D.; KASPAR, P. A brief review of bone cell function and importance. **Cells**, v. 12, p. 2576, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells12212576>. Acesso em: Setembro/2025.

STRANG, H., et al. Role of cytokines and chemokines in wound healing. **Elsevier**, 2020. p. 197–235. DOI:10.1016/B978-0-12-816413-6.00011-3. Acesso em: Setembro/2025.

SUKPAITA, T., et al. Chitosan-Based Scaffold for Mineralized Tissues Regeneration. **Marine Drugs**, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/md19100551>. Acesso em: Julho/2025.

SUZUKI, H. et al. Gene targeting of the transcription factor Mohawk in rats causes heterotopic ossification of Achilles tendon via failed tenogenesis. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 28, p. 7840-7845, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1522054113>. Acesso em: Julho/2025.

SWEARENGEN, J. R. Choosing the right animal model for infectious disease research. **Animal Models and Experimental Medicine**, v. 1, p. 100–108, 2018. DOI: 10.1002/ame2.12020. Acesso em: Agosto/2025.

TAMO, A. K., et al. 3D Printing of Cellulase-Laden Cellulose Nanofiber/Chitosan Hydrogel Composites: Towards Tissue Engineering Functional Biomaterials with Enzyme-Mediated Biodegradation. **Materials**, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ma15176039>. Acesso em: Setembro/2025.

TANDON, B., BLAKER, J., CARTMELL, S. Piezoelectric materials as stimulatory biomedical materials and scaffolds for bone repair. **Acta Biomaterialia**, v. 73, p. 1-20, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.04.026>. Acesso em: Agosto/2025.

TANG, G. et al. Recent Advances of Chitosan-Based Injectable Hydrogels for Bone and Dental Tissue Regeneration. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 2020.

TAGUCHI, T., et al. Regenerative medicine using stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED): a promising new treatment in pediatric surgery. **Surgery Today**, v. 49, p. 316–322, 2019. DOI: 10.1007/s00595-019-01783-z. Acesso em: Outubro/2025.

TAGUCHI, T.; LOPEZ, M. J. An overview of de novo bone generation in animal models. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 39, p. 7–21, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/jor.24852>. Acesso em: Julho/2025.

TAVAKOLI, S.; KLAR, A. S. Advanced Hydrogels as Wound Dressings. **Biomolecules**, v. 10, p. 1169, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.587658>. Acesso em: Julho/2025.

TIAN, B.; LIU, J. Smart stimuli-responsive chitosan hydrogel for drug delivery: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 235, 2023. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.123902. Acesso em: Agosto/2025.

TIMOTHY, C. N.; SAMYUKTHA, P.; BRUNDHA, M. Dental pulp stem cells in regenerative medicine—a literature review. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 12, p. 4052–4056, 2019. DOI:10.5958/0974-360X.2019.00698.X. Acesso em: Setembro/2025.

TOOSI, S.; BEHRAVAN, N.; BEHRAVAN, J. Nonunion fractures, mesenchymal stem cells and bone tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 106, p. 2552–2562, 2018. DOI: 10.1002/jbm.a.36433. Acesso em: Agosto/2025.

USUI, M. et al. Murine and chicken chondrocytes regulate osteoclastogenesis by producing RANKL in response to BMP2. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 23, n. 3, p. 314–325, 2008. DOI: 10.1359/jbmr.071025. Acesso em: Julho/2025.

VASILE, C.; PAMFIL, D.; STOLERU, E.; BAICAN, M. New Developments in Medical Applications of Hybrid Hydrogels Containing Natural Polymers. **Molecules**, v. 25, p. 1539, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25071539>. Acesso em: Agosto/2025.

VO, T. N., TABATA, Y., MIKOS, A. G. Effects of cellular parameters on the *in vitro* osteogenic potential of dual-gelling mesenchymal stem cell-laden hydrogels.

Journal of Biomaterials Science, v. 27, n. 12, p. 1277-1290, 2016. DOI: 10.1080/09205063.2016.1195157. Acesso em: Setembro/2025.

WALTERS, G.; POUNTOS, I.; GIANNOUDIS, P. V. The cytokines and micro-environment of fracture haematoma: current evidence. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 12, p. e1662–e1677, 2018. DOI: 10.1002/term.2593. Acesso em: Outubro/2025.

WILDEMAN, B. et al. Non-union bone fractures. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 7, 57, 2021. DOI: 10.1038/s41572-021-00289-8. Acesso em: Setembro/2025.

WITTIG, N. K.; BIRKEDAL, H. **Acta Crystallographica Section B: Structural Science, Crystal Engineering and Materials**, v. 78, p. 305, 2022. DOI: 10.1107/S2052520622001524. Acesso em: Setembro/2025.

XIAO, L. et al. The bone extracellular matrix in bone formation and regeneration. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00757>. Acesso em: Julho/2025.

XUAN, L.; JU, Z.; SKONIECZNA, M.; ZHOU, P.-K.; HUANG, R. Nanoparticles-induced potential toxicity on human health: applications, toxicity mechanisms, and evaluation models. **MedComm**, v. 4, e327, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1002/mco2.327>. Acesso em: Agosto/2025.

YAMAKAWA, D. et al. Effects of helioxanthin derivative-treated human dental pulp stem cells on fracture healing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, p. 9158, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21239158>. Acesso em: Julho/2025.

YANG, C.; JI, J.; LV, Y.; LI, Z.; LUO, D. Application of piezoelectric material and devices in bone regeneration. **Nanomaterials**, v. 12, n. 4386, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/nano12244386>. Acesso em: Agosto/2025.

YANG, X.; MA, Y.; GUO, W.; YANG, B.; TIAN, W. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth as an alternative cell source in bio-root regeneration. **Theranostics**, v. 9, p. 2694–2711, 2019. DOI: 10.7150/thno.31801. Acesso em: Setembro/2025.

YANG, Y., XU, L., WANG, J., MENG, Q., ZHONG, S., GAO, Y., CUI, X. Recent advances in polysaccharide-based self-healing hydrogels for biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 283, p. 119161, 2022. DOI: 10.1016/j.carbpol.2022.119161. Acesso em: Julho/2025.

YANG, Z.; HE, X.; CHEN, Y.; ZHU, M.; XU, P. 3D-printed piezoelectric scaffolds composed of uniform core-shell structured BaTiO₃@ bioactive glasses particles for bone regeneration. **Ceramics International**, v. 50, n. 11, parte A, p. 18303-18311, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2024.02.314>. Acesso em: Agosto/2025.

YAZDANPANA, Z.; JOHNSTON, J. D.; COOPER, D. M. L.; CHEN, X. 3D bioprinted scaffolds for bone tissue engineering: state-of-the-art and emerging technologies. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.845133>. Acesso em: Agosto/2025.

YU, T. et al. The delivery of RNA-interference therapies based on engineered hydrogels for bone tissue regeneration. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00445>. Acesso em: Agosto/2025.

YU, C., et al. Synthesis of Gallic Acid-Loaded hitosan-Grafted-2-Acrylamido-2-Methylpropane Sulfonic Acid Hydrogels for Oral Controlled Drug Delivery: In Vitro Biodegradation, Antioxidant, and Antibacterial Effects. **Gels**, v. 8, n. 12, p. 806, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/gels8120806>. Acesso em: Julho/2025.

YUE, S. et al. Hydrogel as a Biomaterial for Bone Tissue Engineering: A Review. **Nanomaterials**, v. 10, p. 1511, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/nano10081511>. Acesso em: Agosto/2025.

YUAN, Y.; ZHANG, Q.; LIN, S.; LI, J. Water: the soul of hydrogels. **Progress in Materials Science**, v. 148, 101378, 2025. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2024.101378>. Acesso em: Julho/2025.

ZANETTE, R., et al., Cytocompatible and osteoinductive cotton cellulose nanofiber/chitosan nanobiocomposite scaffold for bone tissue engineering, **Biomedical Materials**, 2023. DOI: 10.1088/1748-605X/aceac8. Acesso em: Maio/2025.

ZHANG, H. et al. Developing natural polymers for skin wound healing. **Bioactive Materials**, v. 33, p. 355–376, 2023. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2023.02.038>. Acesso em: Agosto/2025.

ZHANG, H., MAO, Z., ZHOU, W. Chitosan nanoparticle loaded with luciferase plasmid DNA as a potential non-viral vector for gene delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 8, n.1, p. 63-72, 2011. Acesso em: Junho/2025.

ZHANG, J., et al. Bone formation and bone repair: The roles and crosstalk of osteoinductive signaling pathways. **Process Biochemistry**, v. 118, p. 252-262, 2022. DOI: 10.1016/j.procbio.2022.04.033. Acesso em: Agosto/2025.

ZHAO, X. et al. Chitosan hydrogel-loaded MSC-derived extracellular vesicles promote skin rejuvenation by ameliorating the senescence of dermal fibroblasts. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 12, n. 1, p. 196, 2020. DOI: 10.1186/s13287-021-02262-4. Acesso em: Agosto/2025.

ZHAO, L., et al. Natural Polymer-Based Hydrogels: From Polymer to Biomedical Applications. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 10, p. 2514, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15102514>. Acesso em: Setembro/2025.

ZHOU, X. et al. Fabrication of polylactic acid (PLA)-based porous scaffold through the combination of traditional bio-fabrication and 3D printing technology for bone regeneration. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 197, 111420, 2021. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2020.111420. Acesso em: Agosto/2025.

ZHU, G. et al. Bone physiological microenvironment and healing mechanism: basis for future bone-tissue engineering scaffolds. **Bioactive Materials**, v. 6, n. 11, p. 4110–4140, abr. 2021. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.03.043. Acesso em: Agosto/2025.

ZHU, Y., ZHANG, Y., ZHOU, Y. Application Progress of Modified Chitosan and Its Composite Biomaterials for Bone Tissue Engineering. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 12, p. 6574, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23126574>. Acesso em: Agosto/2025.

ZHU, Y. S. et al. Osteonectin bidirectionally regulates osteoblast mineralization. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 18, n. 1, p. 761, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13018-023-04250-1>. Acesso em: Setembro/2025.

ZOU, W., et al. Cytocompatible chitosan based multi-network hydrogels with antimicrobial, cell anti-adhesive and mechanical properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 202, p. 246-257, 2018. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.08.124. Acesso em: Julho/2025.