

Osteoblastos humanos cultivados sobre arcabouços à base de nanotubos de carbono superhidrofílicos e nanohidroxiapatita

Human osteoblasts cultivated on biomineralized nanohydroxyapatite/superhydrophilic carbon nanotube scaffolds

Gislene R. Silva¹, Fernanda Roberta Marciano¹, Cristina Pacheco-Soares¹, Anderson de O. Lobo¹

Resumo

Nanocompósitos à base de nanotubos de carbono verticalmente alinhados de paredes múltiplas superhidrofílicos (VAMWCNT-O) e nano-hidroxiapatita (nHAp) (nHAp/ VAMWCNT-O) são de grande interesse em medicina óssea regenerativa. A biomineralização utilizando fluido corporal simulado (SBF) vem sendo extensivamente estudado para avaliar a bioatividade de biomateriais. A combinação de nanocompósitos nHAp/VAMWCNT biomineralizados torna-se-ão atraentes e promissores. O objetivo deste estudo foi avaliar a adesão de osteoblastos humanos (HOB) e expressão de fosfatase alcalina in vitro quando cultivados sobre nanocompósitos à base de nHAp/VAMWCNT-O antes e após o período de biomineralização em SBF. A calcificação da matriz extracelular in vitro de células de osteoblastos humanos (HOB) após 7 dias em cultura foi investigada através do ensaio de fosfatase ácida/alcalina. Os arcabouços nHAp/VAMWCNT-O biomineralizados apresentaram maior calcificação da MEC do que os filmes de VAMWCNT-O, nanocompósitos nHAp/VAMWCNT-O e controle de HOB. Estes resultados validam e tornam promissor o processo de biomineralização in vitro dos nanocompósitos nHAp/VAMWCNT-O biomineralizados como arcabouços na regeneração do tecido ósseo.

Palavras-chave: Nanotubos de carbono; Nano-hidroxiapatita; SBF; Osteoblasto; Calcificação; Adesão celular.

Abstract

Nanocomposites based on superhydrophilic vertically aligned multi-walled carbon nanotubes (VAMWCNT-O) and nano-hydroxyapatite (nHAp) are of great interest in bone regenerative medicine. The biomineralization using simulated body fluid (SBF) has been extensively studied to evaluate the bioactivity of biomaterials. The combination of nHAp and VAMWCNT-O is attractive and promising. The aim of this study was to evaluate the in vitro human osteoblast (HOB) adhesion and phosphatase alkaline expression when cultivated on nHAp/VAMWCNT-O nanocomposites before and after the biomineralization into SBF. We also investigated in vitro calcification of the extracellular matrix of HOB cells in culture after 24 hours through the assay of alkaline phosphatase. These promising in vitro results validate biomineralized nHAp/VAMWCNT-O as possible scaffolds for bone tissue regeneration.

Keywords: Carbon nanotubes; Nano-hydroxyapatite; SBF; Osteoblast; Calcification; Cell adhesion.

¹Universidade do Vale do Paraíba – São José dos Campos/SP – Brasil.
Autor correspondente: Anderson O. Lobo – Email: aolobo@univap.br

Introdução

Nanotubos de carbonos (CNT) são estruturas tubulares formadas por arranjos hexagonais de carbono, podendo ser classificados em dois tipos: nanotubos de carbono de paredes simples (SWCNT) e nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT)⁽¹⁻⁶⁾. Os MWCNT são de particular interesse na medicina regenerativa por preservar as propriedades biológicas e permitirem o extenso crescimento, espalhamento e adesão de células, além de possuírem excelente biocompatibilidade celular⁽⁷⁾. Estudos com MWCNT demonstram que os materiais contêm característica e propriedades que suportam o crescimento de células osteoblásticas, estimulando a produção de matriz extracelular (MEC) na formação de tecido ósseo e o crescimento de cristais de hidroxiapatita⁽⁸⁾.

As propriedades de biocompatibilidade dos MWCNT ficam melhores quando se está na forma alinhada (VAMWCNT) e com superhidrofilicidade (VAMWCNT-O)⁽⁴⁾.

Os VAMWCNT-O têm uma combinação excepcional de propriedades mecânicas e químicas, elevada relação de aspecto, a porosidade nanométrica e biocompatibilidade⁽⁵⁾. Esta combinação e seu tamanho nanométrico tem o papel importante no estudo da regeneração de tecido ósseo.

A hidrofilicidade é um fator que favorece diretamente os eventos celulares intrínsecos. A melhor molhabilidade aumenta a superfície de contato entre os nanobiomateriais e as proteínas de adesão celular. Esses fenômenos são importantes para que ocorra a migração, proliferação e diferenciação celular⁽⁴⁾.

A nano-hidroxiapatita (nHAp) é um mineral que favorece o crescimento osseo, é biocompatível e bioativo, e tem aplicação na regeneração óssea por estabelecer ligações químicas entre o material e o tecido osseo permitindo a proliferação celular⁽⁴⁾. A associação de VAMWCNT-O com a nHAp tornam-se emergentes para associar o potencial biomimético com propriedades mecânicas⁽⁵⁾.

Além da aplicação dos nanocompósitos nHAp/VAMWCNT-O como arcabouços, o processo de biomineralização de biomateriais realizado pela incubação das amostras em SBF (com concentrações iônicas semelhantes ao líquido extracelular humano) auxilia no desenvolvimento de apatitas biológicas na superfície dos nanocompósitos nHAp/VAMWCNT-O melhorando a adesão

e proliferação celular em ensaios in vitro com células de osteoblastos humanos⁽⁹⁻¹²⁾.

Os osteoblastos são células de revestimentos responsáveis pela síntese dos componentes orgânicos da matriz óssea. Liberam fibronectinas que têm como característica a habilidade de formar a calcificação óssea e aumentar a liberação de fosfatase alcalina⁽¹³⁾.

A fosfatase alcalina é uma enzima responsável pela proliferação e renovação celular, esta distribuída nos tecidos humanos, principalmente na mucosa intestinal, fígado (canalículos biliares), túbulos renais, baço, ossos (osteoblastos) e placenta, de modo que nos ossos a atividade da mesma está confinada aos osteoblastos onde ocorre a formação óssea⁽¹⁴⁾.

Objetivo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de calcificação da MEC de osteoblastos humanos cultivados sobre a nova classificação de nanobiomateriais representada pelos nanocompósitos de nHAp/VAMWCNT-O biomineralizados visando sua utilização como arcabouços na regeneração do tecido ósseo.

Metodologia

O processo de produção dos VAMWCNT foi realizado no Laboratório Associado de Sensores e Materiais do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. Para o crescimento do filme de VAMWCNT utilizou-se um reator de plasma de microondas. Utilizaram-se ligas de TiAl4V (ASTM, F136) como substrato. Como catalisadores metálicos, para consequente nucleação dos VAMWCNT, utilizou-se o depósito de uma camada de 10 nm de Ni. Os VAMWCNT foram nucleados em duas etapas, denominadas, pré-tratamento e deposição, respectivamente. Na etapa de pré-tratamento, o objetivo foi criar nanoilhas do material catalisador, a partir das quais os nanotubos puderam ser nucleados. Antes de iniciar esse processo, foram inseridos 90 sccm (centímetros cúbicos por minuto) de H_2 + 10 sccm de N_2 a uma pressão de 4×10^3 Pa, aquecendo o porta-amostra com uma resistência elétrica até atingir uma temperatura aproximada de 300°C. Na fase de pré-tratamento, com duração de 5 minutos, a potência do gerador de microondas foi mantida em 800 W e a

temperatura atingiu cerca de 760°C. Na etapa de deposição, 14 sccm de CH₄ foram adicionados como fonte de carbono por 1 minuto⁽⁴⁾.

Para obtenção da superhidrofilicidade, ocorreu a funcionalização dos VAMWCNT (VAMWCNT-O), utilizando o sistema de plasma de O₂ DC-pulsado, nos parâmetros experimentais desenvolvido por Lobo⁽⁴⁾: Tempo de tratamento a plasma: 2 minutos, Tensão aplicada: - 400V e Pressão de trabalho: 80 mTorr.

Utilizou-se a técnica de eletrodeposição de nHAp sobre os VAMWCNT-O₂, desenvolvidas por Lobo⁽⁴⁾. A eletrodeposição de nHAp foi realizada no Laboratório de Nanotecnologia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP). Para a produção do eletrólito utilizou-se os reagentes Ca(NO₃)₂·4H₂O e NH₄H₂PO₄ (Sigma-Aldrich®). Salienta-se que para a preparação do eletrólito utilizou-se a razão Ca/P da nHAp estequiométrica. O pH da solução eletrolítica foi em torno de 4,8.

O processo de deposição eletroquímica foi realizado em um Potenciostato/Galvanostato (AUTOLAB, PGSTAT 128N, HOLANDA), operando em modo Potenciostático.

Para a eletrodeposição de nHAp, foram utilizado como ânodo VAMWCNT-O (15mm x 15mm x 1mm) acoplado à um porta-eletrodo (formato de cachimbo), de teflon, com uma área exposta, um círculo com 2,8x10⁻⁵ m². O processo foi realizado com uma estação de trabalho eletroquímica fornecendo uma energia de corrente contínua no potencial de -2,0 V, durante 1800 segundos. Utilizou-se como contra-eletrodo um bastão de platina com 5x10⁻² m de comprimento e 2x10⁻⁴ m de diâmetro. Manteve-se a temperatura do eletrólito à 80°C durante todo o processo.

A biomineralização dos nHAp/VAMWCNT-O foi realizada pela imersão das amostras em solução de SBF. A solução foi preparada pela mistura de íons em água destilada, em chapa de agitação, medindo o pH com o auxílio do peagâmetro, para obtenção do pH 6,12 em temperatura de 28°C. A composição do SBF está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Quantidade de reagentes para a preparação do SBF.

Reagente	Quantidade (mM)
NaCl	733,5
MgCl ₂	7,5
CaCl ₂ ·2H ₂ O	12,5
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	5
NaHCO ₃	21

Os nanocompósitos de nHAp/VAMWCNT-O alocados nos respectivos tubos corning foram levados à câmara de fluxo laminar de radiação ultravioleta (UV) (modelo BioProtector-12 Plus VECO) por 30 minutos. Após este período, com o auxílio de uma pinça, cada amostras foi colocada em um tubo corning, com 20 mL de SBF, e acondicionadas em incubadora refrigerada de bancada (marca Cientec, modelo CT-712-R). Os tubos foram agitados na incubadora à 75 rpm, em temperatura de 36,5°C pelo período de 7, 14 e 21 dias, para ocorrer o processo de biomineralização dos nHAp/VAMWCNT-O. Após a incubação as amostras foram retiradas da solução de SBF e levadas a estufa (modelo sp400 SPLABOR) a 50°C para secagem.

Para os ensaios biológico foram utilizados células de HOB cultivadas, em garrafas de cultura de células de 25 cm³ em Meio DMEM baixa glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico antimicótico, incubados em estufa (modelo 3110 Forma Scientific), em atmosfera controlada de CO₂ a 5% e temperatura a 37°C para obter a população ideal para o experimento. As células de HOB foram replicadas a partir da contagem inicial e o meio de cultura substituído a cada 48 horas, para melhores condições de proliferação e viabilidade celular. Os testes de cultura de células foram desenvolvidos no Laboratório de Dinâmica de Comportamento Celulares do IP&D da UNIVAP, supervisionados pela Prof^a Dra. Cristina Pacheco-Soares.

Sobre As células HOB foi adicionado tripsina por 3 minutos, feito jatos para soltar as células da garrafa de cultura, com auxílio de uma pipeta foi colocada em tubos corning e centrifugadas por 5 minutos para separação das células, em seguida foram resuspendidas em Meio DMEM baixa glicose (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico antimicótico. O volume de 10 µL foi aplicado à Câmara de Newbauer e levado a contagem das células de HOB no microscópio invertido (marca Olympus CK 40) e determinada a concentração de 4,0 x 10⁵ cel/mL. As amostras foram divididas em 4 grupos: VAMWCNT-O, nHAp/VAMWCNT-O e nHAp/VAMWCNT-O biomineralizados nos respectivos tempos de incubação (7, 14 e 21 dias) e o controle (células de HOB). A seguir, as amostras foram distribuídas nos poços de 3 placas de 24 poços e semeadas sobre cada uma a concentração de 4,0 x 10⁵ cel/mL e levadas a estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 30 minutos para proporcionar maior adesão. Após o período de adesão, nas amostras

foram acrescentadas meio DMEM baixa glicose (Gibco) até completar o volume de 500 μ L e incubadas na estufa nos tempos de 24 horas, 48 horas e 7 dias. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Para o teste de atividade da Fosfatase alcalina (ALP), foram preparadas as soluções 1 e 2 do Kit de ensaio de Fosfatase Ácida/Alcalina (marca Millipore), conforme o manual do produto. Nos tempos determinados (24 horas, 48 horas e 7 dias) as placas foram retiradas da estufa, em cada poço foram adicionados 25 μ L da solução 2 e 100 μ L da solução 1, a placa foi coberta com papel alumínio e aguardou 15 minutos em temperatura ambiente. A seguir as amostras foram levadas para análise imunohistoquímica em aparelho Leitor de microplacas (Synergy HT Multi-Detection, marca Bio-Tek, Winooski, VT) na absorvância de 620nm.

Para a realização das análises estatísticas foram coletadas quatro diferentes leituras, com N = 4 e, expressos como a média. Para a quantificação da calcificação da matriz extracelular utilizou-se o teste de ALP. As diferenças estatísticas foram analisadas pelo Programa Origin 8.0[®]. A população dos grupos foi analisada com distribuição normal e independente para cada experimento. Os valores de p menores que 0,005 foram considerados para indicação de diferenças estatísticas dos grupos analisados.

Para os testes de adesão celular sobre o nanocompósito nHAp/VAMWCNT-O as células HOB cultivadas e semeadas em cada poço a 5×10^5 células / mL, suplementado com 10% de PBS. A incubação foi realizada sob CO₂ atmosfera (5%) a 37°C.

Para a análise da adesão por Microscopia de Varredura as células foram fixadas com 3% de glutaraldeído 0.1% M cacodilato de tampão, durante 1 hora e desidratado em série graduada de solução em etanol (30%, 50%, 70%, 95% e 100%) durante 10 minutos. A fase de secagem utilizada uma solução de 1:1 de etanol com hexametildisilazano (HMDS) e por último o HMDS puro e deixado evaporar a temperatura ambiente, depois foi realizado uma fina camada de ouro, para serem examinadas no MEV (modelo JEOL-JSM 5610 VPI). As micrografias foram coletadas com ampliação de 1.000 - 4.000 x.

Para análise imunohistoquímica as células foram fixadas com soluções contendo: 1,1 mL de tampão cacodilato de sódio, 100 mL de glutaraldeído e 800 mL de paraformaldeído a 4% mL. Para a imunomarcagem as amostras foram incubadas com anticorpo primário Faloidina (Sigma-Aldrich). incubado a temperatura ambiente, no

escuro, por 1 hora. Após este período as amostras foram lavadas com PBS em temperatura ambiente. Para a marcação do DNA foi utilizado o DAPI (4'-diamidino-2-phenylindole, Sigma-Aldrich) por 10min. Após, o microscópio confocal invertido de fluorescência (LSM 510 Axiovert 200 M, Carl Zeiss) foi utilizado nos comprimentos de onda: λ de 560nm (vermelho) e λ de 460 nm (azul), de acordo com o fluorocromo.

Resultados

Os ensaios de liberação e atividade da ALP foram realizados com o objetivo de avaliar o potencial de calcificação da MEC. A ALP é avaliada pela liberação da detimolftaleína por hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato.

A Fig. 1A apresenta os resultados da atividade de ALP nas amostras: VAMWCNT-O, nHAp/VAMWCNT e nHAp/VAMWCNT biominealizados nos respectivos tempos de incubação (7, 14 e 21 dias) e o controle. Os grupos de amostras foram utilizados para comparações de calcificação da matriz, buscando a validação dos nanobiomateriais desenvolvidos, seja pela aplicação de nHAp e/ou pelo processo de biomineralização aplicado. As células de HOB incubaram no material por 24 horas, 48 horas e 7 dias, em todos os grupos analisados.

A Fig. 1B apresenta os resultados da calcificação da MEC em porcentagem em relação ao controle (células) e expressos em porcentagem de acordo com cada grupo apresentadas em (μ mol de timolftaleína/h/mg).

O teste de adesão foi realizado com o objetivo de mostrar a interação das células cultivadas sobre os nanobiomateriais.

A Fig. 2 apresenta as micrografias da HOB cultivadas sobre os nHAp/VAMWCNT-O biominealizados nos tempos de 7, 14 e 21 dias na Microscopia de Varredura. A micrografia 2A apresenta a célula com suas projeções citoplasmáticas, mostrando um bom processo de proliferação, também é possível observar cristais de nHAp sobre nHAp/VAMWCNT-O-7D. Está muito evidente na micrografia 2B a interação da célula com os cristais de nHAp, onde é possível observar todas projeções citoplasmáticas entre os cristais do nHAp/VAMWCNT-O-14D. A Fig. 2C apresenta a HOB com suas projeções alongadas fazendo interação com os cristais de nHAp.

A Microscopia de Fluorescência foi apresentada na Fig. 3. Na Fig. 3A é possível ver em azul o núcleo celular bem evidente. A Fig. 3B apresenta o citoplasma celular em vermelho.

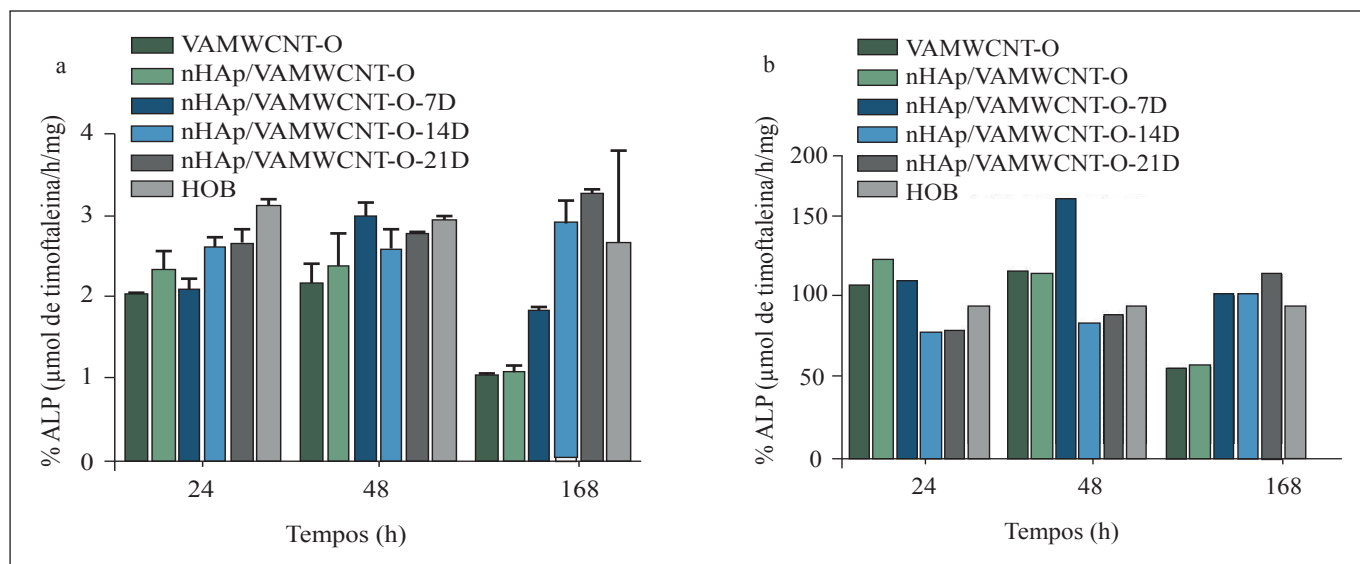


Figura 1. Comparação do crescimento celular nas amostras em absorvância de 620nm (a) e Comparação da calcificação da MEC em porcentagem (a).

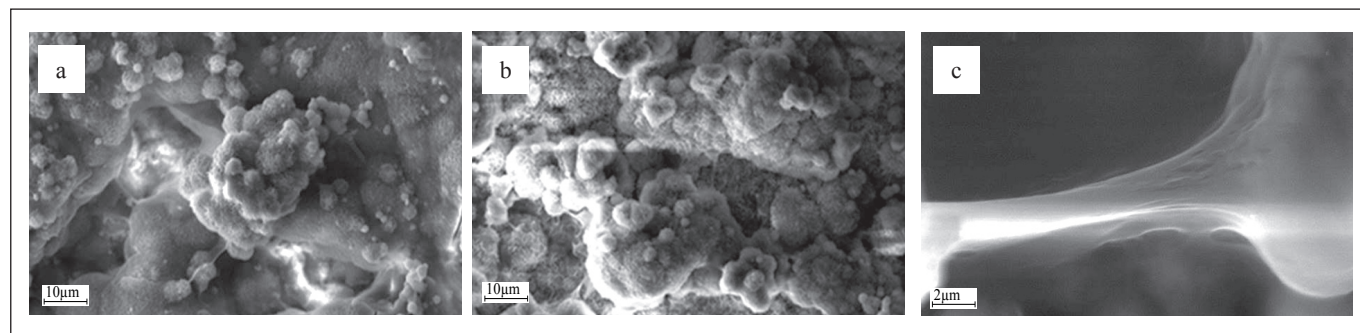


Figura 2. Micrografias da HOB sobre o nHAp/VAMWCNT-O biomineralizados, (a) 7 dias, (b) 14 dias e (c) 21 dias.

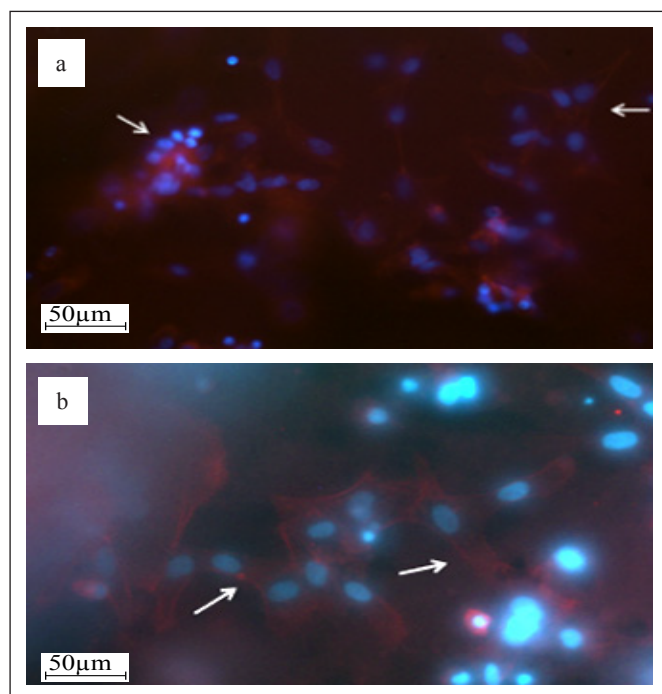


Figura 3. Microscopia de Fluorescência, (a) Núcleo da célula em azul e (b) Citoplasma celular em vermelho.

Discussão

Na comparação entre os grupos, identificou-se que a ALP apresentou valores superiores para nHAp/VAMWCNT biomineralizados por 14 e 21 dias de incubação em SBF, identificadas a partir de 48h de incubação com as células de HOB. Verifica-se no período de 7 dias de incubação com HOB uma elevada calcificação da MEC para as amostras de nHAp/VAMWCNT biomineralizados por 14 e 21 dias de incubação em SBF.

A amostra de nHAp/VAMWCNT biomineralizado por 7 dias de SBF apresentou um pico de calcificação da MEC com 48h de incubação de HOB, porém declinou no período de 7 dias de incubação com HOB. As demais amostras não apresentaram potencial de calcificação da MEC tão intenso quanto as amostras de nHAp/VAMWCNT biomineralizados por 7, 14 e 21 dias de incubação em SBF⁽¹¹⁾.

Xiaoming e colaboradores⁽¹⁵⁾ realizaram o teste da ALP em CNT e observaram no seu estudo que as células de osteoblasto apresentaram maior proliferação nas amostras de VAMWCNT do que em outro biomaterial como foi possível visualizar no nosso trabalho afirmando o que já foi encontrado na literatura.

Em outros estudos^(15,16), para a análise de ALP utilizaram uma absorvância de 405nm, em nosso estudo realizamos análises da ALP em 3 absorvâncias diferentes e tivemos um melhor resultado com a absorvância de 620nm conforme indicação do produto.

A Fig. 1B mostra os valores na comparação da calcificação da MEC em porcentagem das amostras estudadas. Como mostra que as amostras de nHAp/VAMWCNT biomineralizadas apresentaram maior expressão de ALP na cultura de células osteoblásticas humanas.

Nos tempos de 24 e 48 horas os VAMWCNT, nHAp/VAMWCNT e nHAp/VAMWCNT biomineralizados de 7 dias apresentaram uma calcificação da MEC acima de 13% do controle (células), as amostras de nHAp/VAMWCNT biomineralizados de 14 e 21 dias apresentaram 17% menores que as células.

Nos tempo de 7 dias as amostras nHAp/VAMWCNT biomineralizados de 7, 14 e 21 dias apresentaram 7% a mais que as células na calcificação MEC, sendo que no nHAp/VAMWCNT biomineralizados de 21 dias de incubação de SBF apresentou 22% da calcificação da MEC superior as células. Já as amostras VAMWCNT e nHAp/VAMWCNT teve uma queda de 41% na calcificação tendo as células como controle.

Como foi possível ver, as amostras de nHAp/VAMWCNT biomineralizados de 7 dias apresentaram melhor calcificação da matriz celular em todos os tempos.

Os testes de ALP, MEV e MF mostraram que as propriedades físico-químicas do VAMWCNT e nHAp favorecem na proliferação e adesão celular⁽¹⁷⁾.

Conclusão

Estes resultados indicam que os nanocompósitos de nHAp/VAMWCNT biomineralizados apresentaram maior expressão de ALP na cultura de células osteoblásticas humanas (HOB), indicando potencial de biomineralização *in vitro* diferenciado em relação ao controle de células e as amostras de VAMWCNTs não biomineralizados. A expressão de ALP foi mais evidente e crescente nas amostras que estiveram em solução de SBF por 14 e 21 dias, de forma que neste período de incubação se obteve um referencial expressivo sobre a calcificação da MEC induzida pelo processo de biomineralização em solução de SBF.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2011/17877-8) e (2011/20345-7) pelo suporte financeiro e ao Laboratório Associado de Sensores e Materiais do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais pelo espaço cedido para a produção e modificação superficial dos nanotubos de carbono.

Referências

1. Barbosa, G.M., Avaliação dos efeitos de nanotubos de carbono de parede múltipla carboxilados em células do sistema imunológico – Santa Maria, 2010. 50f. : il. Dissertação (Mestrado em Nanociências) – Centro Universitário Franciscano, 2010.
2. Filho, A. G. S.; Fagan, S.B., Funcionalização de nanotubos de carbono, Quim. Nova, Vol. 30, No. 7, 1695-1703, 2007
3. Herbst, M. H.; Macêdo, M. I. F.; Rocco, A. M., Tecnologia dos nanotubos de carbono: tendências e perspectivas de uma área multidisciplinar, Quim. Nova 2004, 27, 986.
4. Lobo, A.O., Obtenção de super-hidrofilicidade em nanotubos de carbono alinhados e sua aplicação como nanobiomaterial - São José dos Campos, 2011. 208f. Tese de doutorado – Instituto Tecnológico de Aeronáutica, 2011.
5. Qia H. J. et al., Determination of mechanical properties of carbon nanotubes and vertically aligned carbon nanotube forests using nanoindentation. J Mech Phys Solids. 2003;51(11-12):2213-37
6. Pereira, P.C.D., Biocompatibilidade e principais aplicações dos nanotubos de carbono – Belo Horizonte, 2009. Monografia do título de Especialista em Microbiologia - Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.
7. Oliveira, V. et al., Nanotubos de carbono aplicados as neurociências: perspectivas e desafios. Rev Psiquiatr. 2011;38(5):201-6
8. Beuvelot, J. et al., In vitro calcification of chemically functionalized carbon nanotube. Acta Biomaterialia 6 (2010) 4110-4117

9. Mendes, R. M. et al., Effects of single wall carbon nanotubes and its functionalization with sodium hyaluronate on bone repair. *Life Sciences* 87 (2010) 215–222
10. WEeI, G. et al., Biomimetic growth of hydroxyapatite on super water-soluble carbon nanotube-protein hybrid nanofibers. *Carbon* 49 (2011) 2216–2226
11. Irineu, J.A.F. et al., Efficient method to produce biomineralized nanohy- droxyapatite/vertically aligned multiwalled carbon nanotube scaffolds. *Materials Letters* 79 (2012) 166–169
12. Marsi, T.C.O., Biomineralização de nanotubos de carbono superhidrofílicos verticalmente alinhados – São José dos Campos, 2012. Dissertação de Mestrado em Engenharia Biomédica – Universidade do Vale do Paraíba, 2012.
13. Rosa, Z.M.A., Isolamento, cultivo, caracterização citoquímica e resposta de células osteoblásticas à irradiação de Laser de Baixa Potência – São José dos Campos, 2004. 106p.:Il.
- Dissertação de Mestrado em Engenharia Biomédica – Universidade do Vale do Paraíba, 2004.
14. Motta, V.T., *Bioquímica Clínica: Princípios e Interpretações* – Disponível em <http://www.labclinisul.com.br/artigos/Bioq.Clinica%20-%20Enzimas.pdf> acesso em 29/08/12.
15. Xiaoming, L. et al., The use of carbon nanotubes to induce osteogenic differentiation of human adipose-derived MSCs in vitro and ectopic bone formation in vivo. *Biomaterials* 33 (2012) 4818 e 4827.
16. Yan, L. et al., Resveratrol-conjugated poly-e-caprolactone facilitates in vitro ineralization and in vivo bone regeneration. *Acta Biomaterialia* 7 (2011) 751–758.
17. Lobo, A.O. et al., An evaluation of cell proliferation and adhesion on vertically-aligned multi-walled carbon nanotube films. *Carbon* 48, (2010) 245 – 254.