



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**CONTRIBUIÇÃO PARA A AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DE
NANOFIBRAS DE CELULOSE COM APLICAÇÃO EM MEDICINA
DENTÁRIA**

Trabalho submetido por
Madalena Félix Vilar
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Outubro de 2018



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**CONTRIBUIÇÃO PARA A AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DE
NANOFIBRAS DE CELULOSE COM APLICAÇÃO EM MEDICINA
DENTÁRIA**

Trabalho submetido por
Madalena Félix Vilar
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Professor Doutor Sérgio Antunes Félix

e coorientado por
Doutora Maria João Silva

Outubro de 2018

Family all together

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, obrigada ao meu orientador Professor Doutor Sérgio Félix por acreditar na minha ideia e confiar no meu trabalho e por todo o apoio prestado.

À minha coorientadora Doutora Maria João Silva, porque sem ela este trabalho não teria sido, de todo, possível. Obrigada por todo o conhecimento, apoio, integração e pela oportunidade incrível que me concedeu.

Ao Instituto Universitário Egas Moniz e ao Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge pelo apoio disponibilizado em meios e materiais para a realização desta dissertação.

Um agradecimento ao Doutor Paulo Ferreira e à Mestre Ana Filipa Lourenço por tão gentilmente me terem cedido as nanoceluloses que utilizei neste trabalho e por se mostrarem sempre disponíveis para esclarecimentos.

À equipa de Toxicologia Genética do INSA, por toda a ajuda prestada. Um obrigada especial à Célia, cuja ajuda foi indispensável e que com a sua boa disposição e alegria diárias tornaram melhores até os dias mais difíceis.

Obrigada ao João Lavinha pela oportunidade e por me ter encaminhado quando a minha ideia era apenas uma semente do que podia ser.

Aos professores Joana Carvalho e José Reis, obrigada por me terem feito crescer, por terem confiado nas minhas capacidades e pela amizade que sei que permanecerá.

Obrigada aos meus amigos por ainda estarem aí apesar de tantos planos furados.

À Margarida, por me aturar todos os dias e mesmo assim gostar de mim. Por me ouvir, por me fazer rir e por me apoiar incondicionalmente.

Às minhas irmãs e aos meus sobrinhos, por serem uma constante fonte de felicidade e por me encherem os dias de tanto amor. Aos meus cunhados por completarem o puzzle da família de forma tão bonita e competente.

E finalmente, aos meus pais. Por tudo e mais alguma coisa. Por acreditarem em mim, por me apoiarem, por me ouvirem, por me amarem incondicionalmente, por me puxarem para a terra quando preciso, mas fazendo-me sempre crer que nem o céu é o limite.

O trabalho experimental conducente a esta dissertação foi realizado no âmbito do projeto ToxApp4NanoCELF1 (PTDC/SAU-PUB/32587/2017) financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia.

RESUMO

A nanomedicina é a aplicação da nanotecnologia à prevenção, diagnóstico e tratamento de patologias. A *nanodentistry* é a nanomedicina aplicada à área da medicina dentária. Apesar da recente expansão de ambas, o seu progresso tem de vir acompanhado da avaliação da segurança dos nanomateriais utilizados, em fases precoces do seu desenvolvimento ou aplicação num produto. A celulose é um material natural que se encaixa na tendência global de sustentabilidade: ecológico, abundante e de baixo custo. Particularmente, as nanofibras de celulose (CNF) apresentam ótimas propriedades físico-químicas e têm sido usadas, entre outras aplicações, para o reforço de materiais restauradores ou como constituintes de matrizes e membranas para regeneração óssea e periodontal. Apesar da CNF bacteriana ser atualmente mais utilizada para fins biomédicos, a CNF proveniente de plantas (PC) tem surgido em forte competição, em termos económicos. Apesar disso, a PC apresenta maiores preocupações de biossegurança, devido à sua constituição e aos seus métodos de obtenção.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a biossegurança de duas CNF obtidas por diferentes métodos, através da análise do seu potencial cito- e genotóxico em osteoblastos humanos.

As duas amostras foram obtidas a partir de pasta industrial branqueada de *Eucalyptus globulus*, através de dois métodos – oxidação mediada por TEMPO e hidrólise enzimática. A citotoxicidade foi aferida pelo ensaio do MTT e a genotoxicidade pelo ensaio do micronúcleo com bloqueio da citocinese.

Nenhuma das CNF demonstrou ser citotóxica, independentemente da dose e do tempo de exposição. Nas concentrações mais baixas, observou-se um aumento da frequência de células micronucleadas e de pontes nucleoplasmáticas, induzidas por ambas as CNF, o que sugere que são genotóxicas.

Com este trabalho contribuiu-se para a caracterização da toxicidade de duas novas CNF, permitindo a alteração de algumas características, de modo a obter CNF seguras para a saúde, antes da sua integração em produtos para a área da medicina.

Palavras-chave: fibras de nanocelulose, nanodentistry, citotoxicidade, genotoxicidade

ABSTRACT

Nanomedicine is based on the application of nanotechnologies into the medical field to advance and improve diagnostics, prevention and treatment of human disease. Nanodentistry is nanomedicine applied to dentistry. While the recent expansion of both has been enormous, its progress must go hand in hand with nanosafety, i.e., with the safety evaluation of nanomaterials in an early phase of its development or application into a product. Cellulose appears as a natural and readily available material, which fits within the global tendency of sustainability: ecological, abundant and low cost. Particularly, cellulose nanofibrils (CNF) show great physicochemical properties and have been used to reinforce restorative materials and as constituents of scaffolds and membranes for bone and periodontal regeneration. Although bacterial nanocellulose is nowadays more used in biomedical applications, CNF produced from plants (PC) has been appearing as an economic competitor. However, PC may bring more toxicological concerns than the bacterial type, due to its composition and methods of production.

The objective of this work was to evaluate the safety of two CNF obtained through different methods, through the analysis of their cytotoxic and genotoxic effects in human osteoblasts.

The CNF were obtained from the same raw material – industrial bleached *Eucalyptus globulus* kraft pulp - by two different methods: TEMPO-mediated oxidation and enzymatic hydrolysis. The CNF cytotoxicity was assessed by the MTT assay and the genotoxicity by the cytokinesis-block micronucleus assay.

None of the CNF showed cytotoxicity towards the studied cells, regardless of doses or exposure time. An increase in micronucleated cells and nucleoplasmatic bridges frequency was noted for the two lowest concentrations, meaning there was some degree of genotoxicity.

This work contributed to the characterization of the potential toxic effects of two new CNF, in order to modify their characteristics so a safer material can be obtained for application in the biomedical field.

Key-words: nanocellulose fibers, nanodentistry, cytotoxicity, genotoxicity

ÍNDICE GERAL

1. ESTADO DA ARTE	13
1.1. Nanoescala, nanomateriais e nanotecnologia	13
1.2. Nanomedicina	14
1.3. Nanodentistry	15
1.4. Nanocelulose	18
1.4.1. Apresentações e modificações da celulose	20
1.4.2. Aplicações biomédicas	20
1.4.3. Aplicações na medicina dentária	22
1.5. Regeneração Periodontal	22
1.5.1. Periodonto	22
1.5.2. Doença periodontal	23
1.5.3. Regeneração periodontal	24
1.5.4. Regeneração óssea guiada	25
1.6. Nanotoxicologia	27
1.6.1. Nanotoxicologia da PC	34
2. OBJETIVOS	35
3. HIPÓTESES EXPERIMENTAIS	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1. Células e manutenção	37
4.2. Nanoceluloses	37
4.3. Ensaio de viabilidade celular	39
4.3.1. MTT	39
4.3.2. Ensaio clonogénico	42
4.4. Ensaio de genotoxicidade	42
4.4.1. Ensaio de micronúcleos com bloqueio da citocinese	42
4.5. Análise estatística	45

5. RESULTADOS	47
5.1. Produção das nanoceluloses	47
5.2. Citotoxicidade	48
5.3. Genotoxicidade	52
6. DISCUSSÃO	59
6.1. Nanoceluloses	60
6.2. Citotoxicidade	60
6.3. Genotoxicidade	62
7. CONCLUSÃO	67
8. LIMITAÇÕES DO ESTUDO E PERSPECTIVAS FUTURAS	69
9. BIBLIOGRAFIA	71
10. ANEXOS	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da nanocelulose	18
Figura 2 – Possíveis fins das células expostas a um agente cito- e/ou genotóxico no CBMN	32
Figura 3 – Processo de formação de micronúcleos e ponte nucleoplasmáticas no processo de divisão celular	33
Figura 4 – Diferentes estádios de crescimento celular das células MG-63	38
Figura 5 – Protocolo de realização do ensaio do MTT de acordo com Mosmann (1983)..	41
Figura 6 – Protocolo do CBMN de acordo com Fenech (2007)	44
Figura 7 – Resultados dos ensaios de viabilidade (MTT) para uma exposição de 24h a CNF TEMPO em células MG-63	48
Figura 8 – Resultados dos ensaios de viabilidade (MTT) para uma exposição de 48h a CNF TEMPO em células MG-63	49
Figura 9 – Resultados dos ensaios de viabilidade (MTT) para uma exposição de 24h a CNF enzimática em células MG-63	49
Figura 10 – Resultados dos ensaios de viabilidade (MTT) para uma exposição de 48h a CNF enzimática em células MG-63	50
Figura 11 – MTT: exposição de 48h a CNF TEMPO	50
Figura 12 – Diferença na adesão de células MG-63 em placas de 96 poços da <i>ThermoFischer Scientific e Nunc</i>	52
Figura 13 – Fotografias do CBMN: células mono-, bi- e multinucleadas	52
Figura 14 – Frequência de células micronucleadas por 1000 células binucleadas e valores de CBPI em células expostas a CNF TEMPO	53
Figura 15 – Frequência de células micronucleadas por 1000 células binucleadas e valores de CBPI em células expostas a CNF Enzimática	54
Figura 16 – Fotografias do CBMN: células MG-63 binucleadas e com presença de micronúcleos	54
Figura 17 – Frequência de células binucleadas com <i>buds</i> por 1000 células binucleadas, de células expostas a CNF TEMPO	55
Figura 18 – Fotografias do CBMN: células MG-63 binucleadas e com presença de <i>buds</i>	55

Figura 19 – Frequência de células binucleadas com <i>buds</i> por 1000 células binucleadas, de células expostas a CNF Enzimática	56
Figura 20 – Fotografias do CBMN: células MG-63 binucleadas e com presença de pontes nucleoplasmáticas	56
Figura 21 – Frequência de células binucleadas com pontes nucleoplasmáticas por 1000 células binucleadas, de células expostas a CNF TEMPO	57
Figura 22 – Frequência de células binucleadas com pontes nucleoplasmáticas por 1000 células binucleadas, de células expostas a CNF Enzimática	57
Figura 23 – Índice replicativo de células MG-63 após exposição a CNF TEMPO	58
Figura 24 – Índice replicativo de células MG-63 após exposição a CNF Enzimática	58

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Aplicações dos nanomateriais nas diferentes áreas da medicina dentária	16
Tabela 2 – Propriedades físico-químicas das CNF	47

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ATCC – Coleção Americana de Tipos de Culturas, do inglês *American Type Culture Collection*

ATM – Articulação temporomandibular

BC – Nanocelulose proveniente de bactérias, do inglês *bacterial cellulose*

CBMN – Ensaio de micronúcleos com bloqueio da citocinese, do inglês *cytokinesis block micronucleus assay*

CBN – células binucleadas

CBPI – Índice de proliferação após citocinese no CBMN, do inglês *cytokinesis-block proliferation index*

CIV – Cimentos de ionómero de vidro

CNC – Cristais de nanocelulose

CNF – Nanofibras de celulose, do inglês *cellulose nanofibers*

DMSO - Dimetilsulfóxido

DP – Grau de polimerização, do inglês *degree of polymerization*

EDTA - ácido etilendiamino tetra-acético, do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*

FBSi – Soro fetal bovino inativado, do inglês *inactivated fetal bovine serum*

GBR – Regeneração óssea guiada, do inglês *guided bone regeneration*

ICH – Conferência Internacional para a Harmonização de Requerimentos Técnicos para o Registo de Medicamentos para Uso Humano, do inglês *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*

ISO – Organização Internacional de Padronização, do inglês *International Organization for Standardization*

MMC – Mitomicina C

MN - micronúcleos

MTT - (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – Tampão fosfato, do inglês *phosphate buffered saline*

PC – Nanocelulose proveniente de plantas, do inglês *plant cellulose*

PMMA – Polimetilmetacrilato

PNP – Pontes nucleoplasmáticas

RI – Índice replicativo, do inglês *replicative index*

ROS – Espécies reativas de oxigênio, do inglês *reactive oxygen species*

RPM – Rotações por minuto

SDS – Dodecil sulfato de sódio, do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate*

TEMPO - 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl

1. ESTADO DA ARTE

1.1 NANOESCALA, NANOMATERIAIS E NANOTECNOLOGIA

There's plenty of room at the bottom (Feynman, 1960).

Assim se iniciou a conversa científica sobre a escala nano e o seu potencial como novo campo da ciência.

A escala nano situa-se, segundo a norma ISO/TS 8004-1:2015, entre 1 nm e 100 nm. Os nanomateriais são definidos, por recomendação da Comissão Europeia (2011), como “um material natural, incidental ou fabricado, que contém partículas num estado desagregado ou na forma de um agregado ou aglomerado, e em cuja distribuição número-tamanho 50% ou mais das partículas têm um ou mais dimensões externas na gama de tamanhos compreendidos entre 1 nanómetro e 100 nanómetros”.

A nanotecnologia baseia-se na aplicação destes nanomateriais à área da tecnologia, isto é, o progresso da tecnologia fazendo uso do conhecimento científico desenvolvido sobre materiais na escala nano (ISO/TS 8004-1:2015). Padovani *et al.* (2015) detalham que a nanotecnologia pretende “o desenvolvimento de materiais e dispositivos de alta *performance* em escalas nanométricas”.

Apesar da sua definição ter um carácter dinâmico que se pode alterar com a progressão do conhecimento científico (Schmalz, Hickel, Landuyt & Reichl, 2017), a nanotecnologia é, neste momento, um campo em expansão em várias áreas (Louro, Borges & Silva, 2013 & Schmalz *et al.*, 2017). De facto, a nanotecnologia é já hoje responsável por uma fatia relevante do crescimento económico em países industrializados. Só a União Europeia é responsável por 30% do mercado produtor (Louro *et al.*, 2013). Como consequência deste progresso têm surgido cada vez mais grupos de trabalho associados a agências nacionais e internacionais com o objetivo de explorar o potencial desta nova tecnologia para que se expanda o seu uso (Schmalz *et al.*, 2017).

Quanto aos nanomateriais, existem diversas classificações e subgrupos. Podem ser de origem natural, presentes na natureza como consequência dos seus fenómenos, ou de origem antropogénica, como resultado de atividades humanas (ex: processos fabris ou produção). Dentro destes últimos, podemos subclassificá-los em nanomateriais incidentais (produto secundário resultante da fabricação de outro produto primário) ou nanomateriais manufacturados, estes sintetizados deliberadamente com certas propriedades para cumprirem um propósito específico (Louro *et al.*, 2013 & Schmalz *et al.*, 2017).

Em relação aos materiais à escala não nanométrica, os nanomateriais da mesma composição química apresentam, obviamente, características físico-químicas diferentes, que lhes conferem propriedades mais vantajosas, tais como propriedades mecânicas, ópticas, eléctricas e magnéticas. Devido à inovação que trazem, os nanomateriais têm vindo a ser aplicados em diversas áreas. Entre elas, a cosmética, o desporto, a produção automóvel, a electrónica e a medicina (Louro *et al.*, 2013).

1.2 NANOMEDICINA

A nanomedicina refere-se à aplicação do desenvolvimento tecnológico na área dos nanomateriais à medicina. É definida como a utilização controlada dos nanomateriais para fins de diagnóstico, monitorização, controlo, prevenção e tratamento de patologias humanas (Tinkle *et al.*, 2014 & Schmalz *et al.*, 2017). O seu aparecimento e evolução pressupõem um aumento na eficiência dos cuidados de saúde, com custos mais reduzidos (Louro *et al.*, 2013).

Soares, Sousa, Pais & Vitorino (2018) definem quatro áreas de aplicação da nanomedicina: nanodiagnóstico, nanoterapêutica, medicina regenerativa e *theranostics* (a combinação de diagnóstico e terapêutica). Dentro destas, as aplicações são imensas, sendo alguns exemplos a transferência de genes (*gene transfer*) (Schmalz *et al.*, 2017), sistemas de terapêutica dirigida (*targeted drug-delivery*), a integração em próteses ortopédicas e a síntese de tecidos artificiais, como osso ou pele (Louro, Bettencourt, Gonçalves, Almeida & Silva, 2015).

1.3 NANODENTISTRY

Tal como nas outras áreas, a aplicação de nanomateriais encontra-se em expansão também na área da medicina dentária (Schmalz *et al.*, 2017). A *nanodentistry* é a utilização da nanotecnologia aplicada ao campo da medicina dentária. Nas palavras de Padovani *et al.* (2015), a *nanodentistry* “é a ciência e tecnologia de diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças orais e dentárias, alívio de dor, preservação e melhoria da saúde oral utilizando materiais nanoestruturados”.

A nanotecnologia tem permitido uma melhor compreensão biomecânica dos tecidos orais, tal como o esmalte, e foca-se agora em conseguir melhorar a performance de vários materiais utilizados nesta área, e que assim se possam apresentar com características estruturais de alta qualidade (Padovani *et al.*, 2015). A diminuição do tamanho das partículas garante vantagens ao nível das propriedades mecânicas, físicas, estéticas, químicas, de efeito terapêutico ou antimicrobiano (Schmalz *et al.*, 2017). Permite também ajudar a contornar as limitações dos materiais dentários atualmente existentes e a melhorar o trabalho do médico dentista e a qualidade de vida do paciente (Khurshid *et al.*, 2015).

As áreas de aplicação dos nanomateriais são transversais às áreas da medicina dentária. Na tabela 1, encontram-se alguns materiais e as suas aplicações detalhadas. De facto, a *nanodentistry* abrange a endodontia, dentisteria, periodontologia, cirurgia, implantologia, medicina dentária preventiva e comunitária, reabilitação oral (Khurshid *et al.*, 2015, Priyadarsini, Mukherjee & Mishra, 2017 & Schmalz *et al.*, 2017) ortodontia e até aos procedimentos transversais a todas as áreas como a anestesia (Chandki *et al.*, 2012 & Khurshid *et al.*, 2015). As perspectivas apontam para que, num horizonte temporal entre 10 e 20 anos, seja possível ter acesso a intervenções tão simples como a incorporação de nanomateriais em materiais já existentes ou à utilização de nanorobots capazes de anestésiar e desanestésiar a polpa com o clique de um botão (Chandki *et al.*, 2012 & Khurshid *et al.*, 2015). Neste contexto, torna-se imperativo garantir que os nanomateriais utilizados são biocompatíveis e não causam efeitos adversos na saúde do paciente, quer a curto quer a longo prazo.

Tabela 1 - Aplicações dos nanomateriais nas diferentes áreas da medicina dentária. Elaborada com base em Chandki et al, 2012, Khurshid et al., 2015, Halib et al., 2017, Priyadarsini et al., 2017 & Schmalz et al., 2017

Área da medicina dentária	Tipo de material	Constituintes	Aplicações
Endodontia	Cimentos Materiais de obturação	Zinco Titânio Cálcio Sílica Prata <i>Polietileneimina de amónio quaternário</i>	Melhoramentos na reologia (escoamento de fluídos) Radiopacidade Melhorar selamento Antibacteriano
Dentisteria restauradora	Ionómeros de vidro e nano-ionómeros Resinas compostas (híbridas ou nanoparticuladas) Sistemas adesivos	(Nano)celulose Sílica Zircónia Prata Ouro Nanotubos de carbono Fluoroaluminosilicatos (FAS) Hidroxiapatite Fluoroapatite	Melhor polimento Aumento das propriedades mecânicas Libertação de flúor Melhorias da adesão Redução da adesão bacteriana Radiopacidade Estética
Periodontologia e medicina regenerativa	Matrizes de regeneração óssea Membranas de regeneração óssea Antibióticos Enxertos ósseos	(Nano)celulose Zircónia Minociclina Hidroxiapatite Colagénio Fibronectina	Osteocondução Adesão, migração e proliferação celular Porosidade
Medicina dentária preventiva e comunitária	Tratamentos de hipersensibilidade Prevenção ou paragem de erosão dentária	Hidroxiapatite Prata Titânio Sílica	Biocompatível Capacidade de oclusão dos túbulos dentinários Antibacteriano

	Pastas de dentes Nanorobots		
Ortodontia	Cimentos Nanorobots		Melhor adesão Redução do tempo de tratamentos
Reabilitação oral	Cimentos Materiais de impressão Cerâmicas Glazes Polimetilmetacrilatos (PMMA)	Celulose Zinco Magnésio Titânio Nanotubos de carbono Grafeno Zircónia	Melhoramentos na reologia (escoamento de flúidos) Radiopacidade Aumento das propriedades mecânicas Superfícies antibacterianas
Implantologia	Implantes	Grafeno Titânio Zircónia Óxido de ferro Prata Fosfato de cálcio	Superfícies antibacterianas Aumento da biocompatibilidade Promoção da osteointegração
Anestesia	Nanorobots		Controlo do tempo de anestesia Redução dos efeitos secundários Redução do desconforto para o paciente

Para além da utilização intencional, os nanomateriais em medicina dentária podem formar-se também como consequência dos procedimentos efetuados, tais como o desgaste de próteses e de restaurações, partículas das próprias brocas, a libertação de partículas em papéis de oclusão ou cimentos ou em materiais de impressão convencionais ou digitais. Assim, os médicos dentistas são capazes de produzir, na própria consulta, nanopartículas mesmo que os materiais não as contenham na sua composição. A presença destas nanopartículas pressupõe a frequente exposição por parte dos profissionais da área

de medicina dentária, tais como médicos e assistentes, dos técnicos de laboratório, aquando do período de manufatura, manipulação e finalização, e do próprio paciente, durante o procedimento e enquanto o material permanecer na sua cavidade oral (Schmalz *et al.*, 2017). Consequentemente, surgem também as preocupações relativamente à exposição ocupacional dos profissionais desta área, exposição essa que se assume vir a ser contínua e prolongada. Para além da exposição ocupacional, existem também preocupações com a disseminação destes materiais e os seus efeitos nas populações e ambiente (Louro *et al.*, 2013).

1.4 NANOCELULOSE

O interesse pela celulose por parte da comunidade científica segue a tendência global de procurar cada vez mais a utilização de materiais de baixo custo e sustentáveis. A celulose é o biopolímero mais abundantemente encontrado na natureza e também o mais renovável. É possível encontrá-lo nas paredes celulares de madeira, algodão, cânhamo e outras plantas, mas também é produzido por algas, fungos e bactérias (família *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Sarcina*). Em termos químicos e estruturais, a celulose é considerada um homopolímero natural de alto peso molecular. Os monómeros que a constituem são anidro-D-glucose unidas em alfa-1,4 e a sua unidade estrutural é a celobiose, a junção de duas moléculas de açúcar. Na natureza não é possível encontrá-la nesta forma uma vez que as moléculas se juntam em cadeias, as cadeias em microfibrilhas e as microfibrilhas em fibras (bundles) (Halib *et al.*, 2017).

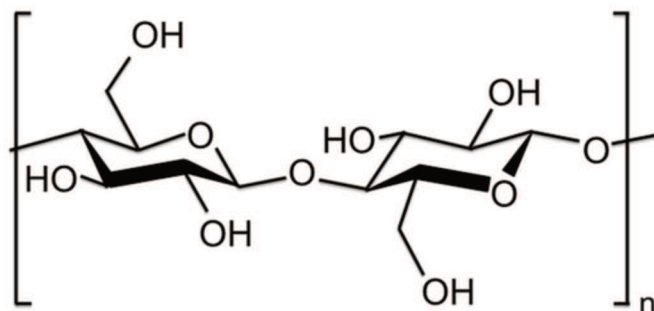


Figura 1 – Estrutura química da nanocelulose. Imagem de Rebouillat & Pla

Com base na sua fonte, a celulose é dividida em celulose bacteriana (*bacterial cellulose*, doravante referida como BC) – e celulose proveniente de plantas (*plant cellulose*, referida neste trabalho como PC).

A BC é considerada uma celulose pura, uma vez que não se encontra associada a lignina ou hemicelulose. Estes compostos, presentes na PC com funções descritas adiante, devem ser removidos antes da aplicação biomédica. Assim, a BC não necessita de sofrer tratamentos químicos para a sua utilização. Está melhor caracterizada e apresenta menores problemas de segurança do que a PC e está, por isso, mais presente no mercado atual. Na sua composição química não difere da PC; no entanto, a sua morfologia estrutural é mais inconsistente do que a da PC, o que lhe confere diferentes características. Após a formação de fibrilhas, a BC organiza-se em estruturas chamadas laços (*ribbons*) numa estrutura de aspecto reticulado e adota também uma estrutura mais cristalina. É uma estrutura altamente hidratada e que sugere semelhanças com as fibrilhas de colagénio. Forma estruturas hidrófilas, biocompatíveis, não tóxicas, absorventes, seletivamente permeáveis e porosas (Halib *et al.*, 2017). A produção de BC não é ainda competitiva em termos económicos por comparação a outros polímeros e, portanto, a PC surge como uma boa alternativa neste campo (Nordli, Chinga-Carrasco, Rokstad & Pukstad, 2016).

A celulose proveniente de plantas não é considerada pura como a BC pois possui outros compostos associados, nomeadamente lignina e hemicelulose que apresentam problemas de biocompatibilidade. A lignina tem um papel na natureza, de conferir rigidez às fibras, tornando-as resistentes às ameaças como a gravidade e o vento. Já a hemicelulose atua como agente de ligação entre a celulose e a lignina. A presença destes compostos requer uma caracterização mais aprofundada em relação aos seus efeitos citotóxicos e de resposta inflamatória (Nordli *et al.*, 2016). Por exemplo, a lignina não é biodegradável, permanecendo no organismo com efeitos imprevisíveis. Assim, a PC tem de ser submetida a processos químicos para remover estes compostos reconhecidamente tóxicos. Esses processos podem em si mesmos aumentar o potencial de toxicidade da PC, já que deixam químicos residuais (Halib *et al.*, 2017). Assim sendo, a PC para aplicações biomédicas necessita de ser purificada (Nordli *et al.*, 2016).

1.4.1 APRESENTAÇÕES E MODIFICAÇÕES DA CELULOSE

A partir das microfibrilhas de celulose é possível obter dois tipos de material: as nanofibras, referidas de aqui em diante como CNF, e os nanocristais (CNC) (Nordli *et al.*, 2016 & Halib *et al.*, 2017).

As CNF são fibras com diâmetro entre 20 e 40 nm e comprimento na ordem dos micrómetros (Nordli *et al.*, 2016 & Halib *et al.*, 2017). Em termos de estrutura, assemelham-se aos nanotubos de carbono e aos asbestos, por possuírem uma razão de aspeto aumentada, isto é, a razão entre o comprimento e a largura da partícula (Ilves *et al.*, 2018).

Apesar de tanto a BC como os CNC terem propriedades interessantes, são actualmente considerados não tóxicos e utilizados no mercado (Ventura, Lourenço, Sousa-Uva, Ferreira & Silva, 2018). O presente trabalho foca-se nas CNF provenientes de plantas.

As nanoceluloses podem ainda sofrer modificações químicas com diversos objetivos. Estas incluem a esterificação, cationização, carboxilação, sililação ou as mais comuns, carboximetilação e acetilação. Estas modificações permitem alterar ligeiramente as propriedades das nanoceluloses para que possam ser utilizadas em diversas aplicações. Por se tratarem de alterações à estrutura base da nanocelulose, podem tornar o material mais dispendioso, menos natural e por isso mais facilmente escrutinado pelos agentes de regulação (Halib *et al.*, 2017).

Para além das modificações introduzidas propositadamente, é possível obter materiais com tamanho, energia de superfície e estrutura física diferentes a partir da mesma matéria prima, de acordo com o método de produção (Lima *et al.*, 2012).

1.4.2 APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

As aplicações das nanoceluloses no campo da área médica são imensas e variadas. Uma vez que se afigura como um material económico e amplamente disponível, o aumento da

sua utilização é expectável. Dentro dos vários exemplos disponíveis, existem áreas onde têm vindo a trazer grandes progressos (Halib *et al.*, 2017).

- Cicatrização de feridas – especialmente de origem térmica, como queimaduras, em que há uma perda excessiva de fluídos com consequências graves para o paciente. CNC e CNF foram já utilizados como sistema de entrega de substâncias bioativas, como anti-inflamatórios, antibióticos e fatores de crescimento. Estes materiais possuem uma ampla área de superfície que permite a incorporação de mais moléculas e são biocompatíveis. CNF associadas a células mesenquimais foi utilizado também como fio de sutura, uma vez que é capaz de manter as duas propriedades mecânicas em ambientes húmidos e de ser uma matriz eficaz ao crescimento celular.
- Regeneração óssea – CNC têm vindo a ser utilizados como matriz para regeneração, não só pelas suas propriedades mecânicas mas por terem capacidade de fixar o cálcio, o que favorece uma deposição mais uniforme, e poderem ser combinados com células mesenquimais que promovem a diferenciação de osteoblastos. CNF foram utilizadas com o mesmo fim e apresentaram bons resultados, uma vez que o seu formato em fibras faz um bom trabalho de mimigar a matriz extracelular. Acetato de celulose foi utilizado como matriz 3D e apresentou uma porosidade óptima para a formação de novo osso e capilares sanguíneos, por excelente difusão de oxigénio e nutrientes. Estes materiais que mimetizam a matriz extracelular promovem a proliferação celular para além dos limites da matriz.
- Regeneração cartilágnea – por ser maioritariamente avascular, a recuperação do tecido cartilágneo é ainda um desafio clínico. Tem-se apostado mais na sua substituição e mais recentemente, com recurso a materiais impressos em impressores 3D. As CNF têm sido utilizadas em conjugação com outros materiais, como por exemplo alginato, para servirem de constituintes à biotinta (*bioink*) das impressoras, formando estruturas viscoelásticas parecidas à cartilagem. Para além da tinta, a CNF é utilizada também em matrizes para o tecido cartilágneo. Mais uma vez, a utilização da celulose tem como vantagem a possibilidade de adicionar substâncias bioativas como células que favorecem a condrogénese.

1.4.3 APLICAÇÕES NA MEDICINA DENTÁRIA

A nanocelulose é já atualmente aplicada no campo da medicina dentária. As suas propriedades são atraentes para melhorar alguns materiais e procedimentos. Na tabela 1, podemos notar a sua presença em diversas áreas da medicina dentária.

As CNF são utilizadas para reforçar diversos materiais, melhorando as suas propriedades mecânicas. É um exemplo disso, os cimentos de ionômero de vidro (CIV), que se apresentam como um dos melhores materiais de restauração, no entanto são ainda frágeis do ponto de vista de durabilidade. Halib *et al.* (2017), descrevem um estudo em que foram avaliadas as propriedades de um CIV reforçado com nanofibras provenientes de polpa de eucalipto. Neste estudo, a força compressiva e a força diamétrica de tensão duplicaram por comparação a um CIV comum, enquanto que o módulo de elasticidade quase triplicou. O polimetilmetacrilato (PMMA), utilizado na confecção de bases para próteses, mostrou igualmente melhorias nas suas propriedades mecânicas com a adição de CNF. Para além disto, as fibras agiram como agente de união entre os componentes do PMMA.

Uma grande área em desenvolvimento na medicina dentária é a regeneração óssea e periodontal.

1.5 REGENERAÇÃO PERIODONTAL

De entre as várias possíveis utilizações da nanocelulose no campo da medicina, e mais concretamente no campo da dentária, surge bastante interesse na sua aplicação em procedimentos de regeneração óssea.

1.5.1 PERIODONTO

O periodonto é definido como o conjunto de tecidos que fornecem suporte aos dentes no osso. É um biosistema funcional, constituído por osso alveolar, cimento radicular, gengiva e ligamento periodontal (Siaili, Chatzopoulou & Gillam, 2017), que se vai

alterando ao longo da vida, por senescência natural ou processos patológicos (Andrei, Dinischiotu, Didilescu, Ionita & Demetrescu, 2017).

O osso alveolar pertence à maxila e à mandíbula e a sua remodelação acontece de maneira semelhante à dos outros ossos do corpo humano, por deposição e reabsorção. O cimento radicular recobre todas as raízes de todos os dentes e é onde se ligam as fibras do ligamento periodontal na porção dentária. A gengiva faz parte da porção mastigatória das mucosas orais e a sua função é proteger os tecidos que circundam os dentes do ambiente oral. É constituída por gengiva livre, gengiva aderida e gengiva interdentária. A margem gengival acompanha o nível do osso, portanto quando há perda deste, existe retração gengival e exposição do cimento à cavidade oral (Andrei *et al.*, 2017).

O ligamento periodontal é o responsável por unir o osso alveolar ao dente. Tem um comportamento elástico e atua como amortecedor das forças que o dente exerce sobre o osso. É um tecido rico em células, possuindo cimentoblastos – as células responsáveis pela formação do cimento – na porção mais próxima do cimento, e osteoblastos e osteoclastos junto ao osso alveolar (Andrei *et al.*, 2017). Possui igualmente células imaturas, capazes de se diferenciarem, o que o torna extremamente importante para a regeneração do periodonto (Siaili *et al.*, 2017).

1.5.2 DOENÇA PERIODONTAL

O envelhecimento da população veio acompanhado de um aumento significativo da prevalência da patologia periodontal. Esta provoca a perda continuada de suporte do dente até à sua eventual avulsão. O tratamento da periodontite permite impedir a progressão da doença, mas muitas vezes não permite recuperar os tecidos que já foram perdidos (Andrei *et al.*, 2017). O osso possui capacidade de regeneração inata mas não ilimitada. Assim, sob grandes perdas ou estímulos que impedem o metabolismo, não consegue recuperar, formando-se zonas de perda óssea (Calciolari & Donos, 2018).

1.5.3 REGERERAÇÃO PERIODONTAL

Apesar das últimas três décadas terem sido ricas em avanços na área da regeneração periodontal, este procedimento ainda se afigura como um desafio clínico. A regeneração dos tecidos periodontais tem aplicações limitadas e resultados pouco previsíveis e é muitas vezes incompleta. As consequências destas limitações são não só estéticas como de saúde já que existe a perpetuação da doença periodontal devido à permanência de áreas de menor resistência, tais como defeitos intraósseos e de furca ou bolsas profundas (Siaili *et al.*, 2017).

O objetivo principal da regeneração periodontal é a recuperação dos tecidos periodontais perdidos. Isto vai levar a que:

1. Exista controlo da infecção e inflamação
2. Exista manutenção da saúde, função, conforto e estética dos tecidos de suporte do dente.

A regeneração periodontal deve procurar mimetizar a formação embriológica dos tecidos periodontais. Foi postulado por Melcher (1976), que a ocupação celular do espaço a regenerar é determinada pelo primeiro tipo de células que adere à raiz do dente. Em vários estudos foi descrita a inibição de crescimento de tecido conjuntivo devido à ocupação por tecido epitelial gengival, o que provoca uma regeneração incompleta sem regeneração óssea. Foi também descrito o crescimento de cimento e fibras de tecido conjuntivo quando o contato era estabelecido com fibras do ligamento periodontal vitais. Isto indica-nos que apenas o ligamento periodontal possui potencial para fazer crescer tecidos diferenciados e assim obter uma verdadeira regeneração periodontal. Este potencial provém da presença de células imaturas neste tecido (Siaili *et al.*, 2017).

Para uma regeneração periodontal completa, é necessário que a regeneração seja a nível de todos os tecidos, nomeadamente do osso, e não apenas à custa da formação de um epitélio juncional longo (Andrei *et al.*, 2017).

Surge, assim, a necessidade de criar um método que impeça as células de mais rápida proliferação de se unirem à raiz do dente, antes que as células que interessam à regeneração verdadeira o façam, ou seja, um método que impeça a aderência dos tecidos

provenientes da gengiva e que favoreçam a adesão dos tecidos provenientes do ligamento periodontal.

1.5.4 REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA

A regeneração óssea guiada (*Guided Bone Regeneration - GBR*) consiste em todos os procedimentos que procuram a regeneração dos tecidos periodontais perdidos através da interposição de uma membrana que exclui os tecidos epiteliais e conjuntivo da gengiva e os impede de aderirem à raiz e ao osso adjacentes. Este procedimento tem-se mostrado uma boa opção para a recuperação parcial do osso perdido e afigura-se hoje em dia como o *gold standard* da regeneração periodontal (Takata, Wang & Miyauchi, 2001 & Siaili *et al.*, 2017).

A GBR pressupõe a utilização de membranas, que podem ser de diversos materiais, reabsorvíveis ou não reabsorvíveis, sendo que tem sido dada preferência às reabsorvíveis (Siaili *et al.*, 2017). Tanto as reabsorvíveis como as não reabsorvíveis têm vantagens e desvantagens. As reabsorvíveis são de fácil uso, reduzem o risco de infecção bacteriana no local e vão sendo gradualmente degradadas, o que não exige uma segunda cirurgia para a remoção. As não-reabsorvíveis são úteis para manter o espaço necessário à regeneração durante o tempo desejado (Andrei *et al.*, 2017).

Para além da sua função mecânica, Takata *et al.*, no seu estudo de 2001, provam que os materiais utilizados na confecção das membranas têm *per se* influência no processo de regeneração óssea.

As propriedades biomecânicas das membranas têm vindo a ser melhoradas através de vários processos, nomeadamente pela adição de novos materiais à sua composição. As membranas mais recentes destacam-se por servirem não só como barreira mas também como agentes de entrega de outras substâncias bioativas, nomeadamente antibióticos (tais como a amoxicilina e a tetraciclina), fatores de crescimento e fatores de adesão. Para além disto, as membranas permitem o recrutamento seletivo de células (Andrei *et al.*, 2017).

O procedimento já utilizou diversos tipos de membranas ao longo dos tempos, no entanto há cinco características essenciais que as membranas devem possuir (Scantlebury, 1993):

1. Integração tecidual
2. Oclusividade celular
3. Manuseabilidade clínica
4. Capacidade de criar e manter espaço para a proliferação das células do ligamento periodontal e osso alveolar para o defeito
5. Biocompatibilidade

Neste momento, são utilizados diversos materiais, do colagénio ao ácido poliláctico para a formação de membranas (Takata *et al.*, 2001), no entanto não existe ainda o material perfeito. O aparecimento da nanocelulose como possível novo material de aplicação nesta área pode vir a colmatar algumas das falhas nos materiais utilizados atualmente.

Para além dos estudos já praticados noutras zonas do corpo e descritos nas aplicações biomédicas da nanocelulose, existem já algumas experiências no osso constituinte do periodonto. No caso da GBR, a nanocelulose já foi aplicada na constituição de membranas, uma vez que obedece a algumas características-chave, nomeadamente promoverem a adesão e migração celular ao longo do material (Halib *et al.*, 2017).

Takata *et al.* (2001), efetuaram dois estudos separados em que avaliaram a afinidade de osteoblastos para diferentes membranas. As membranas de celulose provenientes de plantas (uma combinação de acetato de celulose com nitrocelulose) mostraram o maior número de células aderentes e foram as terceiras na quantificação da migração celular. Os autores concluem que as membranas de celulose estão entre as que melhor promovem a migração de células osteoblásticas.

Em 2017, Siaili *et al.* utilizam membranas de celulose oxidada e descrevem-nas como tendo efeitos prometedores na GBR, no entanto carecem de estudos mais aprofundados.

Retirando também a aplicação na regeneração cartilaginosa, é possível imaginar alguma utilidade na regeneração das estruturas constituintes da articulação temporomandibular, especialmente da cabeça dos côndilos.

1.6 NANOTOXICOLOGIA

O *boom* da nanotecnologia vem logicamente acompanhado de um aumento na exposição humana aos nanomateriais. Esta exposição pode acontecer ao longo de todas fases do ciclo de vida do nanomaterial, sendo os indivíduos potencialmente expostos os trabalhadores envolvidos na síntese, produção e aplicação dos nanomateriais (Louro *et al.*, 2013). Por outro lado, os consumidores e, no caso das aplicações biomédicas, os pacientes, estarão também ubiqüitariamente expostos. Por este motivo, as nanopartículas são cada vez mais uma preocupação para as agências que regulamentam a sua segurança, como a ISO ou a OMS (Carriere, Sauvaigo, Douki & Ravanat, 2016 & Schmalz *et al.*, 2017).

A via inalatória é considerada a mais relevante para a exposição humana, especialmente importante na exposição ocupacional. A via oral é igualmente uma via de exposição em estudo, uma vez que os nanomateriais podem ser absorvidos pelo intestino, obtendo acesso ao meio interno do organismo. A partir daí, devido ao seu tamanho, estas partículas são capazes de, através das circulações sanguínea e linfática, alcançar diversos órgãos e tecidos (Louro *et al.*, 2013 & Schmalz *et al.*, 2017). Para além disto, em comparação com os seus pares macro ou micrométricos, os nanomateriais possuem rácio área superficial/volume aumentado (Schmalz *et al.*, 2017). Alguns materiais conhecidos assumem a forma de fibras e possuem uma razão de aspecto elevada (razão comprimento/largura), como é o caso dos nanotubos de carbono e têm vindo a causar preocupação pelo seu potencial inflamatório e tóxico (Ilves *et al.*, 2018).

Após alcançarem os tecidos, já foi demonstrado que os nanomateriais são capazes de se acumular em praticamente todo o tipo de células. A sua entrada mais provável é por endocitose (Carriere *et al.*, 2016) e após o acesso ao interior da célula podem causar reacções directas ou indirectas sobre o genoma das células (Louro *et al.*, 2013).

De acordo com Carriere *et al.* (2016), existem dois paradigmas quando se fala de toxicologia dos nanomateriais: o seu potencial inflamatório e o stress oxidativo. Por um lado, foi já demonstrado em roedores a existência de uma resposta inflamatória com um consequente aumento do stress oxidativo a partir da produção de radicais livres de oxigénio (ROS). Por outro, mesmo na ausência de células inflamatórias no local, os

nanomateriais podem causar stress oxidativo através dos constituintes da própria célula, como as mitocôndrias (Schmalz *et al.*, 2017). O stress oxidativo pode acontecer por excesso de produção de ROS, por déficit na sua eliminação ou por ambos. A presença crónica deste stress vai provocar a acumulação de alterações genéticas, que podem levar à morte ou à mutação da célula. Se estas lesões não forem reparadas podem surgir aberrações cromossómicas, que irão favorecer o aparecimento de fenómenos cancerígenos (Carriere *et al.*, 2016).

Por outro lado, há que considerar as lesões diretas que estes materiais são capazes de gerar no próprio ADN da célula, uma vez que pela sua pequena dimensão são capazes de alcançar o núcleo. As alterações fruto da interação com o genoma ou com as proteínas presentes no núcleo, causam instabilidade genética que pode então favorecer o aparecimento de neoplasias (Louro *et al.*, 2013 & Carriere *et al.*, 2016). É importante ainda mencionar que as populações estão neste momento expostas a diversos agentes com capacidade de induzir mutações no ADN. A falha na resposta dos mecanismos de reparação em simultâneo com a exposição a agentes cancerígenos, aumentará significativamente as consequências (Carriere *et al.*, 2016).

No caso das nanofibras, características como o comprimento, o diâmetro, a forma e a energia de superfície podem, dentro do mesmo material, causar efeitos adversos distintos (Ilves *et al.*, 2018 & Lima *et al.*, 2012).

Na medicina dentária são variadas as vias de exposição para todos os envolvidos. Um elevado número de partículas é, por exemplo, produzido por meio de aerossóis. Schmalz *et al.* (2017) descrevem um pico de 10^5 a 10^6 partículas/cm³ na zona de respiração do dentista e do paciente aquando do acabamento e polimento de restaurações em resina nos dentes da frente. Para além disto, os pacientes podem estar expostos a nanopartículas de revestimentos dos implantes que se vão libertando com o tempo após a sua colocação e integração. Os mesmos autores relatam alguns estudos em que não só já foram encontradas nanopartículas de titânio no osso regenerado que se cria à volta do implante, como nos próprios tecidos peri-implantares, incluindo em células do ligamento periodontal que demonstraram, por estudo *in vivo* conduzidos em animais, serem sensíveis de uma maneira dose-dependente. As nanopartículas podem, através da corrente sanguínea, chegar a todos os órgãos e foram detectadas, por exemplo, no fígado, no baço,

no pulmão e nos nódulos linfáticos. Não será igualmente difícil de extrapolar a hipótese de nanomateriais utilizados em regeneração óssea ou que estejam em contato direto com o osso, como é o caso de cimentos cirúrgicos, possam também libertar partículas que “viajam”, por conseguinte, por todo o organismo.

Para além da exposição humana direta, o rápido desenvolvimento da nanotecnologia vem logicamente acompanhada de uma crescente disseminação ambiental. Isto é especialmente relevante para a medicina dentária, uma vez que muitos dos processos realizados em consultório sofrem uma constante irrigação e aspiração, o que favorece o transporte de nanopartículas para os sistemas sanitários das cidades. Muitos consultórios estão equipados com sistemas de filtração para as amálgamas dentárias mas não para partículas de dimensões tão reduzidas como é o caso dos nanomateriais (Schmalz *et al.*, 2017).

A toxicidade dos nanomateriais começou por ser tratada de igual modo à dos materiais de dimensões superiores. No entanto, as diferenças nas propriedades físico-químicas que garantem aos nanomateriais serem tão inovadores são muitas vezes as mesmas que aumentam a preocupação em relação à sua segurança. A sua dimensão nano altera a forma como estes materiais se relacionam com os sistemas biológicos (Louro *et al.*, 2013). O facto dos materiais estarem estudados e caracterizados quanto à sua biocompatibilidade, e mesmo que estejam aprovados, nos seus formatos macro e micro, não significa que exibam os mesmos comportamentos no formato nano. Podem induzir alterações citológicas, imunológicas ou genéticas que não haviam sido observadas para esses mesmos materiais não nanoparticulados. Isto obriga a que os materiais sejam estudados no formato em que vão ser aplicados clinicamente, antes disso acontecer (Louro *et al.*, 2015).

Os nanomateriais têm sido estudados como compostos químicos comuns, no entanto, diferem destes pelo seu tamanho, composição química, forma, estrutura e energia de superfície, agregação e solubilidade (Collins *et al.*, 2017). Isto faz com que os estudos já existentes não possuam robustez científica nem elevado poder estatístico (Schmalz *et al.*, 2017) pela enorme variação de protocolos utilizados e, portanto, a dificuldade na sua comparação. Apesar de numerosos esforços conjuntos, tem sido difícil obter consensos em relação ao estudo da toxicidade dos nanomateriais e ainda se encontram em

desenvolvimento *guidelines* para o seu estudo (Soares *et al.*, 2018 & Collins *et al.*, 2017). Um dos pontos de partida ao avaliar a toxicidade destes materiais tem de ser a sua completa caracterização físico-química. É necessário definir detalhadamente propriedades como o tipo de material, o peso molecular, a forma, a carga de superfície e a eventual presença de moléculas funcionalizantes, uma vez que estas alteram a farmacodinâmica e farmacocinética dos nanomateriais (Fornaguera & García-Celma, 2017).

Existem várias abordagens para estudar a toxicidade. Os estudos *in vitro* surgem na linha da frente pela sua simplicidade, tempo de execução, por serem pouco dispendiosos, não apresentarem problema éticos e por ser fácil controlar as condições experimentais. Servem como base para a avaliação de potenciais risco pois são muito úteis a elucidar sobre os mecanismos gerais que causam toxicidade. Têm, no entanto, limitações. No organismo, existe a chamada “resposta coordenada dos tecidos”, que é difícil de mimetizar num sistema tão simples, que elimina todos os sistemas de compensação e as interações que existem dentro de um organismo vivo. Isto reduz a capacidade de avaliar a resposta deste aos nanomateriais, já que o comportamento das células em cultura diverge do seu comportamento no contexto de um sistema biológico complexo (Collins *et al.*, 2017). Os ensaios *in vitro* com nanomateriais são também conhecidos pela interação das partículas com os componentes do ensaio, nomeadamente através da formação de aglomerados, da alteração de propriedades ópticas ou da alteração do pH do meio (Soares *et al.*, 2018).

Collins *et al.* (2017) apresentam o *high throughput screening* (HTS), isto é, o “uso de ferramentas automatizadas para facilitar a rápida execução de um alto número e variedade de ensaios biológicos que podem incluir diversas substâncias em simultâneo”. Isto permite a utilização de vários métodos que juntos visam mimetizar o melhor possível os ensaios *in vivo*, que são dispendiosos e demorados. O HTS sugere um conjunto de ensaios que inclui, entre outros, a avaliação da citotoxicidade e da genotoxicidade.

A molécula de ADN tem um papel central na manutenção da nossa informação genética e a presença de lesões está ligada a distúrbios como a carcinogénese. Existem diversas formas de avaliar o potencial genotóxico de um componente, nomeadamente quantificando e qualificando a presença de lesões, avaliar as consequências dessas

mesmas lesões, detectar alterações nos mecanismos de reparação (Carriere *et al.*, 2016). Um dos estudos sugeridos no HTS é o ensaio do micronúcleo. O ensaio de micronúcleos com bloqueio da citocinese (CBMN) é um ensaio originalmente descrito por Fenech (2007), que quantifica anomalias nos cromossomas – quebras (efeitos clastogénicos) ou perdas (efeitos aneugénicos).

O CBMN consiste na análise de 2000 células para cada concentração, divididas em duas réplicas independentes (1000 células por réplica). Permite-nos identificar danos no ADN através da frequência de fenómenos como a presença de micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e *buds* nucleares, assim como o efeito citostático e citotóxico (análise da percentagem de células em necrose e apoptose) do agente potencialmente tóxico em estudo (figura 2). O efeito citostático avalia a capacidade de replicação das células: devido ao bloqueio da citocinese através da citocalasina B, as células que sofreram uma única divisão vão possuir dois núcleos independentes dentro da mesma membrana citoplasmática, por oposição a apenas um núcleo ou mais do que dois nas células que não se dividiram ou que o fizeram mais que uma vez, respectivamente. Para isto, em cada réplica é calculada a percentagem de células mono, bi e multinucleadas por 1000 células.

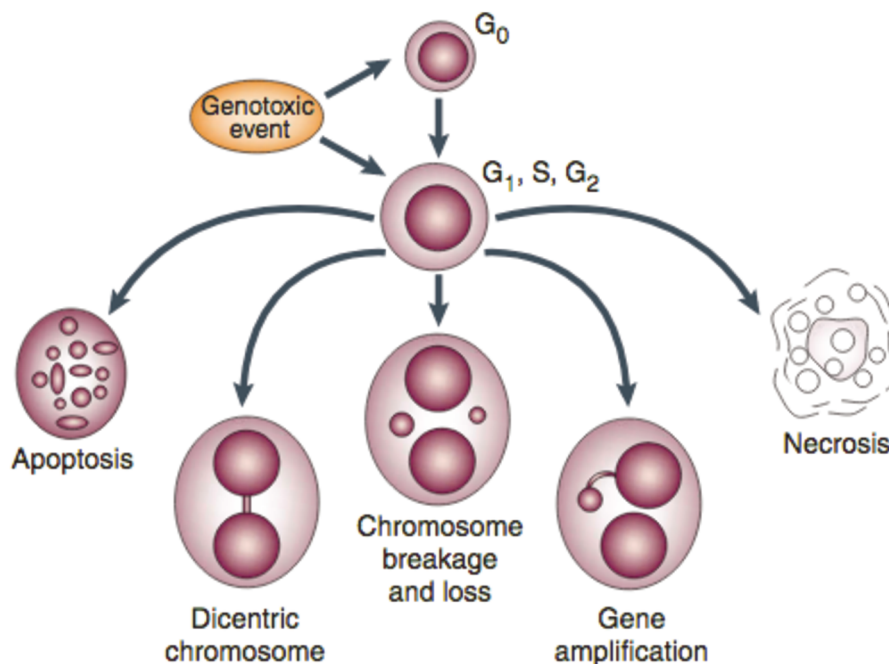


Figura 2 – Possíveis fins das células expostas a um agente cito- e/ou genotóxico no CBMN. Imagem de Fenech (2007).

As alterações cromossômicas são apenas contabilizadas nas células binucleadas:

- Os micronúcleos representam fragmentos ou cromossomas completos que se perderam do resto do núcleo durante a divisão celular e são caracterizados por terem um diâmetro menor que 1/3 do diâmetro do núcleo principal, coloração igual ou ligeiramente mais intensa e não estarem conectados ao núcleo (figura 3). A sua existência pode igualmente ser um sinal de hipometilação do DNA, um evento relacionado com processos epigenéticos de regulação da expressão do DNA.
- As pontes nucleoplasmáticas (PNP) resultam de células com cromossomas dicêntricos que são puxados para polos opostos da célula. A existência destes cromossomas pode ser por união de telómeros (associado a telómeros curtos) ou falhas na reparação do DNA. Ambos estes fenómenos não podem ser avaliados somente pela presença de micronúcleos e, portanto, a avaliação das pontes é um complemento essencial. Ao microscópio, as PNP têm uma largura que não excede 1/4 do diâmetro do núcleo e características de coloração semelhantes (figura 3).

- Os *buds* nucleares estão associados a ampliações de DNA que são parcialmente separadas do núcleo. Possuem morfologia igual à dos micronúcleos mas encontram-se unidos ao núcleo principal por via de uma ponte.

É importante avaliar estes eventos uma vez que um aumento na sua frequência se relaciona com fenómenos de carcinogénese. Este ensaio é um entre vários que deve ser utilizado na análise da genotoxicidade de uma substância ou material.

É urgente que se desenvolvam *guidelines* para avaliar a toxicidade dos nanomateriais, uma vez que, com o seu rápido desenvolvimento e vantagens que oferecem a vários níveis, existirão pressões para serem colocados no mercado e disponibilizados à comunidade. Sem existir uma garantia da sua segurança, as suas propriedades vantajosas podem tornar-se fruto de preocupações para a saúde pública.

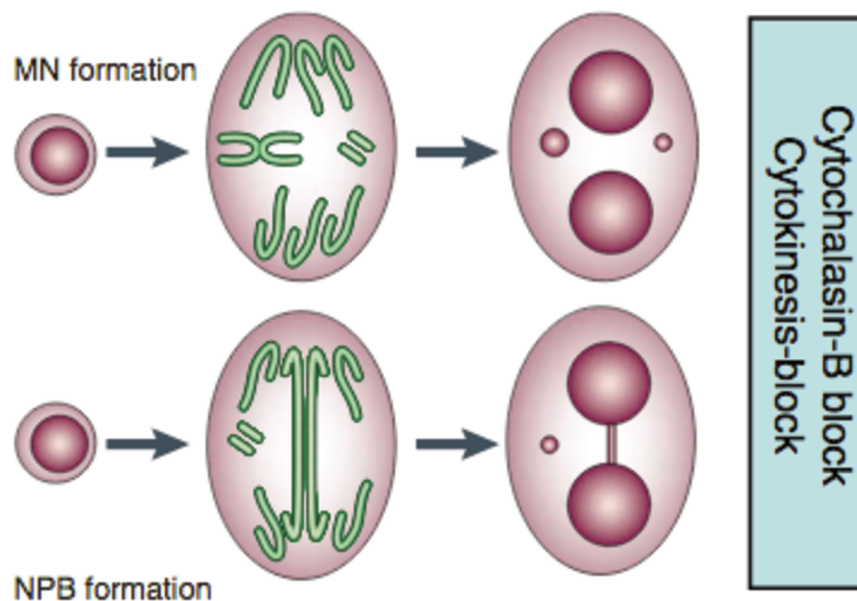


Figura 3 – Esquema que demonstra o processo de formação de micronúcleos (MN) e pontes nucleoplasmáticas (PNP) no processo de divisão celular. Os MN formam-se a partir de fragmentos de cromossomas ou de cromossomas inteiros que ficam para trás e as PNP de erros na reparação de quebras nas cadeias de ADN ou de união de telómeros. Imagem de Fenech (2007).

1.6.1 NANOTOXICOLOGIA DA PC

Todos os materiais disponíveis, especialmente os mais recentemente desenvolvidos e disponíveis no mercado, devem ser estudados em função da sua biocompatibilidade e biossegurança, não só em estudos *in vitro* e em animais como em ensaios clínicos randomizados extensos (Siaili *et al.*, 2017). Em especial, os materiais de aplicação médica exigem sempre uma caracterização do seu potencial de toxicidade, uma vez que a biocompatibilidade é obrigatória para a sua aprovação e comercialização (Nordli *et al.*, 2016).

O mundo das nanoceluloses é vasto e, portanto, existem já alguns estudos sobre diversos tipos de materiais em variadas células. No entanto, as nanoceluloses são nanomateriais e sofrem dos mesmos problemas aquando da validação e comparação dos estudos já existentes.

A maior parte dos estudos aponta para a ausência de citotoxicidade das nanoceluloses (Pereira *et al.*, 2013, Nordli *et al.*, 2016, Lopes, Martinez, Strømme & Ferraz, 2017, Rashad, Mustafa, Heggset & Syverud, 2017, Souza *et al.*, 2018 & Ventura *et al.*, 2018). Vários destes estudos relatam inclusive um aumento na viabilidade celular após a exposição (Nordli *et al.*, 2016, Lopes *et al.*, 2017, Rashad *et al.*, 2017 & Ventura *et al.*, 2018)

Quanto à genotoxicidade, não existem resultados tão homogêneos. Alguns estudos relatam efeitos genotóxicos após exposição (Lima *et al.*, 2012 & Ventura *et al.*, 2018), enquanto que o estudo de Catalán *et al.* (2016) já não observa lesões na cadeia de ADN de células tratadas com CNF.

Como o potencial inflamatório pode conduzir a efeitos de genotoxicidade, existem na literatura estudos que analisam o potencial inflamatório das CNF. A maior parte dos estudos encontrados referem que existe resposta inflamatória após exposição a estas nanofibras (Stefaniak, Seehra, Fix & Leonard, 2014, Catalán *et al.*, 2016 & Lopes *et al.*, 2017).

2. OBJETIVOS

Avaliar a segurança através da análise da citotoxicidade e da genotoxicidade de duas nanoceluloses fabricadas a partir de uma pasta industrial branqueada de *Eucalyptus globulus*, com dois tratamentos diferentes – oxidação mediada por TEMPO e hidrólise enzimática- em células osteoblasto-*like* humanas.

Através desta avaliação, este trabalho pretende contribuir para uma utilização mais segura das nanoceluloses no contexto da medicina dentária.

3. HIPÓTESES EXPERIMENTAIS

Hipótese nula (H0) – As CNF TEMPO/Enzimática não são citotóxicas nem genotóxicas em células MG-63, isto é, não existem diferenças significativas entre células expostas e controlo no que diz respeito a viabilidade celular e indução de micronúcleos.

Hipótese 1 (H1) - As CNF TEMPO/Enzimática são citotóxicas mas não são genotóxicas em células MG-63, isto é, existem diferenças significativas entre células expostas e controlo no que diz respeito a viabilidade celular mas não em relação à indução de micronúcleos.

Hipótese 2 (H2) - As CNF TEMPO/Enzimática não são citotóxicas mas são genotóxicas em células MG-63, isto é, existem diferenças significativas entre células expostas e controlo no que diz respeito à indução de micronúcleos mas não na viabilidade celular.

Hipótese 3 (H3) - As CNF TEMPO/Enzimática são citotóxicas e genotóxicas em células MG-63, isto é, existem diferenças significativas entre células expostas e controlo no que diz respeito a viabilidade celular e à indução de micronúcleos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CÉLULAS E MANUTENÇÃO

As células utilizadas neste estudo são as MG-63 (ATCC® CRL-1427™): osteoblastos humanos provenientes de um osteosarcoma de um dador masculino caucasiano de 14 anos de idade.

O meio de manutenção das culturas celulares de MG-63 (ATCC® CRL-1427™) foi constituído por RPMI 1640 (1X) (Gibco, Scotland, UK) suplementado com 10% de soro fetal bovino inactivado pelo calor (FBSi) (Gibco, Scotland, UK). Adicionou-se ainda mix Penicilina/Estreptomicina (Pen/Strep; with 10000 units/mL of penicillin and 10000 µg/mL of streptomycin, Gibco, Scotland, UK) e anfotericina B (Gibco, Scotland, UK).

As culturas foram mantidas numa estufa a 37°C e 5% de CO² até ao atingimento da subconfluência (aproximadamente 80%). As subculturas obtiveram-se pela desagregação das células com tripsina-EDTA (0.05%) (Gibco, Scotland, UK) incubada a 37°C durante 4 minutos, seguido de inactivação com meio completo e diluição apropriada (figura 4).

A cultura de células foi testada para a presença de micoplasma, sendo o resultado negativo para a contaminação.

4.1 NANOCELULOSES

Ambas as nanoceluloses foram produzidas no departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra, a partir de uma pasta industrial branqueada de *Eucalyptus globulus* (gentilmente cedidas pelo Doutor Paulo Ferreira).

Foram recebidos dois lotes: no primeiro lote, após um dos ensaios, houve dúvida em relação à possível contaminação bacteriana das CNF e foram pedidas novas amostras. As amostras produzidas no 2º lote foram autoclavadas antes dos tratamentos químico e enzimático.

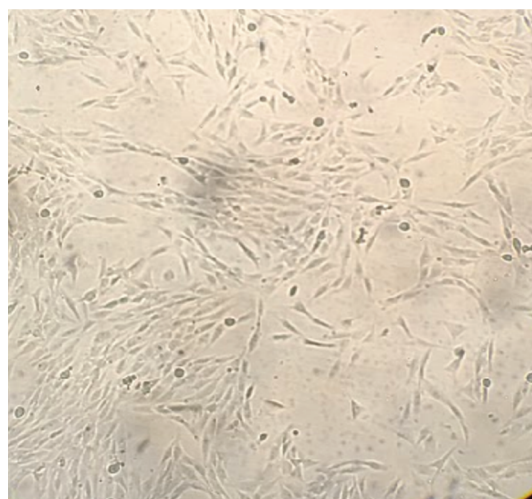
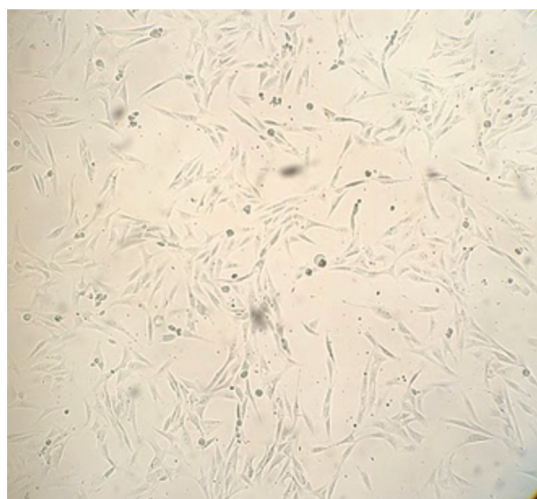
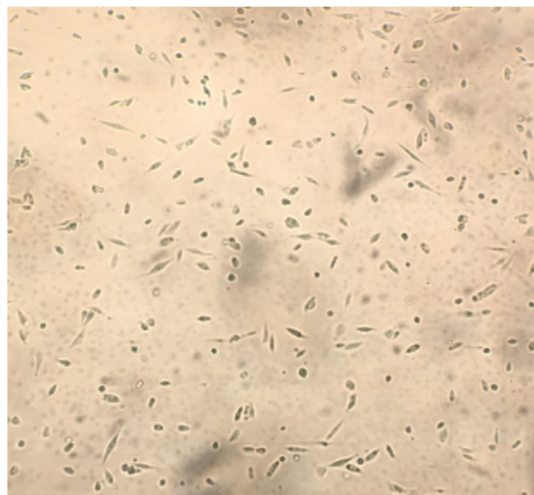


Figura 4 – Diferentes estádios de crescimento celular. (A) Células MG-63 algumas horas após obtenção de subculturas. É possível verificar que a maior parte das células se encontra num formato oval, pouco alongadas, sem prolongamentos. Nesta fase, as células estão a aderir ao fundo do frasco. (B) Células MG-63 48h após a obtenção de subculturas. Temos aproximadamente 50% de confluência e podemos ver a morfologia das células aderidas ao fundo do frasco com prolongamentos, a formarem um aspecto reticulado com “colónias” de células juntas intercaladas com espaços vazios. (C) Células MG-63 a aproximadamente 70% de confluência. Existem zonas de tapete interrompidas por algumas zonas com poucas ou nenhuma células. Todas as células se encontram com morfologia alongada. (Microscópio de inversão Telaval 31, Zeiss. Ampliação 62,5x)

A pasta recém colhida sofreu um primeiro tratamento mecânico para desintegração e refinação das fibras. Depois, cada uma das nanoceluloses recebeu um tratamento diferente:

- A PC TEMPO sofreu uma oxidação mediada por 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO), como descrito no artigo de Saito & Isogai (2007), seguida de um tratamento mecânico numa homogeneizadora de alta pressão.

- A PC Enzimática foi submetida a mais um tratamento mecânico numa homogeneizadora de alta pressão e após este passo foi hidrolisada com endoglucanases de acordo com o método descrito por Tarrés *et al.* (2016).

Numa tentativa de controlarmos a contaminação bacteriana, foi recomendado que se realizasse uma autoclavagem antes da utilização, uma vez que a inoculação em meios apropriados revelou contaminação bacteriana. No entanto, não nos foi possível em tempo útil à realização deste estudo perceber as eventuais consequências que a autoclavagem poderia ter na estrutura das nanoceluloses. Como não obtivemos problema de contaminação aparente durante os ensaios, optámos por não realizar autoclavagem antes da utilização.

Após produção e acondicionamento, as amostras foram mantidas no frio para que melhor preservassem as suas propriedades.

4.2 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR

Os ensaios de viabilidade celular vão permitir detectar a ocorrência de morte celular após exposição a diversas concentrações de um composto ou material. São também bastante úteis pois permitem o apuramento da gama de concentrações correta a utilizar nos ensaios de genotoxicidade, uma vez que não se pretende que ocorram fenómenos de necrose ou apoptose.

4.2.1 MTT

O ensaio do MTT primeiramente descrito por Mosmann (1983) baseia-se na redução do tetrazólio MTT (*(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)*) pelas desidrogenases das mitocôndrias. Este composto possui um anel que é quebrado nas mitocôndrias de células vivas, formando-se cristais de formazan (Dias, 2009). Estes cristais são dissolvidos com dimetilsulfóxido (DMSO), formando um composto corado cuja intensidade é medida espectralmente (absorvância). Assim, este ensaio é quantitativo e permite medir a viabilidade celular.

O procedimento está esquematizado na figura 5. As células MG-63 foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 células/mL nas primeiras réplicas e a 2×10^5 células/mL nas restantes, em placas de 96 poços e incubadas a 37°C e CO₂ a 5%. Após 24h expôs-se as células a concentrações de 1.5, 3.125, 6.25, 12.5, 25 e 50 µg/cm² de CNF TEMPO e CNF enzimática diluídas em meio de cultura completo. As concentrações foram produzidas a partir de uma solução de trabalho constituída por solução aquosa de CNF a 0,83 e 0,77% diluída em tampão fosfato (PBS - *phosphate buffered saline*) para uma concentração de 830 µg /mL e 770 µg /mL.

É importante mencionar que o gel de CNF, especialmente no caso da CNF TEMPO é difícil de dispersar. Como método de combater os aglomerados, as diluições, tanto no PBS como no meio de cultura foram sempre feitas com os solventes à temperatura de 37°C, agitados no *vortex* após diluição e antes da colocação nos poços e ainda ressuspendidos com a pipeta.

Utilizou-se como controlo positivo SDS a 0.07% diluído em meio de cultura (Dias, 2017), produzido a partir de uma solução de trabalho de SDS a 10% diluída em PBS. Adicionou-se às 23h de exposição e deixou-se atuar 1h.

Após 24h de exposição e lavagem com PBS, acrescentou-se 100 µL de MTT a uma concentração de 0,5 mg/mL a cada poço e deixou-se incubar durante 3h. Após esse tempo, colocou-se 100 µL de DMSO em cada poço para dissolver os cristais de formazan e deixou-se 30 minutos sob agitação constante.

Finalmente, realizou-se a leitura da absorvância. em espectrofotómetro Multiscan Ascent (Labsystems, Helsinki, Finland) a 570 nm (filtro de referência 690 nm).

Tivemos alguma dificuldade com a adesão das células no fundo dos poços, portanto, para além de aumentarmos o número de células inicial, efetuámos um controlo microscópico (Telaval 31, Carl Zeiss Microscopy, Alemanha) em cada passo.

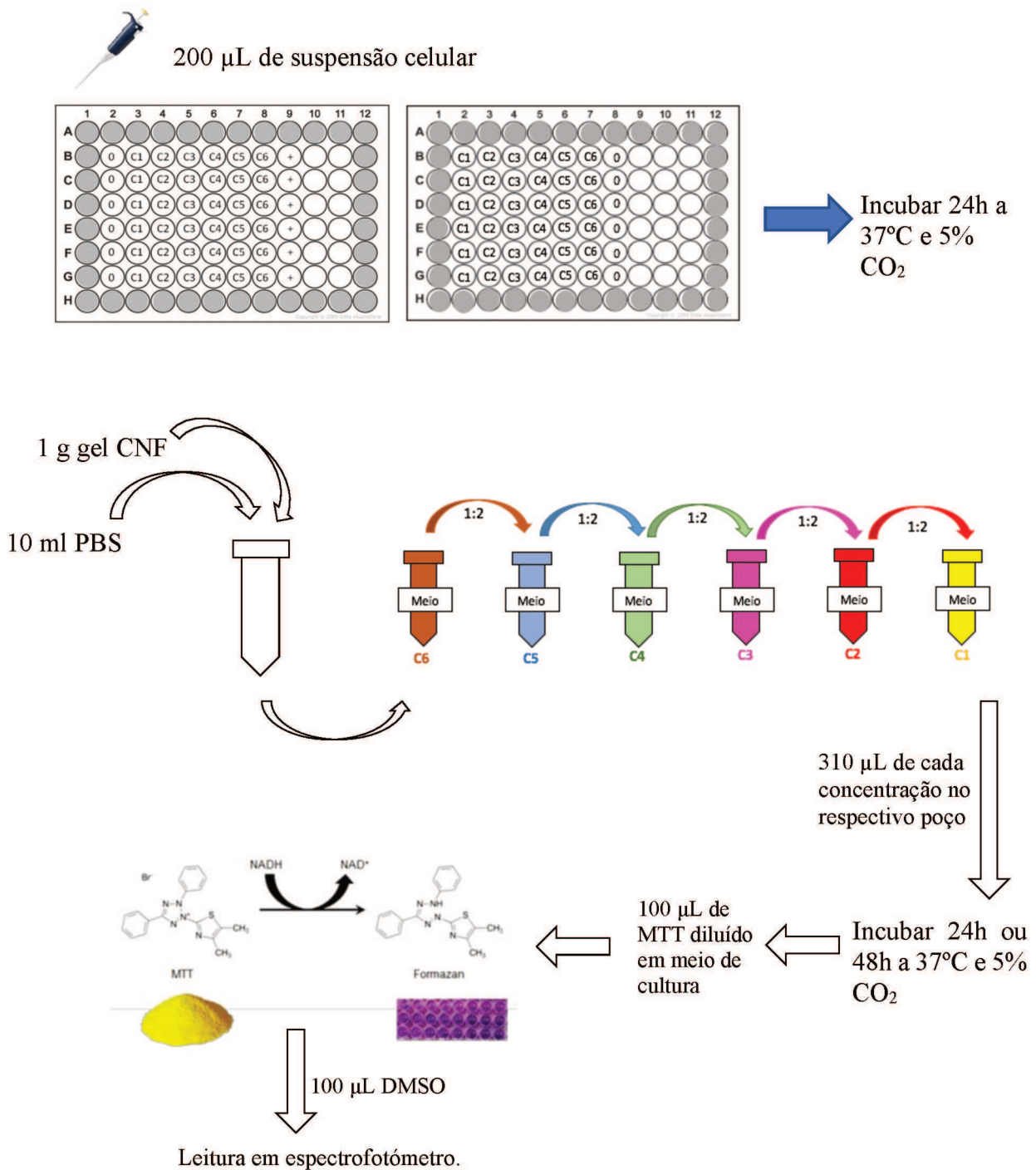


Figura 5 – Protocolo de realização do ensaio do MTT de acordo com Mosmann (1983). Imagem do MTT adaptada de Dias (2017)

4.2.2 ENSAIO CLONOGÉNICO

Fez-se uma tentativa de executar o ensaio clonogénico com uma das CNF. Este ensaio baseia-se na capacidade das células de formar colónias (pelo menos 50 clones de uma única célula), que são posteriormente contadas e comparadas a um controlo negativo (Herzog *et al.*, 2007).

As células foram destacadas da superfície do frasco e a suspensão celular foi centrifugada a 1000 rpm durante 5 minutos e ressuspensa em 3 mL de meio. Juntou-se 50 µL de suspensão celular a 50 µL de azul-tripano e contou-se o número de células numa câmara de Neubauer. Efetuou-se a diluição das células adicionando a quantidade apropriada de meio a partir da concentração inicial e plaqueou-se 2 mL de cultura celular a 1×10^5 células/mL em cada poço de uma placa de 6 poços. Incubou-se durante 20h numa estufa a 37°C e CO₂ a 5%, uma vez que é essencial fazer a exposição antes da primeira divisão celular para que as células estejam individualizadas e se possa aferir realmente se o composto adicionado interfere com a sua capacidade de divisão. As MG-63 têm um tempo de duplicação de aproximadamente 28h.

Às 20h expôs-se as células a concentrações de 1.5, 3.125, 6.25, 12.5, 25 e 50 µg/cm² de CNF TEMPO diluídas em meio de cultura. A exposição ocorreu durante 7 dias e controlou-se a formação de colónias ao microscópio de inversão (Telaval 31, Carl Zeiss Microscopy, Alemanha).

No final do ensaio, procedeu-se à fixação das células seguida de coloração com Giemsa (Merck, Darmstadt, Alemanha) e observou-se as colónias formadas. No entanto, e dado que se obteve uma formação de colónias inconsistente, não foi possível analisar.

4.3 ENSAIO DE GENOTOXICIDADE

4.3.1 Ensaio de Micronúcleos com bloqueio da citocinese (CBMN)

O ensaio foi realizado seguindo as indicações escritas nas linhas de orientação da OCDE (OECD 487, 2014) e o esquema do procedimento encontra-se na figura 6. As células

foram destacadas da superfície do frasco e a suspensão celular foi centrifugada a 1000 rpm durante 5 minutos e ressuspensa em 3 mL de meio. Juntou-se 50 µL de suspensão celular a 50 µL de azul-tripano e contou-se o número de células numa câmara de Neubauer. As células foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 células/mL em placas de 6 poços e deixadas a incubar durante a 37°C e 5% de CO₂. 24h depois realizou-se a exposição às CNF com concentrações de 1.5, 3.125, 6.25 e 12.5 µg/cm² de CNF TEMPO e CNF enzimática diluídas em meio de cultura completo. As concentrações foram produzidas a partir de uma solução de trabalho constituída por solução aquosa de CNF a 0,83 e 0,77% diluída em PBS para uma concentração de 830 µg /mL e 770 µg /mL.

Às 21h de exposição, adicionou-se o controlo positivo consistindo em mitomicina C (MMC) na concentração de 0,1 µg/mL.

Às 22h horas de exposição, retirou-se a MMC, lavou-se os respectivos poços duas vezes com PBS e adicionou-se meio fresco. Introduziu-se a citocalasina B em todos os poços a uma concentração de 4 µg/mL e deixou-se atuar mais 42h.

Ao fim desse tempo, todos os poços foram lavados duas vezes com PBS, as células foram desagregadas por tripsinização e o conteúdo de cada réplica (2 poços) foi passado para um tubo de 15 mL e centrifugado a 1200 rpm durante 5 minutos. Decantou-se o sobrenadante e adicionou-se às células cloreto de potássio (0.1 M) a 37°C, gota a gota e sob agitação constante no *vortex*, com a finalidade de causar um choque hipotónico nas células. Voltou-se a centrifugar sob as mesmas condições e tempos utilizados anteriormente e decantou-se o sobrenadante. Após ressuspensão das células, colocou-se 1 mL de metanol:ácido acético (3:1), previamente arrefecido, gota a gota e sob agitação constante no *vortex*. Colocou-se o conteúdo de cada tubo num funil montado com lâmina e colocou-se na citocentrífuga (Cytospin 3, Shandon) a 1000 rpm durante 5 minutos. Ajustou-se a densidade celular conforme necessário e efetuaram-se duas lâminas para cada réplica.

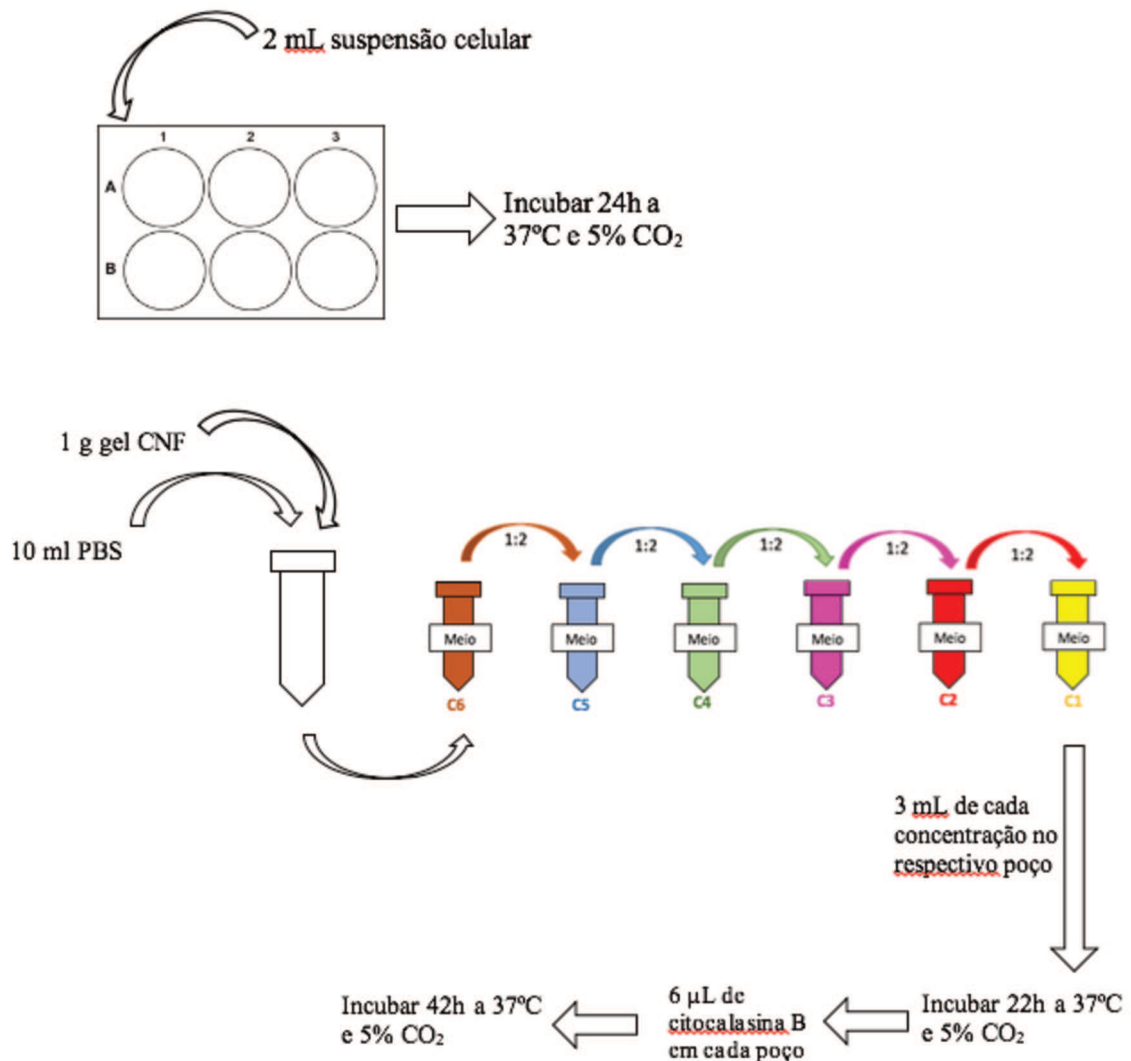
As lâminas foram secadas ao ar, coradas com uma solução de giemsa (Merck, Darmstadt, Alemanha) diluída em tampão gurr (Gibco, Scotland, UK) durante 15 minutos e foram colocadas lamelas com 2 a 3 gotas de entelan (Merck, Darmstadt, Alemanha).

A análise foi feita num microscópio óptico (Axiscop 2 Plus, Carl Zeiss Microscopy, Alemanha) com ampliação de 400x para análise da distribuição de núcleos e ampliação de 1000x para análise de micronúcleos, PNP e *buds*, utilizando lâminas previamente codificadas.

O índice de proliferação (*Cytokinesis-Block Proliferation Index* – CBPI) foi avaliado pela fórmula:

CBPI

$$= \frac{((n^{\circ} \text{ de céls mononucleadas}) + (2 \times n^{\circ} \text{ de céls binucleadas}) + (3 \times n^{\circ} \text{ de céls multinucleadas}))}{n^{\circ} \text{ total de céls}}$$



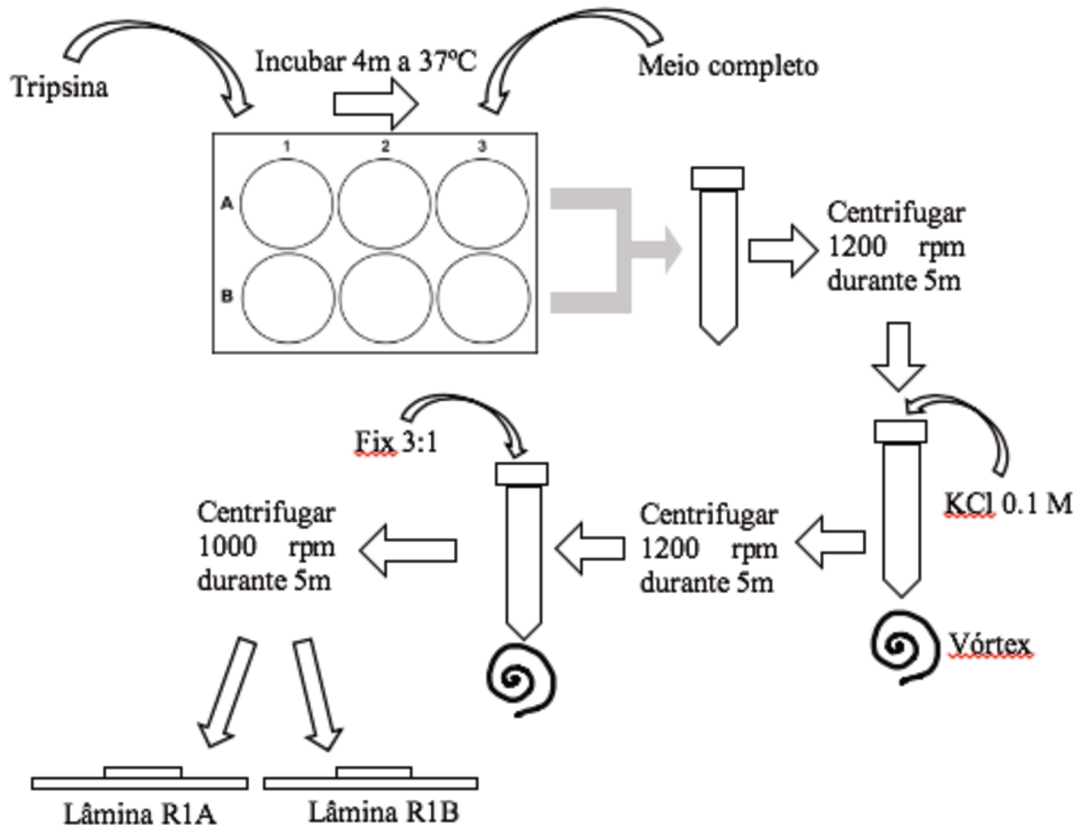


Figura 6 - Protocolo de realização do ensaio do micronúcleo (CBMN), de acordo com Fenech (2007)

O índice replicativo (*Replicative Index – RI*) por esta fórmula:

RI

$$= \frac{((n^{\circ} \text{ de céls binucleadas}) + (2 \times n^{\circ} \text{ de céls multinucleadas})) \div n^{\circ} \text{ total de céls tratadas}}{((n^{\circ} \text{ de céls binucleadas}) + (2 \times n^{\circ} \text{ de céls multinucleadas})) \div n^{\circ} \text{ total de céls não tratadas}} \times 100$$

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O programa utilizado na análise estatística foi o SPSS (IBM SPSS statistics v.22, Chicago, IL). O teste *2-tailed Fisher's exact test* serviu para analisar os resultados no número de células binucleadas com micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e *buds*. Todos os valores de *p* (*p-value*) abaixo de 0.05 foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

5.1 PRODUÇÃO DAS NANOCELULOSES

Como descrito nos materiais e métodos, ambas as CNF sofreram um pré-tratamento de filtração seguido de oxidação mediada por TEMPO (CNF TEMPO) e hidrólise enzimática (CNF enzimática).

Foram utilizados dois lotes de cada CNF, produzidas em tempos diferentes. Os teores de secura das amostras são apresentados na tabela 2.

Na mesma tabela apresentam-se o rendimento da produção e o grau de polimerização (DP) das CNF analisadas. O rendimento diz respeito à percentagem de material que ficou no formato nano e é determinado pela centrifugação a 9000 rpm durante 30 minutos de uma suspensão aquosa a 0.2%. O DP quantifica o número de grupos funcionais (COOH) ligados à molécula da celulose.

O rendimento obtido para a CNF enzimática é baixo relativamente ao da CNF TEMPO. Sendo que apenas 8.2% da amostra se encontra em formato nanométrico, encontramos perante uma celulose com uma estrutura maioritariamente micrométrica.

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas das CNF

Amostra	Lote	Teor de secura (%)	Rendimento (%)	DP
TEMPO	1	0.83	82.4	1177
Enzimática	1	0.83	8.2	185
TEMPO	2	0.77	100.0	364.5
Enzimática	2	0.85	*	1472.3

*valor não calculado

5.2 CITOTOXICIDADE

Os resultados dos ensaios de MTT estão graficamente representados nas figuras 7 a 10. Os resultados estão expressos como percentagem (Média \pm EP) de células viáveis relativamente ao controlo negativo.

Para a CNF TEMPO foram considerados os dados de cinco experiências independentes após 24 horas de exposição e de duas experiências para uma exposição de 48 horas.

Às 24 horas de exposição a CNF TEMPO não se notou nenhuma descida significativa da viabilidade celular, sendo que os valores mais baixos foram de 94% na concentração mais alta ($50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) e de 94.6% na concentração intermédia de $6.25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Não se observou, pois, qualquer relação dose-resposta.

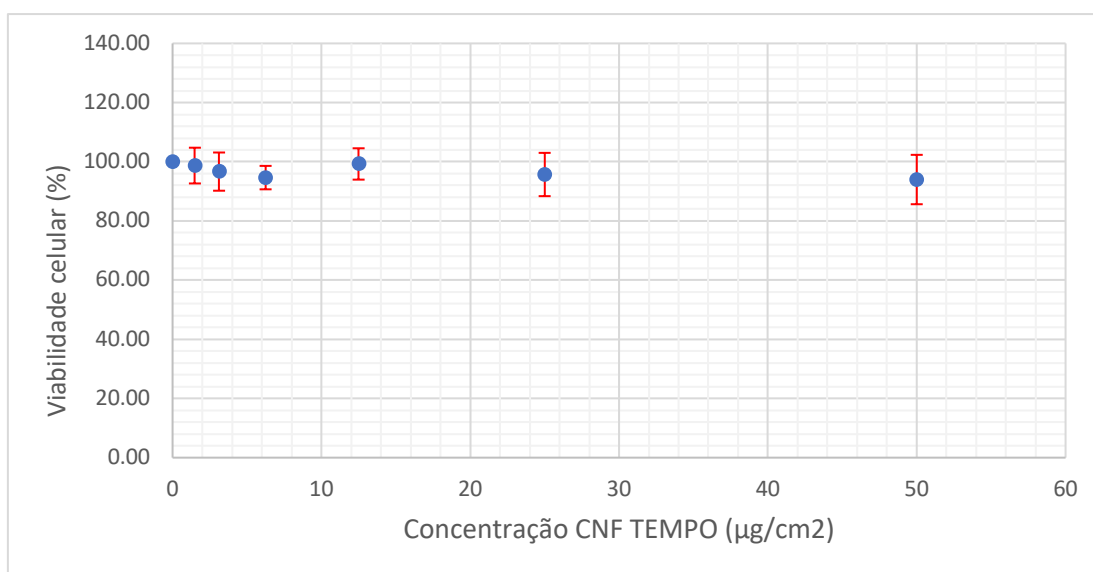


Figura 7- Resultados dos ensaios de viabilidade (MTT) em células MG-63 para uma exposição de 24h a CNF TEMPO

Às 48 horas, também não se observou nenhuma descida significativa nas percentagens de células viáveis, existindo, pelo contrário, um aumento nas concentrações de $6.25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e de $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. O valor mais baixo foi registado na concentração mais alta ($50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) e foi de 90.2%.

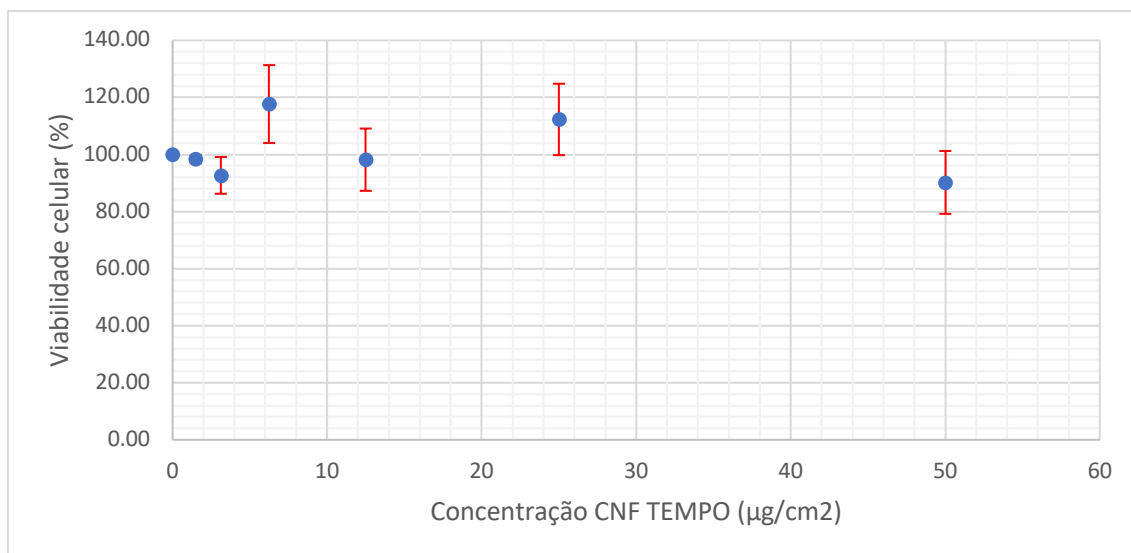


Figura 8 - Resultados dos ensaios de viabilidade (MTT) em células MG-63 para uma exposição de 48h a CNF TEMPO

Para a CNF enzimática consideraram-se cinco experiências com incubação a 24 horas e três experiências com incubação de 48 horas (figuras 9 e 10).

Às 24 horas, ocorreu uma ligeira diminuição da viabilidade celular, dependente da dose até à concentração de 25 µg/cm². Não obstante, este decréscimo não atingiu o limite dos 70% de perda de viabilidade, definido pela ISO como o limite para um nanomaterial ser considerado citotóxico (ISO, 2009). Apesar disso, tentou ajustar-se os dados a uma função polinomial com um R² de 0.6676, cuja equação se apresenta na figura 9.

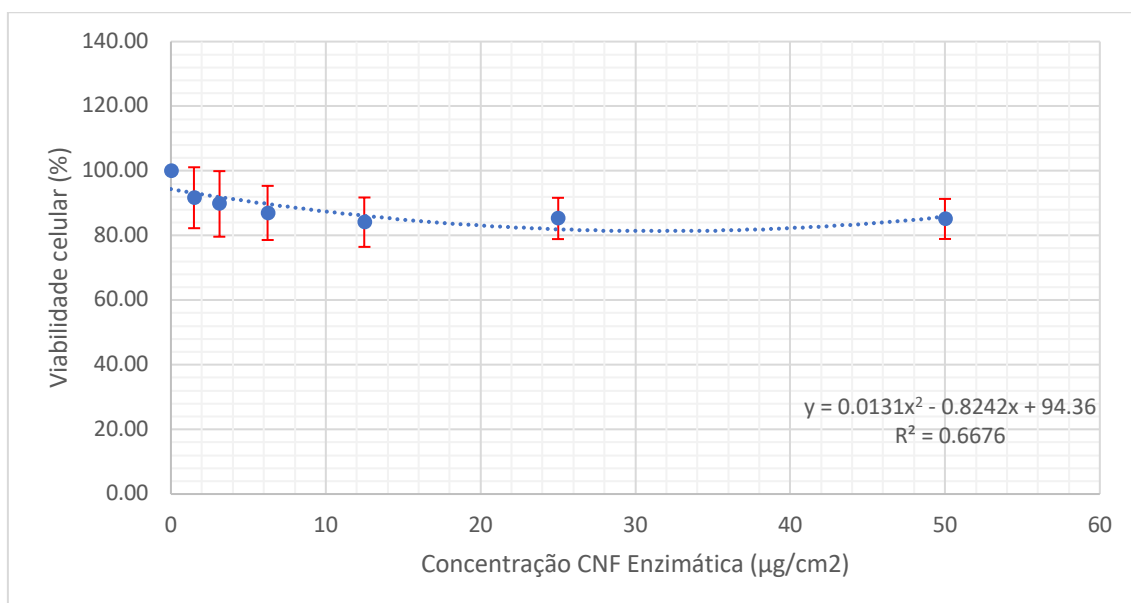


Figura 9 - Resultados dos ensaios de viabilidade (MTT) para uma exposição de 24h a CNF Enzimática em células MG-63

Às 48 horas, notou-se apenas uma ligeira diminuição da viabilidade celular nas concentrações mais baixas, também longe do limite de 70% (figura 10).

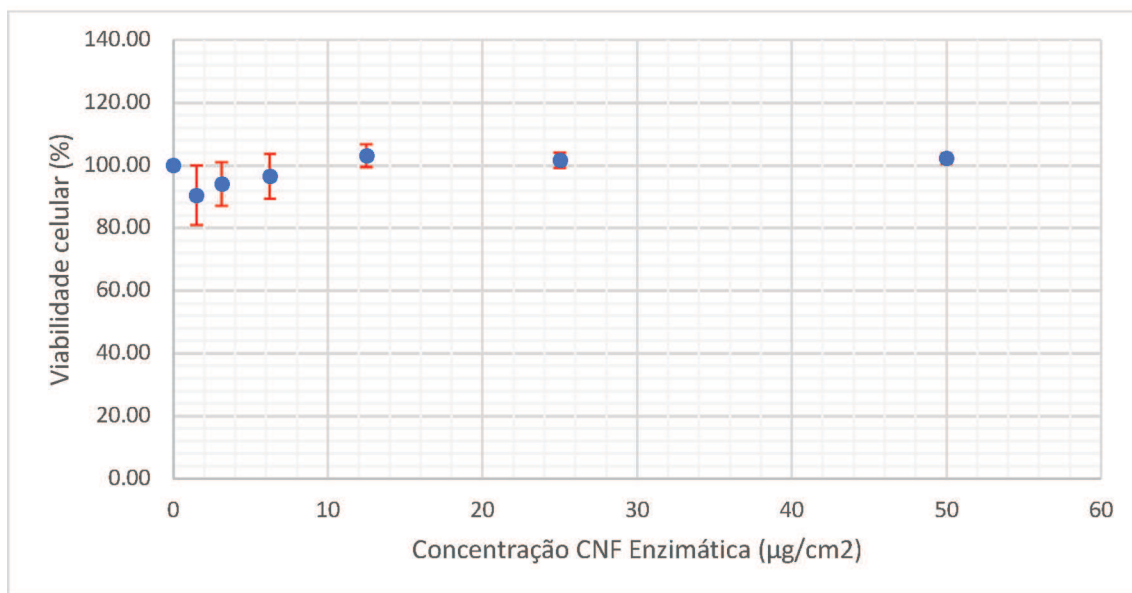
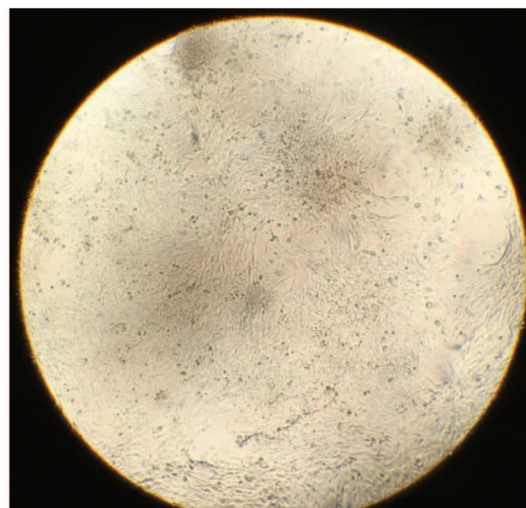
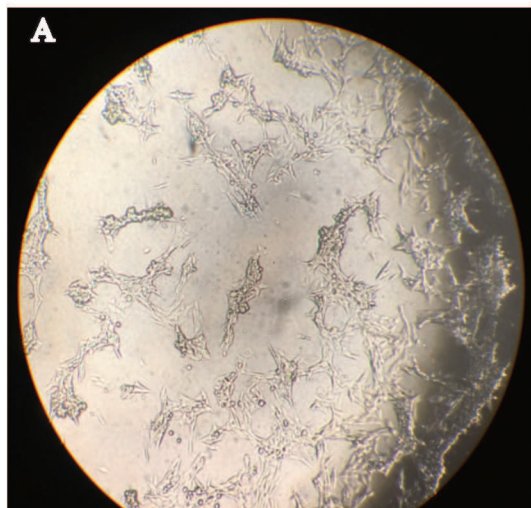


Figura 10 - Resultados dos ensaios de viabilidade (MTT) para uma exposição de 48h a CNF Enzimática em células MG-63



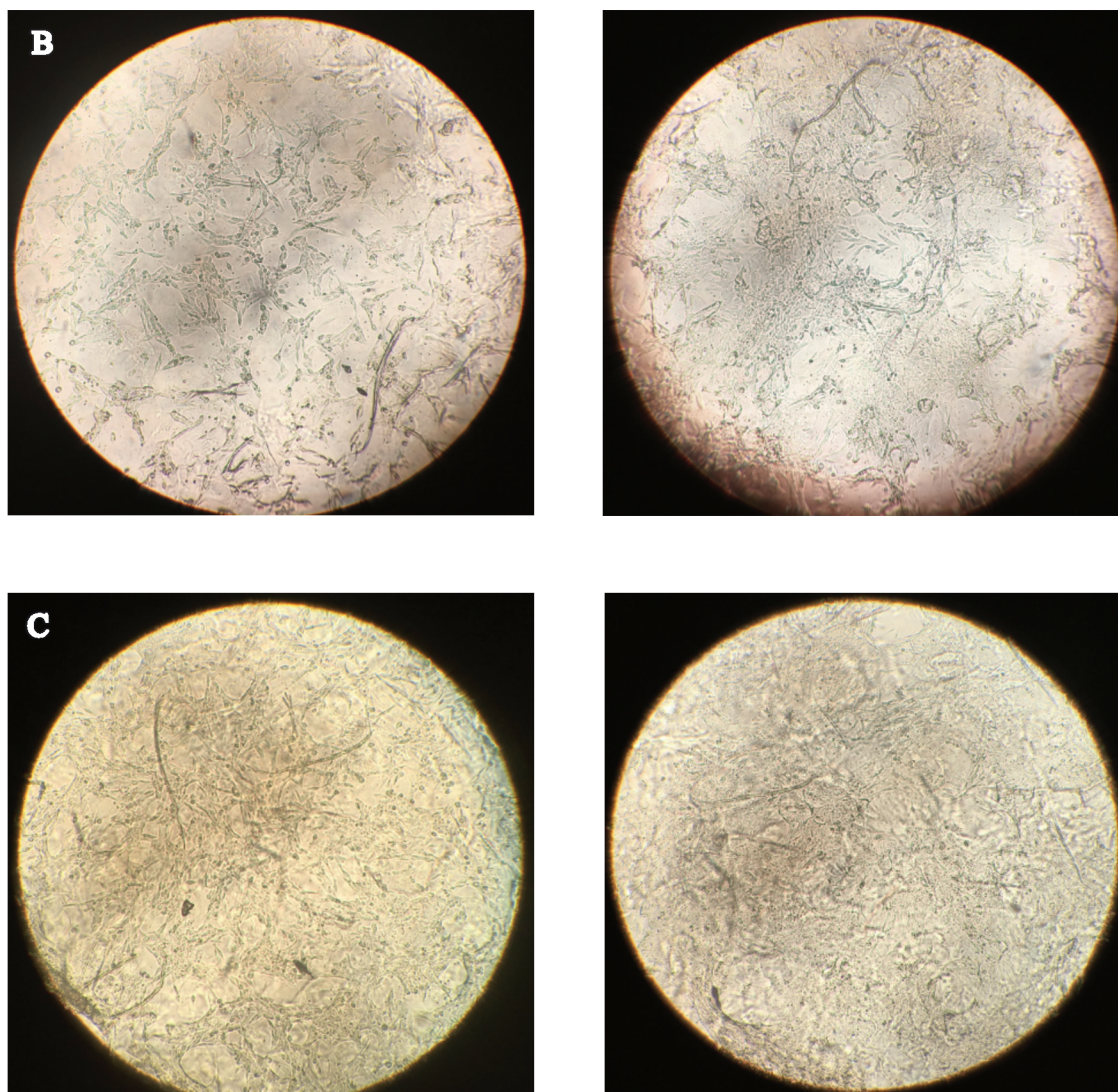


Figura 11- MTT 48h. No lado esquerdo, células MG-63 logo após exposição a CNF TEMPO. Do lado direito, células MG-63 após 48h de exposição a CNF TEMPO. (A) corresponde ao controle negativo (B) corresponde à concentração de $12.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e (C) corresponde à concentração de $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Microscópio de inversão Telaval 31, Zeiss. Ampliação 62,5x)

Verificaram-se algumas limitações de natureza técnica no ensaio do MTT que inviabilizaram os resultados de algumas experiências por não terem sido reprodutíveis. Explorou-se alguns fatores que poderiam interferir com os resultados e notou-se que as células MG-63 aderiam deficientemente à superfície de determinado tipo de placas de 96 poços (marca *Nunc*). Após efetuar um ensaio usando duas placas de marcas diferentes em que se distribuiu a mesma concentração celular exatamente ao mesmo tempo, observamos uma adesão e morfologia completamente díspares, tal como se pode observar na figura 12. Assim, concluiu-se que é importante controlar todos os materiais e todas as fases de um ensaio para minimizar este tipo de variações.

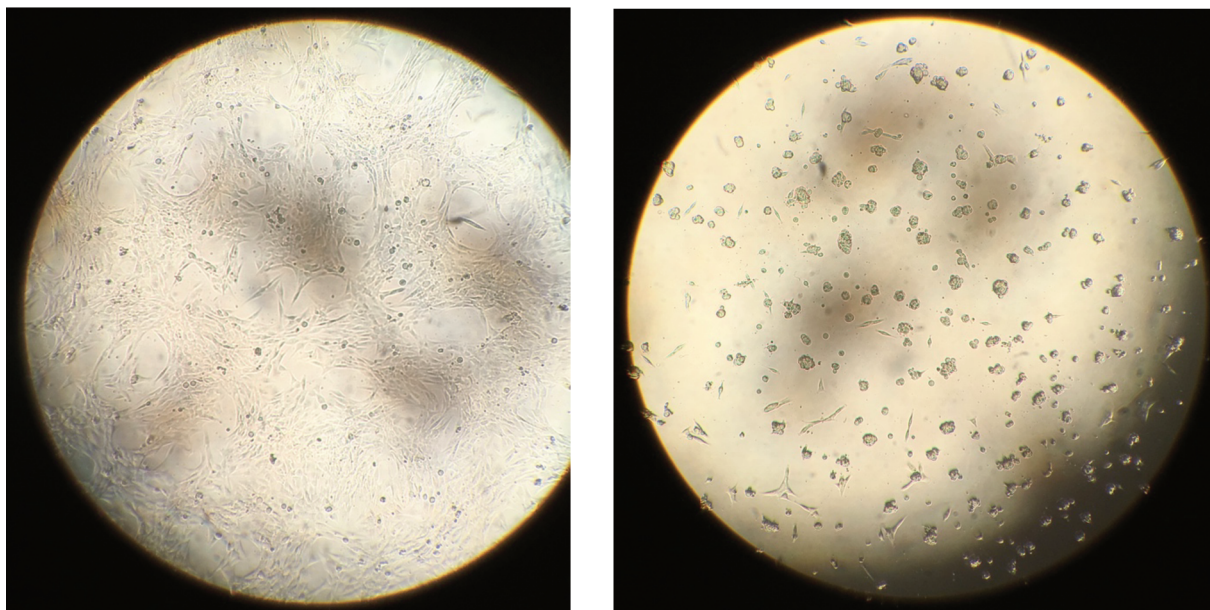


Figura 12 – Diferença na adesão de células MG-63 em placas de 96 poços de ThermoFischer Scientific (A) e Nunc (B). Incubação durante 24h a 37°C e 5% CO₂ de uma suspensão celular de 2x10⁵ células/mL. (A) É possível distinguir a morfologia normal das células, com uma forma alongada e a crescerem em monocamada, por oposição a (B) em que as células têm formato esférico e estão aglomeradas e não aderentes. (Microscópio de inversão Telaval 31, Carl Zeiss Microscopy, Alemanha. Ampliação 62,5x)

5.3 GENOTOXICIDADE

O ensaio utilizado para avaliar a genotoxicidade foi o ensaio do micronúcleo *in vitro*. Foram avaliadas as concentrações de ambas as nanoceluloses entre 1,5 e 12,5 µg/cm² e adicionados também controlos positivo e negativo. Avaliou-se a proporção de células mono-, bi- e multinucleadas para determinação do CBPI (figura 13). Contabilizou-se o número de células binucleadas com presença de micronúcleos (figura 16), *buds* (figura 18) e/ou pontes nucleoplasmáticas (figura 20).

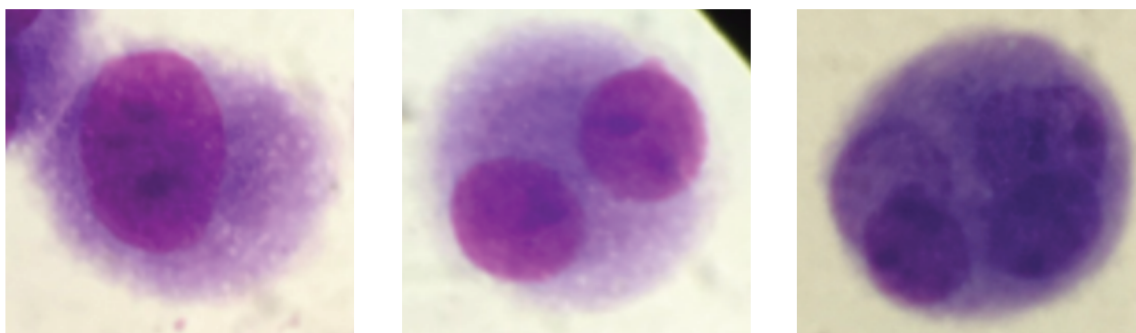


Figura 13 - Fotografias do CBMN: célula MG-63 mononucleada, binucleada e multinucleada. (Microscópio ótico Axioscop 2 Plus, Carl Zeiss Microscopy, Alemanha. Ampliação 1000x)

Em relação à CNF TEMPO, observou-se um aumento estatisticamente significativo da frequência de células binucleadas com presença de micronúcleos (células micronucleadas) nas concentrações mais baixas (1,5 e 3,125 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), assim como no controlo positivo com MMC. Os resultados estão apresentados na figura 14.

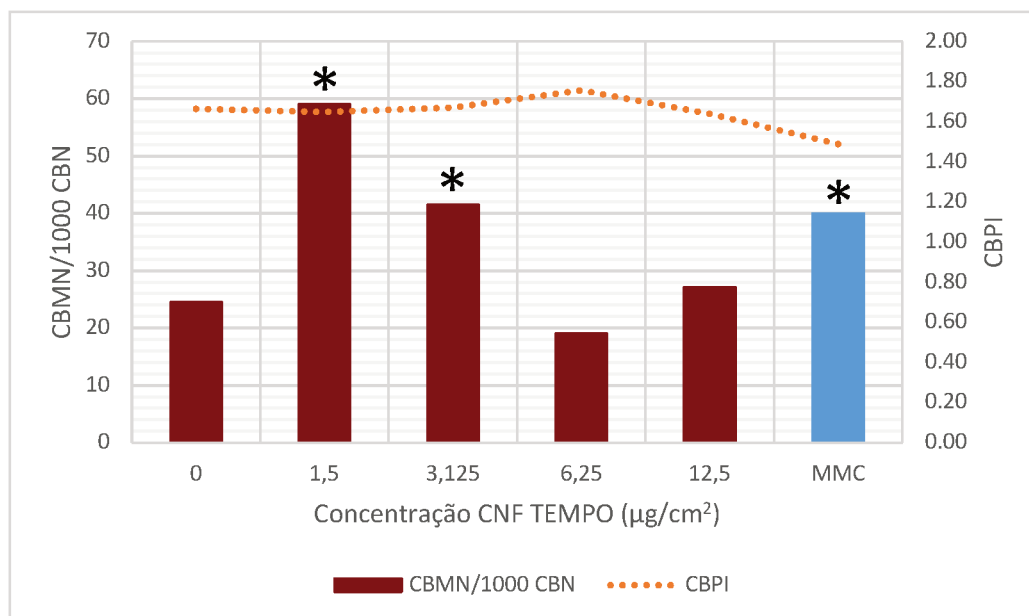


Figura 14 – Frequência de células micronucleadas (CBMN) por 1000 células binucleadas (CBN) e valores de CBPI em células expostas a CNF TEMPO. MMC representa o controlo positivo. * indica aumento estatisticamente significativo em relação ao controlo.

Relativamente à CNF Enzimática, verificou-se também um aumento da frequência de células micronucleadas após exposição às concentrações de 1,5 e 3,125 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, à semelhança do observado para a CNF TEMPO (figura 15).

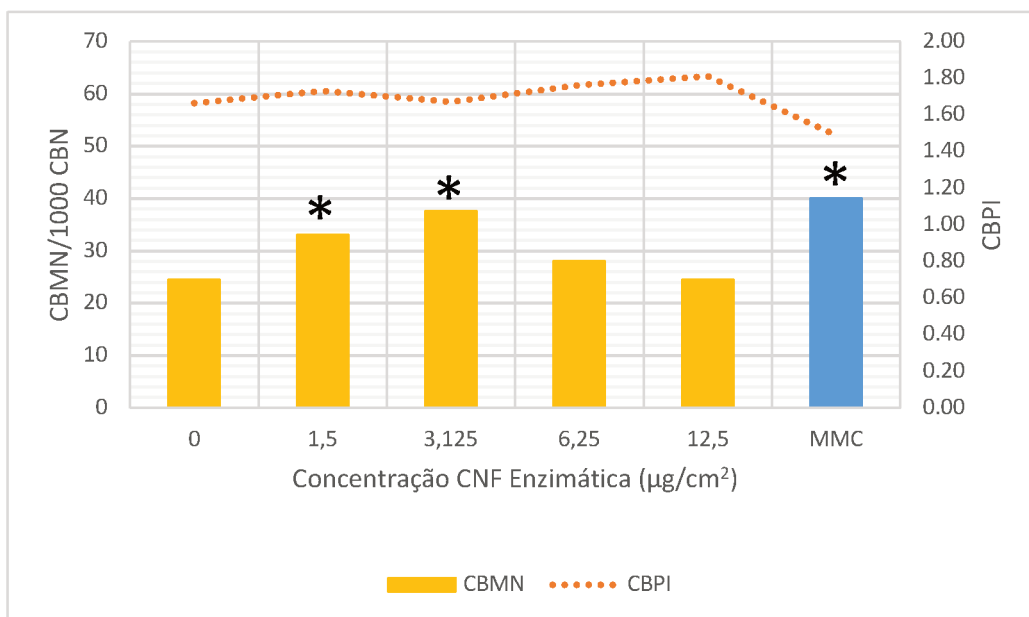


Figura 15 Frequência de células micronucleadas (CBMN) por 1000 células binucleadas (CBN) e valores de CBPI em células expostas a CNF Enzimática. MMC representa o controle positivo. * indica aumento estatisticamente significativo em relação ao controle.

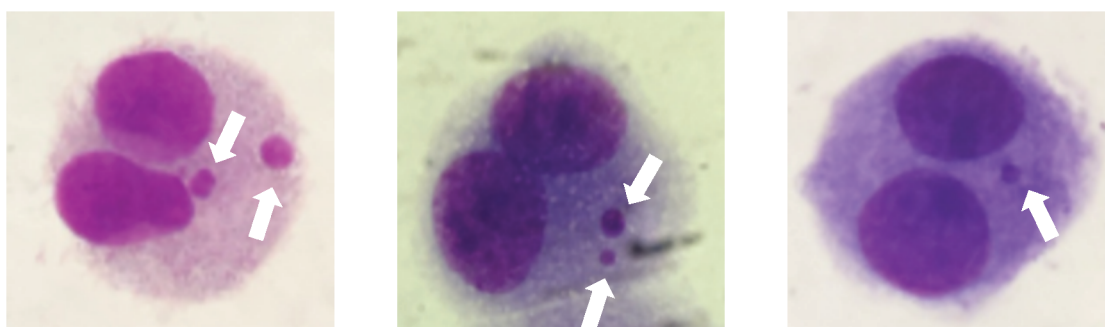


Figura 16- Fotografias do CBMN: células MG-63 binucleadas e com presença de micronúcleos (setas brancas). (Microscópio ótico Axioscop 2 Plus, Carl Zeiss Microscopy, Alemanha. Ampliação 400x e 1000x)

Em termos da frequência de *buds*, não se verificaram aumentos significativos da sua frequência nas células tratadas com as CNF, excetuando para a concentração de 12,5 µg/cm² da CNF Enzimática. As concentrações em que o número de *buds* é nulo correspondem a concentrações em que não foi avaliado este parâmetro por dificuldade na aplicação dos critérios (figuras 17 a 19).

RESULTADOS

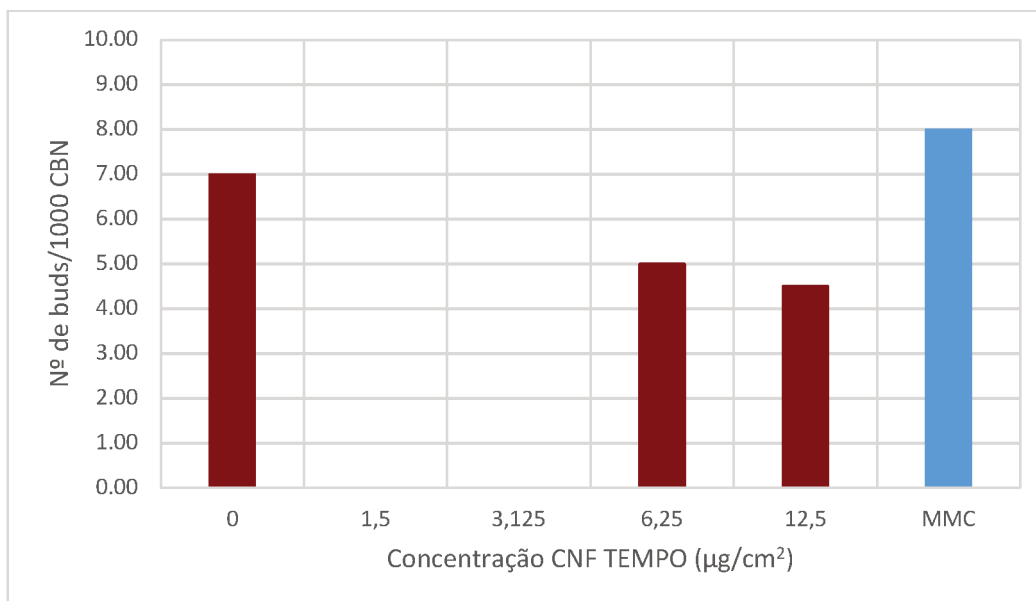


Figura 17 - Frequência de células binucleadas com buds (n° de buds) por 1000 células binucleadas (CBN), expostas a CNF TEMPO. MMC representa o controle positivo. * indica aumento estatisticamente significativo em relação ao controle.

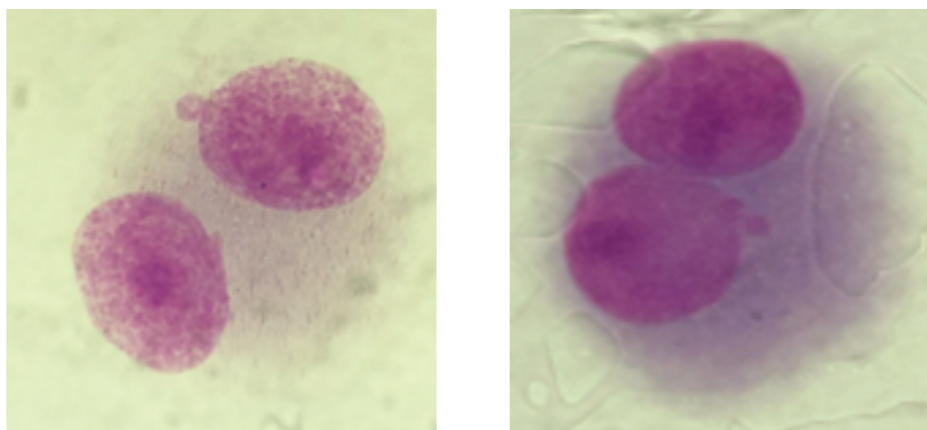


Figura 18- Fotografias do CBMN: células MG-63 binucleadas e com presença de buds. De notar a semelhança aos micronúcleos mas a existência de uma ponte de ligação ao núcleo principal. (Microscópio ótico Axioscop 2 Plus, Carl Zeiss Microscopy, Alemanha. Ampliação 1000x)

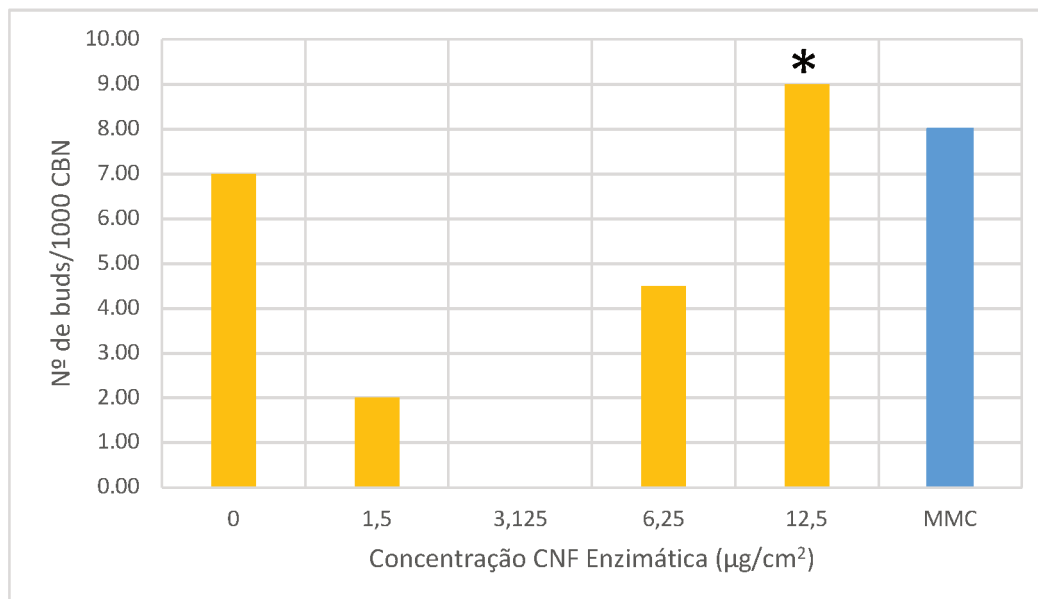


Figura 19 - Frequência de células binucleadas com buds (nº de buds) por 1000 células binucleadas (CBN), expostas a CNF Enzimática. MMC representa o controle positivo. * indica aumento estatisticamente significativo em relação ao controle.

Em relação às pontes (figura 20), temos um padrão semelhante aos micronúcleos em ambas as CNF, como é possível verificar nos gráficos apresentados nas figuras 21 e 22.

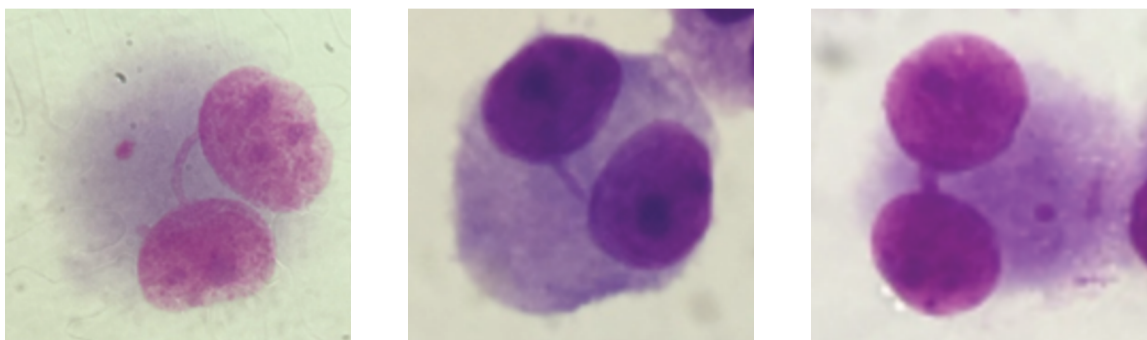


Figura 20 - Fotografias do CBMN: células MG-63 binucleadas e com presença de pontes nucleoplasmáticas. As células das extremidades apresentam igualmente micronúcleos. (Microscópio ótico Axioscop 2 Plus, Carl Zeiss Microscopy, Alemanha. Ampliação 400x e 1000x)

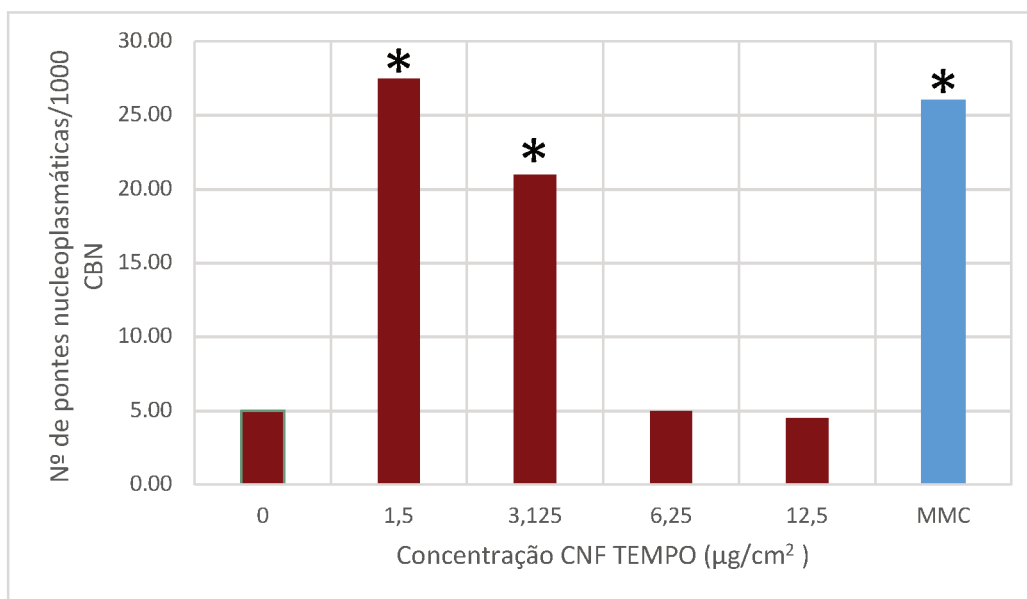


Figura 21 - Frequência de células binucleadas com pontes nucleoplasmáticas (nº de pontes nucleoplasmáticas) por 1000 células binucleadas (CBN), expostas a CNF TEMPO. MMC representa o controlo positivo. * indica aumento estatisticamente significativo em relação ao controlo.

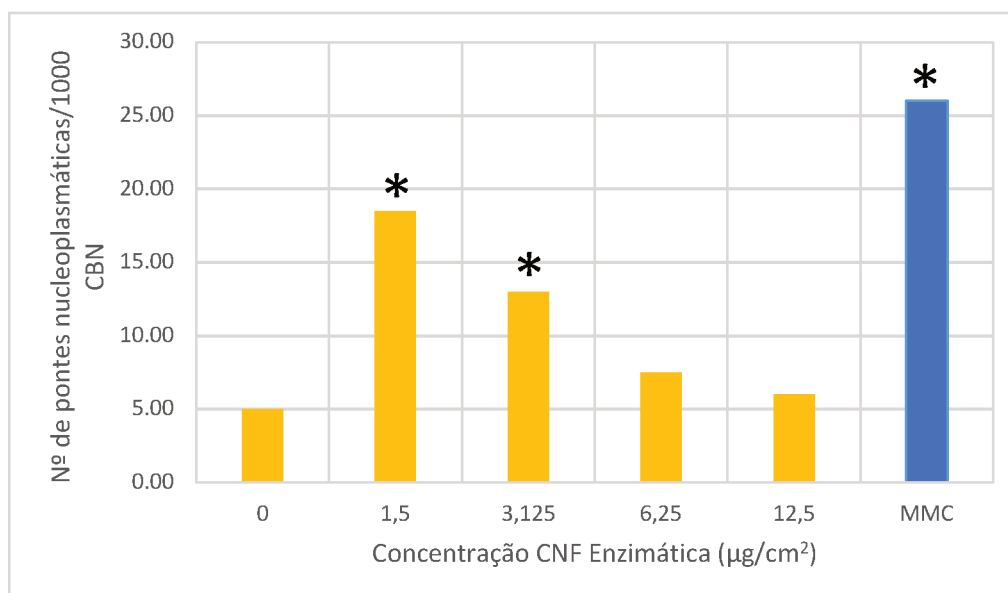


Figura 22 – Frequência de células binucleadas com pontes nucleoplasmáticas (nº de pontes nucleoplasmáticas) por 1000 células binucleadas (CBN), expostas a CNF Enzimática. MMC representa o controlo positivo. * indica aumento estatisticamente significativo em relação ao controlo.

Os valores de RI são apresentados nas figuras 23 e 24 e dizem respeito à capacidade replicativa das células por comparação com o controlo negativo. Como se pode observar, a exposição das células MG-63 não causou diminuição significativa do RI e, pelo contrário, na concentração de 6,25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ induziu um ligeiro aumento do RI.

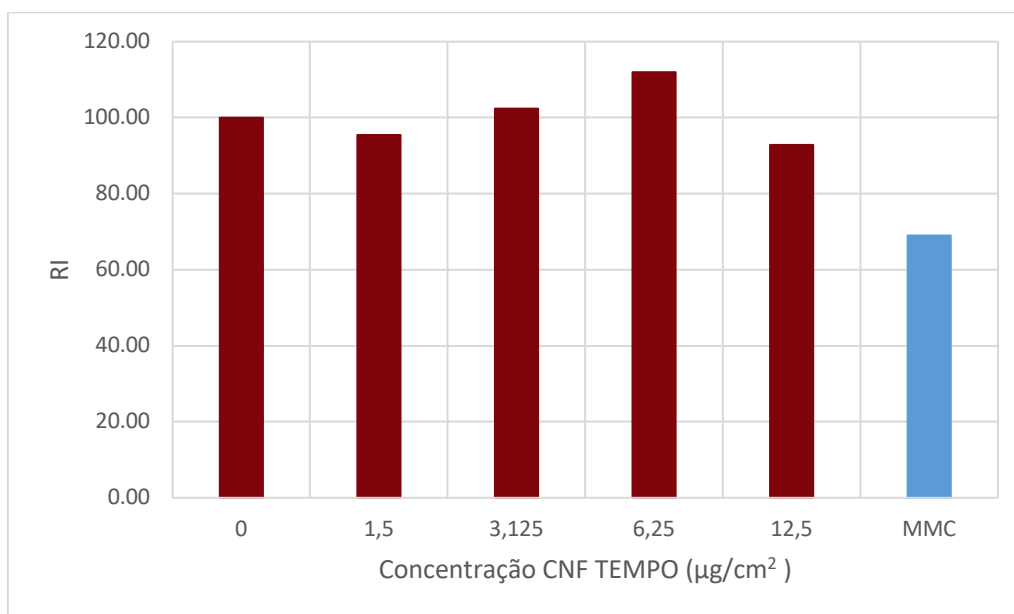


Figura 23 – Índice replicativo (RI) de células MG-63 após exposição a CNF TEMPO. MMC mostra o controlo positivo.

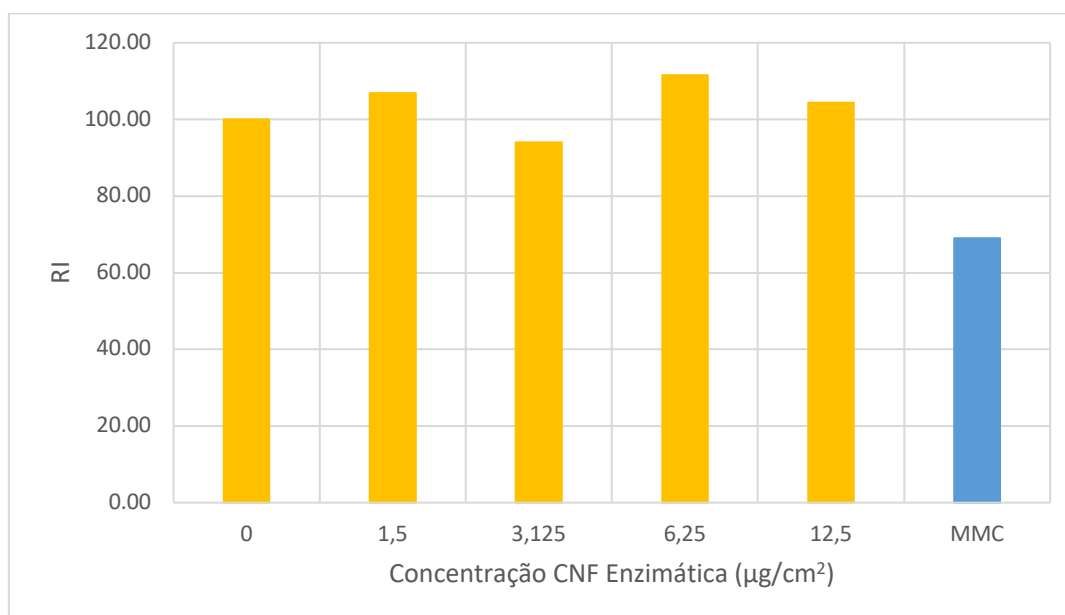


Figura 24 – Índice replicativo (RI) das células MG-63 após exposição a CNF Enzimática. MMC mostra o controlo positivo

6. DISCUSSÃO

Pelas suas características físico-químicas e as aplicações que já tem na área médica, é de esperar que seja cada vez mais frequente a presença dos materiais de e com nanocelulose no consultório médico-dentário. Desde cimentos de ionómero de vidro reforçados por nanocelulose assumirem um papel preponderante nas restaurações diretas, à utilização de membranas com alto conteúdo de nanocelulose em regeneração óssea, periodontal e até ao possível fabrico de próteses de substituição das estruturas cartilagíneas da ATM, existe definitivamente lugar para este nanomaterial no futuro dos materiais dentários.

A sua inevitável presença em ambiente clínico pressupõe a necessidade da sua caracterização e do correto entendimento das suas ações no nosso organismo. No caso das nanofibras de celulose, as vantagens que a sua aplicação traz, principalmente relacionadas com as suas propriedades físico-químicas, podem também estar na origem de efeitos nocivos para a saúde humana e ambiente que não haviam sido demonstrados nos materiais em formato não-nanométrico. Assim, terá de se assegurar o desenvolvimento e aplicação de um material seguro para a saúde humana e para o ambiente, de modo a que possam ser reduzidas as hipóteses de efeitos imprevisíveis tardios, após a sua introdução no mercado. Ainda um outro aspeto importante, diz respeito à exposição a nanofibras em ambiente ocupacional e, em particular, do pessoal médico e biomédico, durante a aplicação clínica de materiais à base de nanofibras e os seus potenciais riscos, uma vez que as CNF apresentam semelhanças estruturais com os nanotubos de carbono e os asbestos, principalmente pela sua razão de aspeto aumentada, cuja toxicidade foi demonstrada num estudo realizado por Ilves *et al.* em 2018.

Com este estudo pretende-se contribuir para a avaliação da segurança de nanofibras de celulose com potencial para aplicações biomédicas, através da caracterização da sua toxicidade em células humanas.

Utilizou-se uma linha celular de osteoblastos, uma vez que, pelo seu potencial de aplicação na regeneração óssea, a nanocelulose se encontrará em contato próximo com este tipo de células no organismo humano. Um estudo *in vitro* numa linha celular permite-nos eliminar problemas éticos e variáveis que podem alterar os resultados finais.

6.1 NANOCELULOSES

A produção da CNF enzimática apresenta, como representado na tabela 2, um rendimento extremamente baixo, isto significa que a maior parte da amostra se encontra numa escala micrométrica. Como já foi referido, as características físico-químicas das nanofibras, incluindo o seu tamanho, influenciam o seu comportamento em sistemas orgânicos. Assim, os resultados obtidos para a CNF enzimática podem refletir a interação de partículas de maiores dimensões, possivelmente incapazes de atravessar a membrana celular e/ou nuclear das células. Esta limitação na produção de CNF enzimática em formato nanométrico pode ser um dos motivos para a ausência de estudos que a utilizem.

6.2 CITOTOXICIDADE

Os resultados obtidos pelo ensaio do MTT após exposição das células durante 24h e 48h a diversas concentrações da CNF TEMPO ou da CNF enzimática indicaram que não houve um decréscimo acentuado da viabilidade celular. Como podemos observar pelas figuras 7 a 10, nenhuma das CNF aqui estudadas apresentou resultados que nos indiquem toxicidade para com as células estudadas. O valor de referência para a demonstração de toxicidade encontra-se nos 70% de viabilidade (ISO, 2009), ou seja, uma perda de 30% de viabilidade em relação ao controlo negativo. No nosso estudo, não se detetou uma relação dose-resposta em nenhuma das CNF em estudo.

Para a CNF TEMPO, não são encontrados valores inferiores a 90%, o que nos indica que, sob as condições exploradas, podemos considerá-la segura em termos de citotoxicidade. Estes resultados são consistentes com a maior parte dos resultados encontrados por outros autores nos seus respetivos estudos: Ventura *et al.* (2018), não detetaram citotoxicidade numa co-cultura de células epiteliais e macrófagos, com uma exposição de 24h; Nordli *et al.* (2016) não observaram igualmente citotoxicidade em fibroblastos e queratinócitos humanos; Rashad *et al.* (2017) obtiveram os mesmos resultados com fibroblastos de rato. Todos estes estudos utilizaram CNF TEMPO, mas apenas o de Ventura *et al.* (2018) era proveniente de *Eucalyptus globulus*. Nordli *et al.* (2016) utilizaram CNF proveniente de *Pinus radiata* e no estudo de Rashad *et al.* (2017) não se especifica a origem da CNF TEMPO utilizada.

No estudo de Souza *et al.* (2018) também não se verificou nenhum decréscimo na viabilidade em fibroblastos nas concentrações estudadas durante as 24h de exposição num ensaio de MTT, utilizando uma CNF produzida a partir de curauá (*Ananas erectifolius L. B. Smith*) com tratamento mecânico precedido de tratamento químico. No entanto, Lima *et al.* (2012) utilizaram uma CNF semelhante e obtiveram resultados que apontaram para a existência de citotoxicidade em fibroblastos de rato (3T3). Não existiu diminuição da viabilidade celular no estudo de Pereira *et al.* (2013) com CNF provenientes de fibras de algodão comercial com um tratamento mecânico e químico. Só a partir dos 200 $\mu\text{g/mL}$ é que os autores notaram um decréscimo. A concentração mais alta estudada pelo presente trabalho foi de 50 $\mu\text{g/cm}^2$, corresponde a 160,3 $\mu\text{g/mL}$. O estudo de Lopes *et al.* (2017) analisou três tipos de CNF provenientes de polpa comercial branqueada de uma planta com celulose de cadeia curta (*softwood pulp*) num estado não modificado, com tratamento de carboximetilação e com tratamento com hidroxipropiltrimetilamónio e não detetou diminuição da viabilidade (estudo Alamar Blue e desidrogenase do lactato (LDH)) numa exposição de 24h em fibroblastos dérmicos humanos (HDF) nem numa linha celular de fibroblastos humanos do pulmão (MRC-5).

Por outro lado, não observámos no nosso estudo, um aumento na viabilidade ou atividade metabólica celular, independentemente do tempo de exposição, tal como relatado por Ventura *et al.* (2018), Rashad *et al.* (2017), Lopes *et al.*, 2017 e Nordli *et al.* (2016). Este resultado poderá estar relacionado com o tipo celular utilizado - fibroblastos, na maior parte dos estudos – e com os seus mecanismos de adesão e proliferação. Pode também dever-se a diferenças na composição ou estrutura das CNF utilizadas ou nas condições de realização dos ensaios.

No caso da CNF Enzimática, apesar de se ter notado (figuras 9 e 10) uma descida mais acentuada da viabilidade celular do que a observada para a CNF TEMPO, não se encontraram, ainda assim, valores de viabilidade inferiores a 80%, independentemente da duração da exposição. Às 48h, foi possível demonstrar uma redução da viabilidade nas concentrações mais baixas. Este resultado pode ser devido, como descrito por Lima *et al.* (2012), ao facto dos nanomateriais terem tendência a aglomerarem-se em concentrações mais elevadas, o que pode alterar a sua interação com a célula. Isto significa que quando temos os materiais mais diluídos, encontramos mais partículas nanométricas livres, sendo

essas capazes de ser internalizadas e, possivelmente, interagir com os componentes da célula.

Estes resultados não estão de acordo com o único estudo encontrado que avalia a citotoxicidade de uma CNF com tratamento enzimático, realizado por Ilves *et al.* (2018). Através do ensaio LDH, os autores notaram um decréscimo significativo na viabilidade celular de macrófagos THP-1. A diferença entre os nossos resultados e o de estes autores pode dever-se não só à proveniência da CNF e ao tratamento enzimático (dados não especificados pelos autores), mas também ao facto da CNF enzimática utilizada no nosso trabalho estar maioritariamente no formato microfibrilhado e não nanofibrilhado, o que pode, como referido em cima, alterar a interação do nanomaterial com as células.

6.3 GENOTOXICIDADE

A carcinogénese em animais é difícil de avaliar de forma direta, uma vez que os ensaios que a avaliam são dispendiosos em termos de tempo e de recursos. A avaliação da genotoxicidade, *in vivo* e *in vitro*, é uma abordagem indireta para avaliar o potencial carcinogénico, uma vez que a indução de alterações genéticas está intimamente relacionada com a iniciação e progressão do processo neoplásico. A utilização de ensaios *in vitro* permitem obter resultados por um método mais simples, rápido e barato (Collins *et al.*, 2017).

Para avaliar a genotoxicidade das CNF sobre os osteoblastos utilizou-se o teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese. Como já foi descrito, este ensaio permite-nos quantificar as alterações cromossómicas induzidas pelas nanofibras em estudo (Fenech, 2007).

Para a CNF TEMPO, foi possível detetar um aumento de células binucleadas com micronúcleos (células micronucleadas) nas concentrações mais baixas, 1,5 e 3,125 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. O aumento da frequência de células micronucleadas indica-nos que existiram alterações na molécula de ADN que não foram reparadas, mantendo-se após a divisão celular e manifestando-se sob a forma de quebras cromossómicas. Assim, as

concentrações mais baixas da CNF TEMPO são genotóxicas para as células MG-63, dentro das condições utilizadas neste estudo.

Estes resultados são consistentes com as descobertas efetuadas por Ventura *et al.* (2018), que também notaram um aumento na frequência de células micronucleadas nas concentrações mais baixas do seu estudo (1,5 e 3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). No entanto, é divergente dos resultados encontrados por Catalán *et al.* (2016), que não apresentam um aumento na frequência de células micronucleadas, utilizando uma CNF TEMPO proveniente de abeto. Os autores explicam que estes resultados podem dever-se à realização do estudo em modelos vivos através da exposição inalatória durante 24h, o que pode não ser tempo suficiente para a nanocelulose ser transportada até à medula óssea (local de estudo da frequência de micronúcleos), ser incorporada pelas células e para que se desencadeiem os mecanismos de genotoxicidade que produzem as variáveis em estudo. Lima *et al.* (2012), observaram quebras na cadeia de ADN em células 3T3 e linfócitos humanos, após exposição a CNF de cuarará, e quebras em 3T3 após exposição a CNF proveniente de algodão (apesar de nesta CNF não se ter observado citotoxicidade).

Quanto às pontes nucleoplasmáticas, observou-se um aumento na sua frequência nas duas concentrações mais baixas. Notou-se, igualmente, um aumento estatisticamente significativo no controlo positivo. Este resultado não foi relatado em nenhum dos estudos encontrados. No entanto, pelo seu mecanismo de ação clastogénico, é possível que a mitomicina C induza este tipo de lesões. Apesar deste facto, não podemos excluir a hipótese de, ao longo do seu ciclo de vida, as células terem adquirido algum tipo de instabilidade genética que as tornou mais predispostas a sofrer mutações.

Os resultados para a CNF Enzimática foram muito semelhantes. Ocorreu um aumento estatisticamente significativo do número de células micronucleadas nas duas concentrações mais baixas, apesar de não apresentarem valores tão elevados como se verificou na CNF TEMPO. O mesmo é verdade para a presença de pontes nucleoplasmáticas. Existiu um aumento estatisticamente significativo, no entanto com números mais baixos que a outra CNF em estudo. Mais uma vez, isto pode ser resultado da dimensão média das CNF enzimática ser superior à das CNF TEMPO.

No caso dos *buds*, detetou-se um aumento significativo na concentração mais alta em estudo (12,5 µg/cm²).

Resumindo, ambas as CNF revelaram capacidade para indução de instabilidade cromossômica na gama de concentrações mais baixa, ou seja, revelaram efeitos genotóxicos.

Apesar de não ser uma variável estudada nesta investigação, é importante mencionar os resultados de imunotoxicidade obtidos por outros autores. No estudo de Lopes *et al.*, 2017, não foram observados aumentos na produção de ROS intracelular. Uma das vias de indução de danos no ADN é através do aumento de ROS e, conseqüentemente, do stress oxidativo (Carriere *et al.*, 2016). O que estes resultados sugerem é que o mecanismo de formação de lesões no ADN por parte das CNF poderá ser por outra via, que não o aumento de ROS intracelular. No entanto, o estudo de Stefaniak *et al.* (2014), demonstrou elevada formação de ROS após exposição a CNF TEMPO. Estas diferenças podem ser elucidativas das diferenças ao nível da toxicidade que se verificam entre diferentes CNF, de acordo com a proveniência e tratamento químico, mecânico ou enzimático que sofrem para a funcionalização.

Outro parâmetro de análise do potencial imunotóxico é a análise do recrutamento de células inflamatórias e da presença de citocinas inflamatórias. Lopes *et al.* (2017), relatam um aumento na secreção de citocinas inflamatórias de uma das CNF em estudo em células onde não tinha existido citotoxicidade. Isto é um indicador de que a citotoxicidade e a atividade inflamatória não estão necessariamente correlacionadas. No estudo de Catalán *et al.* (2016), os autores observaram um recrutamento aumentado de células inflamatórias ao local de exposição, assim como um aumento na concentração de citocinas inflamatórias num estudo *in vivo*. Nem Colic, Mihajlovic, Mathew, Naseri & Kokol (2015) nem Ventura *et al.* (2018), detetaram aumento de citocinas inflamatórias em modelo *in vitro*. Isto pode dever-se aos diferentes mecanismos que ocorrem num organismo vivo com todos os sistemas a funcionar em simultâneo por oposição a uma cultura celular que exclui diversas variáveis. É necessário assim, aprofundar o conhecimento em relação ao verdadeiro potencial inflamatório das CNF, uma vez que é um potencial caminho na indução de genotoxicidade (Carriere *et al.*, 2016).

Estes dados indicam-nos que as CNF podem ser genotóxicas através de diversos mecanismos.

Ambas as nanofibras de celulose são, por este estudo, consideradas seguras em termos de citotoxicidade mas não de genotoxicidade, exigindo assim que sofram alterações na sua produção para que não se obtenham estes resultados no futuro.

As CNF apresentam numerosas vantagens para a sua utilização ser considerada em procedimentos de regeneração óssea e periodontal. São geralmente biocompatíveis, formam estruturas semelhantes à matriz extracelular, o que permite uma ótima difusão de nutrientes e capacidade de concentrar o cálcio nas zonas em que se pretende. Como já foi referido, o próprio material apresentou excelentes resultados na adesão e proliferação celulares na sua superfície, condições ideais para permitir a ocupação com células produtoras de osso e favorecer o processo regenerativo. Por todos estes motivos, os resultados obtidos neste estudo não devem excluir a possibilidade de se utilizar este tipo de material em medicina dentária, pelo contrário, devem contribuir para o seu aperfeiçoamento. Isto é, para a produção de um material que consiga conjugar as suas enormes vantagens com a segurança para o paciente e o médico dentista.

7. CONCLUSÃO

Como tem sido referido ao longo deste trabalho, a presença da nanotecnologia na área da medicina e, em especial, da medicina dentária encontra-se em forte expansão. O seu desenvolvimento trará não só enormes vantagens para a melhor compreensão dos tecidos orais como também avanços no campo dos biomateriais. A incorporação de nanomateriais na manufatura de materiais e dispositivos médicos poderá garantir não só um aperfeiçoamento dos materiais já existentes, como a produção de materiais totalmente novos, com propriedades vantajosas. É, portanto, esperado que nos próximos anos ocorra um aumento exponencial da exposição a estes materiais, com consequências ainda desconhecidas, tanto para os trabalhadores, expostos de forma ocupacional (médicos dentistas, assistentes, técnicos de prótese dentária) como para os pacientes.

Um dos nanomateriais que tem ganho relevância no meio científico é a nanocelulose, nomeadamente as nanofibras de celulose, que se apresentam como uma opção económica e sustentável a uma série de aplicações. Dentro da nanomedicina, as nanofibras de celulose têm mostrado elevado potencial para serem utilizadas na regeneração de tecidos. Na medicina dentária, o aumento da idade média dos pacientes vem acompanhado do aumento da prevalência de doença periodontal, com todos os prejuízos para a saúde e a estética. Assim, a regeneração periodontal é um campo em enorme expansão nesta área.

O objetivo deste trabalho foi precisamente ajudar a contribuir para a caracterização das possíveis consequências que a exposição ubiqüitária às nanofibras de celulose poderá trazer. Mais especificamente, avaliar a segurança destas fibras para a sua utilização em procedimentos de regeneração óssea e periodontal.

Os dados disponíveis hoje em dia acerca das reações adversas provocadas pelas CNF são ainda escassos e é necessário continuar a avaliar as suas ações no organismo humano, utilizando protocolos de modo a uniformizar e reforçar os resultados obtidos.

Os resultados obtidos indicam-nos que tanto a CNF TEMPO como a CNF Enzimática, produzidas a partir de *Eucalyptus globulus*, não causam diminuição na viabilidade de osteoblastos expostos à gama de concentrações estudadas, no entanto são capazes de lhes

induzir mutações cromossômicas. Estes resultados são correspondentes com a nossa hipótese 2 (H2), descrita no início da tese, o que implica que na sua estrutura físico-química atual, não podem ser considerados seguros para serem utilizados em contacto direto com osteoblastos humanos. Será necessário realizar modificações aos nanomateriais e analisar o seu potencial tóxico para que se possa fazer uso das suas vantagens, sem prejuízo à saúde humana.

8. LIMITAÇÕES DO ESTUDO E PERSPETIVAS FUTURAS

Durante este estudo, notámos algumas limitações de carácter técnico que será importante contornar em estudos futuros. Devido à sua predisposição para se aglomerar, é necessário controlar e encontrar métodos para uma mais eficaz dispersão do gel de CNF, sob pena de o estudo estar a ser realizado com estruturas micrométricas e não nanométricas. Outro ponto a ter em conta é que esta dispersão das CNF também depende do meio em que é realizada (Lima *et al.*, 2012), assim é imperativo que em fases mais avançadas da sua produção, se utilizem meios apropriados ao fim a que se destinam. Para este fim, cabe-nos reforçar aos produtores a importância de serem exigentes com a caracterização físico-química do material que produzem.

Por se estar a estudar a aplicação deste material no contexto biomédico, é essencial que a concentração de endotoxinas seja aferida. Lopes *et al.* (2017) utilizaram o teste LAL para esta análise. Só ao estudarmos um material livre de contaminações microbianas, poderemos eliminar essa variável como possível causa das alterações relatadas.

O potencial inflamatório das nanofibras de celulose é extremamente relevante e deve continuar a ser objeto de estudos que averiguem a sua capacidade de induzir alterações inflamatórias locais e sistémicas. A inflamação é uma das vias de criação de stress oxidativo, stress esse que se encontra associado a lesões na cadeia de ADN. Assim, será igualmente importante estudar a produção intracelular de ROS e outras vias alternativas à formação de mutações.

O estudo da genotoxicidade realizado nesta dissertação ajuda a contribuir para a caracterização de genotoxicidade da CNF. No entanto, a *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) indica na sua guideline de 2011, uma série de outros ensaios que devem ser realizados para completar a caracterização. Apesar de esta *guideline* ser específica para medicamentos, os materiais e dispositivos em que as CNF poderão ser aplicadas acabam por se comportar e serem tratados como outras substâncias dentro do organismo. Neste contexto, são sugeridos ensaios para detetar mutações génicas *in vitro*

e a avaliação de genotoxicidade *in vivo*, através do ensaio do micronúcleo em células da medula óssea de ratinhos expostos a CNF.

O estudo completo da toxicidade das CNF deve, obviamente, incluir outros tipos de linhas celulares, uma vez que estas reagem de formas diferentes ao mesmo material.

Finalmente, é importante mencionar que não nos encontramos a trabalhar em contexto regulatório. Um trabalho nesse contexto, pressupõe a necessidade de alargar o raio da ação a todo o tipo de ensaios quantos forem necessários para a correta definição da segurança ou perigo deste nanomaterial.

9. BIBLIOGRAFIA

Andrei, M., Dinischiotu, A., Didilescu, A.C., Ionita, D. & Demetrescu, I. (2018). Periodontal materials and cell biology for guided tissue and bone regeneration. *Annals of Anatomy*. 216, 164-169. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2017.11.007>

Calciolari, E. & Donos, N. (2018). The use of omics profiling to improve outcomes of bone regeneration and osseointegration – how far are we from personalized medicine in dentistry. *Journal of Proteomics*. 188, 85-96. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.01.017>

Carriere, M., Sauvaigo, S., Douki, T. & Ravanat, J. (2016). Impact of nanoparticles on DNA repair processes: current knowledge and working hypotheses. *Mutagenesis*. 1-11. doi: [10.1093/mutage/gew052](https://doi.org/10.1093/mutage/gew052)

Catalán, J., Rydman, E., Aimonen, K., Hannukainen, K-S., Suhonen, S., Vanhala, E., Moreno, C., Meyer, V., Perez, D. S., Sneck, A., Forsström, U., Højgaard, C., Willemoes, M., Winther, J. R., Vogel, U., Wolff, H., Alenius, H., Savolainen, K. M. & Norppa, H. (2017). Genotoxic and inflammatory effects of nanofibrillated cellulose in murine lungs. *Mutagenesis*. 32, 23-31. doi: [10.1093/mutage/gew035](https://doi.org/10.1093/mutage/gew035)

Chandki, R., Kala, M., Kumar, N.K., Brigit, B., Banthia, P. & Banthia, R. 2012. Nanodentistry: exploring the beauty of miniature. *J Clin Exp Dent*. 4(2), 119-24. doi: [10.4317/jced.50720](https://doi.org/10.4317/jced.50720)

Colic, M., Mihajlovic, D., Mathew, A., Naseri, N. & Kokol, V. (2015). Cytocompatibility and immunomodulatory properties of wood based nanofibrillated cellulose. *Cellulose*. 22, 763-778. doi: [10.4172/2155-952X-C1-089](https://doi.org/10.4172/2155-952X-C1-089)

Collins, A. R., Annangi, B., Rubio, L., Marcos, R., Dorn, M., Merker, C., Estrela-Lopis, I., Cimpan, M. R., Ibrahim, M., Cimpan, E., Ostermann, M., Sauter, A., Yamani, N., Shaposhnikov, S., Chevillard, S., Paget, V., Grall, R., Delic, J., Goñi-de-Cerio, F., Suarez-Merino, B., Fessard, V., Hogeveen, K. N., Fjellsbø, L. M., Pran, E. R., Brzicova, T., Topinka, J., Silva, M. J., Leite, P. E., Ribeiro, A. R., Granjeiro, J. M., Grafström, R.,

Prina-Mello, A. & Dusinska, M. (2017). High throughput toxicity screening and intracellular detection of nanomaterials. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol.* 9:1413. doi: 10.1002/wnan.1413

Comissão Europeia. (2011). Recomendação da Comissão de 18 de Outubro de 2011 sobre a definição de nanomaterial. *JOUE*. L275:38-40

Dias, E., Andrade, M., Alverca, E., Pereira, P., Batoréu, M. C. C., Jordan, P., & Silva, M. J. (2009). Comparative study of the cytotoxic effect of microcistin-LR and purified extracts from *Microcystis aeruginosa* on a kidney cell line. *Toxicol.* 53(5), 487–495. doi:10.1016/j.toxicol.2009.01.029

Dias, K.K. (2017). Safety assessment of polymeric nanoparticle carriers for drug delivery in human osteoblasts (Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologias - Universidade Nova de Lisboa). Disponível em <https://run.unl.pt/handle/10362/22042>

Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols.* 2(5), 1084-1104. doi: 10.1038/nprot.2007.77

Feynman, R. (1959). There's plenty of room at the bottom. Palestra na *American Physical Society* no Instituto de Tecnologia da Califórnia. Transcrição disponível em http://web.pa.msu.edu/people/yang/RFeynman_plentySpace.pdf

Fornaguera, C. & García-Celma, M. J. (2017). Personalized nanomedicine: a revolution at the nanoscale. *Journal of Personalized Medicine.* 7(4), 12. doi: <https://doi.org/10.3390/jpm7040012>

Halib, N., Perrone, F., Cemazar, M., Dapas, B. Farra, R. Abrami, M., Chiarappa, G., Forte, G., Zanconati, F., Pozzato, G., Murena, L., Fiotti, N., Lapasin, R., Cansolino, L., Grassi, G. & Grassi, M. (2017). Potential applications of nanocellulose-containing materials in the biomedical field. *Materials.* 10 (8), 977. doi: <https://doi.org/10.3390/ma10080977>

Herzog, E., Casey, A., Lyng, F., Chambers, G., Byrne, H., & Davoren, M. (2007). A new approach to the toxicity testing of carbon-based nanomaterials—The clonogenic assay. *Toxicology Letters*, 174(1-3), 49–60. doi:10.1016/j.toxlet.2007.08.009

International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. (2011). Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use. S2 (R1). Disponível em http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S2_R1/Step4/S2R1_Step4.pdf (consultado em Outubro de 2018)

International Organization for Standardization. (2009). Biological evaluation of medical devices – part 5: tests for in vitro cytotoxicity. ISO 10993-5:2009. Disponível em <https://www.iso.org/standard/36406.html> (consultado em Maio de 2018)

International Organization for Standardization. (2015). Nanotechnologies – Vocabulary. Disponível em <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:ts:80004:-1:ed-2:v1:en> (consultado em Maio de 2018)

Ilves, M., Vilske, S., Aimonen, K., Lindberg, H. K., Pesonen, S., Wedin, I., Nuopponen, M., Vanhala, E., Højgaard, C., Winther, J. R., Willemoës, M., Vogel, U., Wolff, H., Norppa, H., Savolainen, K. & Alenius, H. (2018). Nanofibrillated cellulose causes acute pulmonary inflammation that subsides within a month. *Nanotoxicology*. doi: <https://doi.org/10.1080/17435390.2018.1462312>

Khurshid, Z., Zafar, M., Qasim, S., Shahab, S., Naseem, M. & AbuReqaiba, A. 2015. Advances in nanotechnology for restorative dentistry. *Materials*. 8, 717-731. doi: 10.3390/ma8020717

Lima, R., Oliveira Feitosa, L., Rodrigues Murayama, C., Abreu Barga, M., Yamawaki, P. C., Vieira, L. J., Teixeira, E. M., Corrêa, A. C., Caparelli Mattoso, L. H. & Fernandes Fraceto, L. (2012). Evaluation of the genotoxicity of cellulose nanofibers. *Int J Nanomed*. 7, 3555-3565. doi: 10.2147/IJN.S30596

Lopes, V. R., Sanchez-Martinez, C., Strømme, M. & Ferraz, N. (2017). In vitro biological responses to nanofibrillated cellulose by human dermal, lung and immune cells: surface chemistry aspect. *Particle and Fibre Toxicology*. 14(1). doi: 10.1186/s12989-016-0182-0

Louro, H., Borges, T. & Silva, M. J. (2013). Nanomateriais manufacturados: novos desafios para a saúde pública. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*. 31(2), 145-157. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rpsp.2012.12.004>

Louro, H., Bettencourt, A., Gonçalves, L. M., Almeida, A. J. & Silva, M. J. (2015). Role of nanogenotoxicity studies in safety evaluation of nanomaterials. In Thomas, S., Grohens, Y. & Ninan, N., *Nanotechnology Applications for Tissue Engineering*. 263-268. Oxford, Elsevier

Melcher, A.H. (1976). On the repair potencial of periodontal tissues. *Journal of Periodontology*. 47(5), 256-260. doi: <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2017.11.001>

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65(1-2), 55-63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4

Nordli, H.R., Chinga-Carrasco, G., Rokstad, A.M. & Pukstad, B. (2016). Producing ultrapure wood cellulose nanofibrils and evaluating the cytotoxicity using humans skin cells. *Carbohydrate Polymers*. 150, 65-73. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.094>

OCDE. (2014). In vitro mammalian cell micronucleus test. *OECD Guideline for the Testing of Chemicals*. TG 487. Disponível em <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd-tg487-2014-508.pdf> (consultado em Setembro de 2018)

Padovani, G.C., Feitosa, V.P., Sauro, S., Tay, F.R., Durán, G., Paula, A.J. & Durán, N. (2015). Advances in dental materials through nanotechnology: facts, perspectives and

toxicological aspects. *Trends in Biotechnology*. 33(11), 621-636. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.09.005>

Pereira, M. M., Raposo, N. R. B., Brayner, R., Teixeira, E. M., Oliveira, V., Quintão, C. C. R., ... Brandão, H. M. (2013). Cytotoxicity and expression of genes involved in the cellular stress response and apoptosis in mammalian fibroblast exposed to cotton cellulose nanofibers. *Nanotechnology*, 24(7), 075103. doi:10.1088/0957-4484/24/7/075103

Priyadarsini, S., Mukherjee, S. & Mishra, M. (2017). Nanoparticles used in dentistry: a review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*. 8, 58-67. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2017.12.004>

Rashad, A., Mustafa, K., Heggset, E. B., & Syverud, K. (2017). Cytocompatibility of Wood-Derived Cellulose Nanofibril Hydrogels with Different Surface Chemistry. *Biomacromolecules*, 18(4), 1238–1248. doi:10.1021/acs.biomac.6b01911

Rebouillat, S. & Pla, F. (2013). State of the Art Manufacturing and Engineering of Nanocellulose: A Review of Available Data and Industrial Applications. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*. 4(2), 165-188. doi: 10.4236/jbnnb.2013.42022

Saito T. & Isogai A. (2007). Wet strength improvement of TEMPO-oxidized cellulose sheets prepared with cationic polymers. *Ind. Eng. Chem. Res.* 46, 773–780. doi: 10.1021/ie0611608

Scantlebury, T.V. (1993). 1982-1992: A decade of technology development for guided tissue regeneration. *Journal of Periodontology*. 64(11S), 1129-1137. doi: <https://doi.org/10.1902/jop.1993.64.11s.1129>

Schmalz, G., Hickel, R., van Landuyt, K.L. & Reichl, F. (2017). Nanoparticles in dentistry. *Dental Materials*. 33, 1298-1314. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2017.08.193>

Siaili, M., Chatzopoulou, D. & Gillam, D.G. (2018). An overview of periodontal regenerative procedures for the general dental practitioner. *Saudi Dental Journal*. 30, 26-37. doi: <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2017.11.001>

Soares, S., Sousa, J., Pais, A. & Vitorino, C. (2018). Nanomedicine: principles, properties and regulatory issues. *Front Chem*. 6, 360. doi: [10.3389/fchem.2018.00360](https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00360)

Souza, S. F., Mariano, M., Reis, D., Lombello, C. B., Ferreira, M. & Sain, M. (2018). Cell interactions and cytotoxic studies of cellulose nanofibers from curauá natural fibers. *Carbohydrate Polymers*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.08.056>

Stefaniak, A. B., Seehra, M. S., Fix, N. R. & Leonard, S. S. (2014). Lung biodurability and free radical production of cellulose nanomaterials. *Inhal Toxicol*. 26(12), 733-749. doi: [10.3109/08958378.2014.948650](https://doi.org/10.3109/08958378.2014.948650)

Takata, T., Wang, H-L. & Miyauchi, M. (2001). Migration of osteoblastic cells on various guided bone regeneration membranes. *Clin. Oral Impl. Res*. 12, 332-338. doi: <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.2001.012004332.x>

Tarrés Q., Saguer E., Pèlach M. A., Alcalà M., Delgado-Aguilar M. & Mutjé P. (2016). The feasibility of incorporating cellulose micro / nanofibers in papermaking processes: the relevance of enzymatic hydrolysis. *Cellulose*. 23(2), 1433–1445. doi: [10.1007/s10570-016-0889-y](https://doi.org/10.1007/s10570-016-0889-y)

Tinkle, S., McNeil, S.E., Mühlebach, S., Bawa R., Borchard, G., Barenholz, Y.C., Tamarkin, L. & Desai, N. (2014). Nanomedicines: addressing the scientific and regulatory gap. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1313, 35-56. doi: [10.1111/nyas.12403](https://doi.org/10.1111/nyas.12403)

Ventura, C., Lourenço, A.F., Sousa-Uva, A., Ferreira, P.J.T. & Silva, M.J. (2018). Evaluating the genotoxicity of cellulose nanofibrils in a co-culture of human lung epithelial cells and monocyte-derived macrophages. *Toxicology Letters*. 291, 173-183. doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.04.013>

10. ANEXOS

ANEXO 1: RESULTADOS DOS ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

Tabela: Ensaio de MTT para células expostas a nanofibras de celulose com oxidação mediada por TEMPO (CNF TEMPO)

CNF TEMPO - Viabilidade celular (%)						
24h de incubação						
Concentrações (µg/cm ²)	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	Réplica 5	Média ± EP
0	100	100	100	100	100	100 ± 0
1.5	95.6	113.8	78.6	108.1	97.5	98.7 ± 6
3.125	102	117.3	80.4	86.1	97.6	96.7 ± 6.5
6.25	97.5	108.5	89.4	85.6	92.3	94.7 ± 4
12.5	96.8	116.5	83.8	102.6	96.5	99.3 ± 5.3
25	100.9	117.3	80.9	101.6	77.8	95.7 ± 7.3
50	116.3	101.9	70	101.8	80	94 ± 8.35
SDS 0.07 %	3.2	6	3.4	4.8	3.8	4.2 ± 0.5
48h de incubação						
Concentrações (µg/cm ²)	Réplica 1	Réplica 2				Média
0	100	100				100 ± 1.4
1.5	96.9	99.8				98.3 ± 1.4
3.125	99.1	86.2				92.7 ± 6.4
6.25	131.3	104				117.7 ± 13.7
12.5	109.1	87.3				98.2 ± 10.9
25	124.8	99.8				112.3 ± 12.5
50	101.2	79.2				90.2 ± 11
SDS 0.07 %	18.4	3.1				12.2 ± 7.7

Tabela: Ensaio de MTT para células expostas a nanofibras de celulose hidrolisadas por endoglucanases (CNF Enzimática)

CNF Enzimática - Viabilidade celular (%)						
24h de incubação						
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	Réplica 5	Média ± EP
Concentrações (µg/cm ²)						
0	100	100	100	100	100	100 ± 0
1.5	119.2	76.6	86.9	68.7	107.1	98.7 ± 9.4
3.125	116.9	76.5	74.2	69.4	111.9	96.7 ± 10.2
6.25	105.6	66.3	79.5	75.5	108	94.7 ± 8.4
12.5	86.8	65	68.6	95.7	104.6	99.3 ± 7.6
25	96.8	73.1	66.8	92.4	97.2	95.7 ± 6.4
50	94.9	71.9	69	90.2	99.7	94 ± 6.2
SDS 0.07 %	3.2	6	2.8	2.3	4.8	4.2 ± 0.7
48h de incubação						
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3			Média
0	100	100	100			100 ± 0
1.5	88	75.4	108			90.5 ± 9.5
3.125	85.9	107.9	88.4			94.1 ± 6.9
6.25	104	103.3	82.2			96.5 ± 7.2
12.5	101.9	109.8	97.5			103.1 ± 3.6
25	101	106.2	97.8			101.7 ± 2.5
50	98.7	103.7	104.2			102.2 ± 1.8
SDS 0.07 %	18.4	3.1	5.7			9.1 ± 4.7

ANEXO 2: RESULTADOS DOS ENSAIOS DE GENOTOXICIDADE

Tabela: Contagem de células micronucleadas por 1000 células binucleadas (CBN) após exposição a nanofibras de celulose com oxidação mediada por TEMPO (CNF TEMPO)

CNF TEMPO – Células micronucleadas/1000 CBN			
	Réplica 1	Réplica 2	Média ± DP
Concentrações (µg/cm ²)			
0	20	29	24.5 ± 6.4
1.5	63	55	59 ± 5.7
3.125	46	37	41.5 ± 6.4
6.25	16	22	19 ± 4.2
12.5	28	26	27 ± 1.4
MMC	53	27	40 ± 18.4

Tabela: Contagem de células micronucleadas por 1000 células binucleadas (CBN) após exposição a nanofibras de celulose hidrolisadas por endoglucanases (CNF Enzimática)

Concentrações ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	CNF Enzimática – Células micronucleadas/1000 CBN		
	Réplica 1	Réplica 2	Média \pm DP
0	20	29	24.5 \pm 6.4
1.5	28	38	33 \pm 7.1
3.125	24	51	37.5 \pm 19.1
6.25	26	30	28 \pm 2.8
12.5	18	31	24.5 \pm 9.2
MMC	53	27	40 \pm 18.4

Tabela: Contagem de células binucleadas com *buds* por 1000 células binucleadas (CBN) após exposição a nanofibras de celulose com oxidação mediada por TEMPO (CNF TEMPO)

Concentrações ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	CNF TEMPO – Células binucleadas com <i>buds</i> /1000 CBN		
	Réplica 1	Réplica 2	Média \pm DP
0	2	12	7 \pm 7.1
1.5	*	*	*
3.125	*	*	*
6.25	4	6	5 \pm 1.4
12.5	1	8	4.5 \pm 5
MMC	7	9	8 \pm 1.4

* valor não determinado

Tabela: Contagem de células binucleadas com *buds* por 1000 células binucleadas (CBN) após exposição a nanofibras de celulose hidrolisadas por endoglucanases (CNF Enzimática)

Concentrações ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	CNF Enzimática – Células binucleadas com <i>buds</i> /1000 CBN		
	Réplica 1	Réplica 2	Média \pm DP
0	2	12	7 \pm 7.1
1.5	4	0	2 \pm 2.8
3.125	*	*	*
6.25	3	6	4.5 \pm 2.1
12.5	8	10	9 \pm 1.4
MMC	7	9	8 \pm 1.4

* valor não determinado

Tabela: Contagem de células binucleadas com pontes nucleoplasmáticas (PNP) por 1000 células binucleadas (CBN) após exposição a nanofibras de celulose com oxidação mediada por TEMPO (CNF TEMPO)

Concentrações ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	CNF TEMPO – Células binucleadas com PNP/1000 CBN		
	Réplica 1	Réplica 2	Média \pm DP
0	4	6	5 \pm 1.4
1.5	29	26	27.5 \pm 2.1
3.125	15	27	21 \pm 8.5
6.25	7	3	5 \pm 2.8
12.5	4	5	4.5 \pm 0.7
MMC	32	20	26 \pm 8.5

Tabela: Contagem de células binucleadas com pontes nucleoplasmáticas (PNP) por 1000 células binucleadas (CBN) após exposição a nanofibras de celulose hidrolisadas por endoglucanases (CNF Enzimática)

Concentrações ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	CNF Enzimática – Células binucleadas com PNP/1000 CBN		
	Réplica 1	Réplica 2	Média \pm DP
0	4	6	5 \pm 1.4
1.5	9	28	18.5 \pm 13.4
3.125	14	12	13 \pm 1.4
6.25	2	13	7.5 \pm 7.8
12.5	5	7	6 \pm 1.4
MMC	32	20	26 \pm 8.5

Tabela: CBPI para células expostas a nanofibras de celulose com oxidação mediada por TEMPO (CNF TEMPO)

Concentrações ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	CNF TEMPO – CBPI		
	Réplica 1	Réplica 2	Média \pm DP
0	1.64	1.69	1.67 \pm 0.03
1.5	1.70	1.59	1.65 \pm 0.08
3.125	1.73	1.61	1.67 \pm 0.09
6.25	1.76	1.76	1.76 \pm 0.00
12.5	1.53	1.74	1.64 \pm 0.15
MMC	1.45	1.53	1.49 \pm 0.06

Tabela: CBPI para células expostas a nanofibras de celulose hidrolisadas por endoglucanases (CNF Enzimática)

Concentrações ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	CNF Enzimática – CBPI		
	Réplica 1	Réplica 2	Média \pm DP
0	1.64	1.69	1.67 \pm 0.03
1.5	1.75	1.71	1.73 \pm 0.03
3.125	1.69	1.65	1.67 \pm 0.02
6.25	1.73	1.79	1.76 \pm 0.04
12.5	1.79	1.83	1.81 \pm 0.02
MMC	1.45	1.53	1.49 \pm 0.06

Tabela: Índice replicativo (RI) para células expostas a nanofibras de celulose com oxidação mediada por TEMPO (CNF TEMPO)

Concentrações ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	CNF TEMPO – RI		
	Réplica 1	Réplica 2	Média \pm DP
0	100	100	100 \pm 0
1.5	105.71	85.18	95.45 \pm 14.5
3.125	113.36	91.40	102.38 \pm 15.5
6.25	112.69	111.24	111.96 \pm 1
12.5	70.37	115.30	92.83 \pm 31.8
MMC	55.40	82.60	69 \pm 19.24

Tabela: Índice replicativo (RI) para células expostas a nanofibras de celulose hidrolisadas por endoglucanases (CNF Enzimática)

Concentrações ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	CNF Enzimática – RI		
	Réplica 1	Réplica 2	Média \pm DP
0	100	100	100 \pm 0
1.5	118.64	95.08	106.86 \pm 16.7
3.125	94.38	93.5	93.94 \pm 0.6
6.25	108.86	114.08	111.47 \pm 3.7
12.5	104.4	104.42	104.41 \pm 0
MMC	55.40	82.60	69 \pm 19.24