

__Toxicidade da nanocelulose em modelos *in vitro*: um contributo para a avaliação da sua segurança para a saúde humana

Nanocellulose toxicity in vitro models: contributing to its safety assessment to human health

Célia Ventura^{1,2}, Fátima Pinto^{1,2}, Catarina Marques¹, João Cadete¹, Madalena Vilar¹, Ana Filipa Lourenço³, Jorge F.S. Pedrosa⁴, Susete N. Fernandes⁵, Rafaela R. da Rosa⁵, Maria Helena Godinho⁵, Paulo J.T. Ferreira⁴, Henriqueta Louro^{1,2}, Maria João Silva^{1,2}

m.joao.silva@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Genética Humana. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Centro de Toxicogenómica e Saúde Humana. NOVA Medical School, Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa, Portugal

(3) Instituto de Investigação da Floresta e Papel, Aveiro, Portugal

(4) Centro de Investigação em Engenharia dos Processos Químicos e dos Produtos da Floresta. Departamento de Engenharia Química, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

(5) Centro de Investigação de Materiais. Departamento de Ciência dos Materiais, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa, Caparica, Portugal

__Resumo

As nanoceluloses são nanomateriais inovadores com potencial para uma vasta gama de aplicações industriais e biomédicas. No entanto, a expansão da sua produção tem vindo a suscitar preocupações quanto aos possíveis efeitos, a longo prazo, na saúde humana. Este estudo teve como objetivo avaliar a segurança de algumas nanoceluloses produzidas a partir de matéria-prima nacional, através da caracterização da sua potencial toxicidade em células de mamífero. Para tal, testaram-se duas celuloses nano/microfibrilares (CNF e CMF) e uma celulose nanocristalina (CNC). Analisou-se a citotoxicidade usando ensaios colorimétricos e o ensaio clonogénico, e a genotoxicidade pelo ensaio do micronúcleo *in vitro* em células pulmonares de mamífero (A549 e V79) e em osteoblastos humanos (MG-63). A indução de espécies reativas de oxigénio (ROS) e a internalização celular foram também estudadas nas células A549. Observou-se citotoxicidade no ensaio clonogénico, principalmente no caso da CNC, mas não nos restantes ensaios, não havendo também indução de ROS. Todas as nanoceluloses revelaram efeitos genotóxicos nalgumas concentrações, uma vez que induziram micronúcleos e/ou pontes nucleoplásmicas num dos modelos celulares. Para além disso, visualizou-se a internalização da CNF e CMF, mas não da CNC, em células A549. Esta primeira avaliação toxicológica veio contribuir para prevenir a exposição a materiais celulósicos potencialmente perigosos, procurando impulsionar o desenvolvimento de materiais inovadores e mais seguros.

__Abstract

Nanocelluloses are innovative nanomaterials with potential for a wide range of industrial and biomedical applications. However, the expansion of its production has raised concerns about their possible long-term effects on human health. This study aimed to evaluate the safety of various nanocelluloses through the characterization of their potential toxicity in mammalian cells. Two samples of nano/microfibrillar celluloses with different pre-treatments (CNF and CMF) and a nanocrystalline cellulose (CNC) were tested. The cytotoxicity of the nanocelluloses was analyzed using colorimetric assays and the clonogenic assay, and genotoxicity by

the in vitro micronucleus assay in human alveolar epithelial cells (A549), human osteoblasts (MG-63) and Chinese hamster fibroblasts (V79). Induction of reactive oxygen species (ROS) and cellular internalization were also studied in A549 cells. Cytotoxicity was observed through the clonogenic assay, mainly in the case of CNC, but not in the remaining assays, with no induction of ROS. All nanocelluloses, at some of the concentrations tested, induced micronuclei and/or nucleoplasmic bridges in one of the cellular models. Furthermore, the internalization of CNF and CMF, but not of CNC was visualized in A549 cells. These results aim to contribute to preventing exposure to potentially hazardous cellulosic materials, seeking to boost the development of innovative and safer materials.

__Introdução

Nos últimos anos, tem-se assistido a um enorme desenvolvimento de nanomateriais inovadores, particularmente, no que diz respeito a materiais renováveis, biodegradáveis e sustentáveis. A celulose, sendo o biopolímero mais abundante na natureza, apresenta todas as qualidades requeridas e tem um enorme potencial para ser utilizada numa vasta gama de aplicações industriais. É encontrada principalmente na madeira, fibras de sementes, gramíneas, animais marinhos e algas, mas também pode ser produzida por fungos e bactérias (1). A partir da desconstrução das fibras celulósicas podem ser obtidas diferentes subestruturas, sendo duas delas as nanofibras de celulose (ou celuloses nanofibriladas; CNF) e os nanocristais de celulose (ou celulose nanocristalina; CNC) (2). As CNF são geral-



mente obtidas pela fibrilação das fibras celulósicas através de um tratamento mecânico intensivo, normalmente precedido por um tratamento químico ou enzimático. A oxidação mediada pelo radical 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil (TEMPO) resulta em CNF com um diâmetro entre 3-100 nm e um comprimento da ordem dos μm (ISO/TS 20477:2017 – *Nanotechnologies – Standard terms and their definition for cellulose nanomaterial*). Por sua vez, a aplicação de um pré-tratamento enzimático origina principalmente microfibras de celulose (CMF). A CNC deriva das regiões cristalinas da celulose, isoladas dos domínios amorfos por hidrólise ácida, e assume diâmetros entre 3-50 nm e comprimentos da ordem das várias centenas de nanómetros (ISO/TS 20477:2017).

Apresentando propriedades físico-químicas muito interessantes, tais como, uma elevada área específica, alta resistência à tração e rigidez, biodegradabilidade e biocompatibilidade, os nanomateriais celulósicos têm encontrado diversas aplicações industriais, por exemplo, para aumentar a resistência mecânica de materiais compósitos. Para além disso, as CNF têm sido estudadas com vista ao seu uso em aplicações biomédicas inovadoras, em áreas como a medicina regenerativa, cicatrização de feridas ou sistemas de veiculação de fármacos (3). No entanto, apesar da celulose ser considerada biocompatível, ela pode não o ser à escala nanométrica pela diferente capacidade de atravessar membranas celulares, interagir com biomoléculas e desencadear respostas celulares. Por outro lado, a biopersistência das CMF/CNF nos pulmões após inalação (4) causa preocupação, dado ser uma característica comum a outros materiais fibrosos, como os nanotubos de carbono e o amianto, que são genotóxicos e causam doença pulmonar (5). Os estudos existentes têm revelado resultados contraditórios que poderão estar relacionados com diferentes propriedades físico-químicas das nanoceluloses, tais como a sua morfologia, grau de cristalinidade, hidrofobicidade, carga superficial e química de superfície, que podem modificar os seus efeitos toxicológicos.

O projeto ToxApp4nanoCELFi visa investigar os potenciais efeitos adversos na saúde humana de nanoceluloses com diferentes propriedades físico-químicas. Especificamente,

pretende-se caracterizar os seus potenciais efeitos citotóxicos, imunotóxicos, genotóxicos, e epigenómicos *in vitro* e a possível relação com o desenvolvimento de doenças crónico-degenerativas, com especial enfoque no desenvolvimento de cancro.

_Objetivos

Este estudo teve como objetivo avaliar a segurança de três nanoceluloses com características físico-químicas diferentes, produzidas a partir de matéria-prima nacional. Para tal, foi caracterizada a sua potencial toxicidade (citotoxicidade e genotoxicidade) em células de mamífero, a sua internalização celular e também a indução de espécies reativas de oxigénio (ROS).

_Material e métodos

As CMF, CNF e CNC foram obtidas a partir de polpa kraft industrial branqueada de *Eucalyptus globulus*, de acordo com metodologia previamente descrita (6,7). A caracterização físico-química abrangeu, entre outras propriedades, a determinação das suas dimensões por várias técnicas microscópicas, incluindo a microscopia eletrónica de transmissão (TEM). Esta mesma técnica foi aplicada aos estudos de internalização celular. Estes materiais foram preparados a várias concentrações, sendo testados em células epiteliais alveolares humanas A549 (ATCC® CCL-185™), células osteoblásticas humanas MG-63 (ATCC® (ATCC® CRL-1427™) e fibroblastos pulmonares de hamster chinês V79 (ATCC® CCL-93™). Analisaram-se os efeitos citotóxicos (ensaio do MTT, clonogénico e com iodeto de propídeo), a indução de espécies reativas de oxigénio (sonda H2DCF-DA) e os efeitos genotóxicos (ensaio do micronúcleo em células com bloqueio da citocinese).

_Resultados

A figura 1 mostra a morfologia e dimensão das nanoceluloses em estudo. A análise de células A549 após exposição demonstrou a internalização da CMF e CNF, mas não da CNC que permaneceu à superfície celular. As alterações morfológicas observadas, tais como um aumento dos vacúolos citoplasmáticos ou endocíticos, binucleação e



Figura 1: Imagens de TEM das micro/nanofibras de celulose obtidas após pré-tratamento enzimático (CMF), oxidação mediada por TEMPO (CNF) e dos nanocristais de celulose (CNC), em diferentes ampliações (4).

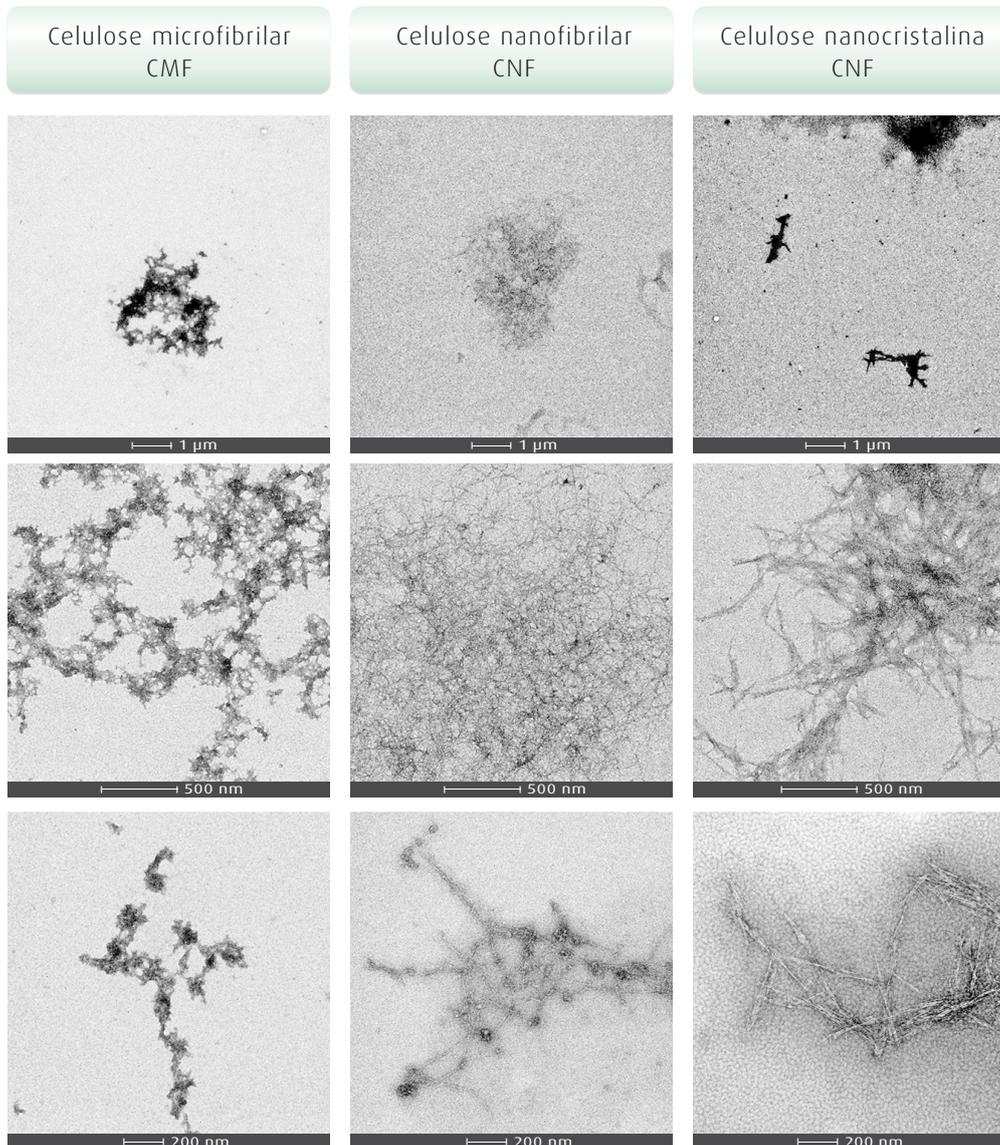


Imagem adaptada de Ventura, *et al.* (7).

protrusões superficiais, são compatíveis com a internalização por endocitose. Os resultados dos estudos toxicológicos encontram-se resumidos na [tabela 1](#). Estes indicaram que nenhuma nanocelulose causou citotoxicidade nas células A549, MG-63 e V79 em exposições até 24h e concentrações até 50 μg/cm². Contudo, a exposição mais prolongada de células pulmonares a CNC, bem como a elevadas concentrações CNF e CMF, produziram morte celular.

Por sua vez, os resultados do ensaio do micronúcleo sugeriram que as nanoceluloses fibrilares têm algum potencial genotóxico, pois induziram a formação de micronúcleos e de pontes nucleoplásmicas nas células expostas, particularmente a concentrações mais baixas (1.5–3 μg/cm²). A [figura 2](#) apresenta os resultados do ensaio do micronúcleo em dois dos modelos celulares utilizados.



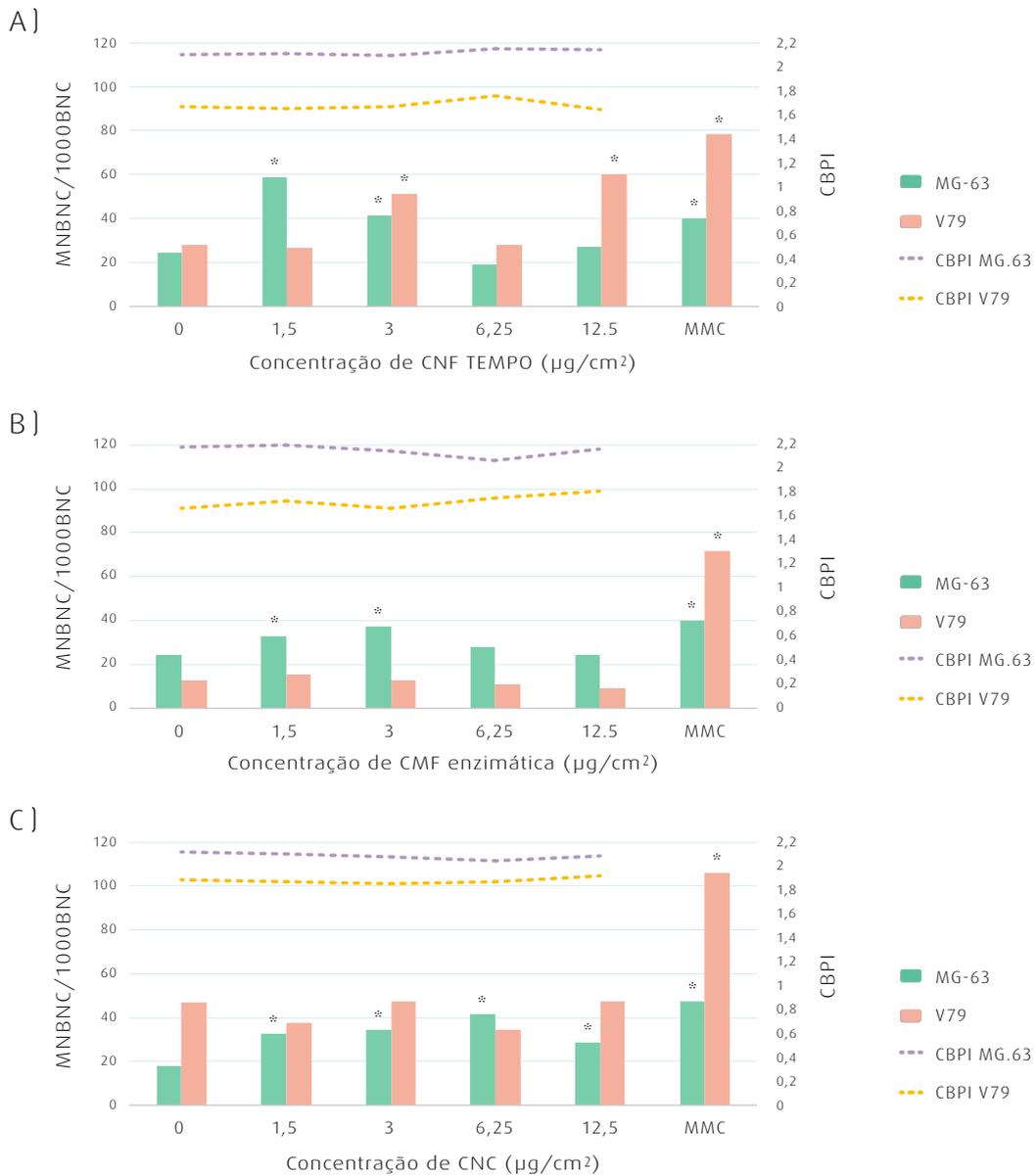
Tabela 1: Resumo dos resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade com os três diferentes tipos de nanoceluloses (6,7,8).

Ensaio	CNF	CMF	CNC
<i>Células A549</i>			
MTT	-	-	-
PI	-	-	-
Clonogénico	-	-	-
ROS, 1 h	-	-	-
ROS, 24 h	-	-	-
MN	-	+	-
PN	-	-	NA
CBPI	-	-	-
<i>Células MG-63</i>			
MTT	-	-	-
MN	+	+	+
PN	+	+	(+)
CBPI	-	-	-
<i>Células V79</i>			
MTT	-	-	-
Clonogénico	(+)	+	++
MN	+	-	-
PN	-	-	-
CBPI	-	-	-

CNF – celulose nanofibrilar; CMF – celulose microfibrilar; CNC – celulose nanocristalina; MN – micro-núcleos; PN – pontes nucleoplásmicas; CBPI – *cytokinesis-block proliferation index*; - : negativo; (+) : positivo numa única concentração; + : positivo, sem relação dose-resposta ++ : positivo, com relação dose-resposta; NA – não analisada.



Gráfico 1: ▾ Frequência de células binucleadas micronucleadas (MNBC) por 1000 células binucleadas (CBN) e valores de CBPI observados em células MG-63 e V79 expostas a (A) CNF (B) CMF e (C) CNC.



CNF – celulose nanofibrilar; CMF – celulose microfibrilar; CNC – celulose nanocristalina
MMC – Mitomicina C; * $p < 0.05$. Figura adaptada de Ventura, *et al.* (7).

Discussão

O conhecimento sobre a toxicidade de nanomaterias celulósicas é ainda escasso e, na sua maioria, os estudos toxicológicos não têm reportado citotoxicidade ou genotoxicidade significativas em sistemas *in vitro* (9).

Neste estudo foram testadas três nanoceluloses produzidas a partir da mesma matéria-prima, mas com propriedades físico-químicas diferentes. Os resultados indicam que nenhuma delas é tóxica para as células pulmonares ou



ósseas quando ocorrem exposições de curta duração. Contudo, após uma exposição mais prolongada, a CNC, em particular, mostrou alguma toxicidade em células pulmonares. Uma possível explicação para essa toxicidade é de que os grupos sulfato que existem à superfície da CNC como resultado da hidrólise ácida interfiram no metabolismo celular.

Relativamente à genotoxicidade, todas as nanoceluloses induziram a formação de micronúcleos, que refletem eventos de quebra ou perda de cromossomas durante a divisão celular (10). Foi também detetado um aumento de pontes citoplasmáticas, causadas por outras anomalias cromossómicas, nas células expostas a concentrações baixas de CNF ou CMF. Uma hipótese explicativa para a ausência de genotoxicidade nas concentrações mais altas de nanocelulose assenta na observação de agregados nessas concentrações que não serão internalizados pelas células. No entanto, a análise por TEM revelou a internalização de fibrilas de nanocelulose numa concentração já elevada (25 µg/cm²), sugerindo que haverá outros fatores explicativos a ser estudados. Dado que nenhuma das nanoceluloses induziu a formação de espécies reativas de oxigénio, é improvável que a genotoxicidade seja mediada por danos oxidativos no DNA, sugerindo antes uma interação mais direta com o DNA ou a existência de outros mecanismos a ser investigados. Os diferentes resultados obtidos relacionam-se, possivelmente, com as diferentes características físico-químicas das nanoceluloses testadas e, também, com a sensibilidade de cada modelo celular. Assim, os nossos resultados demonstram a necessidade de continuar estes estudos utilizando concentrações mais baixas e períodos de exposição mais longos. Para além disso, importará ainda investigar outros potenciais efeitos genéticos e epigenéticos para permitir uma avaliação mais abrangente da toxicidade das nanoceluloses.

Conclusões

Os presentes resultados, obtidos para três nanomateriais celulósicos produzidos a partir de matéria-prima nacional, indicam que a celulose nanocristalina é mais citotóxica do que as duas nanoceluloses fibriladas e que todas

elas possuem algum potencial genotóxico em células pulmonares ou ósseas.

Dado o crescente interesse na aplicação destas nanoceluloses, inclusive na área biomédica, importa prosseguir estes estudos por forma a avaliar, precocemente, a sua toxicidade. Esse conhecimento contribuirá para orientar a produção responsável de novos nanomateriais mais seguros para a saúde humana e para o ambiente.

Financiamento:

Projeto ToxApp4NanoCELF – Uma abordagem de toxicologia preditiva para a caracterização dos potenciais efeitos respiratórios de fibras de nanocelulose funcionalizadas num sistema de co-cultura (PTDC/SAU-PUB/32587/2017).

Referências bibliográficas:

- (1) Kargarzadeh H, Mariano M, Gopakumar D, et al. Advances in cellulose nanomaterials. *Cellulose* 2018;25:2151-89. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-1723-5>
- (2) Tayeb AH, Amini E, Ghasemi S, et al. Cellulose Nanomaterials-Binding Properties and Applications: A Review. *Molecules*. 2018 Oct 18;23(10):2684. <https://doi.org/10.3390/molecules23102684>
- (3) Halib N, Perrone F, Cemazar M, et al. Potential Applications of Nanocellulose-Containing Materials in the Biomedical Field. *Materials (Basel)*. 2017 Aug 21;10(8):977. <https://doi.org/10.3390/ma10080977>
- (4) Stefaniak AB, Seehra MS, Fix NR, et al. Lung biodegradability and free radical production of cellulose nanomaterials. *Inhal Toxicol*. 2014 Oct;26(12):733-49. <https://doi.org/10.3109/08958378.2014.948650>
- (5) Ventura C, Pereira JFS, Matos P, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of MWCNT-7 and crocidolite: assessment in alveolar epithelial cells versus their coculture with monocyte-derived macrophages. *Nanotoxicology*. 2020 May;14(4):479-503. <https://doi.org/10.1080/17435390.2019.1695975>. Erratum in: *Nanotoxicology*. 2022 Aug 27
- (6) Pinto F, Lourenço AF, Pedrosa JFS, et al. Analysis of the In Vitro Toxicity of Nanocelluloses in Human Lung Cells as Compared to Multi-Walled Carbon Nanotubes. *Nanomaterials (Basel)*. 2022 Apr 22;12(9):1432. <https://doi.org/10.3390/nano12091432>
- (7) Ventura C, Marques C, Cadete J, et al. Genotoxicity of Three Micro/Nanocelluloses with Different Physicochemical Characteristics in MG-63 and V79 Cells. *J Xenobiot*. 2022 Apr 21;12(2):91-108. <https://doi.org/10.3390/jox12020009>
- (8) Ventura C, Lourenço AF, Sousa-Uva A, et al. Evaluating the genotoxicity of cellulose nanofibrils in a co-culture of human lung epithelial cells and monocyte-derived macrophages. *Toxicol Lett*. 2018 Jul;291:173-83. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.04.013>
- (9) Ventura C, Pinto F, Lourenço AF, et al. On the toxicity of cellulose nanocrystals and nanofibrils in animal and cellular models. *Cellulose*. 2020;27:5509-44. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03176-9>
- (10) Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc*. 2007;2(5):1084-104. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.77>