



JOÃO RICARDO GONÇALVES CADETE
Licenciado em Bioquímica

Avaliação da Citotoxicidade e Genotoxicidade de
Nanomateriais de Celulose em Células do Trato Respiratório

MESTRADO EM BIOQUÍMICA
Universidade NOVA de Lisboa
Março, 2022



NOVA
NOVA SCHOOL OF
SCIENCE & TECHNOLOGY

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

JOÃO RICARDO GONÇALVES CADETE
Licenciado em Bioquímica

Avaliação da Citotoxicidade e Genotoxicidade de
Nanomateriais de Celulose em Células do Trato Respiratório

MESTRADO EM BIOQUÍMICA
Universidade NOVA de Lisboa
Março, 2022

Avaliação da Citotoxicidade e Genotoxicidade de Nanomateriais de Celulose em Células do Trato Respiratório

JOÃO RICARDO GONÇALVES CADETE

Licenciado em Bioquímica

Orientador: Doutora Maria João Silva

Investigadora, Departamento de Genética Humana do Instituto
Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

Coorientadores: Doutora Henriqueta Louro

Investigadora, Departamento de Genética Humana do Instituto
Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

Júri:

Presidente: Professora Doutora Sofia Rocha Pauleta,

Professora, NOVA School of Science and Technology | FCT NOVA

Arguentes: Doutora Patrícia Alexandra de Sousa Barros,

Investigadora, Departamento de Genética Humana do Instituto Nacional de Saúde
Doutor Ricardo Jorge

Orientador: Doutora Maria João Silva,

Investigadora, Departamento de Genética Humana do Instituto Nacional de
Saúde Doutor Ricardo Jorge

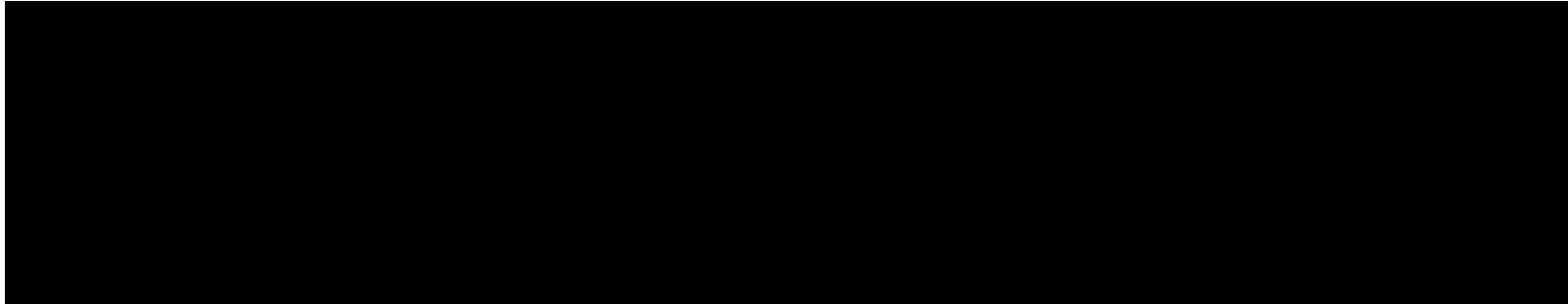
MESTRADO EM BIOQUÍMICA

Universidade NOVA de Lisboa

Março, 2022

Avaliação da Citotoxicidade e Genotoxicidade de Nanomateriais de Celulose em Células do Trato Respiratório

Copyright © João Ricardo Gonçalves Cadete, NOVA School of Science and Technology | FCT NOVA
A NOVA School of Science and Technology | FCT NOVA e a Universidade NOVA de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



2022

João Cadete

Avaliação da Citotoxicidade e Genotoxicidade de Nanomateriais de Celulose em Células do Trato Respiratório

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha orientadora Doutora Maria João Silva por me ter aceite no seu laboratório e me ter concedido a oportunidade de trabalhar neste projeto, por toda a ajuda prestada e pela revisão da dissertação.

À Doutora Henriqueta Louro pela disponibilidade que sempre demonstrou para me ajudar e esclarecer quando necessário.

A toda a equipa do laboratório de Toxicologia Genética, por toda a ajuda prestada durante o decorrer do trabalho e pela boa disposição. Mais especificamente, agradecer à Célia e à Fátima pela ajuda na fase inicial dos ensaios e pelo acompanhamento mais de perto durante o trabalho experimental.

Agradecer à minha família, por todo apoio e suporte durante todos estes anos, sem eles isto não seria possível.

Ao Rodrigo, um colega de mestrado com quem partilhei esta experiência, um obrigado por todos os momentos e boa disposição e por todo o apoio e motivação que sempre me deu.

À Susana, por ter estado sempre aqui para me aturar, ouvir e motivar quando mais foi necessário.

RESUMO

Os nanomateriais (NM) possuem diversas propriedades físico-químicas únicas para utilização em diferentes áreas e aplicações. O desenvolvimento da nanotecnologia tem levado à produção de um número crescente de NM, por exemplo, nanomateriais de celulose (CNM). Com o aumento da sua utilização em diversas indústrias e produtos, a exposição humana a estes CNM irá acentuar-se, ocorrendo a necessidade da avaliação da sua segurança. A literatura já existente tem reportado resultados de toxicidade incoerentes, tanto positivos como negativos, justificando a necessidade de mais investigação nesta área.

O trabalho desenvolvido teve o objetivo de avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade de CNM, mais especificamente, microfibrilas de celulose (CMF) e nanocristais de celulose (CNC), em células do trato respiratório, nomeadamente, células tumorais do epitélio alveolar humano (células A549) e fibroblastos pulmonares de hamster chinês (células V79). Avaliou-se a citotoxicidade através dos ensaios do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio (MTT) e clonogénico e a genotoxicidade pelos ensaios do cometa e do micronúcleo com bloqueio da citocinese (CBMN).

A análise dos resultados mostrou que a exposição de células A549 a 7,2 - 240 µg/mL (1,5 - 50 µg/cm²) de CNC não induziu qualquer efeito citotóxico ou genotóxico. No entanto, após exposição às mesmas concentrações de CMF já se observaram efeitos citotóxicos em células V79, uma vez que se verificou uma diminuição estatisticamente significativa da capacidade de formação de colónias, após 4 dias de tratamento com as duas concentrações mais elevadas (120 e 240 µg/mL). Contudo, a CMF não provocou qualquer citotoxicidade em células A549. No que diz respeito à genotoxicidade, os CNM não induziram quebras significativas no DNA, observando-se, no entanto, danos oxidativos.

A segurança de utilização dos CNM ainda não é completamente conhecida, pelo que mais estudos serão necessários para se avaliar a segurança deste tipo de NM. O trabalho aqui desenvolvido contribui para o conhecimento do potencial citotóxico e genotóxico dos CNM.

Palavras chave: Nanomateriais, Celulose microfibrilar, Celulose nanocristalina, Ensaio do cometa, Ensaio do micronúcleo

ABSTRACT

Nanomaterials (NM) have several unique physicochemical properties for use in different areas and applications. The nanotechnology development has led to the production of an increasing number of NM, for example, cellulose nanomaterials (CNM). With the increase in their use in various industries and products, human exposure to these CNM will increase, resulting in the need to assess their safety. The existing literature has reported incoherent toxicity results, both positive and negative, justifying the need of more investigation in the area.

This work had the goal of evaluating cytotoxicity and genotoxicity of CNM, specifically, cellulose microfibrils (CMF) and cellulose nanocrystals (CNC), in respiratory tract cells, namely, human alveolar epithelial tumor cells (A549) and chinese hamster lung fibroblasts (V79). Cytotoxicity was evaluated by 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) and clonogenic assays and genotoxicity by comet and cytokinesis-blocked micronucleus (CBMN) assays.

The analysis of results showed that exposure of A549 cells to 7,2 - 240 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1,5 - 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) of CNC did not induce any cytotoxic or genotoxic effect. Nonetheless, after exposure to the same concentrations of CMF cytotoxic effects were observed in V79 cells, since it was found a statistically significant decrease in colony forming ability, after a 4-day treatment with the two highest concentrations (120 e 240 $\mu\text{g}/\text{mL}$) tested. However, CMF did not induce any cytotoxicity in A549 cells. Regarding its genotoxicity evaluation, this CNM did not induce significant DNA breaks, however, oxidative damage was observed.

The safety of using CNM is still not completely known, thus more studies are needed to assess the safety of this type of NM. This work contributes to the knowledge of the cytotoxic and genotoxic potential of CNM.

Keywords: Nanomaterials, Microfibrillar cellulose, Nanocrystalline cellulose, Comet assay, Micronucleus assay

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	XI
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XV
ÍNDICE	XVII
ÍNDICE DE FIGURAS	XIX
ÍNDICE DE TABELAS	XXI
ABREVIATURAS	XXIII
NOTA INTRODUTÓRIA	XXV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Nanomateriais: definição e aplicações	1
1.2. Exposição humana e relação entre propriedades físico-químicas e efeitos biológicos dos NM ..	3
1.3. Nanocelulose – definição, propriedades físico-químicas e aplicações	6
1.3.1. Nanofibras de celulose	9
1.3.2. Nanocristais de celulose	9
1.2.3. Celulose bacteriana.....	10
1.4. Exposição humana e efeitos biológicos das nanoceluloses	11
1.5. Caracterização dos efeitos genotóxicos dos nanomateriais	13
1.5.1. Ensaio de citotoxicidade	14
1.5.2. Ensaio de genotoxicidade	14
1.5.2.1. Ensaio do micronúcleo	14
1.5.2.2. Ensaio do cometa	17
2. OBJETIVOS	19
3. MÉTODOS	21
3.1. Cultura Celular.....	21

3.2. Nanocelulose – produção, caracterização e exposição	22
3.3. Ensaio do MTT	23
3.4. Ensaio clonogénico	23
3.5. Ensaio do micronúcleo com bloqueio da citocinese.....	24
3.6. Ensaio do cometa	25
3.7. Análise estatística.....	27
4. RESULTADOS.....	29
4.1. Caracterização dos nanomateriais de celulose.....	29
4.2. Avaliação da citotoxicidade	30
4.3. Avaliação da genotoxicidade.....	33
4.4. Resumo dos resultados obtidos	35
5. DISCUSSÃO	37
5.1. Efeitos dos nanocristais de celulose	37
5.2. Efeitos das microfibras de celulose	40
6. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	45
7. BIBLIOGRAFIA.....	47
ANEXOS.....	53
I. Resultados dos ensaios de citotoxicidade	53
II. Resultados dos ensaios de genotoxicidade	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Principais formas de nano-objetos e o seu número de dimensões na nanoescala. Adaptado de ISO, 2017.	1
Figura 1.2. Número de publicações relacionadas com nanotecnologia, indexadas na Web of Science (Web of Science,2021).	2
Figura 1.3. Influência das propriedades dos nanomateriais em vários processos celulares e potenciais efeitos biológicos. Adaptado de Louro et al., 2015.	4
Figura 1.4. Representação do fenómeno de aglomeração de nanopartículas, com e sem funcionalização da sua superfície. Adaptado de Dhawan et al., 2009.	5
Figura 1.5. Estrutura química da celulose e representação do sistema de pontes de hidrogénio, intra- e intermoleculares. Retirado de O.J. Rojas, 2016.	7
Figura 1.6. Exemplos de aplicações dos nanomateriais de celulose. Adaptado de Ventura et al., 2020... ..	8
Figura 1.7. Número de publicações sobre nanocelulose com respeito a A) ano de publicação e B) área de investigação. (Fonte: Web of Science; Palavra-chave: <i>nanocellulose</i>). Adaptado de Perumal et al., 2022.	8
Figura 1.8. Domínios amorfos e cristalinos da celulose e morfologia dos nanocristais e nanofibras de celulose. Adaptado de Ma et al., 2020.	10
Figura 1.9. Formação de micronúcleos em células em divisão, originados por cromossomas inteiros ou por fragmentos de cromossomas acêntricos. Adaptado de Fenech et al., 2010.	15
Figura 1.10. Mecanismos de formação de micronúcleos após exposição a A) agentes aneugénicos que provocam a perda de cromossomas completos ou a B) agentes clastogénicos que provocam a quebra de cromossomas e a perda de fragmentos. Adaptado de Terradas et al., 2011.	16
Figura 1.11. Esquema do A) ensaio do cometa padrão e B) ensaio do cometa em combinação com FPG. Adaptado de Sierra & Gaivão, 2014.	18
Figura 3.1. Células utilizadas durante este trabalho observadas por microscopia ótica. A) Células A549 em meio RPMI e B) Células V79 em meio DMEM (ampliação 125x).	21
Figura 3.2. Esquema representativo do procedimento do ensaio do cometa.	27

Figura 4.1. Imagens de microscopia ótica de microfibrilas de celulose obtidas após o pré-tratamento enzimático, a diferentes ampliações (imagens cedidas por Universidade de Coimbra).	29
Figura 4.2. Imagens de TEM de nanocristais de celulose e microfibrilas de celulose, respetivamente A e B, diluídas em PBS. Em A.1 e B.1 esta diluição foi feita em meio RPMI (imagens cedidas por Fátima Pinto).	30
Figura 4.3. Resultados do ensaio clonogénico em células A549 expostas a nanocristais de celulose. Resultados apresentados como média+DP de 2 experiências, cada uma com 6 réplicas.	31
Figura 4.4. Resultados do ensaio clonogénico em células A549 expostas a microfibrilas de celulose. Resultados apresentados como média+DP de 3 experiências, cada uma com 6 réplicas.	31
Figura 4.5. Resultados do ensaio MTT em células V79 expostas a microfibrilas de celulose. Resultados apresentados como média+DP da viabilidade celular relativa ao controlo, de 3 experiências, cada uma com 6 réplicas. * $p < 0,05$	32
Figura 4.6. Resultados do ensaio clonogénico em células V79 expostas a microfibrilas de celulose. Resultados apresentados como média+DP de 2 experiências, cada uma com 3 réplicas. * $p < 0,05$	32
Figura 4.7. Resultados da citostase, calculada a partir do ensaio de CMBN, em células V79 expostas a microfibrilas de celulose. Resultados apresentados como média+DP de 1 experiência, com 2 réplicas.	33
Figura 4.8. Resultados do ensaio do cometa em células A549 expostas a nanocristais de celulose. Resultados apresentados como média+DP de 3 experiências, cada uma com 2 réplicas. * $p < 0,05$ em relação ao controlo negativo sem FPG. ** $p < 0,05$ em relação ao controlo negativo com FPG. *** $p < 0,05$ para comparação entre amostra com e sem FPG.	34
Figura 4.9. Resultados do ensaio do cometa em células A549 expostas a microfibrilas de celulose. Resultados apresentados como média+DP de 3 experiências, cada uma com 2 réplicas. * $p < 0,05$ em relação ao controlo negativo sem FPG. ** $p < 0,05$ em relação ao controlo negativo com FPG. *** $p < 0,05$ para comparação entre amostra com e sem FPG.	34
Figura 4.10. Resultados do ensaio de CBMN (micronúcleos com bloqueio da citocinese) em células V79 expostas a microfibrilas de celulose. Resultados apresentados como média+DP de 1 experiências, com 2 réplicas. * $p < 0,05$	35
Figura 4.11. Exemplo de uma célula V79 binucleada com MN, observado por microscopia ótica (ampliação 1000x).	35

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1. Alguns exemplos de aplicações de nanomateriais. Adaptado de Bissessur, 2020.	2
Tabela 1.2. Órgãos afetados após exposição a nanomateriais e exemplos de patologias. Adaptado de Buzea et al., 2007; Pietroiusti, 2012.....	3
Tabela 1.3. Resumo dos estudos onde foi abordada a genotoxicidade dos nanomateriais de celulose em linhas celulares humanas. Os símbolos + e – representam, respetivamente, pelo menos um resultado positivo ou resultados negativos nos ensaios de cito- e genotoxicidade efetuados. n/a significa que não foi feita a avaliação da citotoxicidade.....	12
Tabela 1.4. Opções da bateria de testes adequada para avaliação do potencial genotóxico de novos produtos farmacêuticos. Adaptado de ICH, 2011.	13
Tabela 4.1. Propriedades físico-químicas dos nanomateriais de celulose testados.....	29
Tabela 4.2. Resumo dos resultados obtidos durante o decorrer deste trabalho.....	35

ABREVIATURAS

8-oxoGuanina	7,8-dihidroguanina-8-oxoguanina
A549	Células tumorais do epitélio alveolar humano
AFM	Microscopia de força atômica
ATCC	Do inglês “American Type culture Collection”
BC	Celulose bacteriana
BEAS-2B	Células humanas não tumorais do epitélio pulmonar
CBMN	Micronúcleos com bloqueio da citocinese
CBPI	Índice de proliferação de citocinese bloqueada
C_{COOH}	Quantidade de grupos carboxilo
CMF	Microfibrilas de celulose
CNC	Nanocristais de celulose
CNF	Nanofibras de celulose
CNM	Nanomateriais de celulose
DLS	Dispersão de luz dinâmica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Grau de polimerização
FPG	Formamidopirimidina DNA glicosilase
ICH	Do inglês <i>International Conference on Harmonisation (of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)</i>
ISO	Do inglês <i>International Organization for Standardization</i>
MMC	Mitomicina c
MN	Micronúcleo
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio
η	Viscosidade intrínseca
NM	Nanomaterial
OCDE	Organização de Cooperação e Desenvolvimento Económico
OEL	Limite de exposição ocupacional
PE	Eficiência de plaqueamento
RI	Índice de replicação
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigénio
SF	Fração sobrevivente
TEM	Microscopia eletrónica de transmissão
V79	Fibroblastos pulmonares de hamster chinês

NOTA INTRODUTÓRIA

O trabalho desenvolvido foi realizado no âmbito do projeto “*A predictive toxicology approach to characterize potencial respiratory effects of functionalized nanocellulose fibers in a co-culture system*”, ToxApp4NanoCELF1 (PTDC/SAU-PUB/32587/2017), financiado pela FCT/MCTES.

Parte dos resultados obtidos foram apresentados, num artigo científico já publicado:

Ventura, C., Marques, C., Cadete, J., Vilar, M., Pedrosa, J.F.S., Pinto, F., Fernandes, S.N., da Rosa, R.R., Godinho, M.H., Ferreira, P.J.T., Louro, H., & Silva, M.J. (2022). Genotoxicity of three micro/nanocelluloses with different physicochemical characteristics in MG-63 and V79 cells. *Journal of Xenobiotics*, 12. <https://doi.org/10.3390/jox12020009>.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Nanomateriais: definição e aplicações

Nanomateriais (NM) são definidos como materiais que contêm partículas e onde 50% ou mais destas partículas apresentam pelo menos uma dimensão na gama de tamanhos entre 1 e 100 nm (European Commission, 2011). Os NM podem ser divididos em três principais categorias, tendo em conta o número de dimensões nano- que possuem (Figura 1.1) (ISO, 2017).

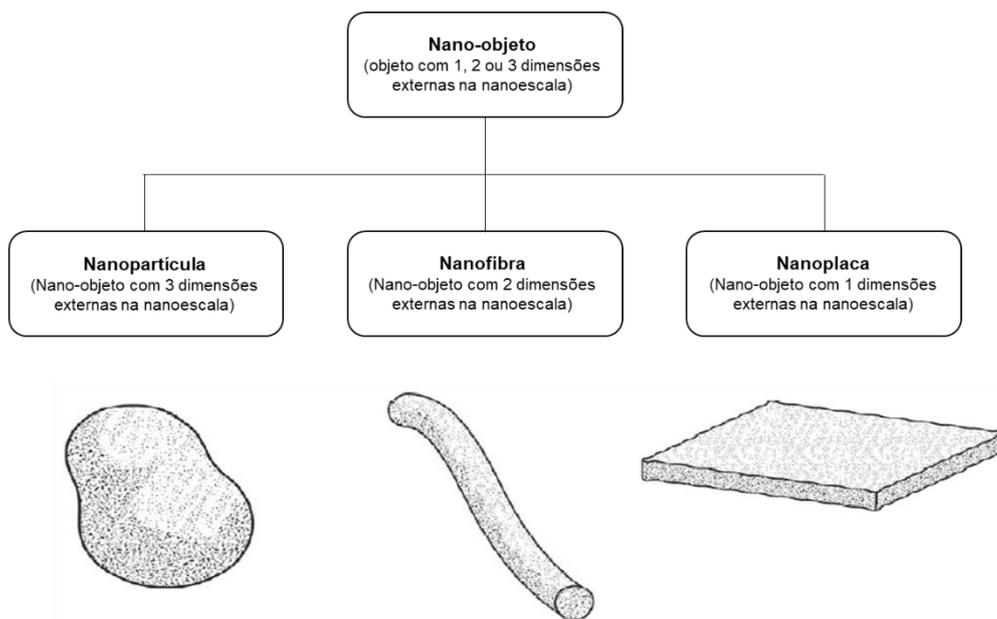


Figura 1.1. Principais formas de nano-objetos e o seu número de dimensões na nanoescala. Adaptado de ISO, 2017.

O crescente desenvolvimento da nanotecnologia e o conseqüente aumento da produção de NM devido às propriedades elétricas, magnéticas, óticas e mecânicas únicas e vantajosas que possuem quando comparados com o mesmo material na forma micro, resultou na sua utilização em diversas áreas e para uma vasta gama de aplicações (Guo & Chen, 2015; Louro et al., 2015). Na Tabela 1.1 estão representados alguns exemplos de aplicações dos NM.

Tabela 1.1. Alguns exemplos de aplicações de nanomateriais. Adaptado de Bissessur, 2020.

Aplicações	Exemplos
Doméstica	Dessalinização, purificação de água
Cosmética, dermatologia e produtos de higiene pessoal	Cremses, produtos para o cabelo, maquiagem, tratamento de doenças de pele, protetores solares, pasta de dentes
Indústria têxtil	Roupa, impermeabilização de tecidos, tingimento
Armazenamento de energia	Armazenamento de hidrogénio, baterias de lítio, supercapacitores
Desporto	Equipamento desportivo
Alimentação e bebidas	Revestimento e segurança de materiais de embalagens, veiculação de sabores ou fragâncias, aditivos alimentares
Indústria automóvel	Baterias, aditivos de combustível, tinta, pneus, sensores
Eletrónica	Eléctrodos eletroquímicos, sensores
Construção	Aumento da força mecânica e integridade estrutural, sensores, revestimento de vidros, paredes ou tetos, lubrificação
Medicina	Veiculação de fármacos, diagnóstico, imagiologia, terapia fotodinâmica, medicina regenerativa

O desenvolvimento da nanotecnologia tem também levado a um rápido aumento de publicações sobre NM, atingindo mais de 2 milhões de artigos desde 2000 indexados na *Web of Science*, de acordo com a StatNano (Figura 1.2) (Web of Science,2021).

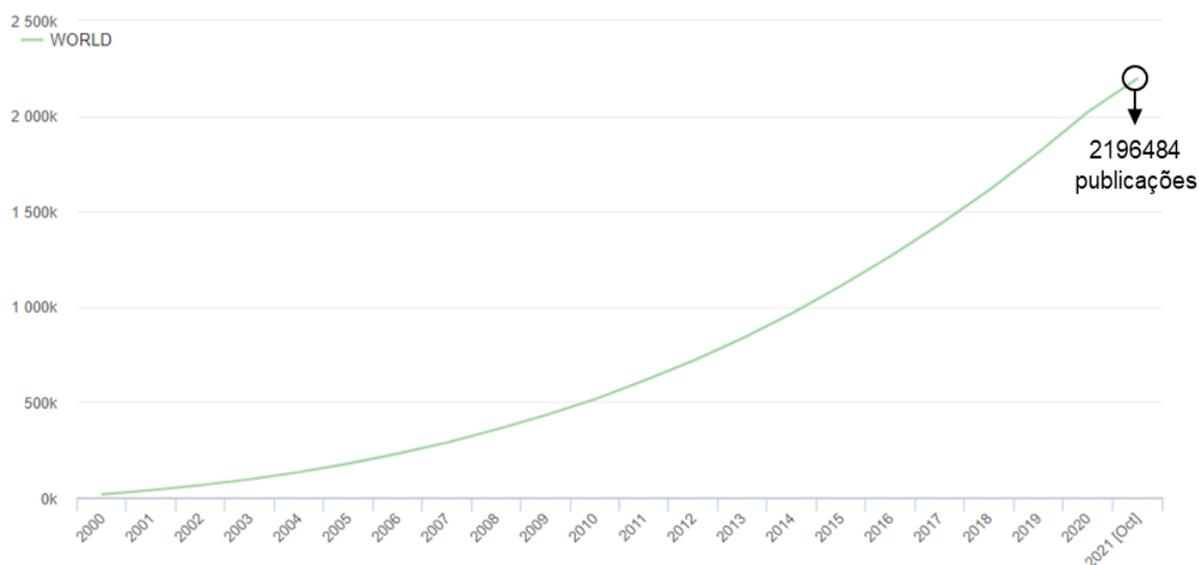


Figura 1.2. Número de publicações relacionadas com nanotecnologia, indexadas na Web of Science (Web of Science,2021).

1.2. Exposição humana e relação entre propriedades físico-químicas e efeitos biológicos dos NM

Aquando da sua produção ou incorporação em produtos pode ocorrer uma exposição dos trabalhadores aos NM no local de trabalho. A pele, o trato gastrointestinal e o trato respiratório estão em constante contacto com o ambiente, pelo que são os locais mais prováveis de entrada de NM no organismo (Buzea et al., 2007; Ostiguy et al., 2015). Destaca-se, no entanto, a via inalatória como a via de exposição principal em contexto ocupacional, devido à formação de aerossóis em diversas situações como a produção de NM sólidos em locais abertos ou mal selados, manuseamento de pós nanométricos ou suspensões líquidas ou durante a limpeza e manutenção de equipamentos (Ostiguy et al., 2015). Uma vez inalados, os NM podem ainda chegar a outros órgãos para além dos pulmões, quer seja pelo sistema circulatório ou pelo sistema linfático. Embora alguns NM sejam inofensivos quando presentes no organismo, outros têm a capacidade de interferir com os processos básicos das células como proliferação, metabolismo e morte. Dado o tamanho dos NM, muitos têm a capacidade de atravessar barreiras fisiológicas, entrar e circular nos sistemas sanguíneo e linfático e afetar outros tecidos e órgãos, originando diversas doenças, por exemplo, doenças respiratórias ou cardiovasculares (Buzea et al., 2007). Alguns efeitos provocados pela presença de NM no organismo estão representados na Tabela 1.2.

Tabela 1.2. Órgãos afetados após exposição a nanomateriais e exemplos de patologias. Adaptado de Buzea et al., 2007; Pietroiusti, 2012.

Órgãos afetados	Exemplos de patologias
Cérebro	Parkinson, Alzheimer, esclerose múltipla
Pulmões	Asma, bronquite, enfisema, cancro, fibrose, pneumonia
Sistema circulatório	Aterosclerose, vasoconstrição, trombose
Coração	Arritmias, enfarte do miocárdio
Sistema linfático	Podoconiose, sarcoma de Kaposi
Pele	Doenças autoimunes, dermatite, tumores benignos
Sistema gastrointestinal	Doença de Crohn, cancro do cólon
Sistema reprodutor	Infertilidade, aborto, malformações pré- e pós-natal

Devido ao seu tamanho reduzido, os NM possuem características físico-químicas singulares, como uma elevada área superficial, que pode levar a modificações superficiais ou à sua funcionalização, potenciando desta forma a sua reatividade química (Louro et al., 2015). Apesar das vantagens na utilização dos NM e como consequência do seu pequeno tamanho, a sua extrema utilização poderá também tornar-se um problema devido a possíveis interações com os sistemas biológicos, uma vez que aumenta a sua reatividade química (Buzea et al., 2007; Dhawan et al., 2009).

São várias as propriedades físico-químicas dos NM que podem influenciar a sua toxicidade no organismo. Na Figura 1.3 estão descritas algumas destas propriedades e também potenciais efeitos biológicos que poderão ocorrer após a exposição a NM (Louro et al., 2015; Ganguly et al., 2018).

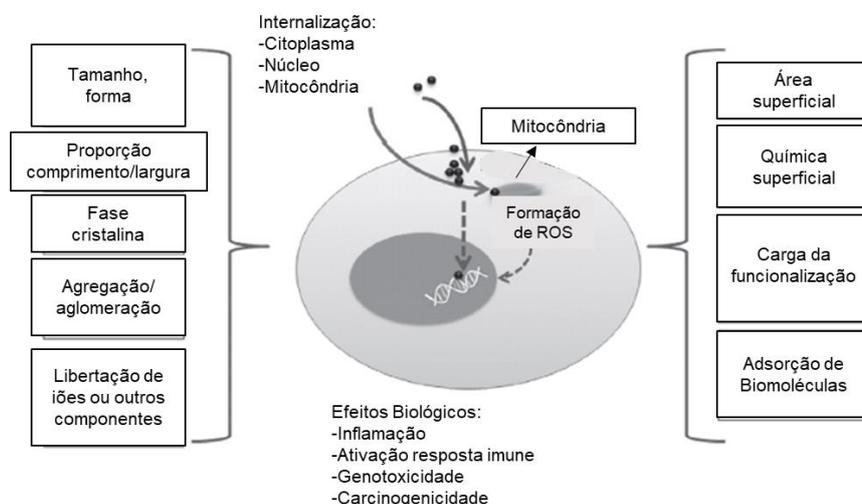


Figura 1.3. Influência das propriedades dos nanomateriais em vários processos celulares e potenciais efeitos biológicos. Adaptado de Louro et al., 2015.

O tamanho dos NM é uma das características mais importantes no que toca à indução de efeitos tóxicos. NM de pequenas dimensões são mais facilmente internalizados pelas células, devido à similaridade de dimensões com as macromoléculas. O aumento da área superficial, também conseguido pela diminuição do tamanho dos NM, pode levar à interação com biomoléculas existentes no meio, fator este que pode não só influenciar a internalização dos NM pelas células, afetando o seu tempo de vida no organismo, como a biodistribuição das biomoléculas. Esta interação NM-biomolécula leva à formação de uma coroa proteica, com a adsorção de proteínas à superfície dos NM. A formação da coroa proteica é um processo dinâmico, podendo-se alterar ao longo do tempo devido a fatores como as características fisiológicas do meio onde os NM se encontram, a concentração de proteínas, o seu tempo de exposição e diferentes constantes de afinidade (Ganguly et al., 2018; T. Lima et al., 2020).

A forma é também um importante fator a ter em conta quando avaliada a toxicidade dos NM. Esta que pode variar entre nanopartículas, nanofibras ou nanoplacas, entre outros, podem induzir efeitos diferentes no organismo uma vez que a sua interação com as células é também diferente. Enquanto as nanopartículas, devido à sua forma esférica, são mais facilmente endocitadas, no caso de NM com uma elevada “razão de aspeto”, isto é, elevada razão comprimento/largura, como é o caso das nanofibras, a sua internalização pode levar à ruptura da membrana celular e à formação de poros, afetando desta forma o balanço iónico dentro e fora da célula e contribuindo para a sua morte. Para além disso, a presença de nanofibras no organismo, particularmente no caso das mais rígidas, apesar da tentativa dos macrófagos as fagocitarem, tal não é possível devido ao seu elevado comprimento exceder o tamanho do macrófago, o que pode resultar na morte dos macrófagos devido a uma fagocitose “frustrada” causando potenciais efeitos adversos devido à bioacumulação deste tipo

de NM no organismo, favorecendo condições pró-inflamatórias (Fubini et al., 2011; Ganguly et al., 2018).

A superfície de qualquer material constitui o primeiro local de interação com o ambiente intra- e extracelular, pelo que a funcionalização dos NM e a sua carga são fatores importantes no despoletar de uma resposta toxicológica. A carga da membrana celular é negativa, pelo que NM positivamente carregados ou neutros têm uma maior facilidade em ser internalizados. A funcionalização dos NM, que pode ocorrer através da formação de ligações covalentes ou eletrostáticas entre a superfície do NM e o ligando, ou através de deposição atômica, para além de influenciar a toxicidade pode modular aplicações dos NM, como veiculação de fármacos ou imagiologia, através da funcionalização com agentes que têm como alvo moléculas ou recetores específicos, proporcionando seletividade aos NM e direcionando-os (Ganguly et al., 2018).

Outro fator determinante na produção de uma resposta toxicológica trata-se da dispersão dos NM. A sua aglomeração/agregação ocorre principalmente através de forças de Van der Waals, um tipo de interação relevante à nanoescala. A agregação dos NM ocorre desde o momento da sua síntese, mas quando introduzidos num meio líquido, especialmente num meio biologicamente relevante, esta torna-se mais severa. A agregação pode ocorrer quando os NM estão em movimento Browniano, um movimento aleatório e importante para pequenas partículas em suspensão. Os NM vão colidir e podem aderir uns com os outros, formando partículas de tamanho sucessivamente crescente e com menor área superficial, afetando deste modo a toxicidade dependente do tamanho e produzindo diferentes efeitos no organismo (Dhawan et al., 2009; Tavares et al., 2014). Uma forma de diminuir a agregação dos NM é revestindo a sua superfície, por exemplo utilizando soro, onde proteínas ficam aderidas à superfície dos NM (Dhawan et al., 2009) (Figura 1.4)

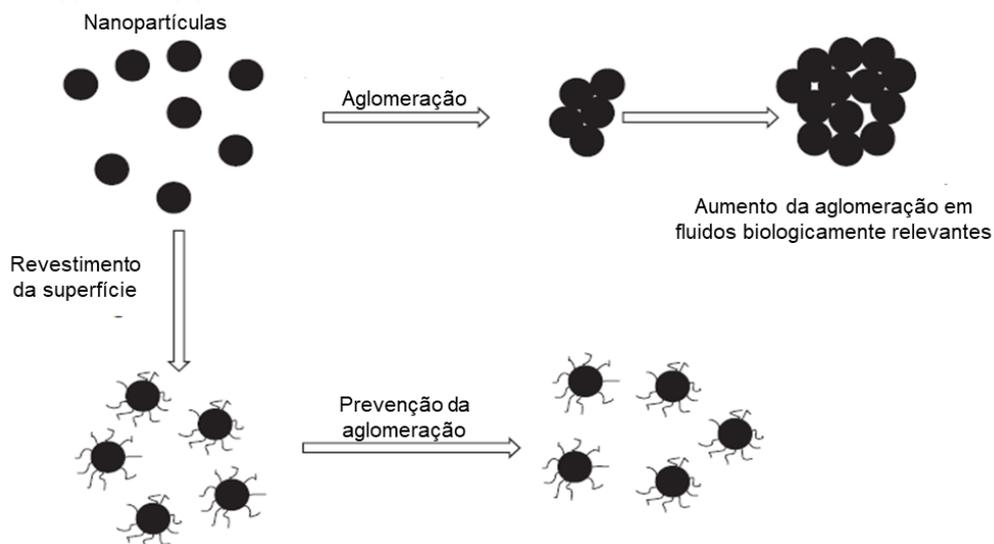


Figura 1.4. Representação do fenómeno de aglomeração de nanopartículas, com e sem funcionalização da sua superfície. Adaptado de Dhawan et al., 2009.

Pode-se então concluir que materiais com a mesma química podem diferir em diferentes propriedades físico-químicas, propriedades estas que podem afetar as interações com as células ou tecidos (Tavares et al., 2014).

Também descrito na Figura 1.3 estão alguns dos efeitos que os NM podem despoletar uma vez no nosso organismo. A inflamação é uma das mais importantes respostas desencadeadas como defesa de qualquer xenobiótico. A resposta inflamatória é controlada por uma série de eventos intra- e extracelulares e a internalização dos NM vai promover a produção de fatores solúveis, mediadores pró-inflamatórios ou citocinas, que por sua vez alertam o sistema imunitário da existência de NM no organismo. São então recrutados neutrófilos e macrófagos para o local da inflamação, de forma a resolvê-la (Buzea et al., 2007; Ganguly et al., 2018).

Outro efeito desencadeado pela presença de NM no organismo é a genotoxicidade, definida pela capacidade de danificar o material genético, ao nível do ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *deoxyribonucleic acid*), ácido ribonucleico (RNA, do inglês *ribonucleic acid*) ou cromossomas, afetando a sua integridade e/ou função (Louro et al., 2015). A genotoxicidade pode ocorrer segundo dois mecanismos diferentes: genotoxicidade primária (direta ou indireta) ou genotoxicidade secundária. A genotoxicidade primária direta ocorre quando há a interação direta dos NM com o material genético. Durante a interfase, os NM podem interagir ou ligar-se ao DNA e assim interferir com a replicação do DNA e a sua transcrição em RNA. As lesões induzidas na molécula de DNA se não sofrerem reparação podem originar quebras nas suas cadeias ou mutações génicas. Os NM têm também a capacidade de perturbar a mitose, podendo interagir com os cromossomas, induzindo quebras e, mais importante, perda de cromossomas durante a mitose, isto é, efeitos clastogénicos e aneugénicos. A genotoxicidade primária indireta é, sobretudo, mediada pela produção de espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) causada pela interação da superfície dos NM com organelos celulares, nomeadamente a mitocôndria. A genotoxicidade secundária é mediada pela produção de ROS devido à indução de processos de inflamação desencadeados pelos NM (Magdolenova et al., 2014). Para além de afetar o DNA, o stress oxidativo desencadeado pela crescente produção e acumulação de ROS, como o anião superóxido, o radical hidroxilo ou peróxido de hidrogénio podem também provocar a peroxidação de lípidos, interferir com vias de sinalização e modular a transcrição de genes (Buzea et al., 2007).

De entre todos os NM que existem, este trabalho teve como objeto de estudo um tipo específico de NM, os nanomateriais de celulose (CNM, do inglês *cellulose nanomaterials*). As suas propriedades e o atual conhecimento sobre a sua toxicidade, vão ser discutidas na próxima secção.

1.3. Nanocelulose – definição, propriedades físico-químicas e aplicações

A celulose é o polímero natural mais abundante na natureza e pode ser obtido de diversas fontes como madeira, algodão, animais marinhos ou até mesmo ser produzido por bactérias. Trata-se de um material renovável e biodegradável e a sua utilização tem vindo a aumentar cada vez mais para

diversas aplicações. A celulose pode definir-se como um homopolissacárido composto por unidades de β -1,4-anidro-D-glucopiranosose, ligadas por ligações glicosídicas β -1,4. A existência de três grupos hidroxilo (-OH) por cada unidade de anidroglicose, responsáveis pela formação de ligações intra- e intermoleculares através da formação de pontes de hidrogénio, fazem da celulose uma molécula altamente reativa. Pontes de hidrogénio intramoleculares ocorrem entre o grupo -OH do C3 com o O do anel do resíduo de glucose anterior e entre os grupos -OH de C2 e C6 de resíduos adjacentes, enquanto pontes de hidrogénio intermoleculares, responsáveis pela interação entre diferentes cadeias de celulose, ocorrem entre o O de C3 e o grupo -OH de C6 (Figura 1.5). As pontes de hidrogénio são essenciais para a rigidez, estabilidade e para um empacotamento fibrilar e linear da celulose (Lin & Dufresne, 2014; O. J. Rojas, 2016; Shankaran, 2018).

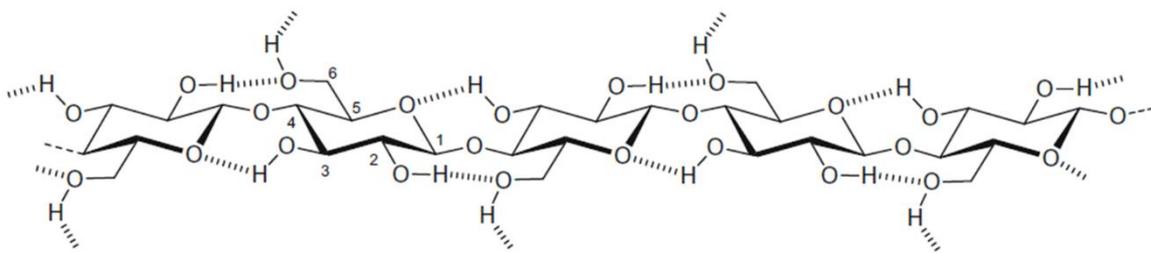


Figura 1.5. Estrutura química da celulose e representação do sistema de pontes de hidrogénio, intra- e intermoleculares Retirado de O. J. Rojas, 2016.

Os CNM mais explorados para diversas aplicações podem categorizar-se em três grupos de acordo com as suas características e origem: nanofibras de celulose (CNF, do inglês *cellulose nanofibers*), nanocristais de celulose (CNC, do inglês *cellulose nanocrystals*) e celulose bacteriana (BC, do inglês *bacterial cellulose*). Estes diferem entre si em fatores como o grau de cristalinidade ou as suas dimensões, devido a diferenças que ocorrem aquando da sua síntese ou dependendo da fonte de celulose que é utilizada para a sua produção. Tal como noutros tipos de NM, diferentes características físico-químicas dos CNM poderão provocar diferentes efeitos toxicológicos uma vez no organismo.

Atualmente existe um grande número de publicações que descrevem a preparação de várias formas de CNM como suspensões, pós, filmes, nanopapéis, hidrogéis ou aerogéis, aplicados em diferentes setores da indústria (Ventura et al., 2020). Exemplos como engenharia de tecidos, veiculação de fármacos, biossensores e diagnóstico, crescimento de vasos sanguíneos e reconstrução de ossos (indústria biomédica) (J. Rojas et al., 2015; Trache et al., 2020); suporte para imobilização de enzimas, estabilização de emulsões e transporte de substâncias ativas para a pele (cosmética) (Almeida et al., 2021); transporte e libertação controlada de fármacos, tratamento de inflamações e cicatrização de feridas (indústria farmacêutica) (Cao, 2018); aditivos na fabricação de papel, aumentando a sua força e qualidade (Li et al., 2021); revestimento de embalagens de alimentos (Fotie et al., 2020); colheita e conservação de energia celular, aumento da segurança de baterias (Wang et al., 2017) tratam-se de potenciais aplicações dos CNM (Figura 1.6).



Figura 1.6. Exemplos de aplicações dos nanomateriais de celulose. Adaptado de Ventura et al., 2020.

A utilização deste polímero natural para a produção de nanomateriais tem despertado um grande interesse, dada a variedade de nanoestruturas com diferentes formas, tamanhos e propriedades que existem. Este facto pode ser comprovado na publicação de (Perumal et al., 2022), onde se fez uma pesquisa e se observou um aumento do número de publicações acerca da nanocelulose, em diferentes áreas (Figura 1.7). Não se abordou no entanto resultados de estudos toxicológicos.

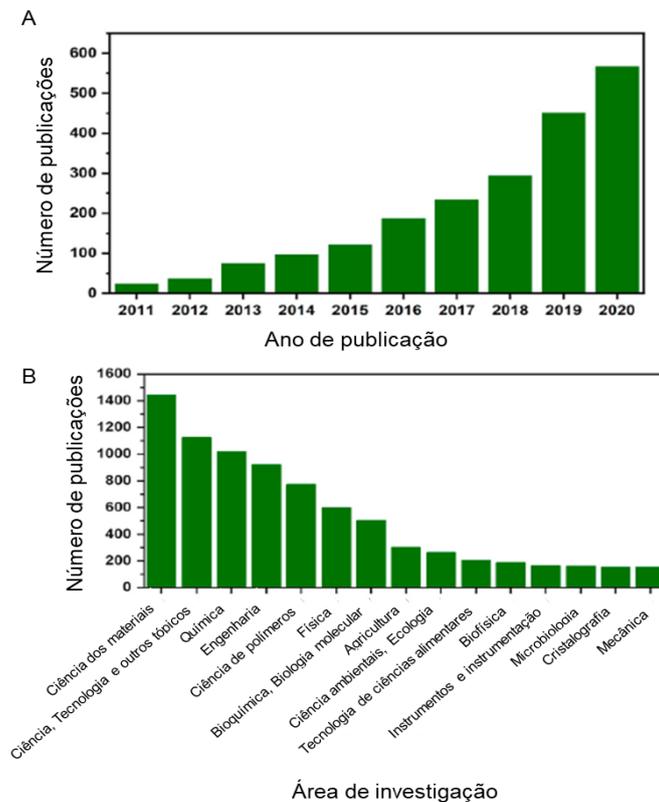


Figura 1.7. Número de publicações sobre nanocelulose com respeito a A) ano de publicação e B) área de investigação. (Fonte: Web of Science; Palavra-chave: *nanocelulose*). Adaptado de Perumal et al., 2022.

1.3.1. Nanofibras de celulose

As CNF definem-se como agregados de nanofibras de celulose com um comprimento até 100 µm e diâmetros entre 3-100 nm, tratando-se de um NM com uma elevada “razão de aspeto”, para além de uma elevada força e rigidez. A sua produção ocorre segundo uma abordagem *top-down*, onde posteriormente à extração da celulose ocorre um tratamento mecânico destrutivo da polpa celulósica, normalmente com a utilização de um homogenizador de alta pressão, que resulta na separação de fibras de celulose em microfibras e seguidamente em fibras elementares (Lin & Dufresne, 2014; O. J. Rojas, 2016; Ventura et al., 2020). Trata-se, no entanto, de um processo que requer uma grande quantidade de energia, pelo que necessita de um pré-tratamento químico ou enzimático de modo a facilitar o processo e diminuir a energia necessária. Para além das vantagens em torno do processo, relativas ao seu baixo custo e elevada exequibilidade, este pré-tratamento traz também vantagens ao nível do produto, como alterar a sua cristalinidade, aumentar a área superficial ou aumentar a sua reatividade. Um exemplo de pré-tratamento utilizado para preparação de CNF é a oxidação catalítica com o radical 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil (TEMPO), em condições aquosas, que se mostrou vantajoso relativamente à eficiência e seletividade da reação e que simultaneamente reduz os ciclos necessários de diminuição de tamanho das fibras aquando do tratamento mecânico (Ventura et al., 2020).

Além da elevada força e rigidez já referidas, as CNF apresentam uma elevada área superficial, elevada resistência mecânica, uma baixa densidade, uma elevada biocompatibilidade e uma fácil capacidade para formação de filmes, que as torna um NM atrativo para investigação e utilização (Ventura et al., 2018; Zeng et al., 2021). Algumas aplicações das CNF incluem a melhoria das propriedades mecânicas do papel, medicina regenerativa, cicatrização de feridas, membranas de hemodiálise e veiculação de fármacos (Ventura et al., 2018).

1.3.2. Nanocristais de celulose

As CNF são constituídas por dois domínios distintos, um cristalino (ordenado) e outro amorfo (não-ordenado) e a partir da remoção deste último e preservação do domínio cristalino são obtidos os CNC (Figura 1.8). Este processo é normalmente conseguido através de uma hidrólise ácida (com ácido clorídrico ou sulfúrico) sob condições controladas de agitação, temperatura (entre 40 – 50 °C), tempo (entre 30 – 90 minutos) e concentração de ácido (entre 50 – 70 wt%), e é seletivo para as zonas não cristalinas, sobrando apenas um resíduo com uma elevada cristalinidade (Shankaran, 2018; Thompson et al., 2019).

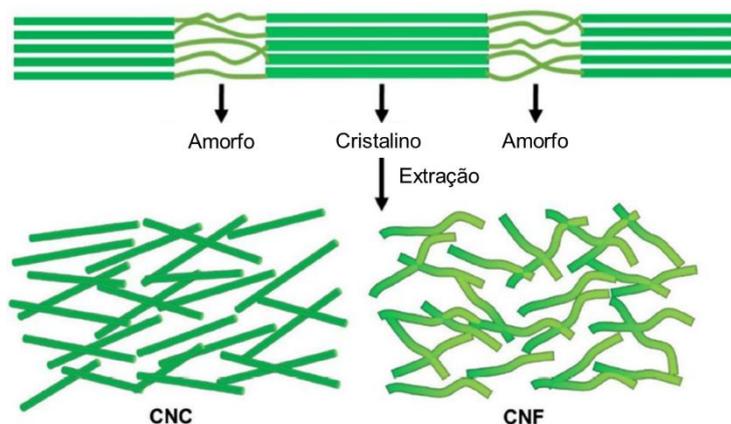


Figura 1.8. Domínios amorfos e cristalinos da celulose e morfologia dos nanocristais e nanofibras de celulose. Adaptado de Ma et al., 2020.

Durante o processo da sua formação primeiramente procede-se à purificação da biomassa, eliminando a lignina e hemiceluloses, a qual é posteriormente sujeita a uma hidrólise ácida. A difusão do ácido nas fibras de celulose vai promover uma clivagem transversal das fibras em pequenos nanocristais. Os CNC são diluídos em água e lavados por sucessivas centrifugações. De seguida são dialisados de forma a remover resíduos de ácido que possam ainda existir. Ocorre ainda a desintegração de agregados, por sonicação, de forma a dispersar os CNC. São posteriormente introduzidos grupos com carga negativa nos CNC, que resulta na sua estabilização em suspensões aquosas polares. Relativamente à sua estrutura e dimensões, os CNC apresentam uma forma de bastonete alongado, um diâmetro entre 3-50 nm e um comprimento que pode variar entre 100 nm e vários μm , dependendo da sua fonte e condições de produção (Rojas, 2016; Shankaran, 2018; Ventura et al., 2020).

Os CNC possuem uma elevada “razão de aspeto”, elevada área superficial, elevada força mecânica, além de uma natureza cristalina como referido anteriormente. São hidrofílicos na natureza, mas podem ser facilmente funcionalizados de forma a produzir compósitos e matrizes poliméricas hidrofóbicas (Shankaran, 2018).

Relativamente a aplicações os CNC são já utilizados, por exemplo, em sistemas antivirais, em engenharia de tecidos, na veiculação de fármacos, em biossensores, em sistemas de tratamento de águas, no desenvolvimento de supercapacitores e filmes condutores, em embalagens de alimentos ou em produtos de cuidado pessoal (Grishkewich et al., 2017).

1.3.3. Celulose bacteriana

Contrariamente do que ocorre para CNF e CNC, a biossíntese de BC ocorre segundo uma abordagem *bottom-up*, onde a partir de qualquer fonte de carbono que possa originar glucose e de uma estirpe estável e eficiente na produção de celulose, será possível a formação de fibras (Lin & Dufresne, 2014; Gorgieva & Trček, 2019). A estirpe melhor estudada e mais utilizada é a *Komagataeibacter xylinus*, uma acetobactéria estritamente aeróbia e gram-negativa. A formação de BC ocorre na membrana bacteriana, a partir de glucose-ativada, e segundo uma sequência de passos. Se o substrato

inicial for a glucose, primeiramente ocorre a sua fosforilação e isomerização pela glucoquinase e fosfoglucomutase, respetivamente, formando glucose-1-fosfato a partir de glucose-6-fosfato. De seguida ocorre a síntese de UDP-glucose, pela uridililtransferase (UTP)-glucose-1-fosfato, e por último a celulose sintase transfere o resíduo glucosil da UDP-glucose para a cadeia β -D-1,4-glocuse nascente. A cadeia formada é então excluída através de poros existentes na membrana celular e ocorre a formação de pontes de hidrogénio inter- e intramoleculares a partir dos grupos -OH livres. Em casos onde não temos a glucose como substrato inicial, outras fontes de carbono como maltose, frutose ou sacarose podem ser utilizadas e podem proporcionar o aumento do rendimento da reação de formação das fibras de celulose, no entanto na maioria dos casos a utilização de glucose trata-se da melhor fonte de energia para as bactérias (Dourado et al., 2017; Gorgieva & Trček, 2019).

Tratando-se de um modo de produção diferente daquele observado para CNF e CNC, a BC apresenta características e propriedades distintas, nomeadamente a sua elevada pureza, devido à inexistência de lignina e hemicelulose na sua constituição. Outro aspeto é a agregação das cadeias de glucose recém-formadas, que confere à BC hidrofiliçidade, cristalinidade e moldabilidade. As fibras de BC formam agregados com <100 nm de largura, enquanto as fibras individuais apresentam larguras de 7-8 nm e vários micrómetros de comprimento (Dourado et al., 2017; Gorgieva & Trček, 2019). Este tipo de celulose tem vindo a ser utilizada em produtos alimentares, comercializada sob o nome de “*nata de coco*”, pelo que diversas organizações têm vindo a desenvolver estudos de modo a avaliar a sua toxicidade aguda e crónica, carcinogenicidade, mutagenicidade e neurotoxicidade (Dourado et al., 2017).

Apesar de abordado este tipo de CNM, este trabalho debruçar-se-á apenas sobre as CNF e as CNC.

1.4. Exposição humana e efeitos biológicos das nanoceluloses

Relativamente à exposição aos CNM, existe alguma falta de informação acerca do seu potencial tóxico, e não existem estudos que possam ser usados para determinação de um valor de limite de exposição ocupacional (OEL, do inglês *occupational exposure limits*). Tendo em conta a existência de indicadores que demonstram que a biopersistência de CNM inalados pode ser perigosa, o Instituto Finlandês de Saúde Ocupacional, em 2014, definiu o valor de OEL dos CNM em 0,01 fibras/cm³, valor igual ao das nanofibras de carbono (Stockmann-Juvala et al., 2014).

Baseado no conhecimento já existente sobre os possíveis efeitos adversos de outros materiais fibrilares e a sua biopersistência no organismo, como os nanotubos ou as nanofibras de carbono, seria de esperar uma maior toxicidade por parte dos CNM quando comparado com o mesmo material na forma de maiores dimensões, isto é, não nano (Ventura et al., 2020). Estudos toxicológicos têm sido feitos com o objetivo de avaliar os efeitos adversos causados pelos CNM, particularmente a sua citotoxicidade e genotoxicidade. Na Tabela 1.3 apresenta-se um resumo dos estudos que englobaram a avaliação da genotoxicidade dos CNM, sendo possível observar uma incoerência nos resultados. Observou-se alguma escassez de informação acerca do comportamento dos CNM em tecido e células humanas.

Tabela 1.3 Resumo dos estudos onde foi abordada a genotoxicidade dos nanomateriais de celulose em linhas celulares humanas. Os símbolos + e - representam, respetivamente, pelo menos um resultado positivo ou resultado negativo nos ensaios de cito- e genotoxicidade efetuados. n/a significa que não foi feita a avaliação da citotoxicidade.

NM	Fonte/Características físico-químicas	Sistema experimental	Citotoxidade	Genotoxicidade	Resultados principais	Referência
C N F	Fonte - algodão (branco e de 3 outras cores) e curauá; Comprimentos à volta de 150 nm; Diâmetro à volta de 12 nm (CNF de algodão) e à volta de 6 nm (CNF de curauá); Potencial zeta de todas as CNF à volta de -25 mV	Ensaio do cometa em linfócitos humanos; Exposição de 1h a 0,1%	n/a	+	Danos significativos no DNA após exposição a CNF de algodão castanho e curauá	(de Lima et al., 2012)
C N F	Fonte - <i>Eucalyptus globulus</i> ; Pré-tratamento - Oxidação por TEMPO; Comprimento <50 nm (determinado DLS); Diâmetro de 25,9 nm (determinado por AFM) e de 18,5 nm (determinado por DLS);	Citotoxicidade avaliada pelos ensaios do MTT (24h e 48h), LDH e clonogénico (8 dias); Genotoxicidade avaliada pelos ensaios do cometa (24h) e micronúcleos (6h); Exposição a 1,5 - 25 µg/cm ² numa co-cultura de células A549 e THP-1	+	+	Aumento da viabilidade celular após uma exposição de 48h a 1,5 e 3 µg/cm ² e diminuição após exposição a 12,5 e 25 µg/cm ² . Aumento significativo da %DNA na cauda após uma exposição a 25 µg/cm ² . Aumento da frequência de micronúcleos após exposição a 1,5 e 3 µg/cm ² .	(Ventura et al., 2018)
C N F	Fonte - Madeira macia; Químicas superficiais diferentes das CNF: não funcionalizadas (diâmetro de agregados entre 10 - 30 nm; potencial zeta em meio de cultura de -14,1 mV), carboximetiladas (agregados com 10 - 30 nm; -20,8 mV), fosforiladas (fibras individuais 4-5 - 29,6 mV), sulfoetiladas (fibras individuais 4-5 nm; -17,8 mV e com hidroxipropiltrimetilamónio (fibras individuais 4-5 nm; 18,7 mV)	Citotoxicidade avaliada por um ensaio de viabilidade celular luminiscente (24h e 48h); Genotoxicidade avaliada pelo ensaio do cometa (24h) e micronúcleos (48h). Exposição a 3,9 - 500 µg/mL (citotoxicidade) e 6 - 500 µg/mL (genotoxicidade) em células BEAS-2B	-	-	Nenhuma das CNF induziu danos significativos no DNA. Um efeito dose-resposta foi observado para as CNF fosforiladas	(Aimone et al., 2021)
C N C / M C C	Comprimento de 135 nm e largura de 7,3 nm(CNC) e tamanho de aproximadamente 50 µm (MCC, celulose microcristalina)	Citotoxicidade avaliada por contagem de células e ensaio luminiscente. Genotoxicidade avaliada pelo ensaio dos micronúcleos. Exposição de 4h, 24h e 48h a 5 - 300 µg/mL (citotoxicidade) e 48h a 2,5 - 100 µg/mL (genotoxicidade) em células BEAS-2B	+	-	Citotoxicidade observada maioritariamente à concentração de 100 µg/mL, quer seja nos diferentes ensaios como nos diferentes tempos de exposição. Nenhuma das concentrações testadas induziu um aumento da frequência de MIN	(Catalán et al., 2015)
C N C	Fonte - Madeira; Diâmetro de 209 ± 136 nm e largura de 54 ± 17 nm / 37 ± 15 nm para CNC em pó ou gel, respetivamente (determinado por AFM)	Citotoxicidade avaliada pelo ensaio do LDH; Genotoxicidade avaliada pelo ensaio do cometa. Exposição de 72h a 30 µg/cm ² em BEAS-2B	-	+	Aumento significativo dos danos no DNA	(Kisin et al., 2020)

Tal como referido anteriormente, uma simples mudança na fonte de celulose pode ser suficiente para alterar as propriedades dos CNM e, conseqüentemente, os seus efeitos nas células. Essa variabilidade pode explicar, em parte, a discrepância e a falta de comparabilidade que existe nos resultados dos estudos toxicológicos. Também a utilização de diferentes linhas celulares podem justificar a incoerência nos resultados, uma vez que diferentes células reagem de forma distinta quando são expostas aos CNM. O crescente aumento da produção de CNM leva ao aumento da exposição humana e ao emergir de uma preocupação acerca dos efeitos que estes podem provocar na saúde humana (Louro et al., 2015). Tendo isto em conta, bem como a discrepância dos resultados obtidos no baixo número de estudos existentes, é evidente a necessidade da realização de mais estudos toxicológicos de modo a garantir e clarificar a segurança da produção e utilização dos CNM.

1.5. Caracterização dos efeitos genotóxicos dos nanomateriais

Uma avaliação completa da genotoxicidade dos NM é requerida pelas agências reguladoras. É recomendado o uso de uma bateria de testes padrão que tem como base a detecção de três tipos de alterações genéticas – mutações genéticas, quebras cromossômicas e perda de cromossomas. Uma vez que um único teste não é suficiente para caracterizar a capacidade de indução destes três eventos genéticos, a *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) propôs um conjunto de testes *in vitro* e *in vivo* (ICH, 2011). As combinações de testes estão sumarizadas na Tabela 1.4.

Tabela 1.4. Opções da bateria de testes adequada para avaliação do potencial genotóxico de novos produtos farmacêuticos. Adaptado de ICH, 2011.

Opção 1	i.	Um teste para mutações génicas em bactérias (por exemplo o teste de Ames).
	ii.	Um teste citogenético para danos cromossómicos (teste de aberração cromossómica em metafase ou teste de micronúcleos <i>in vitro</i>), ou ensaio de mutação do gene <i>Tk</i> em células de linfomas de rato.
	iii.	Um teste <i>in vivo</i> para genotoxicidade, geralmente um teste para danos cromossómicos usando células hematopoiéticas de roedores, ou para micronúcleos ou para aberrações cromossómicas em células em metafase.
Opção 2	i.	Um teste para mutações genéticas em bactérias (por exemplo o teste de Ames)
	ii.	Uma avaliação genotóxica <i>in vivo</i> com dois tecidos diferentes, geralmente um ensaio para micronúcleos usando células hematopoiéticas de roedores e um segundo ensaio <i>in vivo</i> . Tipicamente este seria um ensaio de quebras de DNA no fígado, a menos que justificado de outra forma.

Estes testes foram, no entanto, desenvolvidos para a avaliação de novos produtos farmacêuticos, químicos convencionais e materiais na sua forma não nano. Se se tratam de testes adequados para a avaliação da genotoxicidade de NM foi alvo de debate e investigação, uma vez que na sua maioria se tratam de partículas insolúveis e os modos de ação de muitos NM ainda não são

claros. Após anos de investigação a Organização de Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE) concluiu que não seria necessário desenvolver novos ensaios para a avaliação da genotoxicidade dos NM. É, no entanto, indicada a necessidade de adaptação dos testes às especificidades de cada NM (OCDE, 2012). Mais recentemente, a OCDE publicou um relatório sobre a genotoxicidade de NM onde procura ultrapassar os problemas associados à sua avaliação (OCDE, 2014). Algumas recomendações foram, por exemplo, a não realização do teste de Ames para investigação da genotoxicidade dos NM e a caracterização dos NM em meio de cultura antes e após a sua exposição às células.

1.5.1. Ensaios de citotoxicidade

É geralmente recomendada a realização de ensaios de citotoxicidade, sobretudo a avaliação da proliferação celular, para acompanhar os ensaios de genotoxicidade. Estes são importantes na determinação do intervalo de concentrações a testar nas células, de modo a garantir que os tratamentos são conduzidos a níveis apropriados de citotoxicidade evitando a produção de uma resposta citotóxica extrema (OECD, 2016).

O ensaio do MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio) é um dos ensaios colorimétricos mais utilizados para avaliar a citotoxicidade. Este ensaio baseia-se na atividade das enzimas mitocondriais em reduzir o MTT, pelo NADH, formando cristais de formazan de cor púrpura. A atividade mitocondrial das células viáveis é constante pelo que um aumento ou uma diminuição no número de células viáveis está diretamente relacionado com a atividade mitocondrial e, portanto, com a concentração de cristais de formazan que se formam. Estes cristais são posteriormente solubilizados e podem ser quantificados através da leitura da sua absorvância a um comprimento de onda específico (van Meerloo et al., 2011; Aslantürk, 2018).

Um outro ensaio utilizado para avaliar citotoxicidade é o ensaio clonogénico, que mede a capacidade de uma célula singular se dividir e formar uma colónia, definida por conter pelo menos 50 células. Este trata-se de um ensaio bastante usado e eficaz para testar a capacidade citotóxica de um agente e a capacidade de divisão e proliferação das células (Franken et al., 2006; Chackalamannil et al., 2017).

1.5.2. Ensaios de genotoxicidade

1.5.2.1. Ensaio do micronúcleo

Primeiramente reconhecidos por Howell e Jolly no final do século XIX, os micronúcleos (MN) foram descritos como restos nucleares de eritrócitos. A sua importância foi mais tarde avaliada, Dawson e Bury encontraram MN em eritrócitos na medula óssea em diferentes estados patológicos e associaram a sua formação à deficiência de ácido fólico e vitamina B. Os MN foram posteriormente descritos em linfócitos, num estudo onde a exposição dos linfócitos a radiação demonstrou uma relação linear entre dose de radiação e a indução de micronúcleos. Dados os resultados obtidos, o ensaio dos

micronúcleos foi proposto como um ensaio viável para avaliação de danos cromossômicos (Luzhna et al., 2013).

Tendo em conta a relação entre a indução de MN e a exposição a radiação, os MN podem ser considerados um biomarcador de efeito. Um biomarcador pode-se definir como qualquer substância, estrutura ou processo que pode ser monitorizado em tecidos ou fluidos e que prevê ou influencia o estado de saúde de um indivíduo. Os biomarcadores de efeito providenciam uma confirmação científica de vias de exposição-doença propostas em humanos, uma vez que podem ser vistas como um indicador de uma interação de um sistema biológico com o ambiente. Um grupo importante de biomarcadores de efeito são os biomarcadores de genotoxicidade, que têm sido desenvolvidos *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*. Biomarcadores citogenéticos são os mais utilizados, são os *endpoints* mais frequentes em estudos de biomonitorização humana e são usados para avaliar o impacto ambiental, ocupacional e outros fatores na estabilidade genética. Entre os variados biomarcadores citogenéticos, MN em linfócitos humanos fornecem uma abordagem promissora para avaliar os riscos na saúde humana (Ladeira & Smajdova, 2017).

A presença de agentes genotóxicos no ambiente pode causar, através de diferentes mecanismos, alterações cromossômicas, que poderão estar associadas com a indução de efeitos hereditários ou cancro. As aberrações cromossômicas distinguem-se em duas categorias, aberrações estruturais e aberrações numéricas, relacionadas, respetivamente, com a estrutura dos cromossomas ou com o seu número. As aberrações cromossômicas estruturais são induzidas por agentes mutagénicos físicos ou químicos, principalmente através de danos formados diretamente no DNA, que são observadas em células em metafase, ou alternativamente em células em interfase, através da contagem de MN.

Os MN são originados, principalmente, por fragmentos cromossômicos ou cromossomas inteiros que se atrasaram na anafase e não foram incluídos no núcleo principal durante a mitose, uma vez que não foram corretamente ligados ao fuso mitótico durante o processo de segregação. Estes fragmentos de cromossomas ou cromossomas inteiros são posteriormente rodeados por uma membrana nuclear e são morfológicamente similares aos núcleos, com exceção do seu tamanho inferior (Figura 1.9) (Dhawan & Bajpayee, 2019; Fenech et al., 2010).

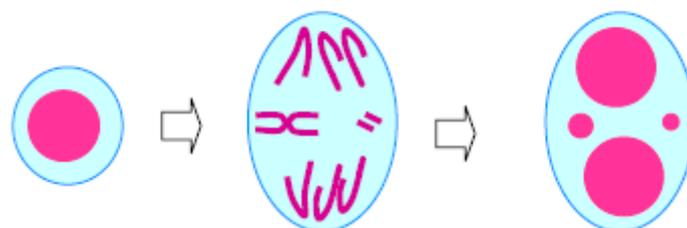


Figura 1.9. Formação de micronúcleos em células em divisão, originados por cromossomas inteiros ou por fragmentos de cromossomas acêntricos. Adaptado de Fenech et al., 2010.

A importância da contagem de MN produzidos tem sido enfatizada por vários citogeneticistas e a técnica tem sido melhorada (Luzhna et al., 2013). Dada a necessidade das células se dividirem para originarem MN, desenvolveu-se a técnica de micronúcleos com bloqueio da citocinese (CBMN, do inglês *Cytokinesis Blocked Micronucleus*) (Dhawan & Bajpayee, 2019). O ensaio de CBMN permite a

contagem de MN em células binucleadas, através do tratamento das células com citocalasina B que inibe a polimerização dos filamentos de actina, impedindo assim a citocinese de ocorrer após a divisão nuclear (Ladeira & Smajdova, 2017; Dhawan & Bajpayee, 2019). É um método que permite avaliar danos no DNA causados por xenobióticos, sejam eles agentes aneugênicos ou clastogênicos. Aneugênicos provocam a segregação incorreta dos cromossomas durante a anafase, enquanto clastogênicos induzem quebras nos cromossomas, dando origem a fragmentos acêntricos (Figura 1.10) (Terradas et al., 2011).

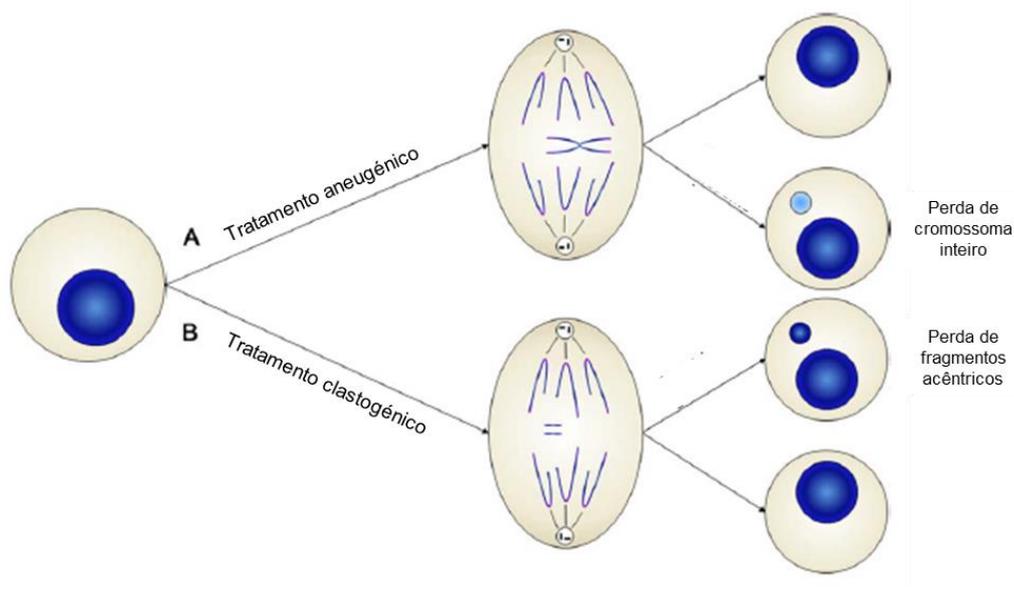


Figura 1.10. Mecanismos de formação de micronúcleos após exposição a A) agentes aneugênicos que provocam a perda de cromossomas completos ou a B) agentes clastogênicos que provocam a quebra de cromossomas e a perda de fragmentos. Adaptado de Terradas et al., 2011.

Para além dos MN, outros *endpoints* que podem ser avaliados são pontes nucleoplasmáticas e vesículas (*buds*) nucleares que são, respetivamente, biomarcadores de reparação incorreta e/ou fusões terminais dos telómeros e biomarcadores de eliminação de DNA amplificado e/ou complexos de reparação do DNA (Ladeira & Smajdova, 2017).

O ensaio de CBMN é usado regularmente como teste de avaliação de genotoxicidade, tratando-se do ensaio de eleição para estudos de biomonitorização humana para detetar efeitos citogenéticos após exposição a agentes genotóxicos. A OECD publicou normas para a sua realização (OECD, 2016) em que o protocolo se baseia na utilização de células humanas ou de roedores tratadas com um xenobiótico. Durante a exposição ao químico em estudo, as células são incubadas durante um período de tempo que permite que lesões cromossômicas levem à formação de micronúcleos. Posteriormente, as células são colhidas, coradas e a presença de MN é analisada. Esta análise deve ser feita apenas em células binucleadas, ou seja, células que completaram a mitose durante o período de exposição ao químico testado. Quando as culturas são tratadas com um agente bloqueador da citocinese, como é o caso da citocalasina B, isto é facilmente observável. É ainda importante demonstrar que ocorreu proliferação celular e avaliar a extensão de citotoxicidade e citostase que ocorreu tanto nos controlos como nas culturas tratadas, conseguido através do cálculo do índice de proliferação de citocinese

bloqueada (CBPI, do inglês *Cytokinesis-Block Proliferation Index*) e do índice de replicação (RI, do inglês *Replication Index*). Ambas as fórmulas serão apresentadas mais à frente (OECD, 2016).

1.5.2.2. Ensaio do cometa

O ensaio do cometa em meio alcalino, ou eletroforese de célula única em gel, é também um ensaio frequentemente utilizado para a avaliação da genotoxicidade de xenobióticos (Louro et al., 2015). Trata-se de uma técnica simples, versátil, sensível e rápida capaz de detectar quebras de cadeia simples ou dupla no DNA. Células em suspensão são misturadas com agarose e colocadas sob a forma de um gel numa lâmina de microscopia. Posteriormente procede-se à lise das células por imersão num tampão que contém um detergente e uma elevada concentração de sal, de forma a remover as membranas e componentes celulares e nucleares solúveis, obtendo-se nucleóides (DNA superenrolado ligado a uma matriz nuclear, formando *loops*). Seguidamente é realizada uma eletroforese, que permite às quebras existentes no DNA migrarem. Após uma coloração fluorescente, a imagem que aparece ao microscópio assemelha-se a um cometa, com a cabeça referente ao DNA intacto, superenrolado, e a cauda representando a quantidade de quebras do DNA que foram capazes de migrar. A intensidade de fluorescência na cauda é proporcional ao número de quebras do DNA (Sierra & Gaivão, 2014).

Nos últimos anos a técnica tem sido adaptada de forma a detectar diferentes tipos de danos no DNA, como quebras de cadeia simples e dupla, locais lábeis alcalinos, danos oxidativos, ligações cruzadas e aductos de DNA (Dhawan & Bajpayee, 2019). Primeiramente descrito por Ostling e Johanson (Ostling & Johanson, 1984), os passos de lise e eletroforese foram realizados sob condições neutras. Neste procedimento apenas as quebras de cadeia dupla eram possíveis de analisar. O ensaio foi mais tarde modificado por Singh (Singh et al., 1988) que realizou a eletroforese em condições alcalinas (pH > 13), condições estas que permitiram o relaxamento e o desenrolar do DNA superenrolado, que tornou possível a deteção de quebras de DNA em cadeias simples e locais lábeis alcalinos. Esta modificação do ensaio permitiu aumentar a sua sensibilidade (Piperakis, 2009). Desde aí, várias modificações no ensaio têm sido descritas. Uma das mais importantes foi a inclusão de enzimas para detectar lesões específicas no DNA. Collins (Collins et al., 1993) foi o primeiro a utilizar enzimas em combinação com o ensaio do cometa, aumentando deste modo a sua sensibilidade. O protocolo desenvolvido incluía a incubação das células lisadas com a endonuclease III, uma enzima que remove pirimidinas oxidadas e produz no local uma quebra na cadeia de DNA. Dadas as condições alcalinas, estas quebras são também detetadas no ensaio do cometa. Desde aí, várias enzimas têm sido utilizadas em combinação com o ensaio, nomeadamente a formamidopirimidina DNA glicosilase (FPG) que deteta bases púricas oxidadas, principalmente a 7,8-dihidroguanina-8-oxoguanina (8-oxoGuanina), e formamidopirimidinas que resultam da quebra de purinas alquiladas ou oxidadas (Figura 1.11) (Sierra & Gaivão, 2014).

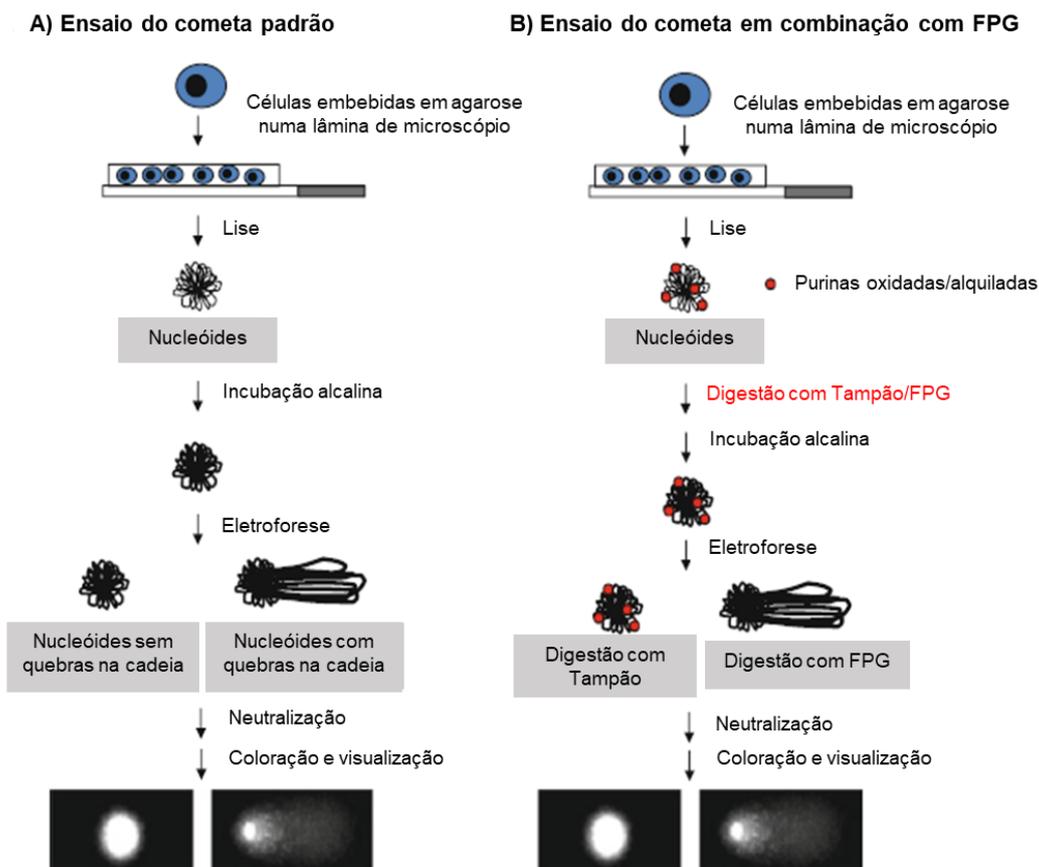


Figura 1.11. Esquema do A) ensaio do cometa padrão e B) ensaio do cometa em combinação com FPG. Adaptado de Sierra & Gaivão, 2014.

A técnica é já bastante usada em vários estudos para medir as quebras na cadeia de DNA. Algumas das aplicações são estudos humanos, monitorização ecológica, estimativa da reparação do DNA e a avaliação de genotoxicidade de novos cosméticos, fármacos e químicos (Piperakis, 2009; Sierra & Gaivão, 2014). Apesar de não estar incluído na bateria de testes de avaliação da genotoxicidade, o programa da União Europeia REACH (do inglês *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of the Chemical Substances*) tem recomendado a realização deste ensaio. Mais recentemente, a ICH incluiu o ensaio do cometa *in vivo* como uma das estratégias da avaliação da genotoxicidade de fármacos e a OCDE publicou orientações para a realização do ensaio do cometa *in vivo* (Sierra & Gaivão, 2014).

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo contribuir para a avaliação da segurança de vários tipos de nanoceluloses, através da caracterização de potenciais efeitos citotóxicos e genotóxicos induzidos em duas linhas celulares de mamífero representativas do pulmão.

Especificamente, neste trabalho:

Avaliou-se a cito- e genotoxicidade, *in vitro*, de microfibrilas de celulose e nanocristais de celulose, por ensaios já padronizados e aceites para a avaliação de efeitos causados por diferentes tipos de nanomateriais, o ensaio do MTT, o ensaio clonogénico, o ensaio do cometa e o ensaio do micronúcleo com bloqueio da citocinese, em células tumorais do epitélio alveolar humano (A549) e fibroblastos pulmonares de hamster chinês (V79).

3. MÉTODOS

3.1. Cultura celular

Foram utilizadas duas linhas celulares neste estudo, a linha A549 (ATCC® CCL-185™) e a linha V79 (ATCC® CCL-93™) (Figura 3.1). Escolheram-se duas linhas celulares representativas do trato respiratório dada a relevância da via inalatória no contexto da exposição humana a CNM. As células A549 derivam de uma cultura de explante de tecido de carcinoma pulmonar de um homem caucasiano de 58 anos e têm um tempo de duplicação de aproximadamente 22h (<https://www.atcc.org/products/ccl-185>, consultado 09/02/2022). As células V79 foram isoladas de tecido pulmonar de um hamster chinês macho, e apresentam um tempo de duplicação entre 12-14h (<https://www.atcc.org/products/ccl-93>, consultado 09/02/2022).

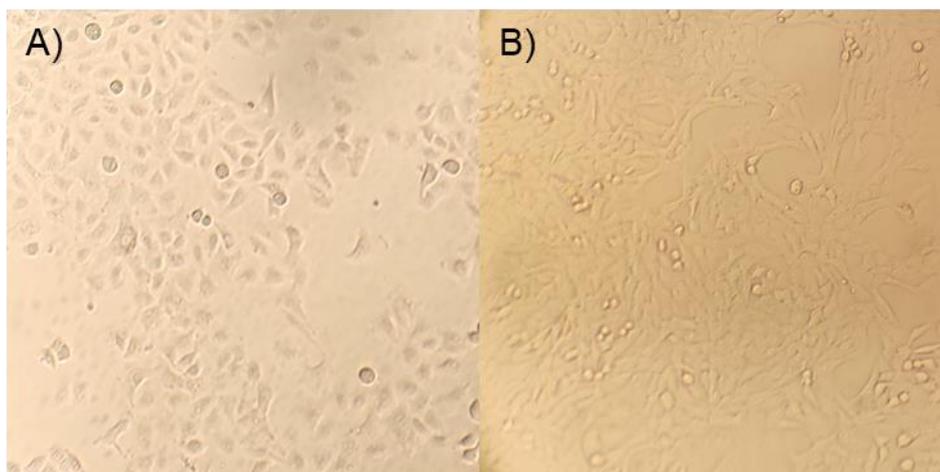


Figura 3.1. Células utilizadas durante este trabalho observadas por microscopia ótica. A) Células A549 em meio RPMI e B) Células V79 em meio DMEM (ampliação 125x).

As células A549 cresceram em meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI) com GlutaMAX, suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado (FBSi), 1% de penicilina/estreptomicina (1000 U/mL e 10 mg/mL) e 1% de fungizona (0,25 mg/mL). A cultura das células V79 foi realizada em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com glucose (4500 mg/L), 10% de soro bovino fetal (FBS), 2,5% de tampão HEPES e 1% de fungizona. Ambas as linhas celulares foram mantidas a 37°C e 5% CO₂.

A subcultura das células e plaqueamento para ensaios efetuou-se quando estas estavam na fase exponencial de crescimento, ou seja, quando atingiam cerca de 70-80% de confluência. Para tal retirou-se o meio de cultura, lavou-se brevemente as células com tripsina-EDTA (0,05%) e, seguidamente, incubou-se com 2 mL desta solução por 4 minutos, a 37°C. A tripsina foi então inativada, as células ressuspendidas e diluídas em novo meio de cultura.

Todos os reagentes utilizados foram fornecidos pela Gibco™, ThermoFisher Scientific.

3.2. Nanocelulose – produção, caracterização e exposição

As amostras de CNM testadas no presente trabalho foram produzidas e caracterizadas na Faculdade de Ciências e Tecnologia (FCT) da Universidade de Coimbra, em colaboração com o Centro de Investigação RAIZ (CMF, gentilmente cedidas pelo Professor Paulo Ferreira) ou na FCT da Universidade Nova de Lisboa (CNC, gentilmente cedidas pelas Professoras Helena Godinho e Susete Fernandes). Todos os CNM foram produzidos a partir da polpa branqueada de *Eucalyptus globulus*. No caso da nanocelulose fibrilada, efetuou-se um pré-tratamento de forma a fibrilar a polpa, que consistiu numa hidrólise enzimática com uma enzima comercial (Serzym; Sertec 20), resultando, principalmente, na produção de microfibrilas de celulose (CMF, do inglês *celulose microfibrils*). Seguiu-se um tratamento mecânico num homogeneizador de alta pressão (GEA Niro SoaviModelPanther NS3006L), segundo procedimentos já descritos (Lourenço et al., 2017; Saito & Isogai, 2007; Tarrés et al., 2016). A CNC foi obtida pela hidrólise ácida da polpa com ácido sulfúrico (62% wt.), destruindo as regiões amorfas da celulose e deixando as cristalinas intactas, numa razão de ácido/sólido de 8:1, a partir de uma adaptação do método já descrito (Chen et al., 2015). Resumidamente, o processo ocorreu a 55°C, sob agitação mecânica, sendo adicionada água ultrapura aos 75 minutos da reação. Subsequentemente, efetuaram-se vários ciclos de centrifugação até a CNC ser liberta no sobrenadante. Seguidamente, a CNC em suspensão foi dialisada contra água ultrapura até se chegar a um pH constante. Finalmente, a CNC na sua forma acídica (pH 3,3 em suspensão) foi seca por um processo de liofilização (-45°C, a 0,3 mbar, VaCO 2, Zirbus).

A celulose fibrilada foi caracterizada relativamente ao rendimento de fibrilação, quantidade de grupos carboxilo (COOH), grau de substituição, grau de polimerização, viscosidade e tamanho. O rendimento foi determinado em percentagem, no sobrenadante de uma suspensão de 0,2% wt de nanocelulose, após centrifugação a 9000 r/min durante 30 minutos (Hettich Universal 32). A concentração de grupos COOH foi determinada por uma titulação condutimétrica, de acordo com a metodologia já descrita (Lourenço et al., 2017). O grau de polimerização foi calculado a partir da equação de Mark-Houwink e a viscosidade a partir da metodologia cupri-etilenodiamina. A estrutura das fibras foi avaliada por microscopia óptica de luz polarizada, usando um microscópio Olympus BH-2 KPA (Olympus Optical Co., Ltd) equipado com uma câmara CCD de alta resolução (Olympus ColorView III), por emissão de campo – microscopia eletrónica de varrimento (FE-SEM, do inglês *field emission – scanning electron microscopy*) utilizando um microscópio Carl Zeiss Merlin com uma coluna Gemini II em filmes de 20 g/m² preparados por secagem ao ar de uma suspensão de celulose 0,2% (w/v), e por microscopia eletrónica de transmissão (TEM, do inglês *transmission electron microscopy*) usando uma câmara FEI - Velleta. Foi ainda avaliado o potencial zeta da solução stock de celulose,

determinado por espalhamento dinâmico de luz (DLS, do inglês *dynamic light scattering*) utilizando um equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments), com um laser a 532 nm e um ângulo de dispersão de 173°. Relativamente à CNC, esta foi analisada por TEM e DLS, como anteriormente descrito para aCMF, e por microscopia de força atômica (AFM, do inglês *atomic force microscopy*), cujas imagens foram adquiridas (sistema autónomo Asylum Research MFD-3D em modo de contacto intermitente, com sondas de silicone, a uma frequência de 300 kHz e $k=26$ N/m) e usadas para medir o comprimento, de acordo com Saraiva et al., 2020, e a largura, como descrito em Honorato-Rios et al., 2018, utilizando o *software* Gwyddion (versão 2.52).

Para a exposição das células, preparou-se uma solução stock a 1500 µg/mL em tampão fosfato salino (PBS, Gibco), a partir da qual foram preparadas as seis diluições em meio de cultura: 7,2; 14,4; 28,8; 59,4; 120 e 240 µg/mL (respetivamente 1,5; 3; 6; 12,5; 25 e 50 µg/cm²).

3.3. Ensaio do MTT

Para este ensaio, a linha celular V79 foi plaqueada a uma densidade de $0,5 \times 10^4$ células/poço em placas de 96 poços, e incubada por 24h, a 37°C e 5% CO₂. As células foram seguidamente expostas às concentrações acima referidas dos CNM e incubadas por 17h a 37°C e 5% CO₂. Às 16h de exposição foi adicionado SDS 0,1% (Sigma-Aldrich) aos poços do controlo positivo. Ao final das 17h de tratamento lavaram-se as placas com PBS e foi adicionado um volume de 100 µL de MTT (0,5 mg/mL, Calbiochem) a cada poço, incubando-se as placas por mais 3h nas mesmas condições. Após esse tempo, adicionaram-se 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) sob agitação durante 30 minutos. Ao fim deste tempo leu-se a absorvância das amostras num leitor de microplacas (Multiscan Ascent spectrophotometer, Labsystems) a 570 nm (filtro de referência a 690 nm). A citotoxicidade foi avaliada a partir da média de três experiências independentes.

3.4. Ensaio clonogénico

Este ensaio foi efetuado para as duas linhas celulares, usando protocolos adaptados ao seu tempo de duplicação em cultura.

Para as células V79, efetuou-se o seu plaqueamento em placas de 6 poços, a uma densidade de 50 células/poço. As células foram incubadas durante 7h a 37°C e 5% CO₂ e posteriormente expostas às concentrações já referidas dos CNM ou a mitomicina C (MMC, Sigma-Aldrich) a uma concentração de 0,2 µg/mL (controlo positivo). Após 17h nas mesmas condições, retirou-se o meio de cultura, lavaram-se as células com PBS, adicionou-se novo meio de cultura e incubou-se por 4 dias, para permitir a formação de colónias. Ao final dos 4 dias, lavaram-se os poços com PBS e as células foram fixadas com metanol (a - 20°C, Merck) durante 10 minutos. Depois de secas, procedeu-se à sua coloração com Giemsa 10% (Merck), preparado em tampão Gurr (Gibco), por 10 minutos. As placas foram lavadas no mesmo tampão e foram colocadas a secar.

Relativamente às células A549 foi seguida a metodologia já reportada em (Louro et al., 2019). Resumidamente, plaquearam-se as células a uma densidade de 150 células/poço e incubou-se a placa

overnight, a 37°C e 5% CO₂. Foi feita a exposição aos CNM e à MMC (0,05 µg/mL) e a placa foi incubada por 8 dias. Os passos de fixação e coloração são iguais ao já referido para as células V79.

As colónias formadas foram contadas e calculou-se a eficiência de plaqueamento (PE, do inglês *plating efficiency*) e a fração de células sobreviventes (SF, do inglês *surviving fraction*), que demonstram, respetivamente, a relação entre o número de colónias formadas e de células plaqueadas no controlo negativo (não exposto) e a relação entre o número de colónias formadas nas culturas expostas em relação ao controlo negativo. As equações de ambas estão apresentadas abaixo (Franken et al., 2006).

$$PE = \frac{\text{n}^\circ \text{ colónias formadas no controlo negativo}}{\text{n}^\circ \text{ células plaqueadas no controlo negativo}} \times 100\% \quad \text{Equação 3.1}$$

$$SF = \frac{\text{n}^\circ \text{ colónias formadas após tratamento}}{\text{n}^\circ \text{ células plaqueadas} \times PE/100} \quad \text{Equação 3.2}$$

3.5. Ensaio do micronúcleo com bloqueio da citocinese

Este ensaio foi efetuado como descrito em (OECD, 2016). As células V79 foram plaqueadas em frascos de cultura de 25 cm² a uma densidade de 3x10⁵ células/frasco, foram incubadas por 24h a 37°C e 5% CO₂, e depois expostas aos CNM nas concentrações já referidas ou a MMC (controlo positivo, 0,2 µg/mL, Sigma-Aldrich) e incubadas por mais 17h, o tempo necessário para se garantir um ciclo celular. Após as 17h, removeu-se o meio dos frascos, lavaram-se as células com PBS, adicionou-se 5 mL de meio de cultura e 7,5 µL de citocalasina B (concentração final de 3 µg/mL, Sigma-Aldrich) para inibir a citocinese e incubou-se novamente por mais 24h. Após remover o meio, as células foram lavadas, tripsinizadas e centrifugadas a 1200 rpm (Megafuge 1.0, Heraeus) por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se o *pellet* e adicionou-se 5 mL de KCl 0,4% (Merck) a cada tubo, gota a gota, ficando a incubar a 37°C por 6 minutos para o choque hipotónico. As células foram centrifugadas nas condições já referidas e posteriormente fixadas com uma mistura de 19:1 de metanol:ácido acético (ambos Merck), previamente arrefecida a – 20°C. Pipetaram-se 3 gotas da suspensão celular em cada lâmina e deixou-se a secar, à temperatura ambiente. Após secarem, as lâminas foram hidratadas com tampão Gurr por 5 minutos. Seguidamente, foram imersas 10 minutos em Giemsa 4%, preparado em tampão Gurr, e foram posteriormente lavadas no mesmo tampão. Quando secas, montaram-se as lâminas com meio de montagem Entellan (Merck).

As lâminas foram analisadas num microscópio ótico (ampliação 1000x, Axio Imager.A2, Carl Zeiss Microscopy) e contaram-se 1000 células binucleadas por cultura (réplica), 2000 por tratamento, para a análise da presença de MN, pontes nucleoplasmáticas e vesículas (*buds*) nucleares.

Para estes, também a citostase foi avaliada, ou seja, a inibição da multiplicação celular, através do cálculo do CBPI e do RI. As equações de ambos estão representadas abaixo (OECD, 2016):

$$CBPI = \frac{(\text{n}^\circ \text{ células mononucleadas}) + (2 \times \text{n}^\circ \text{ células binucleadas}) + (3 \times \text{n}^\circ \text{ células multinucleadas})}{\text{n}^\circ \text{ total de células}} \quad \text{Equação 3.3}$$

$$RI = \frac{\left(\frac{(n^\circ \text{ células binucleadas}) + (2 \times n^\circ \text{ células multinucleadas})}{n^\circ \text{ total células tratadas}} \right)}{\left(\frac{(n^\circ \text{ células binucleadas}) + (2 \times n^\circ \text{ células multinucleadas})}{n^\circ \text{ total células controlo}} \right)} \times 100 \quad \text{Equação 3.4}$$

Uma vez com estes valores calculados, a citostase é calculada pelas seguintes equações:

$$\% \text{Citostase} = 100 - 100 \frac{CBPI_T - 1}{CBPI_C - 1} \times 100 \quad \text{Equação 3.5}$$

CBPI_T – CBPI do tratamento; CBPI_C – CBPI do controlo negativo

$$\% \text{Citostase} = 100 - RI \quad \text{Equação 3.6}$$

Existem uma série de critérios a considerar na contagem das células, MN e pontes nucleoplasmáticas. Relativamente às características das células: 1) estas têm de ser binucleadas; 2) os dois núcleos devem ter as membranas nucleares intactas e estar situados dentro do mesmo limite citoplasmático; 3) Os dois núcleos devem ser aproximadamente iguais em tamanho, padrão e intensidade de coloração; 4) Os dois núcleos podem estar ligados por pontes nucleoplasmáticas, mas estas não podem ter largura superior a 1/4 do diâmetro do núcleo mais largo; 5) os núcleos podem estar em contacto, mas idealmente não se devem sobrepor. Células com núcleos sobrepostos podem, no entanto, ser contadas, se os limites de ambos os núcleos forem distinguíveis e 6) a membrana citoplasmática deve estar intacta e ser distinguível das membranas de células adjacentes. Relativamente às características dos MN: 1) estes devem apresentar um diâmetro entre 1/16 e 1/3 em comparação com o tamanho dos núcleos principais; 2) devem apresentar uma forma redonda ou oval; 3) devem ser não-refratários; 4) não estarem ligados ou conectados aos núcleos principais; 5) podem tocar mas não sobrepor os núcleos principais e os seus limites devem ser distinguíveis; 6) normalmente apresentam a mesma intensidade de coloração dos núcleos principais, mas podem ocasionalmente ser mais intensos. Quanto às pontes nucleoplasmáticas: 1) têm de ser uma ligação contínua entre os núcleos de uma célula binucleada; 2) a sua largura geralmente não excede 1/4 do diâmetro dos núcleos; 3) devem ter as mesmas características de coloração dos núcleos principais; 4) Em raras ocasiões podem ser encontradas mais do que uma ponte nucleoplasmática numa célula binucleada; 5) uma célula com pontes nucleoplasmáticas pode, ou não, conter MN. (Fenech et al., 2003).

3.6. Ensaio do cometa

Este ensaio foi realizado como anteriormente reportado por (Louro et al., 2016). Resumidamente, as células A549 foram plaqueadas a uma densidade de $0,3 \times 10^5$ células/mL, incubadas durante 24h a 37°C e 5% CO₂ e expostas às concentrações dos CNM já referidas por 3h, e incubadas nas mesmas condições. Às 2h de exposição, adicionou-se o controlo positivo, etil metanossulfonato (EMS, 5 mM, Sigma-Aldrich). Ao fim das 3h de exposição, as células foram lavadas, tripsinizadas e centrifugadas a 1200 rpm, por 10 minutos, a 4°C (Centrifuge 5415R, Eppendorf). Retirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em agarose de baixo ponto de fusão a 0,8% (Sigma)

previamente aquecida a 37°C. Rapidamente, de forma a evitar a solidificação da agarose, dividiu-se a agarose com as células por 2 lâminas (previamente revestidas com agarose 1%, GE Healthcare). Cobriu-se cada gel com uma lamela e guardaram-se as lâminas a 4°C, por 10 minutos, para permitir a solidificação total dos géis. Após esse tempo, removeram-se as lamelas e as lâminas foram imersas numa solução de lise (NaCl 2,5 M (Sigma-Aldrich), Na₂EDTA.2H₂O 100 mM (Calbiochem), Tris-HCl 10 mM (Invitrogen); pH 10; 1% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) e 10% de DMSO) e incubadas *overnight* a 4°C. No dia seguinte retiraram-se as lâminas da solução de lise e lavaram-se 2 vezes em tampão F durante 10 minutos (HEPES 40 mM (Sigma-Aldrich), KCl 100 mM, EDTA ácido 0,5 mM (Sigma-Aldrich) e 0,2 mg/mL de BSA (Sigma-Aldrich); pH 8). Os nucleoides incorporados na agarose, resultantes da lise das células, foram então tratados com FPG (8 U/mL, New England BioLabs Inc.) diluída em tampão F ou apenas com tampão F (50 µL/lâmina) e incubaram-se as lâminas por 30 minutos a 37°C. As lâminas foram seguidamente imersas em tampão de eletroforese (NaOH 0,3 M, Na₂EDTA.2H₂O 1 mM; pH 13) por 30 minutos, de forma a permitir o desenrolar do DNA, seguindo-se então a eletroforese, por 25 minutos a 28 V e 300 mA (PowerPac Basic™, BioRad). Seguiu-se um passo de neutralização, com a imersão das lâminas em PBS, 10 minutos, e seguidamente em água destilada, também 10 minutos (Figura 3.2).

Após estarem secas, efetuou-se a sua coloração com brometo de etídio (0,125 µg/µL, Sigma-Aldrich) e procedeu-se à análise das lâminas, contando 100 nucleoides por cultura, tanto para culturas não tratadas com FPG, como para culturas tratadas com esta enzima. Esta análise foi efetuada num microscópio ótico (ampliação 100x, Leica DM2500) equipado com uma lâmpada fluorescente (X-Cite 120PC Q, Excelitas Technologies) e ligado a um *software* de contagem (Comet Assay IV, Instem) que avalia vários parâmetros dos nucleoides, entre os quais a percentagem de DNA na cauda, indicativo da quantidade de quebras no DNA.

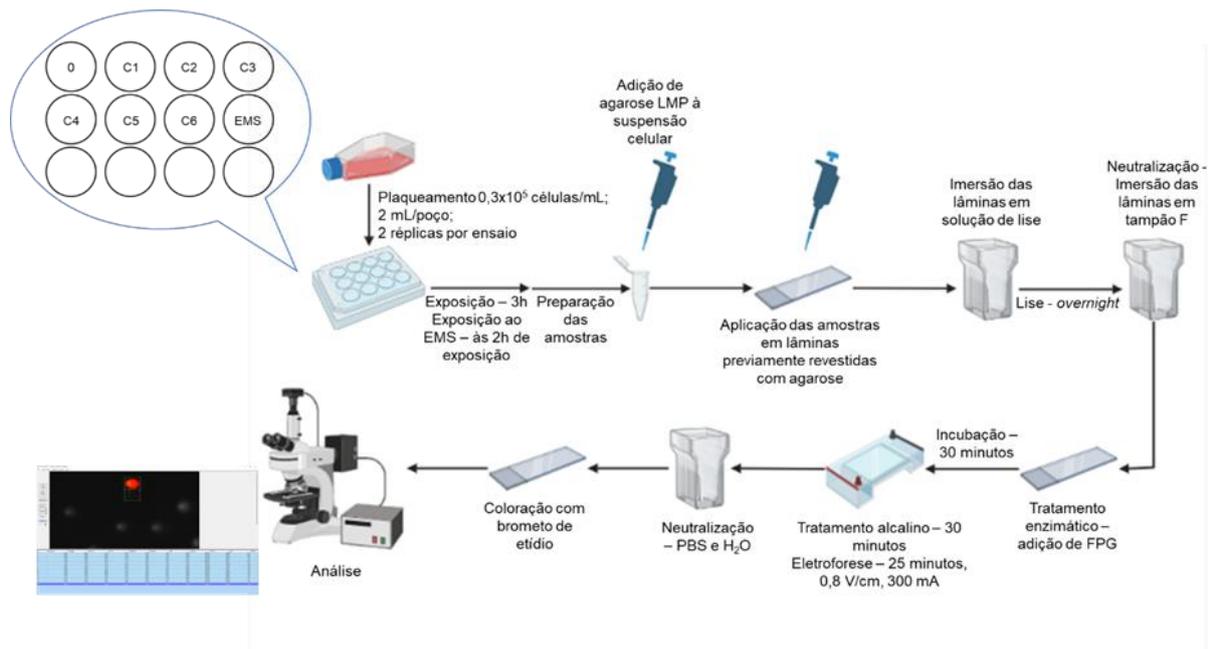


Figura 3.2 Esquema representativo do procedimento do ensaio do cometa.

3.7. Análise estatística

Toda a análise estatística foi feita no *software* IBM® SPSS® Statistics v.28.

No ensaio de CBMN foi utilizado o teste exato de Fisher para comparar a frequência de células binucleadas com MN entre as culturas tratadas e não tratadas. No caso da comparação do CBPI e do RI, foi feito um teste t de *Student*.

Para os restantes ensaios (MTT, clonogénico e cometa) primeiramente foi verificado se os resultados seguiam uma distribuição normal. Dado existir uma distribuição normal, a análise estatística foi feita com o teste One-Way ANOVA, seguida de testes Post-Hoc, neste caso, o teste Tukey, de modo a comparar todas as concentrações testadas com o controlo negativo. Adicionalmente, no ensaio do cometa, procedeu-se à comparação entre os valores sem e com FPG, através de um teste t de *Student*, de forma a avaliar os danos oxidativos.

Os *outliers* identificados pelo mesmo software foram excluídos de todas as análises estatísticas.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização dos nanomateriais de celulose

As características físico-químicas primárias e secundárias (em meio de cultura das células completo) dos CNM foram avaliadas, nomeadamente a percentagem de fibrilação (a proporção de fibras que se encontra na forma nano), quantidade de grupos carboxilo (C_{COOH}) ligados à cadeia de celulose, o grau de polimerização (DP), a viscosidade intrínseca (η), o diâmetro dos NM (estimados por TEM) e o potencial zeta (estimado por DLS) são apresentadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Propriedades físico-químicas dos nanomateriais de celulose testados.

Nanomaterial de celulose	Fibrilação (%)	C_{COOH} ($\mu\text{mol/g}$)	DP	η (mL/g)	Diâmetro (nm)		Potencial zeta (mV)	
					PBS	Meio RPMI	PBS	Meio RPMI
CMF-Enzimática	4,9	143	1591	618	29,7 \pm 7,3	85,2 \pm 41,2	-11,6 \pm 1,0	-9,4 \pm 0,6
CNC	n/a	n/a	n/a	n/a	19,7 \pm 6,1	36,0 \pm 9,0	-17,3 \pm 0,8	-13,9 \pm 0,3

n/a significa que estas características não são aplicáveis ao tipo de nanomaterial.

C_{COOH} – quantidade de grupos carboxilo; DP – grau de polimerização; η – viscosidade intrínseca.

Na Figura 4.1 estão representadas as imagens das CMF obtidas através de microscopia ótica. É possível observar uma grande distribuição de tamanhos, com várias fibras a apresentarem diâmetros perto de 1 μm , demonstrando-se o seu carácter maioritariamente microfibrilado.



Figura 4.1 Imagens de microscopia ótica de microfibrilas de celulose obtidas após o pré-tratamento enzimático, a diferentes ampliações (imagens cedidas por Universidade de Coimbra).

Para além do diâmetro dos CNM, a estrutura destes materiais foi também avaliada por TEM. Estas imagens estão apresentadas na Figura 4.2, onde é possível observar diferenças na estrutura de ambos. Enquanto nos CNC é observável a sua estrutura de bastonete alongado, na amostra de CMF observa-se alguma agregação.

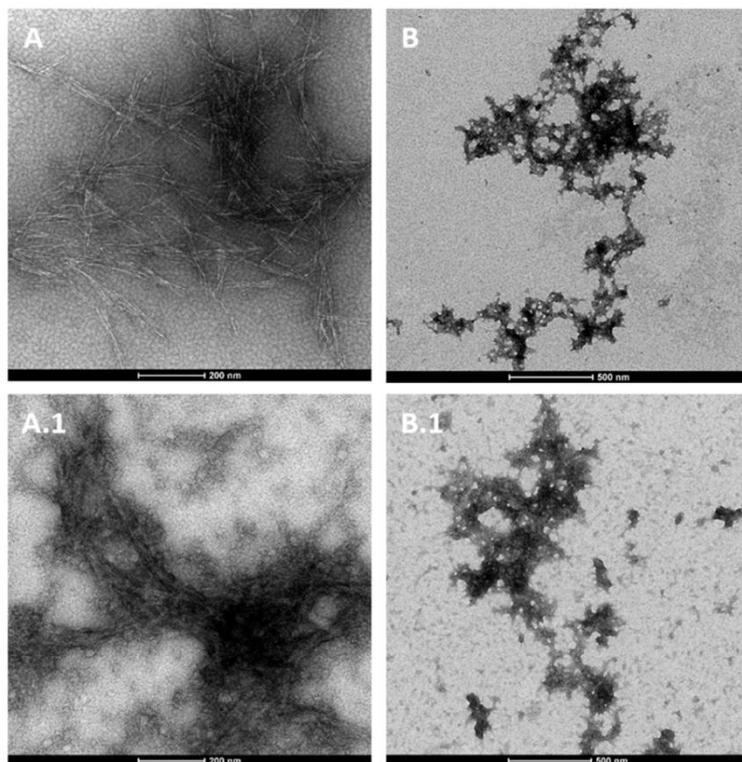


Figura 4.2. Imagens de TEM de nanocristais de celulose e microfibrilas de celulose, respetivamente A e B, diluídas em PBS. Em A.1 e B.1 esta diluição foi feita em meio RPMI (imagens cedidas por Fátima Pinto).

4.2. Avaliação da citotoxicidade

Foram realizados dois ensaios para a avaliação da possível citotoxicidade dos CNM em estudo. A citotoxicidade dos CNC foi analisada apenas em células A549, através do ensaio clonogénico, enquanto a citotoxicidade de CMF foi caracterizada em ambas as linhas celulares, também através do ensaio clonogénico (A549 e V79) e, ainda, pelo ensaio do MTT (apenas V79). Adicionalmente, os valores de CBPI e RI calculados a partir do ensaio do ensaio de CBMN, realizado em V79, dão também informações acerca da citotoxicidade, pelo que também serão apresentados neste subcapítulo.

Relativamente aos CNC, foi feita a sua exposição, durante 8 dias, na linha celular A549. Na Figura 4.3 estão representados os resultados obtidos.

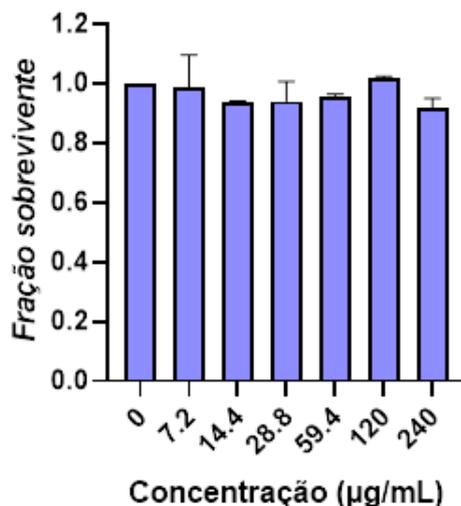


Figura 4.3. Resultados do ensaio clonogénico em células A549 expostas a nanocristais de celulose. Resultados apresentados como média+DP de 2 experiências, cada uma com 6 réplicas.

Através da análise do gráfico é possível observar que nenhuma das concentrações testadas de CNC induziu uma diminuição significativa do número de colónias formadas ao final de 8 dias de exposição, em relação ao controlo negativo. Relativamente à exposição ao controlo positivo, MMC, não se observou crescimento de colónias, ou seja, tratou-se de um tratamento letal para as células. Os valores da fração sobrevivente estão apresentados na Tabela I.1 (Anexo I).

O mesmo padrão foi observado para a mesma linha celular, desta vez exposta a CMF (Figura 4.4). Os valores da fração sobrevivente estão apresentados na Tabela I.2 (Anexo I).

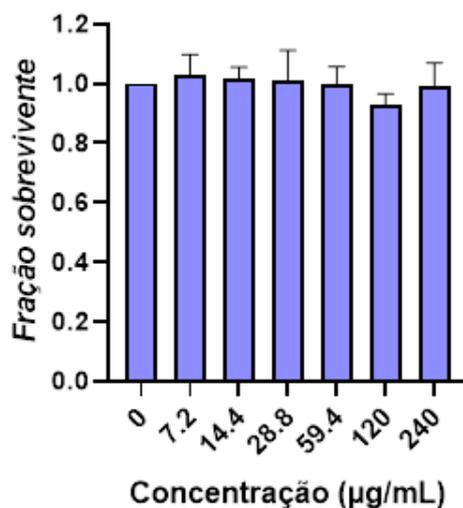


Figura 4.4. Resultados do ensaio clonogénico em células A549 expostas a microfibrilas de celulose. Resultados apresentados como média+DP de 3 experiências, cada uma com 6 réplicas.

Ainda relativamente a CMF mas em células V79 avaliou-se a viabilidade celular, através do ensaio do MTT. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 4.5.

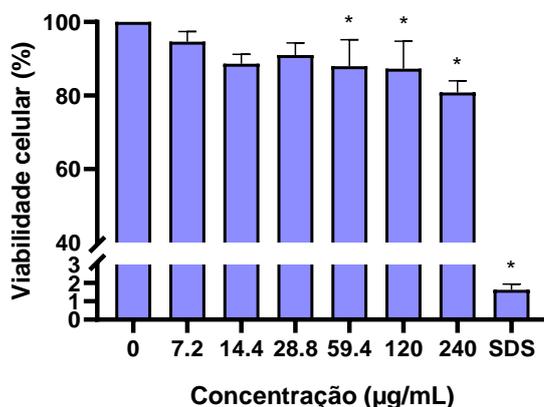


Figura 4.5. Resultados do ensaio MTT em células V79 expostas a microfibrilas de celulose. Resultados apresentados como média+DP da viabilidade celular relativa ao controlo, de 3 experiências, cada uma com 6 réplicas. * $p < 0,05$.

As três concentrações mais altas testadas provocaram uma diminuição significativa da viabilidade celular, relativamente ao controlo negativo (ANOVA $p = 0,033$, $p = 0,020$ e $p < 0,001$, respetivamente para as concentrações 59,4, 120 e 240 µg/mL). Também o controlo positivo, SDS 0,1%, provocou uma diminuição estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo (ANOVA, $p < 0,001$). Os valores da viabilidade celular estão apresentados na Tabela I.3 (Anexo I).

Os resultados da exposição das células V79 a CMF durante 4 dias, para o ensaio clonogénico, estão apresentados na Figura 4.6.

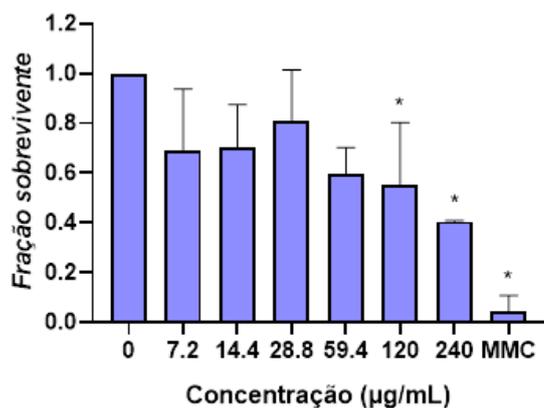


Figura 4.6. Resultados do ensaio clonogénico em células V79 expostas a microfibrilas de celulose. Resultados apresentados como média+DP de 2 experiências, cada uma com 3 réplicas. * $p < 0,05$.

Como podemos observar, a exposição destas células a CMF provocou uma diminuição do número de colónias estatisticamente significativa, relativamente ao controlo negativo, nas duas concentrações mais elevadas testadas (ANOVA, $p = 0,029$ e $p = 0,001$, respetivamente para as concentrações 120 e 240 µg/mL). Também a exposição a MMC provocou esta diminuição (ANOVA, $p < 0,001$). Os valores da fração sobrevivente estão apresentados na Tabela I.4 (Anexo I)

Relativamente à inibição do crescimento celular e multiplicação, avaliado no ensaio de CBMN através do cálculo do CBPI e RI para as células V79 expostas a CMF, não se verificou qualquer variação estatisticamente significativa (Figura 4.7). Ambos os valores de CBPI e RI calculados levaram à mesma percentagem de citostase, quando comparado com o controlo negativo. Os valores da citostase estão apresentados na Tabela I.5 (Anexo I).

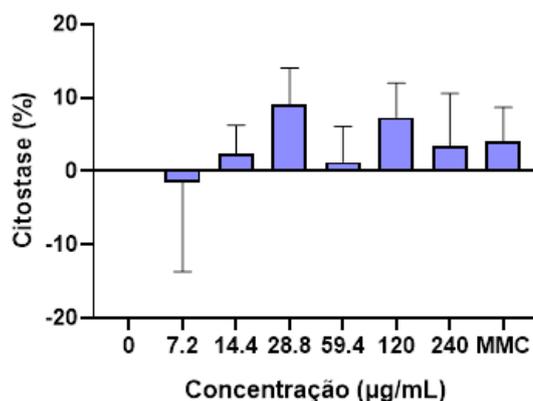


Figura 4.7. Resultados da citostase, calculada a partir do ensaio de CMBN, em células V79 expostas a microfibrilas de celulose. Resultados apresentados como média+DP de 1 experiência, com 2 réplicas.

4.3. Avaliação da genotoxicidade

Avaliou-se a genotoxicidade destes CNM, utilizando os ensaios cometa e CBMN, usando as mesmas duas linhas celulares. A genotoxicidade da CNC foi analisada através do ensaio do cometa em células A549, enquanto que a genotoxicidade da CMF foi caracterizada através do mesmo ensaio também na linha celular A549 e, ainda, através do ensaio de CBMN na linha V79.

Relativamente ao ensaio do cometa e tal como é possível observar nas Figura 4.8 e 4.9, nenhuma das concentrações testadas de nenhum dos CNM provocou um aumento estatisticamente significativo da percentagem de DNA na cauda, quando comparado com o controlo negativo. Apenas a exposição ao controlo positivo, EMS, provocou um aumento significativo da percentagem de DNA na cauda (ANOVA, $p < 0,001$) não só para ambos os NM estudados, mas também nas diferentes condições, com e sem a incubação com FPG. Os valores de DNA na cauda estão apresentados na Tabela II.1 e II.2 (Anexo II).

Relativamente a danos oxidativos provocados no DNA, determinados através da adição da FPG, estes verificaram-se após a exposição a ambos os CNM. Os CNC, provocaram danos oxidativos estatisticamente significativos, na concentração mais baixa testada e em três concentrações intermédias (teste t de *Student*, 7,2 ($p = 0,002$), 28,8 ($p = 0,028$), 59,4 ($p = 0,004$) e 120 µg/mL ($p = 0,015$)) (Figura 4.8). Relativamente às CMF, todas as concentrações testadas com exceção da 28,8 e 240 µg/mL provocaram danos oxidativos significativos (teste t de *Student*, $p = 0,010$, $p = 0,005$, $p < 0,001$ e $p = 0,012$, respetivamente para as concentrações de 7,2, 14,4, 59,4 e 120 µg/mL) (Figura 4.9). No entanto, a comparação de cada concentração quer da CNC como da CNF em relação ao controlo

negativo não foi significativa. De notar que, também no controlo negativo, no caso da CMF, existem danos oxidativos significativos (teste t de Student, $p = 0,038$).

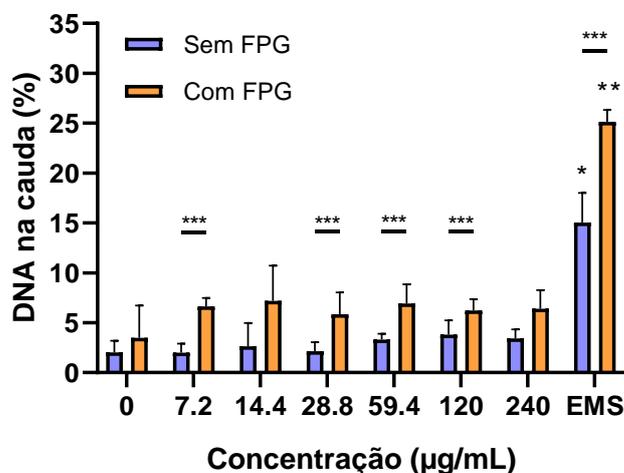


Figura 4.8. Resultados do ensaio do cometa em células A549 expostas a nanocristais de celulose. Resultados apresentados como média+DP de 3 experiências, cada uma com 2 réplicas. $*p < 0,05$ em relação ao controlo negativo sem FPG. $**p < 0,05$ em relação ao controlo negativo com FPG. $***p < 0,05$ para comparação entre amostra com e sem FPG.

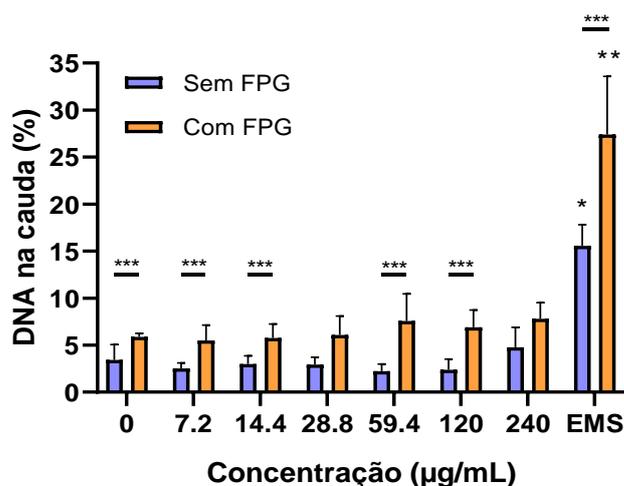


Figura 4.9. Resultados do ensaio do cometa em células A549 expostas a microfibrilas de celulose. Resultados apresentados como média+DP de 3 experiências, cada uma com 2 réplicas. $*p < 0,05$ em relação ao controlo negativo sem FPG. $**p < 0,05$ em relação ao controlo negativo com FPG. $***p < 0,05$ para comparação entre amostra com e sem FPG.

Quanto ao ensaio do CBMN, também nenhuma das concentrações testadas foi capaz de induzir um aumento significativo da frequência de MN nas células V79, após exposição a CMF (Figura 4.10). A exposição a MMC provocou um aumento estatisticamente significativo da frequência de MN (Teste exato de Fisher, $p < 0,001$). Os valores de MN por 1000 células binucleadas estão apresentados na Tabela II.3 (Anexo II).

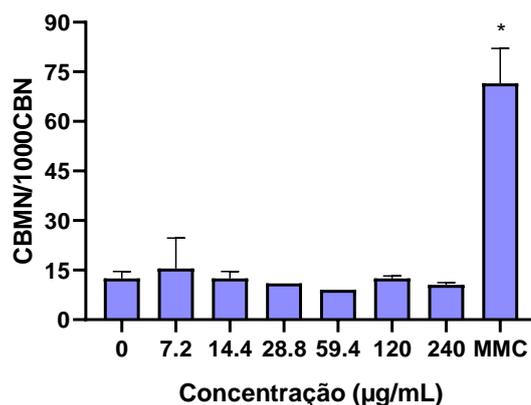


Figura 4.10. Resultados do ensaio de CBMN (micronúcleos com bloqueio da citocinese) em células V79 expostas a microfibrilas de celulose. Resultados apresentados como média+DP de 1 experiência, com 2 réplicas. * $p < 0,05$.

Na Figura 4.11 está representado uma célula binucleada com um MN, observado por microscopia ótica.



Figura 4.11. Exemplo de uma célula V79 binucleada com MN, observado por microscopia ótica (ampliação 1000x).

4.4. Resumo dos resultados obtidos

Na tabela 4.2 está representado um resumo dos resultados de citotoxicidade e genotoxicidade obtidos para as duas linhas celulares.

Tabela 4.2. Resumo dos resultados obtidos durante o decorrer deste trabalho.

	CMF	CNC
V79		
Clonogénico	+	+*
MTT	+	-*
CBPI / RI	-	-*
Micronúcleos	-	-*
A549		
Clonogénico	-	-
Cometa	-	-
Cometa – Danos oxidativos**	(+)	+

*ensaios realizados por outro membro do grupo

**comparação entre valores com e sem FPG

-: negativo; (+): equívoco, positivo numa concentração única ou significado biológico incerto; +: positivo, não dependente da concentração;

5. DISCUSSÃO

A aplicação de materiais sustentáveis e renováveis tem-se tornado cada vez mais importante na produção de vários produtos com um baixo impacto ambiental (Trache et al., 2020). Este é o caso dos CNM, que emergiram como um NM ideal para um desenvolvimento sustentável uma vez que são facilmente isolados de fontes de celulose renováveis. Apresentam baixa ou nenhuma toxicidade para humanos e são biodegradáveis na natureza (Phuong et al., 2022). Devido ao seu tamanho, os CNM têm muitas propriedades interessantes, como a sua elevada força mecânica, rigidez e o potencial de funcionalização ou modificação química da sua superfície. Os CNM têm sido cada vez mais desenvolvidos e investigados não só para os melhorar, mas também para poderem ser utilizados em novas aplicações ou indústrias (Phuong et al., 2022; Trache et al., 2020).

No caso dos CNM fibrilados, que apresentam uma elevada “razão de aspeto” (comprimento/largura), foram descobertos efeitos adversos na saúde, potencialmente associados com doenças pulmonares, dada a inalação destas fibras, a principal via de exposição a este tipo de NM em ambiente ocupacional. Estes efeitos adversos podem depender não só do comprimento e da rigidez das fibras, propriedades chave no desencadear de uma resposta adversa dada a possibilidade de ocorrer fagocitose “frustrada”, como da sua biopersistência uma vez no organismo (Endes et al., 2016).

Vários estudos têm sido feitos de forma a avaliar os possíveis riscos para a saúde, provocados pelos CNM, no entanto é clara a incoerência nos resultados observados dificultando a compreensão da relação estrutura-atividade. Enquanto alguns estudos demonstram a segurança dos CNM, outros demonstram o seu potencial em provocarem efeitos adversos (Endes et al., 2016).

5.1. Efeitos dos nanocristais de celulose

A citotoxicidade dos CNC foi avaliada em células A549, pelo ensaio clonogénico, após uma exposição de 8 dias. Neste ensaio não foi verificada qualquer citotoxicidade, uma vez que não se observou uma diminuição significativa na fração sobrevivente, ou seja, no número de colónias após o tratamento com os CNC. No entanto, quando aplicado este ensaio para as células V79 (realizado por outro membro da equipa), verificou-se uma diminuição estatisticamente significativa da capacidade de formação de colónias em todas as concentrações testadas (14,4; 28,8; 59,4; 120 e 240 µg/mL) com exceção da mais baixa utilizada (7,2 µg/mL), sugerindo que a linha celular A549 é mais resistente que a V79 aos efeitos dos CNC.

Um estudo avaliou a viabilidade celular de A549 após exposição a CNC, em pó e gel, a concentrações entre 1,5 – 45 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ durante 24 e 72h. Os CNC, com diâmetros de cerca de 150 nm, provocaram uma diminuição da viabilidade celular na ordem dos 10 – 20% e não foi observado qualquer efeito dose-resposta. A internalização dos CNC foi também estudada e foi possível observar mudanças morfológicas nas células a partir das 24h de exposição, à concentração mais alta testada. Observaram-se tonofilamentos (filamentos intermediários de queratina), bem como a formação de vacúolos e gotículas lipídicas. Às 72h de exposição estes efeitos acentuaram-se. Foi possível observar os CNC no interior das células, sugerindo a sua internalização (Menas et al., 2017). Como referido, os CNC deste estudo apresentavam diâmetros de cerca de 150 nm, muito superiores aos utilizados neste trabalho experimental (20 nm). O tamanho do NM é um fator importante no que toca à internalização nas células, quanto menor o seu tamanho, mais facilitada é esta internalização (Ganguly et al., 2018). Comparando o tamanho de ambos os CNC e tendo em conta a sua internalização por parte das células A549, seria de esperar que também os CNC utilizados neste trabalho fossem internalizados, no entanto não foi isso que se observou. Quando avaliada a internalização dos CNC por TEM (resultados de Fátima Pinto), observou-se que a grande maioria permaneceu na superfície das células. Tendo em conta estes resultados, é possível sugerir que a não internalização dos CNC por parte das células A549 sejam a razão da não indução de uma resposta citotóxica.

A proliferação celular após uma exposição de 7 dias a 30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de CNC em pó e gel foi avaliada noutro tipo de células pulmonares, células humanas não tumorais do epitélio pulmonar (BEAS-2B) e observou-se um aumento da proliferação celular, para ambas as formas de CNC. Aumento este que, segundo os autores, pode estar relacionado com a geração de ROS intracelulares, bem como a sobre-expressão de várias interleucinas (Kisin et al., 2020). Ainda em células BEAS-2B, estas foram expostas a CNC isolados a partir de algodão, com uma largura média de 7,3 nm, durante 4, 24 e 48h e foi observada citotoxicidade a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A citostase dos CNC foi ainda estimada, a partir da avaliação do CBPI, não se observando alterações significativas (Catalán et al., 2015).

Um outro estudo com várias linhas celulares, tanto humanas como de rato, avaliou a viabilidade celular de CNC, isolados de madeira, a concentrações entre 10 – 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, durante 48h. Em nenhuma destas linhas celulares os CNC provocaram diminuições significativas da viabilidade celular, resultados estes essenciais para futuras aplicações seguras dos CNC (DONG et al., 2012). Comparando ainda células humanas com outras linhas celulares de mamífero, uma exposição de 24h a 100 – 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CNC a macrófagos de rato (Raw 264.7) e queratinócitos humanos (HaCaT) provocou um aumento da viabilidade celular às concentrações mais baixas, seguida de uma diminuição com o aumentar da concentração de CNC, observando-se um efeito dependente da dose. A partir da concentração de 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi observada uma diminuição significativa da viabilidade celular apenas nas células HaCaT (Tuerxun et al., 2019).

Vários estudos em linhas celulares de ratos e roedores têm sido feitos de modo a avaliar a citotoxicidade de CNC, alguns demonstrando resultados positivos. Células de glioma de rato (C6) e fibroblastos de roedores (NIH3T3) demonstraram uma diminuição significativa da viabilidade celular após exposição a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 24h, a CNC com um diâmetro médio de $39 \pm 9,1$ nm (Shazali et al., 2019). Exposição a 1% durante 24h de CNC provenientes de algodão, com cerca de 10 nm de

diâmetro, provocou uma diminuição significativa da viabilidade celular, cerca de 70%, em fibroblastos de rato (L929) (Ni et al., 2012). Resultados negativos foram ainda observados em macrófagos alveolares de roedores (MH-S) expostos a CNC isolados da madeira, em pó e gel, com diâmetros de cerca de 150 e 135 nm, respetivamente. Estes macrófagos tiveram uma pequena diminuição da sua viabilidade e proliferação celular, não significativa, após exposição a concentrações entre 1,5 – 90 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. A internalização dos CNC foi também avaliada e observou-se uma maior internalização no caso dos CNC em gel, comparativamente com os CNC em pó que apresentavam agregados à superfície das células (Samulin Erdem et al., 2019). Também a citotoxicidade de células V79 foi avaliada, não se observando qualquer alteração significativa na viabilidade destas células após exposição a CNC com diâmetros de 3 – 6 nm e comprimentos de 120 – 140 nm (Male et al., 2012).

Apesar de diferentes linhas celulares terem sido utilizadas tanto nas diversas publicações como neste trabalho, é clara a incoerência de resultados obtidos. Os CNC podem ser isolados de diferentes fontes, podendo apresentar diferentes características físico-químicas e, conseqüentemente, desencadear diferentes respostas uma vez expostos às células (Ventura et al., 2020). Uma simples variação no NM pode levar a uma mudança completa no seu comportamento e no modo de ação nas células (Ganguly et al., 2018). Tanto este fator como os diferentes tempos de exposição ou a resposta singular de cada linha celular para com os CNC podem ser consideradas razões para os resultados discordantes entre as várias publicações e em comparação com os resultados obtidos neste trabalho. Globalmente, neste trabalho, observou-se uma maior citotoxicidade em células V79 em comparação com as A549, sugerindo uma maior resistência aos CNC por parte das últimas, talvez explicada pela não internalização deste NM. É sabido que a linha celular V79 não apresenta o gene p53 funcional, cuja expressão produz uma proteína essencial na resposta a danos do DNA, interrompendo temporariamente o ciclo celular até o DNA ser reparado (Chaung et al., 1997). Uma possível explicação para a diminuição da capacidade de proliferação das células V79 é o excesso de não reparação de danos no DNA, após exposição aos CNC. Se isso acontecer, as células poderão ter sido incapazes de se dividir e formar colónias.

Relativamente à genotoxicidade, esta foi avaliada pelo ensaio do cometa em meio alcalino e pela sua versão modificada com adição da enzima FPG. Uma exposição de 3h a CNC não provocou aumentos significativos da percentagem de DNA na cauda, o parâmetro utilizado para avaliar a genotoxicidade, uma vez que se relaciona com o nível de quebras no DNA, e, em combinação com a enzima FPG, mede também danos oxidativos, que se revelaram significativos em várias das concentrações de CNC testadas.

Existem poucos estudos que avaliem a genotoxicidade dos CNC, e apresentam resultados contraditórios. CNC isolados a partir de algodão, com uma largura de 7,3 nm, foram expostos em células BEAS-2B, durante 48h. Nenhuma das concentrações testadas (2,5 – 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) induziu um aumento da frequência de MN (Catalán et al., 2015). Por outro lado, e também em células BEAS-2B, foi feita uma exposição a 30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de CNC em duas formas, em pó e em gel, com diâmetros médios de $149,8 \pm 2,6$ e $147,5 \pm 1,2$ nm, respetivamente. Foi feita uma avaliação dos danos no DNA após uma exposição de 72h e observou-se que ambas as formas de CNC aumentaram significativamente os danos no DNA. Após uma exposição de 4 semanas observou-se a internalização dos CNC nas células,

acompanhado de mudanças morfológicas nas células, nomeadamente a formação de vacúolos citoplasmáticos (Kisin et al., 2020). Uma vez mais é observada uma incoerência de resultados, talvez explicada pela diferença de características físico-químicas dos CNC ou a não ocorrência de internalização dos CNC do primeiro estudo apresentado.

Como referido, os CNC utilizados neste trabalho não foram internalizados pelas células A549, o que pode explicar a não indução de quebras no DNA, após uma exposição de 3h. Apesar de uma diferente linha celular, os CNC usados no estudo de (Kisin et al., 2020) foram internalizados pelas células BEAS-2B após 4 semanas de exposição, um tempo muito superior quando comparado com as 3h de exposição no ensaio do cometa. Com um maior tempo de exposição talvez as células A549 fossem capazes de internalizar os CNC e estes poderiam provocar quebras significativas no DNA.

5.2. Efeitos das microfibrilas de celulose

Neste trabalho a avaliação da citotoxicidade das CMF foi feita a partir de dois ensaios. O ensaio do MTT teve um tempo de exposição de aproximadamente 1 ciclo celular (17h), em células V79, e provocou uma diminuição estatisticamente significativa da viabilidade celular, em relação ao controlo negativo. No entanto, apesar da aparente citotoxicidade, a menor viabilidade celular observada foi de cerca de 80%, para a maior concentração testada (240 µg/mL). De acordo com a Organização Internacional para Padronização (ISO, do inglês *International Organization for Standardization*) apenas quando a citotoxicidade é menor do que 70%, comparativamente com o controlo negativo, o xenobiótico em estudo apresenta um potencial citotóxico (ISO, 2009). Tendo isto em conta, apesar da diminuição estatisticamente significativa da viabilidade celular, estas CMF não podem ser consideradas um agente citotóxico, uma vez que a resposta que produziram nas células V79 não provocou uma diminuição da viabilidade celular biologicamente significativa.

Outro ensaio utilizado para avaliação da citotoxicidade foi o ensaio clonogénico, onde foi feita uma exposição de 8 dias, em células A549. Neste ensaio não foi verificada qualquer citotoxicidade, uma vez que não se observou uma diminuição significativa na fração sobrevivente, ou seja, no número de colónias após o tratamento com as CMF. No entanto, e tal como observado no caso dos CNC, quando aplicado este ensaio para as células V79, verificou-se uma diminuição estatisticamente significativa nas duas concentrações mais elevadas testadas (120 e 240 µg/mL), sugerindo, novamente, uma maior sensibilidade por parte das células V79 a este tipo de NM.

A citotoxicidade das CNF produzidas a partir da polpa branqueada de *Eucalyptus globulus* e pré-tratadas com TEMPO foi avaliada através do ensaio do MTT e clonogénico, numa co-cultura de A549 e macrófagos derivados de monócitos (THP-1). A exposição a 1,5 – 25 µg/cm² durante 24h não provocou citotoxicidade. Por outro lado, a exposição a 48h provocou um aumento da viabilidade celular nas duas concentrações mais baixas (1,5 e 3 µg/cm²) e uma diminuição significativa, em relação ao controlo negativo, após exposição às duas concentrações mais altas testadas (12,5 e 25 µg/cm²), observando-se um efeito dose-resposta. Contrariamente ao observado para a concentração de 12,5 µg/cm², apenas a exposição a 25 µg/cm² provocou um claro efeito citotóxico, dada a viabilidade celular ser inferior a 70% (51 ± 1,42%). Relativamente à proliferação celular, avaliada pelo ensaio clonogénico,

uma exposição de 8 dias a CNF provocou um aumento para a concentração de 1,5 µg/cm² seguida de uma pequena diminuição, não significativa, para concentrações superiores (Ventura et al., 2018). Os resultados obtidos neste trabalho experimental estão em concordância com os observados nesse estudo, em que nenhum dos NM afetou significativamente a proliferação celular (em A549) e, relativamente à viabilidade celular, não houve alterações significativas às 24h de exposição (comparativamente com as 17h de exposição realizadas durante este trabalho experimental, nas células V79, ambas as exposições durante um ciclo celular). Também em células A549, foi avaliada a viabilidade celular de CNF, em pó e gel. Novamente não foi observada uma diminuição significativa após 24h de exposição, no entanto, quando expostas durante 72h a concentrações 1,5 – 45 µg/cm², todas as concentrações em estudo diminuíram a viabilidade em cerca de 40 – 50%. A internalização das CNF foi avaliada e observou-se que, apesar de ocorrerem alterações morfológicas nas células, tanto após 24h de exposição como após 72h, não foi observada a internalização pelas células A549, ficando apenas localizadas nos limites celulares (Menas et al., 2017). Neste trabalho, a avaliação da internalização da CMF por TEM (resultados de Fátima Pinto) mostrou alterações fenotípicas em células A549, nomeadamente a existência de um maior número de vacúolos citoplasmáticos ou endocíticos, que podem ser indícios da internalização da CMF. Isto demonstra que este tipo de NM não afeta significativamente as células A549 ou que estas apresentam uma capacidade de reparação.

A viabilidade celular de células de adenocarcinoma colorretal humanas (Caco-2) foi avaliada após exposição a 100 – 1000 µg/mL de CNF, obtidas a partir de algodão, durante 24h. Não se observou nenhuma alteração significativa da viabilidade celular (Zhang et al., 2021). Outro estudo com células Caco-2 avaliou a citotoxicidade de CNF, isoladas de madeira, não funcionalizadas e com diferentes funcionalizações (carboximetilação, substituição com hidroxipropiltrimetilamónio, fosforilação e sulfoetilação). Após uma exposição a 50 – 500 µg/mL não foi observada qualquer indução citotóxica estatisticamente significativa, apesar de ter ocorrido uma diminuição da atividade metabólica após exposição durante 48h a 500 µg/mL às CNF carboximetiladas (Lopes et al., 2020). A viabilidade celular de CNF com as mesmas funcionalizações foi avaliada noutro estudo, após exposição a 3,9 – 500 µg/mL durante 24 e 48h, em células BEAS-2B. Novamente não foi observada nenhuma citotoxicidade associada com estas funcionalizações nas CNF (Aimonen et al., 2021).

A citotoxicidade de CNF foi avaliada em três linhas celulares diferentes, células cancerígenas de pulmão (NCIH-460), células de teratocarcinoma humanas (PA-1) e células do tecido embrionário (L132). Observou-se que em nenhuma das linhas celulares ocorreu diminuição da viabilidade celular, após exposição a 10 – 1000 µg/mL, durante 24h (Kumari et al., 2019).

Relativamente a linhas celulares não humanas, fibroblastos bovinos foram expostos a 0,02 – 5000 µg/mL de CNF, isoladas de algodão, e observou-se uma diminuição estatisticamente significativa da viabilidade celular a partir da concentração de 200 µg/mL (Pereira et al., 2013). A viabilidade celular de células L929 foi também avaliada após uma exposição a 31,25 – 500 µg/mL de CNF. Também nesta linha celular se observou uma diminuição significativa da viabilidade celular, a partir da concentração de 250 µg/mL (Čolić et al., 2015).

Embora grande parte dos estudos em células humanas estejam de acordo com os resultados obtidos neste trabalho, a não toxicidade associada a CMF, existem também alguns estudos onde foram

observadas respostas citotóxicas após exposição, demonstrando uma vez mais a incoerência associada a exposições aos CNM. Relativamente a linhas celulares não humanas, verificou-se, tal como observado no decorrer deste trabalho experimental, a indução de efeitos citotóxicos. No entanto, a indução de citotoxicidade em linhas celulares não humanas nos estudos toxicológicos indicados pode ser explicada por diferentes propriedades físico-químicas das CNF ou por diferentes fontes da celulose.

A CNF utilizada em (Pereira et al., 2013) apresentava um comprimento entre 85 – 225 μm , comprimento este que pode ser uma razão para a citotoxicidade associada, dada a possibilidade de ocorrer fagocitose “frustrada”. Este comprimento observou-se ainda ser superior ao das CNF utilizadas nos restantes estudos toxicológicos. Por outro lado, a CNF utilizada em (Čolić et al., 2015) teve como fonte madeira de abeto, fonte de celulose esta que não foi utilizada em nenhum dos estudos toxicológicos apresentados.

Relativamente à genotoxicidade, esta foi avaliada pelo ensaio do cometa. Uma exposição de 3h às CNF não provocou aumentos significativos da percentagem de DNA na cauda, o parâmetro utilizado para avaliar a genotoxicidade. Observaram-se, no entanto, danos oxidativos. A genotoxicidade das CNF foi ainda avaliada pelo ensaio de CBMN, após uma exposição de 17h, em células V79. Neste ensaio os resultados foram também negativos, uma vez que não ocorreu um aumento significativo da frequência de MN.

Noutros trabalhos, foi avaliada a genotoxicidade de CNF obtidas de algodão (branco, castanho, verde e rubi), com comprimentos médios de 150 nm, e de curauá, em linfócitos humanos e fibroblastos embrionários de ratos (3T3). Dos vários tipos de CNF, apenas as derivadas de algodão castanho e curauá induziram danos significativos no DNA em ambas as linhas celulares. As duas CNF provocaram quebras e degradação no DNA, observáveis através do ensaio do cometa (a uma concentração de 0,1%, ensaio realizado para os linfócitos) ou através de uma eletroforese em gel de agarose (concentração 1%, realizado para os fibroblastos) (de Lima et al., 2012).

A genotoxicidade de uma CNF produzida a partir da polpa branqueada de *Eucalyptus globulus* e pré-tratadas com TEMPO foi avaliada através do ensaio de CBMN e ensaio do cometa, numa co-cultura de células A549 e THP-1. Relativamente ao ensaio dos MN, ocorreu um aumento da sua frequência nas duas concentrações mais baixas testadas (1,5 e 3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) acompanhado por um aumento na frequência de vesículas (*buds*) nucleares na concentração de 3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. A partir do ensaio do cometa foi possível observar um aumento significativo da percentagem de DNA na cauda após uma exposição a 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de CNF, durante 24h. Apesar deste aumento, os danos observados são muito baixos e não foram considerados biologicamente relevantes. Ocorreu ainda um pequeno aumento, não significativo, de danos no DNA após exposição a 1,5 e 12,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, após tratamento com a enzima FPG (Ventura et al., 2018). Como anteriormente referido, a adição da enzima FPG ao ensaio do cometa veio permitir a deteção dos danos oxidativos, causados pela exposição ao xenobiótico em estudo. É sabido que danos oxidativos nas células podem ser rapidamente reparados pelos sistemas de recuperação celulares, pelo que uma exposição de 24h pode ser o suficiente para impossibilitar a deteção deste tipo de lesões no DNA. No entanto, uma exposição de 3h não é suficiente para excluir completamente os danos oxidativos provocados (Ventura et al., 2018). Durante o decorrer deste trabalho, os ensaios do cometa foram efetuados com exposições de 3h, e foram realmente observados

danos oxidativos estatisticamente significativos, após comparados os valores da %DNA na cauda com e sem FPG. Interessantemente, após a exposição a 7,2 µg/mL (1,5 µg/cm²) de CMF às células V79, ocorreu um ligeiro aumento, não significativo, da frequência de MN. Isto que também foi observado no estudo de Ventura et al., 2018, apesar de em ambos se tratar da concentração mais baixa do respetivo NM.

Um estudo avaliou a genotoxicidade de CNF derivadas de madeira não funcionalizadas e com diferentes funcionalizações (carboximetilação, substituição com hidroxipropiltrimetilamónio, fosforilação e sulfoetilação), em células BEAS-2B. A partir dos ensaios dos cometas e micronúcleos observou-se que nenhuma destas CNF foram capazes de induzir efeitos genotóxicos, nestas condições experimentais (exposição de 24h a concentrações de CNF entre 6 – 500 µg/mL), observando-se apenas uma curva dose-resposta para as CNF fosforiladas no ensaio do cometa (Aimonen et al., 2021).

Comparando os resultados obtidos neste trabalho experimental, nomeadamente os resultados para as células A549, e tendo em conta as características físico-químicas das CMF e dos CNC, seria de esperar uma maior toxicidade por parte das CMF, no entanto, não é isto que se observa, uma vez que ambos provocam, sensivelmente, a mesma cito- e genotoxicidade.

6.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho teve como objetivo a avaliação da cito- e genotoxicidade de CMF e CNC, em duas linhas celulares diferentes, A549 e V79, ambas linhas celulares do trato respiratório, dada a exposição a este tipo de NM em ambiente ocupacional ocorrer, principalmente, através da inalação dos mesmos.

Relativamente aos CNC, estes não demonstraram qualquer citotoxicidade quando em A549. No entanto, os resultados de ensaios feitos anteriormente em células V79 demonstraram uma diminuição da proliferação celular. Quanto às CMF, quando avaliada a sua citotoxicidade, foram observados efeitos positivos apenas na linha celular V79, verificando-se uma diminuição da viabilidade e da proliferação celular.

Relativamente à genotoxicidade de CNC e CMF, através do ensaio do cometa em células A549 não se observou qualquer aumento estatisticamente significativo do nível de quebras no DNA, após uma exposição de curto termo, demonstrando a incapacidade destes NM de induzirem lesões no DNA. Foram, no entanto, observados danos oxidativos após exposição a CNC. A genotoxicidade da CMF foi ainda avaliada em células V79, pelo ensaio de CBMN, e após uma exposição durante, aproximadamente, um ciclo celular não se observou um aumento significativo do nível de alterações cromossômicas.

A diferença de resultados obtidos nas duas linhas celulares durante o decorrer deste trabalho poderá ser explicada por características das próprias linhas celulares, podendo-se sugerir uma maior suscetibilidade aos efeitos adversos dos CNM pelas células V79, de hamster, comparativamente com a linha celular humana, a A549, uma vez que nestas últimas não se observou qualquer citotoxicidade.

Tendo em conta a evidências de possíveis efeitos genotóxicos associados aos CNM, são necessários mais estudos para uma melhor compreensão dos efeitos que estes provocam uma vez no nosso organismo, nomeadamente o estudo da produção de ROS e a realização do ensaio do cometa durante uma exposição mais prolongada.

Também o sistema experimental é uma melhoria a considerar, dadas as limitações que os ensaios *in vitro* apresentam. Sugere-se a utilização de ensaios *in vivo* ou a realização de ensaios *in vitro* em co-cultura que são sistemas experimentais que melhor mimetizam as condições e respostas biológicas *in vivo*, após exposição aos CNM.

A ausência de citotoxicidade e genotoxicidade em células A549, humanas, favorece a hipótese da biocompatibilidade dos CNM que pode ser considerada vantajosa, pois vai no sentido de permitir

que este tipo de NM possa ser utilizado, de uma forma segura, em cada vez mais aplicações e áreas inovadoras.

7. BIBLIOGRAFIA

- Aimonen, K., Suhonen, S., Hartikainen, M., Lopes, V. R., Norppa, H., Ferraz, N., & Catalán, J. (2021). Role of Surface Chemistry in the In Vitro Lung Response to Nanofibrillated Cellulose. *Nanomaterials*, 11(2), 389. <https://doi.org/10.3390/nano11020389>
- Almeida, T., Silvestre, A. J. D., Vilela, C., & Freire, C. S. R. (2021). Bacterial Nanocellulose toward Green Cosmetics: Recent Progresses and Challenges. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 2836. <https://doi.org/10.3390/ijms22062836>
- Aslantürk, Ö. S. (2018). In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. In *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71923>
- Bissessur, R. (2020). Nanomaterials applications. In *Polymer Science and Nanotechnology* (pp. 435–453). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816806-6.00018-2>
- Buzea, C., Pacheco, I. I., & Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4), MR17–MR71. <https://doi.org/10.1116/1.2815690>
- Cao, Y. (2018). Applications of cellulose nanomaterials in pharmaceutical science and pharmacology. *Express Polymer Letters*, 12(9), 768–780. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2018.66>
- Catalán, J., Ilves, M., Järventaus, H., Hannukainen, K.-S., Kontturi, E., Vanhala, E., Alenius, H., Savolainen, K. M., & Norppa, H. (2015). Genotoxic and immunotoxic effects of cellulose nanocrystals in vitro. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 56(2), 171–182. <https://doi.org/10.1002/em.21913>
- Chackalamannil, S., Rotella, D., & Ward, S. (2017). *Comprehensive Medical Chemistry III* (3rd ed., Vol. 1). Amsterdam:Elsevier.
- Chen, L., Wang, Q., Hirth, K., Baez, C., Agarwal, U. P., & Zhu, J. Y. (2015). Tailoring the yield and characteristics of wood cellulose nanocrystals (CNC) using concentrated acid hydrolysis. *Cellulose*, 22(3), 1753–1762. <https://doi.org/10.1007/s10570-015-0615-1>
- Čolić, M., Mihajlović, D., Mathew, A., Naseri, N., & Kokol, V. (2015). Cytocompatibility and immunomodulatory properties of wood based nanofibrillated cellulose. *Cellulose*, 22(1), 763–778. <https://doi.org/10.1007/s10570-014-0524-8>
- Collins, A. R., Duthie, S. J., & Dobson, V. L. (1993). Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis*, 14(9), 1733–1735. <http://carcin.oxfordjournals.org/>

- de Lima, R., Mattoso, Feitosa, Maruyama, Barga, Yamawaki, Vieira, Teixeira, & Fraceto, L. (2012). Evaluation of the genotoxicity of cellulose nanofibers. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 3555–3565. <https://doi.org/10.2147/IJN.S30596>
- Dhawan, A., & Bajpayee, M. (2019). *Genotoxicity Assessment* (A. Dhawan & M. Bajpayee, Eds.; Vol. 2031). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9646-9>
- Dhawan, A., Sharma, V., & Parmar, D. (2009). Nanomaterials: A challenge for toxicologists. *Nanotoxicology*, 3(1), 1–9. <https://doi.org/10.1080/17435390802578595>
- DONG, S., HIRANI, A. A., COLACINO, K. R., LEE, Y. W., & ROMAN, M. (2012). CYTOTOXICITY AND CELLULAR UPTAKE OF CELLULOSE NANOCRYSTALS. *Nano LIFE*, 02(03), 1241006. <https://doi.org/10.1142/S1793984412410061>
- Dourado, F., Gama, M., & Rodrigues, A. C. (2017). A Review on the toxicology and dietetic role of bacterial cellulose. In *Toxicology Reports* (Vol. 4). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.09.005>
- Endes, C., Camarero-Espinosa, S., Mueller, S., Foster, E. J., Petri-Fink, A., Rothen-Rutishauser, B., Weder, C., & Clift, M. J. D. (2016). A critical review of the current knowledge regarding the biological impact of nanocellulose. *Journal of Nanobiotechnology*, 14(1), 78. <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0230-9>
- European Commission. (2011). *Commission Recommendation on the definition of nanomaterial*.
- Fenech, M., Chang, W. P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., & Zeiger, E. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 534(1–2), 65–75. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00249-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00249-8)
- Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A. T., Surralles, J., Crott, J. W., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D. A., Tucker, J. D., & Thomas, P. (2010). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26(1), 125–132. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq052>
- Fotie, G., Limbo, S., & Piergiovanni, L. (2020). Manufacturing of Food Packaging Based on Nanocellulose: Current Advances and Challenges. *Nanomaterials*, 10(9), 1726. <https://doi.org/10.3390/nano10091726>
- Franken, N. A. P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., & van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, 1(5), 2315–2319. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>
- Fubini, B., Fenoglio, I., Tomatis, M., & Turci, F. (2011). Effect of chemical composition and state of the surface on the toxic response to high aspect ratio nanomaterials. *Nanomedicine*, 6(5), 899–920. <https://doi.org/10.2217/nnm.11.80>
- Ganguly, P., Breen, A., & Pillai, S. C. (2018). Toxicity of Nanomaterials: Exposure, Pathways, Assessment, and Recent Advances. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 4(7), 2237–2275. <https://doi.org/10.1021/acsbmaterials.8b00068>
- Gorgieva, S., & Trček, J. (2019). Bacterial cellulose: Production, modification and perspectives in biomedical applications. *Nanomaterials*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/nano9101352>

- Grishkewich, N., Mohammed, N., Tang, J., & Tam, K. C. (2017). Recent advances in the application of cellulose nanocrystals. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 29, 32–45. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2017.01.005>
- Guo, X., & Chen, T. (2015). Progress in Genotoxicity Evaluation of Engineered Nanomaterials. In *Nanomaterials - Toxicity and Risk Assessment*. InTech. <https://doi.org/10.5772/61013>
- Honorato-Rios, C., Lehr, C., Schütz, C., Sanctuary, R., Osipov, M. A., Baller, J., & Lagerwall, J. P. F. (2018). Fractionation of cellulose nanocrystals: enhancing liquid crystal ordering without promoting gelation. *NPG Asia Materials*, 10(5), 455–465. <https://doi.org/10.1038/s41427-018-0046-1>
- ICH. (2011). *Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use*.
- ISO. (2009). *Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity (ISO 10993-5)*.
- ISO. (2017). *Nanotechnologies - Vocabulary - Part 2: Nano-objects (ISO/TS 80004-2:2015)*.
- Kisin, E. R., Yanamala, N., Rodin, D., Menas, A., Farcas, M., Russo, M., Guppi, S., Khaliullin, T. O., Iavicoli, I., Harper, M., Star, A., Kagan, V. E., & Shvedova, A. A. (2020). Enhanced morphological transformation of human lung epithelial cells by continuous exposure to cellulose nanocrystals. *Chemosphere*, 250. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126170>
- Kumari, P., Pathak, G., Gupta, R., Sharma, D., & Meena, A. (2019). Cellulose nanofibers from lignocellulosic biomass of lemongrass using enzymatic hydrolysis: characterization and cytotoxicity assessment. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27(2), 683–693. <https://doi.org/10.1007/s40199-019-00303-1>
- Ladeira, C., & Smajdova, L. (2017). The use of genotoxicity biomarkers in molecular epidemiology: applications in environmental, occupational and dietary studies. *AIMS Genetics*, 04(03), 166–191. <https://doi.org/10.3934/genet.2017.3.166>
- Li, A., Xu, D., Luo, L., Zhou, Y., Yan, W., Leng, X., Dai, D., Zhou, Y., Ahmad, H., Rao, J., & Fan, M. (2021). Overview of nanocellulose as additives in paper processing and paper products. *Nanotechnology Reviews*, 10(1), 264–281. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2021-0023>
- Lima, T., Bernfur, K., Vilanova, M., & Cedervall, T. (2020). Understanding the Lipid and Protein Corona Formation on Different Sized Polymeric Nanoparticles. *Scientific Reports*, 10(1), 1129. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57943-6>
- Lin, N., & Dufresne, A. (2014). Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect. *European Polymer Journal*, 59, 302–325. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.07.025>
- Lopes, V. R., Strømme, M., & Ferraz, N. (2020). In Vitro Biological Impact of Nanocellulose Fibers on Human Gut Bacteria and Gastrointestinal Cells. *Nanomaterials*, 10(6), 1159. <https://doi.org/10.3390/nano10061159>
- Lourenço, A. F., Gamelas, J. A. F., Nunes, T., Amaral, J., Mutjé, P., & Ferreira, P. J. (2017). Influence of TEMPO-oxidised cellulose nanofibrils on the properties of filler-containing papers. *Cellulose*, 24(1), 349–362. <https://doi.org/10.1007/s10570-016-1121-9>
- Louro, H., Bettencourt, A., Gonçalves, L. M., Almeida, A. J., & João Silva, M. (2015). Role of Nanogenotoxicology Studies in Safety Evaluation of Nanomaterials. In *Nanotechnology*

- Applications for Tissue Engineering* (pp. 263–287). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-32889-0.00016-9>
- Louro, H., Pinhão, M., Santos, J., Tavares, A., Vital, N., & Silva, M. J. (2016). Evaluation of the cytotoxic and genotoxic effects of benchmark multi-walled carbon nanotubes in relation to their physicochemical properties. *Toxicology Letters*, 262, 123–134. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.09.016>
- Louro, H., Saruga, A., Santos, J., Pinhão, M., & Silva, M. J. (2019). Biological impact of metal nanomaterials in relation to their physicochemical characteristics. *Toxicology in Vitro*, 56, 172–183. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.01.018>
- Luzhna, L., Kathiria, P., & Kovalchuk, O. (2013). Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. *Frontiers in Genetics*, 4. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00131>
- Ma, T., Hu, X., Lu, S., Liao, X., Song, Y., & Hu, X. (2020). Nanocellulose: a promising green treasure from food wastes to available food materials. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(4), 989–1002. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1832440>
- Magdolenova, Z., Collins, A., Kumar, A., Dhawan, A., Stone, V., & Dusinska, M. (2014). Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology*, 8(3), 233–278. <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.773464>
- Male, K. B., Leung, A. C. W., Montes, J., Kamen, A., & Luong, J. H. T. (2012). Probing inhibitory effects of nanocrystalline cellulose: inhibition versus surface charge. *Nanoscale*, 4(4), 1373. <https://doi.org/10.1039/c2nr11886f>
- Menas, A. L., Yanamala, N., Farcas, M. T., Russo, M., Friend, S., Fournier, P. M., Star, A., Iavicoli, I., Shurin, G. v., Vogel, U. B., Fadeel, B., Beezhold, D., Kisin, E. R., & Shvedova, A. A. (2017). Fibrillar vs crystalline nanocellulose pulmonary epithelial cell responses: Cytotoxicity or inflammation? *Chemosphere*, 171, 671–680. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.105>
- Ni, H., Zeng, S., Wu, J., Cheng, X., Luo, T., Wang, W., Zeng, W., & Chen, Y. (2012). Cellulose nanowhiskers: Preparation, characterization and cytotoxicity evaluation. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 22(1–3), 121–127. <https://doi.org/10.3233/BME-2012-0697>
- OECD. (2012). *Six Years of OECD Work on the Safety of Manufactured Nanomaterials: Achievements and Future Opportunities*.
- OECD. (2014). *Genotoxicity of Manufactured Nanomaterials: Report of the OECD Expert Meeting*.
- OECD. (2016). *OECD Guideline for the Testing of Chemicals In vitro Mammalian Cell Micronucleus Test 487*. <http://www.oecd.org/termsandconditions/>.
- Ostiguy, C., Debia, M., Roberge, B., & Dufresne, A. (2015). *Best Practices Guidance for Nanomaterial Risk Management in the Workplace* (2nd ed.). IRRST. <https://abonnement.lacsst.com/prevention>
- Ostling, O., & Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic Study of Radiation-Induced DNA Damages in Individual Mammalian Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123(1), 291–298. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(84\)90411-X](https://doi.org/10.1016/0006-291X(84)90411-X)
- Pereira, M. M., Raposo, N. R. B., Brayner, R., Teixeira, E. M., Oliveira, V., Quintão, C. C. R., Camargo, L. S. A., Mattoso, L. H. C., & 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. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/24/7/075103>
- Perumal, A. B., Nambiar, R. B., Moses, J. A., & Anandharamakrishnan, C. (2022). Nanocellulose: Recent trends and applications in the food industry. *Food Hydrocolloids*, 127, 107484. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107484>
- Phuong, H. T., Thoa, N. K., Tuyet, P. T. A., Van, Q. N., & Hai, Y. D. (2022). Cellulose Nanomaterials as a Future, Sustainable and Renewable Material. *Crystals*, 12(1), 106. <https://doi.org/10.3390/cryst12010106>
- Pietroiuști, A. (2012). Health implications of engineered nanomaterials. *Nanoscale*, 4(4), 1231–1247. <https://doi.org/10.1039/c2nr11688j>
- Piperakis, S. M. (2009). Comet assay: A brief history. *Cell Biology and Toxicology*, 25(1), 1–3. <https://doi.org/10.1007/s10565-008-9081-y>
- Rojas, J., Bedoya, M., & Ciro, Y. (2015). Current Trends in the Production of Cellulose Nanoparticles and Nanocomposites for Biomedical Applications. In *Cellulose - Fundamental Aspects and Current Trends* (pp. 193–228). InTech. <https://doi.org/10.5772/61334>
- Rojas, O. J. (2016). *Cellulose Chemistry and Properties: Fibers, Nanocelluloses and Advanced Materials* (O. J. Rojas, Ed.; 1st ed., Vol. 271). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-26015-0>
- Saito, T., & Isogai, A. (2007). Wet Strength Improvement of TEMPO-Oxidized Cellulose Sheets Prepared with Cationic Polymers. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 46(3), 773–780. <https://doi.org/10.1021/ie0611608>
- Samulin Erdem, J., Alswady-Hoff, M., Ervik, T. K., Skare, Ø., Ellingsen, D. G., & Zienolddiny, S. (2019). Cellulose nanocrystals modulate alveolar macrophage phenotype and phagocytic function. *Biomaterials*, 203, 31–42. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.02.025>
- Saraiva, D. v., Chagas, R., Abreu, B. M. de, Gouveia, C. N., Silva, P. E. S., Godinho, M. H., & Fernandes, S. N. (2020). Flexible and Structural Coloured Composite Films from Cellulose Nanocrystals/Hydroxypropyl Cellulose Lyotropic Suspensions. *Crystals*, 10(2), 122. <https://doi.org/10.3390/cryst10020122>
- Shankaran, D. R. (2018). Cellulose Nanocrystals for Health Care Applications. In *Applications of Nanomaterials* (pp. 415–459). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-101971-9.00015-6>
- Shazali, N., Zaidi, N., Ariffin, H., Abdullah, L., Ghaemi, F., Abdullah, J., Takashima, I., & Nik Abd. Rahman, N. (2019). Characterization and Cellular Internalization of Spherical Cellulose Nanocrystals (CNC) into Normal and Cancerous Fibroblasts. *Materials*, 12(19), 3251. <https://doi.org/10.3390/ma12193251>
- Sierra, L. M., & Gaivão, I. (2014). *Genotoxicity and DNA Repair* (L. M. Sierra & I. Gaivão, Eds.). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1068-7>
- Singh, N. P., Mccoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. In *Experimental Cell Research* (Vol. 175).
- Stockmann-Juvala, H., Taxell, P., & Santonen, T. (2014). *Formulating Occupational Exposure Limits Values (OELs) (Inhalation & Dermal)*.

- Tarrés, Q., Sagner, 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. <https://doi.org/10.1007/s10570-016-0889-y>
- Tavares, A. M., Louro, H., Antunes, S., Quarré, S., Simar, S., de Temmerman, P.-J., Verleysen, E., Mast, J., Jensen, K. A., Norppa, H., Nesslany, F., & Silva, M. J. (2014). Genotoxicity evaluation of nanosized titanium dioxide, synthetic amorphous silica and multi-walled carbon nanotubes in human lymphocytes. *Toxicology in Vitro*, 28(1), 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.06.009>
- Terradas, M., Martín, M., Tusell, L., & Genescà, A. (2010). Genetic activities in micronuclei: Is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? In *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* (Vol. 705, Issue 1, pp. 60–67). <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2010.03.004>
- Thompson, L., Azadmanjiri, J., Nikzad, M., Sbarski, I., Wang, J., & Yu, A. (2019). Cellulose Nanocrystals: Production, Functionalization and Advanced Applications. *REVIEWS ON ADVANCED MATERIALS SCIENCE*, 58(1), 1–16. <https://doi.org/10.1515/rams-2019-0001>
- Trache, D., Tarchoun, A. F., Derradji, M., Hamidon, T. S., Masruchin, N., Brosse, N., & Hussin, M. H. (2020). Nanocellulose: From Fundamentals to Advanced Applications. *Frontiers in Chemistry*, 8. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00392>
- Tuerxun, D., Pulingam, T., Nordin, N. I., Chen, Y. W., Kamaldin, J. bin, Julkapli, N. B. M., Lee, H. V., Leo, B. F., & Johan, M. R. bin. (2019). Synthesis, characterization and cytotoxicity studies of nanocrystalline cellulose from the production waste of rubber-wood and kenaf-bast fibers. *European Polymer Journal*, 116, 352–360. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.04.021>
- van Meerloo, J., Kaspers, G. J. L., & Cloos, J. (2011). Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. In I. A. Cree (Ed.), *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols* (2nd ed., Vol. 731, pp. 237–245). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.04.013>
- Ventura, C., Pinto, F., Lourenço, A. F., Ferreira, P. J. T., Louro, H., & Silva, M. J. (2020). On the toxicity of cellulose nanocrystals and nanofibrils in animal and cellular models. *Cellulose*, 27(10), 5509–5544. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03176-9>
- Wang, X., Yao, C., Wang, F., & Li, Z. (2017). Cellulose-Based Nanomaterials for Energy Applications. *Small*, 13(42), 1702240. <https://doi.org/10.1002/sml.201702240>
- Web of Science. (n.d.). *Nanotechnology publications*. Retrieved November 11, 2021, from <https://statnano.com/report/s29>
- Zeng, J., Zeng, Z., Cheng, Z., Wang, Y., Wang, X., Wang, B., & Gao, W. (2021). Cellulose nanofibrils manufactured by various methods with application as paper strength additives. *Scientific Reports*, 11(1), 11918. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91420-y>
- Zhang, K., Zhang, H., & Wang, W. (2021). Toxicological studies and some functional properties of carboxymethylated cellulose nanofibrils as potential food ingredient. *International Journal of Biological Macromolecules*, 190, 887–893. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.055>

ANEXOS

I. Resultados dos ensaios de citotoxicidade

Tabela I.1. Resultados da fração sobrevivente, no ensaio clonogénico, em células A549 expostas a nanocristais de celulose. S e NS significam, respetivamente, estatisticamente significativa e não significativa.

Concentração (µg/mL)	Média	DP	Significância (p)		Notas
			ANOVA	Post Huc Tukey HSD	
7,2	0,988	0,076	<0,001	1,000	NS
14,4	0,938	0,001		0,843	NS
28,8	0,939	0,048		0,942	NS
59,4	0,956	0,005		0,986	NS
120	1,016	0,005		1,000	NS
240	0,917	0,023		0,338	NS
Mitomomicina (0,05 µg/mL)	0,000	0,000		<0,001	

Tabela I.2. Resultados da fração sobrevivente, no ensaio clonogénico, em células A549 expostas a microfibrilas de celulose. S e NS significam, respetivamente, estatisticamente significativa e não significativa.

Concentração (µg/mL)	Média	DP	Significância (p)		Notas
			ANOVA	Post Huc Tukey HSD	
7,2	1,026	0,059	<0,001	1,000	NS
14,4	1,016	0,032		1,000	NS
28,8	1,011	0,083		1,000	NS
59,4	0,966	0,043		0,809	NS
120	0,930	0,025		0,999	NS
240	0,989	0,065		1,000	NS
Mitomomicina (0,05 µg/mL)	0,000	0,000		<0,001	

Tabela I.3. Resultados da viabilidade celular, no ensaio do MTT, em células V79 expostas a microfibrilas de celulose. S e NS significam, respetivamente, estatisticamente significativa e não significativa.

Concentração (µg/mL)	Média (%)	DP (%)	Significância (p)		Notas
			ANOVA	Post Huc Tukey HSD	
7,2	94,6	2,3	<0,001	0,853	NS
14,4	88,6	2,1		0,052	NS
28,8	91,0	2,7		0,219	NS
59,4	88,0	5,9		0,033	S
120	87,3	6,1		0,020	S
240	80,8	2,7		<0,001	S
SDS (0,1%)	1,6	0,3		<0,001	S

Tabela I.4. Resultados da fração sobrevivente, no ensaio clonogénico, em células V79 expostas a microfibrilas de celulose. S e NS significam, respetivamente, estatisticamente significativa e não significativa.

Concentração (µg/mL)	Média	DP	Significância (p)		Notas
			ANOVA	Post Huc Tukey HSD	
7,2	0,693	0,172	<0,001	0,283	NS
14,4	0,703	0,121		0,301	NS
28,8	0,809	0,147		0,808	NS
59,4	0,596	0,075		0,065	NS
120	0,556	0,176		0,029	S
240	0,406	0,003		0,001	S
Mitomomicina (0,2 µg/mL)	0,045	0,045		<0,001	S

Tabela I.5. Resultados da citostase, a partir dos valores de CBPI e RI em células V79 expostas a microfibrilas de celulose. NS significa estatisticamente não significativa.

Concentração (µg/mL)	CBPI	RI	Citostase (%)		Significância (p)	Notas
			Média	DP	t Test	
7,2	2,222	101,50	-1,5	8,6	0,879	NS
14,4	2,176	97,674	2,3	2,8	0,497	NS
28,8	2,094	90,864	9,1	3,5	0,120	NS
59,4	2,189	98,754	1,2	3,4	0,750	NS
120	2,116	92,691	7,3	3,3	0,159	NS
240	2,162	96,512	3,5	5,0	0,556	NS
Mitomomicina (0,2 µg/mL)	2,156	96,013	4,0	3,3	0,353	NS

II. Resultados dos ensaios de genotoxicidade

Tabela II.1. Resultados da percentagem de DNA na cauda e danos oxidativos, no ensaio do cometa, em células A549 expostas a nanocristais de celulose. S e NS significam, respetivamente, estatisticamente significativa e não significativa.

Concentração (µg/mL)	Sem FPG					Com FPG				
	Média (%)	DP (%)	Significância (p)		Notas	Média (%)	DP (%)	Significância (p)		Notas
			ANOVA	Post Hoc Tukey HSD				ANOVA	Post Hoc Tukey HSD	
7,2	2,0	0,8	<0,001	1,000	NS	6,6	0,8	<0,001	0,257	NS
14,4	2,7	2,1		0,996	NS	7,2	3,2		0,148	NS
28,8	2,1	0,8		1,000	NS	5,8	2,0		0,607	NS
59,4	3,3	1,2		0,848	NS	6,9	1,8		0,173	NS
120	3,8	1,3		0,528	NS	6,2	4,0		0,561	NS
240	3,4	0,8		0,740	NS	6,4	1,7		0,404	NS
EMS (5 mM)	15,0	2,6		<0,001	S	25,1	2,2		<0,001	S
Danos oxidativos										
Concentração (µg/mL)	0	7,2	14,4	28,8	59,4	120	240	EMS (5 mM)		
Significância (p) – t Test	0,497	0,002	0,135	0,028	0,004	0,015	0,115	0,020		
Notas	NS	S	NS	S	S	S	NS	S		

Tabela II.2. Resultados da percentagem de DNA na cauda e danos oxidativos, no ensaio do cometa, em células A549 expostas a microfibrilas de celulose. S e NS significam, respetivamente, estatisticamente significativa e não significativa.

Concentração (µg/mL)	Sem FPG					Com FPG				
	Média (%)	DP (%)	Significância (p)		Notas	Média (%)	DP (%)	Significância (p)		Notas
			ANOVA	Post Hoc Tukey HSD				ANOVA	Post Hoc Tukey HSD	
7,2	2,5	0,5	<0,001	0,946	NS	5,5	1,5	<0,001	1,000	NS
14,4	3,0	0,8		0,999	NS	5,8	1,4		1,000	NS
28,8	2,9	0,7		0,999	NS	6,1	1,8		1,000	NS
59,4	2,2	0,7		0,800	NS	7,6	2,6		0,965	NS
120	2,4	1,0		0,887	NS	6,9	1,7		0,998	NS
240	4,8	1,9		0,734	NS	7,8	1,6		0,932	NS
EMS (5 mM)	15,6	2,1		<0,001	S	27,4	5,5		<0,001	S
Danos oxidativos										
Concentração (µg/mL)	0	7,2	14,4	28,8	59,4	120	240	EMS (5 mM)		
Significância (p) – t Test	0,038	0,010	0,005	0,058	<0,001	0,012	0,230	0,026		
Notas	S	S	S	NS	S	S	NS	S		

Tabela II.3. Resultados do ensaio dos micronúcleos em células V79 expostas a microfibrilas de celulose. S e NS significam, respetivamente, estatisticamente significante e não significante.

Concentração (µg/mL)	Média	DP	Significância (p)	Notas
			Teste Exato de Fisher	
7,2	15,5	6,5	0,501	NS
14,4	12,5	1,5	1,000	NS
28,8	11,0	0,0	0,770	NS
59,4	9,0	0,0	0,358	NS
120	12,5	0,5	1,000	NS
240	10,5	0,5	0,657	NS
Mitomomicina (0,2 µg/mL)	71,5	7,5	<0,001	S