

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

**Rafaella de Souza Salomão Zanette**

**PRODUÇÃO DE NANOBIOCOMPÓSITO CONTENDO NANOFIBRAS  
DE CELULOSE PARA O CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO  
MESENQUIMAIS E APLICAÇÃO EM REPARO ÓSSEO**

Tese  
Juiz de Fora  
2019

**RAFAELLA DE SOUZA SALOMÃO ZANETTE**

**PRODUÇÃO DE NANOBIOCOMPÓSITO CONTENDO NANOFIBRAS  
DE CELULOSE PARA O CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO  
MESENQUIMAIS E APLICAÇÃO EM REPARO ÓSSEO**

Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Doutora em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia.

**Orientador (a): Professora Doutora Michele Munk Pereira**

Juiz de Fora  
2019

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

Zanette, Rafaella de Souza Salomão.

Produção de nanobiocompósito contendo nanofibras de celulose para o cultivo de células-tronco mesenquimais e aplicação em reparo ósseo / Rafaella de Souza Salomão Zanette. -- 2020.

210 p. : il.

Orientadora: Michele Munk Pereira

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2020.

1. Métodos in vitro. 2. Polímeros naturais. 3. Citocompatibilidade. 4. Engenharia tecidual. 5. Diferenciação osteogênica. I. Pereira, Michele Munk, orient. II. Título.

**RAFAELLA DE SOUZA SALOMÃO ZANETTE**

**PRODUÇÃO DE NANOBIOCOMPÓSITO CONTENDO NANOFIBRAS DE  
CELULOSE PARA O CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUINAIS E  
APLICAÇÃO EM REPARO ÓSSEO**

Tese de Doutorado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 04/03/2020

**BANCA EXAMINADORA:**

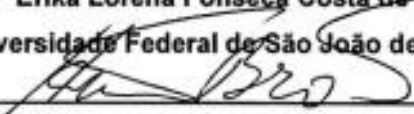
  
\_\_\_\_\_  
**Prof.ª Dr.ª Michele Munk Pereira**

**Orientadora**

**Universidade Federal de Juiz de Fora**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof.ª Dr.ª Érika Lorena Fonseca Costa de Alvarenga**

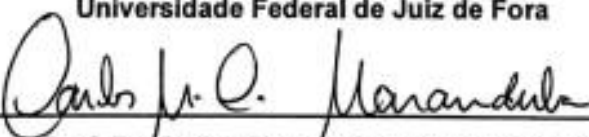
**Universidade Federal de São João del-Rei**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Humberto de Mello Brandão**

**Enbrapa**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof.ª Dr.ª Priscila de Faria Pinto**

**Universidade Federal de Juiz de Fora**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba**

**Universidade Federal de Juiz de Fora**

Aos meus pais, Marcos e Giselle  
E às memórias de minha avó Eliane e de  
minha Bisa Gigi.

## AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da UFJF e seu corpo docente pelo aprendizado e oportunidade de realização deste projeto.

À Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade de Juiz de Fora (PROPESQ/UFJF) pelo apoio financeiro, que permitiu a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro e pela aprovação do projeto (APQ-02342-17) que permitiu a execução deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

À professora Dra. Michele Munk por dedicar seu tempo e seus saberes a mim, e pela oportunidade e confiança para que eu desenvolvesse esse trabalho com sua orientação.

Ao professor Dr. Humberto Brandão que esteve sempre disposto a me ajudar, não há palavras suficientes para agradecer.

Ao professor Dr. Carlos Maranduba por ter participado da minha formação científica inicial.

Ao professor Dr. Marcelo por toda a disponibilidade, conhecimento e vontade em ajudar.

Aos professores Drs. Lyderson, José Marcello e Saulo por todos os conhecimentos e ideias compartilhados. A todos os outros professores que dedicaram um pouco do seu tempo para me ensinar.

Aos integrantes do Laboratório de Nanotecnologia da Embrapa Gado de Leite. Em especial à Camila, que nunca mediu esforços em me ajudar.

Ao Sivioney, técnico do laboratório, sempre disposto a ajudar em qualquer momento.

Aos amigos do Laboratório pela parceria e cooperação que fazem o trabalho não apenas dar certo, mas ser divertido e prazeroso, em especial a Leonara, Eduarda, Dani, Ju, Elyabe e Leo pela companhia, pela troca de ideias e pela amizade de vocês, essenciais para esta conquista.

À Lívia, minha IC, que sempre teve boa vontade, paciência e curiosidade em me ajudar a desenvolver o projeto.

À minha amiga Izabela pela parceira de todas as horas e por sempre me apoiar.

Aos meus pais Marcos e Giselle por não medirem esforços para me permitir ir mais longe.

Ao meu irmão Marcos Vinícius pelo companheirismo.

À minha avó Eliane (*in memorian*) e minha bisavó Gigi (*in memorian*), que estarão sempre em meu coração em forma da melhor saudade que posso sentir.

À toda minha família, que está sempre comigo.

Ao meu namorado Rafael, amigo e companheiro de todas as horas, por me acalmar nos momentos de desespero.

Aos presentes na banca, o meu sincero agradecimento.

À Deus, por colocar as coisas sempre nos momentos certos.

*“Estou entre aqueles que acham que a  
ciência tem uma grande beleza”*

*Marie Curie*



## RESUMO

As nanofibras de celulose (NFCs) são polímeros naturais que apresentam propriedades mecânicas que as tornam muito atrativas para aplicações na construção de matrizes poliméricas aplicadas à engenharia de tecidos. O fornecimento exógeno de uma matriz polimérica de suporte em associação com células-tronco surge como solução promissora para a indução de diferenciação de células-tronco e reparo de lesões ósseas. Porém, apesar da celulose ser um material biocompatível, quando os materiais estão em nanoescala tornam-se mais reativos, necessitando investigar seu potencial efeito tóxico para garantir uma aplicação segura. A hipótese desse trabalho é que as NFCs são citocompatíveis e quando utilizadas como componentes de nanobiocompósitos induzem a proliferação e diferenciação de células-tronco mesenquimais humanas. O objetivo geral deste projeto foi avaliar a citocompatibilidade das NFCs de algodão e o potencial do nanobiocompósito contendo NFC e quitosana em promover a proliferação e diferenciação osteogênica das células-tronco mesenquimais humanas. No experimento 1 foi realizada a caracterização físico-química das NFCs e a avaliação do potencial efeito tóxico e de indução de diferenciação osteogênica das NFCs em suspensão nas células-tronco mesenquimais humanas extraídas da polpa dentária cultivadas *in vitro*. No experimento 2, foi realizada a síntese pela técnica de evaporação do solvente e a caracterização físico-química do nanobiocompósito. Células HEK293 foram cultivadas sobre essa matriz para testar a citocompatibilidade e a capacidade do nanobiocompósito em promover a adesão e proliferação de células humanas. Posteriormente, no experimento 3, visando uma maior estabilidade as propriedades físico-químicas do nanobiocompósito foram alteradas e, novamente caracterizadas e, então as células-tronco mesenquimais humanas foram cultivadas sobre o nanobiocompósito para avaliar a citocompatibilidade e o potencial de indução de diferenciação osteogênica. Os resultados do experimento 1 revelaram que as NFCs de algodão se apresentam em forma de fibra alongada semelhante à agulha, com diâmetros de cerca de 6 a 18 nm, enquanto o seu comprimento variou de 85 a 200 nm. As bandas características da celulose foram obtidas pelas espectroscopias e as NFCs demonstraram exibir cargas superficiais negativas em sua superfície (-10 mV). Nas condições testadas, não houve diferença ( $p > 0,05$ ) nas taxas de proliferação, viabilidade, ciclo celular e níveis de SOD extracelular. No entanto, a exposição às NFCs por 48 h diminuiu os níveis de expressão dos genes relacionados ao estresse e apoptose (ATF4, DAPK1 e BAX;  $p < 0,05$ ). Adicionalmente, os resultados de atividade da fosfatase alcalina ( $p < 0,05$ ), von Kossa e Vermelho de alizarina demonstraram que as NFCs de algodão demonstraram capacidade de indução osteogênica nas células-tronco mesenquimais humanas. No experimento 2, os resultados de caracterização mostraram que a NFC aumentou a nanotopografia e diminuiu as taxas de intumescimento e degradação do nanobiocompósito NFC/quitosana ( $p < 0,05$ ). Nos ensaios de citocompatibilidade, o nanobiocompósito promoveu a proliferação celular e o aumento da área das células HEK293 ( $p < 0,05$ ), porém mostrou-se citotóxico após 72 h de cultura. No experimento 3, as propriedades físico-químicas do nanobiocompósito foram alteradas melhorando a citocompatibilidade, bem como apresentou capacidade de indução de diferenciação osteogênica para células tronco-mesenquimais humanas. Em conjunto, os dados desse estudo forneceram novas informações sobre a citocompatibilidade das NFCs de algodão e dos nanobiocompósitos contendo NFCs de algodão. As NFCs e os nanobiocompósitos

induziram a proliferação e diferenciação das células-tronco, o que abre possibilidades para futuras aplicações desses biomateriais na terapia celular e regeneração óssea.

**Palavras-chave:** Métodos *in vitro*, Polímeros naturais, Citocompatibilidade, Engenharia tecidual, Diferenciação osteogênica

## ABSTRACT

Cellulose nanofibers (CNFs) are natural polymers that have mechanical properties that make them very attractive for applications in the construction of polymeric matrices applied to tissue engineering. The exogenous supply of a supportive polymer matrix in combination with stem cells emerges as a promising solution for inducing stem cell differentiation and repair of bone lesions. However, although cellulose is a biocompatible material, when materials are in nanoscale become more reactive, needing to investigate its potential toxic effect to ensure safe application. The hypothesis of this work is that CNFs are cytocompatible and when used as nanobiocomposite components induce the proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells. The general objective of this project was to evaluate the cytocompatibility of cotton CNFs and the potential of nanobiocomposites containing CNF and chitosan in promoting the proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. In experiment 1, the physicochemical characterization of CNFs was performed and the evaluation of the potential toxic effect and induction of osteogenic differentiation of suspended CNFs in human mesenchymal stem cells extracted from the dental pulp cultivated in vitro. In experiment 2, the synthesis was performed using the solvent evaporation technique and the physical-chemical characterization of the nanobiocomposite containing CNF and chitosan. HEK293 cells were grown on this matrix to test the cytocompatibility and the nanobiocomposite's ability to promote the adhesion and proliferation of human cells. Subsequently, in experiment 3, aiming at greater stability the physicochemical properties of the nanobiocomposite were altered and, again characterized and then human mesenchymal stem cells were cultivated on the nanobiocomposite to evaluate cytocompatibility and the induction potential of osteogenic differentiation. The results of experiment 1 revealed that cotton CNFs are needle-like elongated fiber, with diameters of about 6 - 18 nm, while their length ranged from 85 to 200 nm. The cellulose characteristic bands were obtained by spectroscopy and CNFs showed negative surface charges on their surface ( $-10$  mV). In the conditions tested, there was no difference ( $p>0.05$ ) in the rates of proliferation, viability, cell cycle and extracellular SOD levels. However, exposure to CNFs for 48 h decreased the expression levels of genes related to stress and apoptosis (ATF4, DAPK1 and BAX;  $p<0.05$ ). Additionally, the activity results of alkaline phosphatase ( $p<0.05$ ), von Kossa and Alizarin Red demonstrated that cotton CNFs demonstrated the ability to induce osteogenic in human mesenchymal stem cells. In experiment 2, characterization results showed that CNF increased nanotopography and decreased the rates of intumescent and degradation of CNF/chitosan nanobiocomposite ( $p<0.05$ ). The cytocompatibility assays, nanobiocomposite promoted cell proliferation and increased area of HEK293 cells ( $p<0.05$ ), but was cytotoxic after 72 h of culture. In experiment 3, the physicochemical properties of the nanobiocomposite were altered by improving cytocompatibility, as well as presented the ability to induce osteogenic differentiation for human mesenchymal stem cells. Together, the data in this study provided new information on the cytocompatibility of cotton CNFs and nanobiocomposites containing cotton CNFs. The CNFs and nanobiocomposites have induced the proliferation and differentiation of stem cells, which opens possibilities for future applications of these biomaterials in cell therapy and bone regeneration.

**Keywords:** In vitro methods, Natural polymers, Cytocompatibility, Tissue engineering, Osteogenic differentiation

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Escala nanométrica dos materiais quando comparados com biomoléculas. Fonte: Adaptado de: Belyanina et al. (2017) .....	28
Figura 2 - Molécula de celulose: ligação 1-4 dos monômeros $\beta$ glicose. Adaptados de: Saba; Jawaid (2017). .....	30
Figura 3 - Esquema mostrando a hidrólise ácida da celulose. Adaptado de: Lee et al. (2014). .....	32
Figura 4 – Esquema das células-tronco isoladas da polpa dentária humana mostrando a capacidade de diferenciação em diferentes tipos celulares. Fonte: Adaptado de: BOJIC et al. (2014).....	41
Figura 5 - Ilustração esquemática das interações dos nanomateriais com células-tronco. Essas interações podem estimular a diferenciação de células-tronco em uma variedade de tecidos, incluindo, entre outros, nervos, músculos, pele, fígado e ossos. Fonte: Adaptado de: Zhou et al. (2018).....	46
Figura 6 – Esquema da desacetilação da quitina. Fonte: Adaptado de : MAHANTA; MAITI (2016) .....	52
Figura 7 - Estrutura química da celulose, hidroxietilcelulose, quitina e quitosana. Fonte: Adaptado de: YOUSSEF et al. (2015).....	53
Figura 8 - Representação esquemática da reticulação de quitosana com TPP. Fonte: (SHENVI; ISMAIL; ISLOOR, 2014) .....	54
Figura 9 – Representação esquemática da metodologia realizada no Capítulo 1.....	88
Figura 10 - Imagens das nanofibras de celulose (NFCs) de algodão. (a) Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). A ampliação foi de 110 x. A barra de escala é de 200 nm. (b) Imagens de Microscopia de Força Atômica (AFM) das NFCs após secagem em uma superfície de mica. A barra de escala é 1 $\mu$ m. ....	102
Figura 11 - Padrão de Difração de Raio X da nanofibra de celulose (NFC) de algodão. ....	102

- Figura 12 - Caracterização das nanofibras de celulose (NFCs) de algodão utilizando espectroscopia Raman..... 103
- Figura 13 - Caracterização das nanofibras de celulose (NFCs) de algodão utilizando espectroscopia de FTIR. .... 104
- Figura 14 – Aspecto visual de suspensão líquida estoque das nanofibras de celulose (NFCs) de algodão ( $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) antes (A) e depois (B) de sonicadas em meio de cultura celular DMEM. .... 105
- Figura 15 - Análise da morfologia celular usando um microscópio óptico invertido. As células-tronco mesenquimais humanas foram incubadas com nanofibras de celulose (NFCs) de algodão por 24 h (a-f), 48 h (g-l) e 72 h (m-r) nas concentrações: 0 (controle veicular) (a, g, m), 0,1 (b, h, n), 1 (c, i, o), 10 (d, j, p), 50 (e, k, q), 100 (f, l, r)  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Ampliação 100x. Barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ . .... 106
- Figura 16 - Viabilidade mitocondrial das células-tronco mesenquimais humanas expostas à diferentes concentrações de nanofibras de celulose (NFCs) de algodão (0,1; 1; 10; 50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) em diferentes tempos 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C) baseado no ensaio de MTT. Os valores estão representados pela média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes ( $p > 0,05$ ). .... 107
- Figura 17 - Proliferação celular das células-tronco mesenquimais humanas expostas às nanofibras de celulose (NFC) de algodão com diferentes concentrações (0,1; 1; 10; 50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) por 24, 48 e 72 h com base no ensaio de MTT. A proliferação foi medida com o ensaio de MTT e os resultados são dados pelas médias de absorção. Os valores estão representados pela média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes ( $p > 0,05$ ), não houve diferença significativa..... 108
- Figura 18 - Análise por citometria de fluxo de células-tronco mesenquimais humanas tratadas com diferentes concentrações de nanofibras de celulose de algodão por 24 h, e depois coradas com iodeto de propídio. O quadrante superior em cada painel mostra a população de células mortas e o quadrante inferior mostra a população de células vivas. FSC-A, *Forward Scatter Signal* (tamanho da célula). PI-585-A, parâmetro de fluorescência para iodeto de propídio. Os valores são as médias  $\pm$  SEM de três experimentos independentes ( $p > 0,05$ ). .... 108

Figura 19 - Análise por citometria de fluxo de células-tronco mesenquimais humanas tratadas com diferentes concentrações de nanofibras de celulose de algodão por 48 h, e depois coradas com iodeto de propídio. O quadrante superior em cada painel mostra a população de células mortas e o quadrante inferior mostra a população de células vivas. FSC-A, *Forward Scatter Signal* (tamanho da célula). PI-585-A, parâmetro de fluorescência para iodeto de propídio. Os valores são as médias  $\pm$  SEM de três experimentos independentes ( $p > 0,05$ ). ..... 109

Figura 20 - Análise por citometria de fluxo de células-tronco mesenquimais humanas tratadas com diferentes concentrações de nanofibras de celulose de algodão por 72h, e depois coradas com iodeto de propídio. O quadrante superior em cada painel mostra a população de células mortas e o quadrante inferior mostra a população de células vivas. FSC-A, *Forward Scatter Signal* (tamanho da célula). PI-585-A, parâmetro de fluorescência para iodeto de propídio. Os valores são as médias  $\pm$  SEM de três experimentos independentes ( $p > 0,05$ ). ..... 109

Figura 21 – O gráfico mostra a porcentagem relativa de células do genótipo indicado nas fases G1, S e G2 do ciclo celular em células-tronco mesenquimais humanas tratadas com diferentes concentrações de nanofibras de celulose de algodão (0, 0,1, 1, 10, 50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) por 24, 48 e 72 h. .... 110

Figura 22 - Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD). As células-tronco mesenquimais humanas foram tratadas com 0; 0,1; 1; 10; 50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de nanofibras de celulose (NFCs) de algodão por 24, 48 e 72 h e então, a atividade de SOD no meio de cultura foi detectada por fluorescência utilizando o kit SOD Assay. Nenhuma diferença ( $p > 0,05$ ) foi encontrada em comparação com o controle não tratado (0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Os resultados estão representados pela média  $\pm$  SEM (barras verticais) de três experimentos independentes realizados em triplicata..... 111

Figura 23 - Expressão relativa (média  $\pm$  SEM) dos transcritos *Heat shock protein family A member 5* (HSPA5), *activating transcription factor 4* (ATF4), *BCL2*, *BCL2 associated X protein* (BAX), e *Death associated protein kinase 1* (DAPK1) em células-tronco mesenquimais humanas incubadas com 0 (grupo controle); 0,1; 1; 10; 50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de nanofibras de celulose (NFCs) de algodão por 48h. Expressão relativa = 1,00 ( $p > 0,05$ ; média  $\pm$  SEM). ..... 112

Figura 24 - Eletroforese em gel de agarose mostrando produtos específicos da PCR em tempo real com o tamanho das bandas esperado para cada gene. "M" representa o marcador de tamanho das bandas de DNA, "0" representa o grupo de controle sem nanofibras de celulose (NFCs) de algodão, "0,1; 1; 10; 50 e 100" representa os grupos tratados com NFC de algodão ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e "Neg" representa o controle negativo (reação sem cDNA)..... 112

Figura 25 - Viabilidade mitocondrial das células-tronco mesenquimais expostas à diferentes concentrações de nanofibras de celulose (NFCs) de algodão (0, 10, 100 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) durante 7, 14 e 21 dias cultivadas em meio basal (A) e em meio de indução osteogênica (B) baseado no ensaio de MTT. Os valores estão representados pela média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes ( $p > 0,05$ )..... 114

Figura 26 – Atividade da Fosfatase Alcalina intracelular das células-tronco mesenquimais humanas expostas à diferentes concentrações de nanofibras de celulose (NFCs) de algodão (0, 10, 100 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) durante 7, 14 e 21 dias cultivadas em meio basal (A) e em meio de indução osteogênica (B). Os valores estão representados pela média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes ( $*p < 0,05$ ). ..... 114

Figura 27 - Imagens representativas por microscopia de luz da coloração von Kossa das células-tronco mesenquimais humanas expostas à diferentes concentrações de NFC de algodão (0, 10, 100 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) por 21 dias em meio basal e em meio indutor osteogênico. Seta branca indica nódulos de mineralização. Ampliação 200x. Barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ . ..... 116

Figura 28 - Imagens representativas por microscopia de luz da coloração com Vermelho de Alizarina S das células-tronco mesenquimais humanas expostas à diferentes concentrações de NFC de algodão (0, 10, 100 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) por 21 dias em meio basal e em meio indutor osteogênico. Ampliação 100x. Barra de escala = 100  $\mu\text{m}$ . ..... 117

Figura 29 - Representação esquemática da metodologia realizada no Capítulo 2. 142

- Figura 30 – Esquema da preparação do filme de quitosana e do nanobiocompósito de nanofibras de celulose/quitosana, contendo  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  de NFC, pela técnica de evaporação de solvente. .... 143
- Figura 31 - Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) do (a) filme de quitosana sem reticular, (b) tripolifosfato de sódio (TPP), (c) filme de quitosana reticulado, (d) nanofibras de celulose de algodão e (e) nanobiocompósito NFC/quitosana reticulado. .... 149
- Figura 32 – Imagens tridimensional da topografia por Microscopia de Força Atômica (AFM) de filmes de quitosana (A) e nanobiocompósito de NFC/quitosana (B). Área de digitalização  $3 \times 3 \mu\text{m}^2$ . Análise de AFM da rugosidade da superfície do filme de quitosana (C) e do nanobiocompósito NFC/quitosana (D). Ra indica a média da rugosidade da superfície. .... 150
- Figura 33 – Percentual de intumescimento do filme de quitosana e do nanobiocompósito NFC/quitosana em solução salina tamponada com fosfato (PBS 1x) em relação ao tempo..... 151
- Figura 34 - Percentual da perda de massa *in vitro* nos tempos de 24, 48 e 72 h em pH 7,4 do filme de quitosana (QT) e do nanobiocompósito NFC/quitosana (QTNFC1000). .... 152
- Figura 35 – (A) Imagens de microscopia de luz de células de rim embrionário humano 293 (HEK293) após 72 h em filme de quitosana e em nanobiocompósito NFC/quitosana. (B) Quantificação da área celular ( $\mu\text{m}^2$ ) para células de cada grupo (média  $\pm$  DP). Os dados foram obtidos a partir de imagens microscópicas de luz e analisados com o software Image J. Letras diferentes significam diferença estatística ( $p < 0,001$ ). .... 152
- Figura 36 - Proliferação celular avaliada pelo ensaio de 3- (4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) após 24 (A) e 72 h (B) de cultura em placa de poliestireno (controle), filme de quitosana e nanobiocompósito de NFC/quitosana. Cada valor representa a média  $\pm$  (SEM) ( $n = 6$ ). Os valores não foram estatisticamente significativos ( $p > 0,05$ ). .... 153



- Figura 37 - Gráfico de dispersão por citometria de fluxo: iodeto de propídio (PI-558-A) *versus* dispersão direta (FSC-A) de células HEK293 após 24 e 72 h em filme de quitosana e em nanobiocompósito NFC/quitosana. Q1 mostra a porcentagem de células não viáveis coradas com iodeto de propídio. Foram analisados 10.000 eventos..... 154
- Figura 38 – Representação esquemática da metodologia realizada no Capítulo 3.171
- Figura 39 - Esquema da preparação do filme de quitosana e dos nanobiocompósitos de nanofibras de celulose/quitosana contendo 10,100 ou 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de NFC pela técnica de evaporação de solvente. .... 172
- Figura 40 – Caracterização por espectroscopia Raman (a) quitosana, (b) NFC de algodão, (c) TPP, (d) Nanobiocompósito NFC/quitosana ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), e (e) Nanobiocompósito NFC/quitosana ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) reticulado com TPP. .... 181
- Figura 41 - Caracterização utilizando espectroscopia de FTIR (a) quitosana (b) NFC de algodão (c) TPP (d) Nanobiocompósito NFC/quitosana ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), e (e) Nanobiocompósito NFC/quitosana ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) reticulado com TPP. .... 182
- Figura 42 - Caracterização por espectroscopia Raman (a) Filme de quitosana, (b) Nanobiocompósito NFC/quitosana ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), (c) Nanobiocompósito NFC/quitosana ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), (d) Nanobiocompósito NFC/quitosana ( $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). .... 183
- Figura 43 - Caracterização utilizando espectroscopia de FTIR do (a) Filme de quitosana, (b) Nanobiocompósito NFC/quitosana ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), (c) Nanobiocompósito NFC/quitosana ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), e (d) Nanobiocompósito NFC/quitosana ( $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). .... 183
- Figura 44 - Imagens de Microscopia de Força Atômica obtidas do (a) filme de quitosana e dos nanobiocompósitos NFC/quitosana contendo diferentes concentrações de NFCs de algodão: (b)  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; (c)  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; (d)  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ . .... 184

- Figura 45 - Imagens de Microscopia de Força Atômica obtidas do nanobiocompósito NFC/quitosana ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ); (a) não reticulado com TPP; (b) e reticulado com TPP. .... 184
- Figura 46 - Percentual de intumescimento do filme de quitosana (QT) e dos nanobiocompósitos NFC/quitosana contendo  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  (QTNFC10),  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  (QTNFC100) ou  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  (QTNFC1000) de NFC de algodão em solução salina tamponada com fosfato (PBS 1x) em relação ao tempo. .... 185
- Figura 47 - Percentual de perda de massa do filme de quitosana (QT) e dos nanobiocompósitos NFC/quitosana contendo  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  (QTNFC10),  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  (QTNFC100) ou  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  (QTNFC1000) de NFC de algodão em solução salina tamponada com fosfato (PBS 1x) em relação ao tempo. .... 186
- Figura 48 - Análise da morfologia celular usando um microscópio óptico invertido. As células-tronco mesenquimais humanas foram cultivadas em contato direto por 24 h com ambos (A) placa de poliestireno (controle negativo) e filme de quitosana; (B) placa de poliestireno e nanobiocompósito NFC/quitosana ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ); (C) placa de poliestireno e nanobiocompósito NFC/quitosana ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ); e (D) placa de poliestireno e nanobiocompósito NFC/quitosana ( $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). A linha preta mostra a divisão dos dois tipos de superfície nos poços; asterisco mostra filme de quitosana (A) e nanobiocompósitos NFC/quitosana  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  (B, C e D, respectivamente). Ampliação 100x. Barra de escala =  $100 \mu\text{m}$ . .... 188
- Figura 49 – Percentual de células-tronco mesenquimais humanas aderidas no filme de quitosana (QT), nos nanobiocompósitos NFC/quitosana contendo  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  (QTNFC10),  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  (QTNFC100) e  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  (QTNFC1000) de NFC de algodão e na placa de poliestireno (PLACA), após 3, 6 e 24 h de plaqueamento. Cada valor representa a média  $\pm$  (SEM) ( $n = 3$ ). Os valores  $p < 0,05$  foram estatisticamente significativos. .... 189
- Figura 50 - Viabilidade mitocondrial das células-tronco mesenquimais humanas cultivadas sobre o filme de quitosana (QT) e sobre os nanobiocompósitos NFC/quitosana contendo  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  (QTNFC10),  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  (QTNFC100) e  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  (QTNFC1000) de NFCs de algodão durante 7, 14 e 21 dias utilizando meio basal (A) e meio de indução osteogênica (B) baseado no ensaio de MTT. Os valores

estão representados pela média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes ( $p > 0,05$ ). ..... 189

Figura 51 - Atividade da Fosfatase Alcalina intracelular em células-tronco mesenquimais humanas cultivadas sobre os filmes de quitosana (QT) e nanobiocompósitos NFC/quitosana contendo  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  (QTNFC10),  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  (QTNFC100) e  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  (QTNFC1000) de NFCs de algodão durante 7, 14 e 21 dias utilizando meio basal (A) e meio de indução osteogênica (B). Os valores estão representados pela média  $\pm$  SEM de dois experimentos independentes ( $*p < 0,05$ ) ..... 190

Figura 52 - Imagens por microscopia de luz da coloração von Kossa das células-tronco mesenquimais humanas cultivadas em contato direto com o filme de quitosana (A e B) e com os nanobiocompósitos NFC/quitosana contendo  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  (C e D),  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  (E e F) e  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  (G e H) por 21 dias em meio basal (A, C, E e G) e em meio de indução osteogênica (B, D, F, H). Ampliação 200x. Barra de escala =  $50 \mu\text{m}$ . ..... 192

Figura 53 - Imagens por microscopia de luz da coloração com Vermelho de Alizarina S das células-tronco mesenquimais humanas cultivadas em contato direto com o filme de quitosana (A e B) e com os nanobiocompósitos NFC/quitosana contendo  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  (C e D),  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  (E e F) e  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  (G e H) por 21 dias em meio basal (A, C, E e G) e em meio de indução osteogênica (B, D, F, H). Ampliação 100x. Barra de escala =  $100 \mu\text{m}$ . ..... 193

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências dos <i>primers</i> usadas para análise de expressão gênica relativa por reação em cadeia da polimerase em tempo real. ....	95
Tabela 2 - Relação entre as expressões de mRNA de BAX / BCL2 em células-tronco mesenquimais humanas expostas a nanofibras de celulose de algodão. ....	113
Tabela 3- Propriedades mecânicas para os nanobiocompósitos .....	187

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{g mL}^{-1}$	Micrograma por mililitro
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrômetro
AFM	Microscopia de Força Atômica
ALP	<i>Alkaline phosphatase</i> "Fosfatase Alcalina"
ANOVA	Análise de variância
APTR	<i>Adenine Phosphoribosyltransferase</i> "Adenina Fosforibosiltransferas"
ATF4	<i>Activating Transcription Factor 4</i>
BAX	<i>BCL2 associated X protein</i>
BCIP	Fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolil
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i> "Linfoma 2 de célula B"
BMP-2	Proteína morfogenética óssea 2
BSP	Sialoproteína óssea
cDNA	DNA complementar ao RNA mensageiro
$\text{cm}^{-1}$	por centímetro
$\text{CO}_2$	Gás Carbônico
Col-1 $\alpha$	Colágeno tipo I alfa
CT	<i>Cycle Threshold</i>
DAPK1	<i>Death Associated Protein Kinase 1</i> "Proteína Quinase 1 Associada à Morte"
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DRX	Difração de Raio X
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
g	Gravidade
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> "
h	Hora
$\text{H}_2\text{O}_2$	Peróxido de hidrogênio
$\text{H}_2\text{SO}_4$	Ácido sulfúrico
HEK293	Linhagem de célula de rim de embrião humano
HSPA5	<i>Heat Shock Protein Family A member 5</i>
kV	Kilovolt
M	Molar
mA	Miliamper
MAPK	Proteíno-quinases ativadas por mitógenos
MEC	Matriz extracelular

MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	Miligrama
mg mL <sup>-1</sup>	Miligrama por mililitro
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
mV	Milivolt
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NBT	Nitro azul tetrazólio
NFC	Nanofibra de celulose
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NM	Nanomaterial
nº	Número
NP	Nanopartícula
° C	Graus Celsius
OCN	Osteocalcina
OPN	Osteopontina
OSX	Osterix
p/v	Peso por volume
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Iodeto de propídio
PZ	Potencial Zeta
Ra	Rugosidade média
RB1	<i>Retinoblastoma protein</i> "Proteína Retinoblastoma"
REST	<i>Relative Expression Software Tool</i>
RNA <sub>m</sub>	Ácido Ribonucleico mensageiro
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	PCR semi-quantitativa
RT-qPCR	PCR em tempo real
s	Segundos
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SEM	Erro padrão da média
SFB	Soro fetal bovino
SOD	Superóxido Dismutase
SPP1	<i>Secreted phosphoprotein 1</i>
TBE	tris-borato-EDTA
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
TPP	Tripolifosfato de sódio

U mL <sup>-1</sup>	Unidade por mililitro
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UV	Ultravioleta
V	Volts
v/v	Volume por volume
WST	<i>Water-soluble tetrazolium salt</i>
α	Alfa
β	Beta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>27</b>
<b>1.1 NANOBIOTECNOLOGIA .....</b>	<b>28</b>
<b>1.2 NANOFIBRAS DE CELULOSE (NFCs).....</b>	<b>29</b>
<b>1.3 NANOTOXICIDADE .....</b>	<b>33</b>
<b>1.3.1 TÉCNICAS DE AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE .....</b>	<b>34</b>
<b>1.3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOMATERIAIS .....</b>	<b>37</b>
<b>1.3.3 CULTURA DE CÉLULAS <i>IN VITRO</i> COMO MODELO PARA AVALIAÇÃO DA NANOTOXICIDADE .....</b>	<b>39</b>
<b>1.4 NFC APLICADA A ENGENHARIA DE TECIDOS.....</b>	<b>42</b>
<b>1.4.1 DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO INDUZIDA POR NANOMATERIAS .....</b>	<b>44</b>
<b>1.4.2 DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA .....</b>	<b>47</b>
<b>1.4.3 TECIDO ÓSSEO .....</b>	<b>49</b>
<b>1.4.4 MINERALIZAÇÃO ÓSSEA .....</b>	<b>51</b>
<b>1.4.5 NANOBIOCOMPÓSITOS .....</b>	<b>52</b>
<b>1.5 OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>56</b>
<b>1.6 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>57</b>
<b>2. CAPÍTULO 1: PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOFIBRAS DE CELULOSE (NFCs) DE ALGODÃO E ANÁLISE DA CITOCOMPATIBILIDADE E INDUÇÃO DE DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS .....</b>	<b>85</b>
<b>2.1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>85</b>
<b>2.2 OBJETIVOS .....</b>	<b>87</b>
<b>2.2.1 OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>87</b>
<b>2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>87</b>
<b>2.3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>88</b>
<b>2.3.1 OBTENÇÃO DAS NFCs DE ALGODÃO .....</b>	<b>88</b>
<b>2.3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NFCs DE ALGODÃO .....</b>	<b>89</b>
<b>2.3.2.1 ANÁLISE DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO .....</b>	<b>89</b>
<b>2.3.2.3 ANÁLISE DE DIFRAÇÃO POR RAIOS X (DRX) .....</b>	<b>90</b>
<b>2.3.3 CULTURA CELULAR <i>IN VITRO</i>.....</b>	<b>91</b>
<b>2.3.4 AVALIAÇÃO DA CITOCOMPATIBILIDADE .....</b>	<b>92</b>



2.3.5 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA .....	98
2.3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	101
2.4 RESULTADOS .....	102
2.4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NFCs DE ALGODÃO .....	102
2.4.2 EFEITO DAS NFCs DE ALGODÃO NA MORFOLOGIA E VIABILIDADE CELULAR .....	105
2.4.3 ANÁLISE DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO .....	110
2.4.4 ESTADO ANTIOXIDANTE DAS CÉLULAS EXPOSTAS À NFC DE ALGODÃO .....	110
2.4.5 MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM CÉLULAS EXPOSTAS ÀS NFCs DE ALGODÃO .....	111
2.4.6 CAPACIDADE DE DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA DAS CÉLULAS EXPOSTAS ÀS NFCs DE ALGODÃO .....	113
2.5 DISCUSSÃO .....	118
2.6 CONCLUSÃO .....	125
2.7 REFERÊNCIAS .....	126
3. CAPÍTULO 2: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CITOCOMPATIBILIDADE DO NANOBIOCOMPÓSITO DE NANOFIBRA DE CELULOSE DE ALGODÃO/QUITOSANA EM CÉLULAS HEK293 .....	138
3.1 INTRODUÇÃO .....	138
3.2 OBJETIVOS .....	141
3.2.1 OBJETIVO GERAL .....	141
3.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	141
3.3 MATERIAL E MÉTODOS .....	142
3.3.1 PREPARAÇÃO DOS FILMES DE QUITOSANA E NANOBIOCOMPÓSITOS NFC/QUITOSANA .....	142
3.3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOBIOCOMPÓSITOS NFC/QUITOSANA	144
3.3.3 AVALIAÇÃO DA CITOCOMPATIBILIDADE .....	146
3.3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	148
3.4 RESULTADOS .....	149
3.4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOBIOCOMPÓSITOS NFC/QUITOSANA	149
3.4.2 INTUMESCIMENTO E DEGRADAÇÃO DO NANOBIOCOMPÓSITO NFC/QUITOSANA .....	151
3.4.3 ESTUDOS DE CITOCOMPATIBILIDADE .....	152

<b>3.5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>155</b>
<b>3.6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>158</b>
<b>3.7 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>159</b>
<b>4. CAPÍTULO 3: ANÁLISE DE CITOCOMPATIBILIDADE E BIOATIVIDADE DE NANOBIOCOMPÓSITOS CONTENDO NFCs DE ALGODÃO NO CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS</b> .....	<b>168</b>
<b>4.1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>168</b>
<b>4.2 OBJETIVOS</b> .....	<b>170</b>
<b>4.2.1 OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>170</b>
<b>4.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>170</b>
<b>4.3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>171</b>
<b>4.3.1 PREPARAÇÃO DOS FILMES DE QUITOSANA E NANOBIOCOMPÓSITOS NFC/QUITOSANA</b> .....	<b>171</b>
<b>4.3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOBIOCOMPÓSITOS CONTENDO NFCs DE ALGODÃO E QUITOSANA</b> .....	<b>173</b>
<b>4.3.3 AVALIAÇÃO DE CITOCOMPATIBILIDADE DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS NOS NANOBIOCOMPÓSITOS NFC/QUITOSANA</b>	<b>176</b>
<b>4.3.4 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA</b> .....	<b>178</b>
<b>4.3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	<b>180</b>
<b>4.4 RESULTADOS</b> .....	<b>181</b>
<b>4.4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOBIOCOMPÓSITOS NFC/QUITOSANA</b>	<b>181</b>
<b>4.4.2 INTUMESCIMENTO E DEGRADAÇÃO DO NANOBIOCOMPÓSITO NFC/QUITOSANA</b> .....	<b>185</b>
<b>4.4.3 PROPRIEDADES REOLÓGICAS</b> .....	<b>186</b>
<b>4.4.4 AVALIAÇÃO DA CITOCOMPATIBILIDADE</b> .....	<b>187</b>
<b>4.4.5 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA</b> .....	<b>190</b>
<b>4.5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>194</b>
<b>4.6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>199</b>
<b>4.7 PERSPECTIVAS</b> .....	<b>200</b>
<b>4.8 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>201</b>
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS</b> .....	<b>208</b>
<b>APÊNDICE A</b> .....	<b>209</b>
<b>APÊNDICE B</b> .....	<b>210</b>
<b>APÊNDICE C</b> .....	<b>211</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Na última década os avanços da nanobiotecnologia impulsionaram o desenvolvimento de novos nanobiomateriais aplicados a área biomédica. Isso foi possível, pois quando as dimensões dos materiais encontram-se na escala nanométrica, as propriedades físicas e químicas passam a ser diferentes das observadas no mesmo material quando comparado ao seu tamanho micro ou macro (BOONRUNGSIMAN et al., 2017; ZAMANI et al., 2017). Essas novas propriedades tem sido exploradas em áreas emergentes da medicina conhecidas como medicina regenerativa e engenharia de tecidos (GAO et al., 2017; HILL; MAHMOUDI; ABADI, 2019).

Os nanomateriais (NMs) possuem características biomiméticas, propriedades biológicas e mecânicas especiais que os credenciam a induzirem a diferenciação celular de células-tronco em vários tipos celulares como muscular, cartilagem, neuronal, ósseo, dentre outras (AMARAL et al., 2019; NGUYEN et al., 2017; ZHANG et al., 2018a, 2018b). As nanofibras de celulose (NFCs), derivadas da biomassa renovável, são uma das classes mais importantes de NMs naturais, com um enorme potencial de aplicação na biomedicina. Devido às suas propriedades mecânicas excepcionalmente altas (alta resistência específica), alta área de superfície, (LOKANATHAN et al., 2017) e características similares a componentes da matriz extracelular (BHAT et al., 2017; NGUYEN et al., 2017), as NFCs podem ser utilizadas como material bioativo e de reforço para compósitos poliméricos aplicados a cultura e diferenciação de células-tronco.

Por outro lado, há uma preocupação com as questões de saúde humana e ambiental que impulsionaram pesquisas com novos NMs renováveis e biocompatíveis obtidos a partir de recursos naturais (MUNK et al., 2016, 2017). Portanto, o uso das NFCs requer, em primeiro lugar, uma melhor compreensão de seus efeitos, incluindo possíveis impactos à saúde humana quando utilizados em aplicações biomédicas.

A hipótese desse trabalho é que as NFCs são citocompatíveis quando em contato com as células-tronco mesenquimais humanas e quando utilizadas como componentes de nanobiocompósitos induzem a proliferação e diferenciação osteogênica.

## 1.1 NANOBIOTECNOLOGIA

O prefixo "Nano" deriva da palavra grega *nanos* que significa anão. Nas últimas décadas, a nanotecnologia surgiu como uma ferramenta multidisciplinar, a fim de aprimorar produtos existentes e gerar novas tecnologias de alto desempenho para pesquisa e indústria utilizando dispositivos em escala nanométrica que possuem pelo menos uma de suas dimensões entre 1 e 100 nm (Figura 1) (JAIN, 2008; THIMIRI GOVINDA RAJ; KHAN, 2016).

Devido ao número de dimensões, os NMs podem apresentar diferentes formas: nanopartículas com as três dimensões inferiores a 100 nm, nanofilmes com apenas uma dimensão inferior a 100 nm e as nanofibras que apresentam duas dimensões inferiores a 100 nm (BYSTRZEJEWSKA-PIOTROWSKA; GOLIMOWSKI; URBAN, 2009).

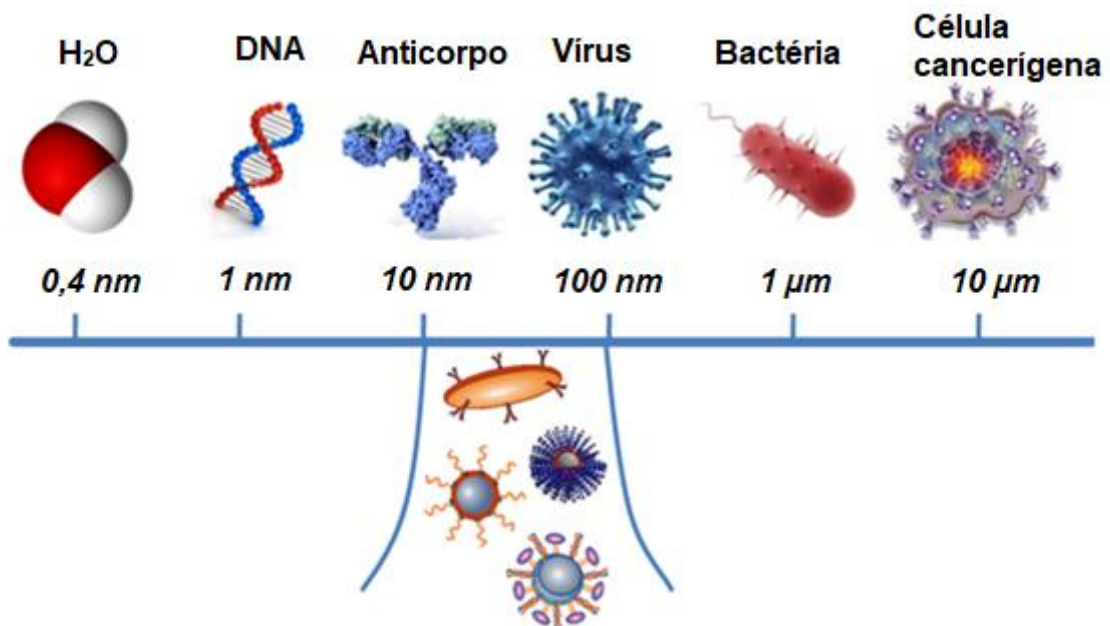


Figura 1 - Escala nanométrica dos materiais quando comparados com biomoléculas. Fonte: Adaptado de: Belyanina et al. (2017)

Os materiais na faixa de tamanho nanométrico ocorrem tanto na natureza liberados nas queimadas e emissões vulcânicas, quanto como resultado de processos

industriais tais como nos processos de refinação, soldadura, produção de alimentos ou combustão de automóveis. No entanto, novos NMs e nanoestruturas vêm sendo manufaturados de forma intencional pelo homem com propriedades físico-químicas relacionadas à aplicação final do produto (BUZEA; PACHECO; ROBBIE, 2007; FARRÉ et al., 2009; ROBLES-GARCÍA et al., 2016).

Os NMs podem ser sintetizados por duas técnicas convencionais: *top down* ou métodos de cima para baixo e *bottom-up* ou métodos de baixo para cima. No método *top down* as estruturas maiores são diminuídas continuamente de tamanho, até chegarem a dimensões nanométricas. Os métodos *bottom-up* utilizam vários processos químicos, físicos e conjugados para organizar os átomos e produzir os NMs. Durante o processo de fabricação, o arranjo de átomos e moléculas dos NMs é modificado visando obter um produto final mais barato, preciso e adequado (CHEN et al., 2013; SABA; JAWAID, 2017).

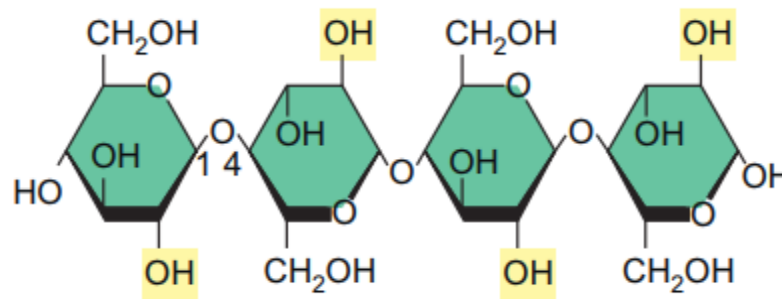
O uso da nanotecnologia associada à sistemas biológicos resultou na emergência da nanobiotecnologia (ZAMANI et al., 2017). O crescimento do uso da nanotecnologia na área da saúde é resultado da identificação de muitas propriedades únicas dos NMs, tais como características magnéticas, catalíticas, óticas, elétricas e mecânicas (JORFI; FOSTER, 2015; LI; ZHAO; LIU, 2013), com objetivo de prevenir, diagnosticar ou tratar doenças (CHANG et al., 2015; JULIANO, 2013). Essas novas propriedades e fenômenos dos materiais na escala atômica e molecular podem ser controlados para novos usos que não eram possíveis com os mesmos materiais na sua escala original.

Além disso, à medida que são feitos avanços na nanobiotecnologia, também estão sendo alcançados progressos no desenvolvimento de NMs biodegradáveis ou recicláveis para garantir seu uso seguro e sustentável (CHANG et al., 2015).

## 1.2 NANOFIBRAS DE CELULOSE (NFCs)

A celulose é um dos principais polímeros estruturais das paredes celulares das plantas (ABDUL KHALIL et al., 2014), sendo o polímero natural mais abundante e renovável do mundo, com aproximadamente 10<sup>9</sup> toneladas produzidas anualmente

(URRUZOLA et al., 2014). É um polissacarídeo semicristalino composto de monômeros  $\alpha$ -D-glicopiranosose ligados por ligações glicosídicas 1-4- $\beta$  com unidades de glicose alternadas, como mostrado na Figura 2. Devido à alta intensidade dos grupos hidroxila ao longo do esqueleto, formam-se as redes estendidas de ligações de hidrogênio (ligações intra e intermoleculares), consequentemente, duas regiões estruturais podem ser encontradas: a região cristalina e a região amorfa (MAHFOUDHI; BOUFI, 2017).



**Figura 2 - Molécula de celulose: ligação 1-4 dos monômeros  $\beta$  glicose. Adaptados de: Saba; Jawaid (2017).**

Com o desenvolvimento da nanotecnologia, as NFCs receberam mais atenção entre os pesquisadores (GARCÍA et al., 2016). O termo nanocelulose tem sido amplamente utilizado para descrever NMs à base de celulose, tendo pelo menos uma dimensão na escala nanométrica, ou seja, com 1 a 100 nm de diâmetro e o comprimento podendo estar na escala micrométrica variando de 100 nm a 2,1  $\mu$ m (ABDUL KHALIL et al., 2014; AZIZI SAMIR; ALLOIN; DUFRESNE, 2005; KLEMM et al., 2011).

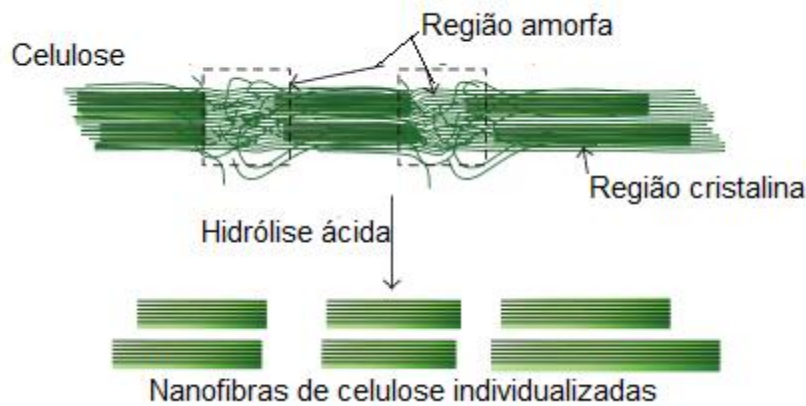
A nanocelulose pode ser dividida em três tipos diferentes com base em suas dimensões, funções e métodos de preparação, que por sua vez dependem principalmente da fonte da celulose e das condições de processamento, resultando em partículas com variadas cristalinidades, superfície química e propriedades mecânicas (ABDUL KHALIL et al., 2014; ABITBOL et al., 2016; NASIR et al., 2017). Essas três categorias incluem a celulose bacteriana, que é produzida por bactérias (por exemplo a bactéria *Gluconacetobacter xylinus*) (MOREIRA et al., 2009); os

nanocristais de celulose, também conhecidos como celulose nanocristalina ou *nanowhiskers* de celulose, que apresentam tanto o comprimento quanto o diâmetro em dimensões nanométricas; e as nanofibras de celulose (NFCs), também conhecidas como nanocelulose fibrilada, que possuem diâmetro de 1 a 100 nm e comprimento em até alguns micrômetros (EICHHORN et al., 2010; NASIR et al., 2017).

As NFCs apresentam domínios cristalinos separados por regiões amorfas menos ordenadas (LEE et al., 2014). As proporções dos domínios cristalinos e amorfos variam de acordo com a fonte de extração e o método de obtenção das NFCs de modo que as propriedades mecânicas dessas nanofibras são diferentes umas das outras (ABITBOL et al., 2016; BECK; BOUCHARD, 2014; GARCÍA et al., 2016).

As NFCs podem ser extraídas de diversas fontes renováveis como o algodão (MUNK et al., 2015), a palma (FAHMA et al., 2011), o bambu (YU et al., 2012) e a palha de arroz (LU; HSIEH, 2012), através de uma ampla variedade de métodos de obtenção, incluindo tratamento químico, tratamento enzimático e tratamento mecânico. O pré-tratamento de fibras de celulose ou uma combinação de dois ou mais métodos é tipicamente usado para obter as características desejadas desse NM (ABDUL KHALIL et al., 2017).

A hidrólise ácida, relatada pela primeira vez em 1947 (NICKERSON; HABRLE, 1947), é o método *top-down* com tratamento químico mais utilizado para obtenção das NFCs (BHAT et al., 2017). A hidrólise ácida (Figura 3) facilita o processo mecânico removendo regiões amorfas das fibras de celulose e aumenta a cristalinidade das fibras (ABDUL KHALIL et al., 2017). No processo de hidrólise ácida, o íon de hidrogênio entra nas regiões amorfas das cadeias de celulose e promove a clivagem hidrolítica das ligações glicosídicas. Um tratamento mecânico para dispersão de NFC, como a sonicação, pode ser necessário para evitar a aglomeração (NASIR et al., 2017). O ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) é o ácido mais comum usado para esse fim (BHAT et al., 2017).



**Figura 3 - Esquema mostrando a hidrólise ácida da celulose. Adaptado de: Lee et al. (2014).**

Entre os diferentes tipos de NMs, as NFCs de algodão têm atraído uma atenção especial por serem conhecidas como materiais de celulose de alta pureza, pois seu teor de celulose é superior em relação às fibras lignocelulósicas, além de serem abundantes e renováveis (CHEN et al., 2014).

A NFC pode ser aplicada em diversas áreas devido às suas características únicas, como sustentabilidade, biodegradabilidade (quando liberada no ambiente), baixa densidade (aproximadamente  $1,566 \text{ g cm}^{-3}$ ), disponibilidade abundante e baixo custo. Além disso, a dimensão nanoscópica da celulose possui uma relação superfície-volume muito grande, alto módulo de elasticidade, alta resistência à tração, alta rigidez, flexibilidade e boas propriedades térmicas, elétricas e ópticas (BHAT et al., 2017; FLAUZINO NETO et al., 2013; SILVÉRIO et al., 2013).

Além de apresentarem suas propriedades físicas, químicas e mecânicas únicas, oferecem sítios de adesão celular e exibem propriedades semelhantes às fibras do colágeno com direcionamento, importantes na proliferação, migração e diferenciação celular (JORFI; FOSTER, 2015; MATHEW et al., 2012; POOYAN et al., 2013).

As NFCs podem ser aplicadas em cosméticos (TIDJARAT et al., 2014), liberação de fármacos (BHANDARI et al., 2017) e aplicações clínicas, especialmente na engenharia de tecidos e na medicina regenerativa (AO et al., 2017; PARK et al., 2015). Devido a essas várias aplicações, o mercado global de NFCs deverá registrar um tamanho de mercado em termos do valor de US\$ 661,3 milhões até 2023 (MARKETSANDMARKETS, 2019).



### 1.3 NANOTOXICIDADE

A nanotoxicologia foi proposta como um ramo da toxicologia para preencher as lacunas no conhecimento e abordar, especificamente, os potenciais efeitos adversos à saúde e ao meio ambiente causados pelos NMs (HUSSAIN et al., 2015; KHAN; FULEKAR; PATHAK, 2015).

Os rápidos avanços na nanobiotecnologia tiveram um grande impacto em áreas como eletrônica, agricultura e medicina (D'MELLO et al., 2017; KAH et al., 2018; PAN et al., 2018), e conseqüentemente aumentou a exposição humana aos NMs por diferentes vias como inalação, ingestão, absorção pela pele e injeção (NEL et al., 2014; OBERDÖRSTER et al., 2015; OBERDÖRSTER; OBERDÖRSTER; OBERDÖRSTER, 2005). O número emergente de produtos contendo NMs leva à preocupações quanto ao potencial risco para a saúde humana após a exposição do consumidor (GODWIN et al., 2015; VANCE et al., 2015).

O estudo da toxicidade dos NMs não apenas fornece dados para a avaliação da segurança de nanoestruturas e nanodispositivos projetados, mas também ajuda a avançar no campo da nanomedicina, fornecendo informações sobre as propriedades indesejáveis dos NMs e os meios para evitá-las (JOHNSTON et al., 2013; RADOMSKA; LESZCZYSZYN; RADOMSKI, 2016; RYCROFT et al., 2018). Assim a nanotoxicologia é importante para o desenvolvimento de uma nanotecnologia segura e sustentável.

As mesmas propriedades que tornam os NMs únicos, como dimensões em nanoescala, grande área de superfície e forma particular, podem contribuir para seu perfil toxicológico (HUSSAIN et al., 2015; IVASK et al., 2014), uma vez que aumenta sua interação com tecidos biológicos (BUERKI-THURNHERR et al., 2018; HOUGAARD et al., 2015). A nanotoxicologia engloba desde os estudos das características físico-químicas, até os aspectos de interação dos NMs com sistemas biológicos. Além disso, está envolvida na elaboração de protocolos confiáveis, robustos, reprodutíveis e com dados confiáveis para investigação dos possíveis riscos humanos e ambientais causados pelos NMs (D'MELLO et al., 2017; LEWINSKI; COLVIN; DREZEK, 2008).

O potencial de resposta biológica significativa em cada via de exposição requer investigação. A atividade biológica depende de muitos parâmetros dos NMs

incluído tamanho, forma, química, cristalinidade, propriedades da superfície (área, porosidade, carga, modificações da superfície), estado de aglomeração, biopersistência e dose (FALAGAN-LOTSCH; GRZINCIC; MURPHY, 2016; HUSSAIN et al., 2015; OBERDÖRSTER; OBERDÖRSTER; OBERDÖRSTER, 2005). Nesse contexto, iniciativas de pesquisas regulatórias tem surgido para estabelecer normas legislativas que possibilitem o desenvolvimento e a aplicação segura de NMs (JANTUNEN et al., 2018).

A celulose em nanoescala apresenta morfologia em forma de fibras que tem sido associada aos efeitos adversos de outros NMs fibrosos (BOONRUNGSIMAN et al., 2017; SHARMA et al., 2016). Até o momento, pouco se sabe sobre como os NMs fibrosos se comportam quando em contato com células de mamíferos. Estudos atuais sobre os efeitos toxicológicos das NFCs ainda são escassos. Alguns estudos sobre a citotoxicidade das NFCs de algodão foram previamente relatados em células de mamíferos, por exemplo, células pulmonares humanas (CLIFT et al., 2011), células de fibroblastos bovinos (PEREIRA et al., 2013a), enquanto outras foram testadas em embriões bovinos (MUNK et al., 2016).

No entanto, a maioria dos estudos em nanotoxicologia tem sido realizada usando linhagens celulares diferenciadas. Enquanto alguns mecanismos tóxicos podem ser universais, outros podem variar de uma maneira específica de cada tipo celular (BONDARENKO et al., 2013; HANSJOSTEN et al., 2018). Portanto, torna-se necessário a avaliação de diferentes tipos celulares, incluindo células indiferenciadas, para a elucidação dos possíveis riscos do uso de NFCs.

### **1.3.1 TÉCNICAS DE AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE**

Com o crescente interesse no potencial de toxicidade, os efeitos adversos dos NMs produzidos são intensamente investigados por diferentes mecanismos *in vitro* ou *in vivo*.

Os sistemas de modelos *in vitro* utilizando linhagens celulares já estabelecidas são extremamente relevantes e importantes e fornecem um meio rápido e eficaz para avaliar a toxicidade dos NMs (LAI, 2017). Eles também permitem o desenvolvimento de avaliações por mecanismos padronizados e fornecem

informações refinadas sobre como os NMs interagem com as células humanas de várias maneiras. Pela exposição de culturas celulares a determinado NM de interesse é possível estabelecer relações de dose e efeito nas células. Esses ensaios são adequados para evitar a necessidade de grandes quantidades de testes *in vivo* já que um número cada vez maior de novos NMs são produzidos (CIAPPELLANO et al., 2016; COHEN et al., 2014).

Ensaio clássico de toxicidade *in vitro* são utilizados para determinar a viabilidade e citotoxicidade em células cultivadas. Estes ensaios relativamente simples utilizam corantes colorimétricos ou fluorescentes como marcadores para determinar a viabilidade celular avaliando a integridade da membrana utilizando, por exemplo, a citometria de fluxo ou avaliando o metabolismo celular pelo ensaio de MTT (brometo 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio) (LI et al., 2015a; MONTEIRO-RIVIERE; INMAN; ZHANG, 2009). O ensaio de MTT é um teste colorimétrico que determina os efeitos intracelulares prejudiciais nas mitocôndrias e na atividade metabólica que podem ser causados por NMs (CIAPPELLANO et al., 2016).

Estudos mostram que NMs de vários tamanhos e várias composições químicas podem atingir preferencialmente as mitocôndrias (FOLEY et al., 2002; LI et al., 2003; SAVIĆ et al., 2003; YANG et al., 2016). Como as mitocôndrias são organelas redox ativas, há uma probabilidade de alterar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e, assim, sobrecarregar ou interferir nas defesas antioxidantes celulares (LI et al., 2015a). Portanto, o estresse oxidativo é um mecanismo comum de dano celular induzido por NMs (ANSPACH et al., 2016; PEREIRA et al., 2013a).

Entretanto, as células também apresentam um sistema de defesa antioxidante para combater as EROs, seja diretamente por interceptação ou indiretamente através da reversão do dano oxidativo (ARORA; RAJWADE; PAKNIKAR, 2012; DAYEM et al., 2017). A enzima superóxido dismutase (SOD) converte o radical superóxido altamente reativo no peróxido menos reativo ( $H_2O_2$ ), que também pode ser destruído (STAHL et al., 1998). Um dos métodos mais utilizados para medir a atividade da SOD é um ensaio colorimétrico usando xantina oxidase que converte o corante tetrazólio solúvel em água (WST-1) (2- (4-Iodofenil) - 3- (4-nitrofenil) -5- (2,4-dissulfofenil) - 2tetrazólio, sal monossódico) em formazan. A taxa de redução com um ânion superóxido está diretamente relacionada à atividade da xantina oxidase e é inibida pela SOD (YANG et al., 2009).

A viabilidade das células pode ser determinada por citometria de fluxo, adicionando um corante de ligação ao DNA, como o iodeto de propídio (PI), em uma concentração relativamente baixa a uma população de células (ADAN et al., 2017). O PI é uma molécula fluorescente, de elevado peso molecular, que cora o núcleo celular desde que a membrana celular esteja permeável. Não sendo possível sua penetração em células intactas e em células apoptóticas que não apresentam alterações da permeabilidade da membrana, ou seja, marca as células em estágios finais da apoptose (BENDALE; BENDALE; PAUL, 2017).

Além da apoptose, existem outras formas de morte celular, como por exemplo a morte celular dependente de autofagia e a necrose. A autofagia é um processo conservado que fornece componentes do citoplasma aos lisossomos para degradação. Embora originalmente identificada como um mecanismo de sobrevivência celular, a autofagia desempenha papéis altamente específicos ao contexto na mediação da morte celular (DENTON; KUMAR, 2019).

A distinção entre necrose e apoptose é devida em parte a diferenças na forma como a membrana plasmática participa desses processos. Na necrose, a perda precoce da integridade da membrana plasmática permite um influxo de íons extracelulares e líquidos, com aumento do volume da célula e de suas organelas. Na apoptose, a integridade da membrana plasmática persiste até o final do processo, além de ocorrer a condensação da cromatina, a fragmentação nuclear e a formação de bolhas na membrana plasmática (HOTCHKISS et al., 2009).

A avaliação da expressão gênica pode determinar quais vias celulares são alteradas pela exposição a NMs e estudar esses mecanismos no nível molecular (FALAGAN-LOTSCH; GRZINCIC; MURPHY, 2016; SNYDER-TALKINGTON et al., 2015). Para investigar possíveis alterações na expressão gênica em células causadas por NMs, alguns genes são utilizados, como biomarcadores de ciclo celular, apoptose e estresse (ANSPACH et al., 2016; FALAGAN-LOTSCH; GRZINCIC; MURPHY, 2016; SAHU, 2016).

Os genes HSPA5 (*Heat shock protein family A member 5*) e ATF4 (*activating transcription factor 4*), são exemplos de genes que podem ser modulados pela exposição à NMs e estão envolvidos na regulação da autofagia por estresse do retículo endoplasmático (LIU et al., 2019a; SUSHMA et al., 2018).

A família de genes BCL2 desempenha um importante papel na regulação da apoptose (ALARIFI et al., 2017). O gene BAX (*BCL2 associated X protein*), é

membro da família BCL2, pró-apoptótico e está envolvido na apoptose quando as células estão sob estresse. O gene BCL2 (*B-cell lymphoma 2*) é um gene anti-apoptótico e classificado como oncogene (COSENTINO; GARCÍA-SÁEZ, 2017). Quando um fator, como por exemplo a exposição à NMs, induz as células à morte, o gene BAX é sobre-regulado e desempenha um papel importante nessa via, o BCL2 também é sobre-regulado, mas essa proteína inibe a apoptose nas células, portanto, quando as células estão sob estresse, o balanço da expressão desses dois genes determina se as células entrarão ou não em apoptose (PEREIRA et al., 2013b). Dessa forma, a razão BAX/BCL2 é importante na expressão desses genes, quando essa razão é maior do que 1, as células entram em apoptose, e quando menor que 1 as células se mantêm vivas (AHMADIAN et al., 2017).

O gene DAPK1 (*Death associated protein kinase 1*) é um importante regulador de morte celular e da autofagia (GADE et al., 2014). Além disso, é um mediador de vias pró-apoptóticas e, também, está envolvido em múltiplos processos de morte celular induzidos por NMs (LI et al., 2018).

Estudos mostram que os NMs podem afetar a expressão gênica de células de mamíferos (ASARE et al., 2016; POPOV; POPOVA; IRINA I. SELEZNEVA, AZAMAT Y. AKKIZOV, 2016). Entretanto, ainda são escassos estudos sobre como os NMs podem alterar a expressão gênica de células humanas (FALAGAN-LOTSCH; GRZINCIC; MURPHY, 2016; VAN DER ZANDE et al., 2016) e, para NFC, inexistentes em células-tronco mesenquimais humanas.

### **1.3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOMATERIAIS**

O tamanho, a morfologia e a composição são parâmetros críticos para a bioatividade do NM, mas é difícil determinar qual propriedade desempenha um papel essencial nas interações biológicas quando se trata de vários tipos de NMs (JEMEC et al., 2016; MU et al., 2014), por isso é de extrema importância a caracterização para conhecer bem o NM utilizado e seus possíveis efeitos toxicológicos.

Muitos estudos começaram a ser feitos para investigar os possíveis efeitos dos NMs com diferentes tamanhos, formas e superfícies químicas na citotoxicidade e regulação gênica (ATHA et al., 2017; CHITHRANI; CHAN, 2007; CHITHRANI;

GHAZANI; CHAN, 2006; CHO et al., 2009; XUN et al., 2017; ZHAO et al., 2014). A exposição aos NMs induz diferentes efeitos toxicológicos dependendo das linhagens celulares (LAHIANI et al., 2017; MAHAPATRA et al., 2017; YANG et al., 2009). Estudos *in vitro* demonstraram que a exposição à celulose nanocristalina e nanofibrilada não causaram a morte celular nem citotoxicidade em diferentes tipos de células de mamíferos, como por exemplo células endoteliais e epiteliais humanas e epiteliais, fibroblastos e macrófagos de rato (DONG et al., 2012; NI et al., 2012; YANG et al., 2013b). Enquanto outros relataram uma redução significativa na viabilidade celular em células de mamíferos, como células pulmonares humanas e fibroblastos bovinos (CLIFT et al., 2011; PEREIRA et al., 2013a). Assim, para garantir a aplicação segura principalmente em aplicações biomédicas, as propriedades dos NMs devem ser avaliadas.

Os NMs podem ser caracterizados por diversas técnicas (SABA; JAWAID, 2017). As técnicas microscópicas incluem microscopias óptica, eletrônica e sonda de varredura. Especificamente, as técnicas mais utilizadas para a caracterização dos NMs são microscopia eletrônica de transmissão (MET), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (AFM), que possuem resolução de escala subnanométrica. Além da obtenção de imagem, esses métodos são aplicados para determinar agregação, dispersão, tamanho, estrutura e forma dos NMs (FARRÉ et al., 2009; LIN et al., 2014a).

O potencial elétrico na superfície de cisalhamento é chamado de potencial Zeta, que é geralmente determinado pela medição da velocidade das espécies carregadas em direção ao eletrodo na presença de um campo elétrico externo através da solução da amostra (PONS et al., 2006; SAPSFORD et al., 2011). O potencial Zeta com um valor de  $\pm 30$  mV é geralmente escolhido para inferir a estabilidade de partículas, através do qual o valor em módulo superior a 30 mV indica uma condição estável, enquanto um potencial Zeta inferior a 30 mV em módulo indica uma condição de instabilidade, agregação, coagulação ou floculação (SAPSFORD et al., 2011).

A carga superficial dos NMs pode ser determinada com auxílio da técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) (OH; PARK, 2014). Dependendo de como o NM pode estar carregado, as formas de interação com as células se alteram (WALKEY et al., 2012). A carga superficial dos NMs tem influência sobre a captação celular que é conduzida principalmente por interações eletrostáticas. Os NMs neutros e aniônicos são menos eficientemente internalizados do que os catiônicos, porque a

membrana celular é normalmente carregada negativamente (MAO; ZHOU; GAO, 2013).

A caracterização estrutural de NMs pode ser feita utilizando as técnicas de Espectroscopia Raman e Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), que fornecem informações a nível molecular sobre as características estruturais e composicionais dos NMs (AHLINDER et al., 2013; BANDYOPADHYAY et al., 2012). Na espectroscopia Raman, um laser é utilizado para irradiar a amostra com radiação monocromática e os fótons perdem um pouco de energia relativa à energia excitante para as coordenadas vibracionais específicas da amostra, portanto, para observar as bandas, a vibração molecular deve causar uma mudança na polaridade (ZARE et al., 2019). A Espectroscopia FTIR mede a vibração e rotação de moléculas influenciadas pela radiação infravermelha em um comprimento de onda específico. Essa técnica permite a identificação de alterações estruturais na ligação molecular entre diferentes compostos, que podem fornecer informações sobre a natureza de suas interações (FAGHIHZADEH et al., 2016).

Técnicas de caracterização são fundamentais para garantir a segurança de uso dos NMs nas mais diversas áreas, incluindo a biomédica. Particularmente, é necessário caracterizar o NM destinado ao uso terapêutico utilizando um conjunto de técnicas adequadas para potencial uso na engenharia de tecidos (LIN et al., 2014a).

### **1.3.3 CULTURA DE CÉLULAS *IN VITRO* COMO MODELO PARA AVALIAÇÃO DA NANOTOXICIDADE**

O uso de células como modelos de toxicidade *in vitro* colabora para a redução do uso de animais em estudos *in vivo*, bem como tem o potencial de aumentar a compreensão da base molecular da toxicidade, em pesquisas farmacêuticas e médicas e em estudos pré-clínicos aprimorados para prever a resposta biológica e os riscos ambientais (LIU et al., 2013).

Para avaliação *in vitro* dos possíveis efeitos adversos dos NMs, devem ser utilizados sistemas de teste representativos, como células primárias, células imortalizadas ou células-tronco. As células primárias são aquelas que desprendem do tecido, porém não são facilmente obtidas e não podem ser mantidas em cultura *in vitro*

por períodos prolongados (HANDRAL et al., 2016), porém apresentam maior similaridade ao tecido original e menor variação cromossômica. Linhagens celulares imortalizadas, são linhagens celulares transformadas e têm várias vantagens sobre as células primárias, como a capacidade de proliferar praticamente indefinidamente, a relação custo-benefício, a facilidade de manuseio e não há restrições éticas associadas ao uso de tecidos animais ou humanos (ACHILLI; CIANA; MINETTI, 2018). Entretanto, as linhagens imortalizadas podem apresentar variações cromossômicas após longos períodos de cultura *in vitro* (HUGHES et al., 2007). A linhagem celular 293 derivada de rim embrionário humano (HEK) é um tipo de linhagem imortalizada utilizada em diversos estudos *in vitro* de citotoxicidade (ROMO-URIBE; MENESES-ACOSTA; DOMÍNGUEZ-DÍAZ, 2017), de biologia molecular (LIN et al., 2014b), e na engenharia de tecidos (REYES et al., 2016).

As células-tronco são células fenotipicamente indiferenciadas com capacidade de se auto renovar e com potencial de desenvolvimento para formar várias linhagens celulares (LIU et al., 2013). As células-tronco mesenquimais estão presentes em muitos tecidos e podem ser isoladas, por exemplo, da medula óssea, tecido adiposo, cordão umbilical e dentes; apresentando a capacidade de se especializar na maioria dos tipos de células corporais, incluindo as de linhagens de músculos, ossos, gordura e cartilagens (CHRISTODOULOU et al., 2018).

Segundo a Sociedade Internacional para Pesquisas com Células-tronco (BYDLOWSKI et al., 2009; LIU; ZHUGE; VELAZQUEZ, 2009), alguns itens são considerados para afirmar que se trata de uma célula-tronco mesenquimal, tais como: (1) uma única célula é capaz de formar colônia; (2) morfologia típica (células aderentes ao plástico, tendo morfologia semelhante ao fibroblasto); (3) as células tem a capacidade de se diferenciar (em osteoblasto, condrócito e adipócito); (4) apresentar marcadores de superfícies (perfil imunofenotípico: OCT4, Nanog, Nestin, CD105, CD31, CD34); além de (5) expressar genes marcadores (OCT4, Nanog, Nestin, CD105).

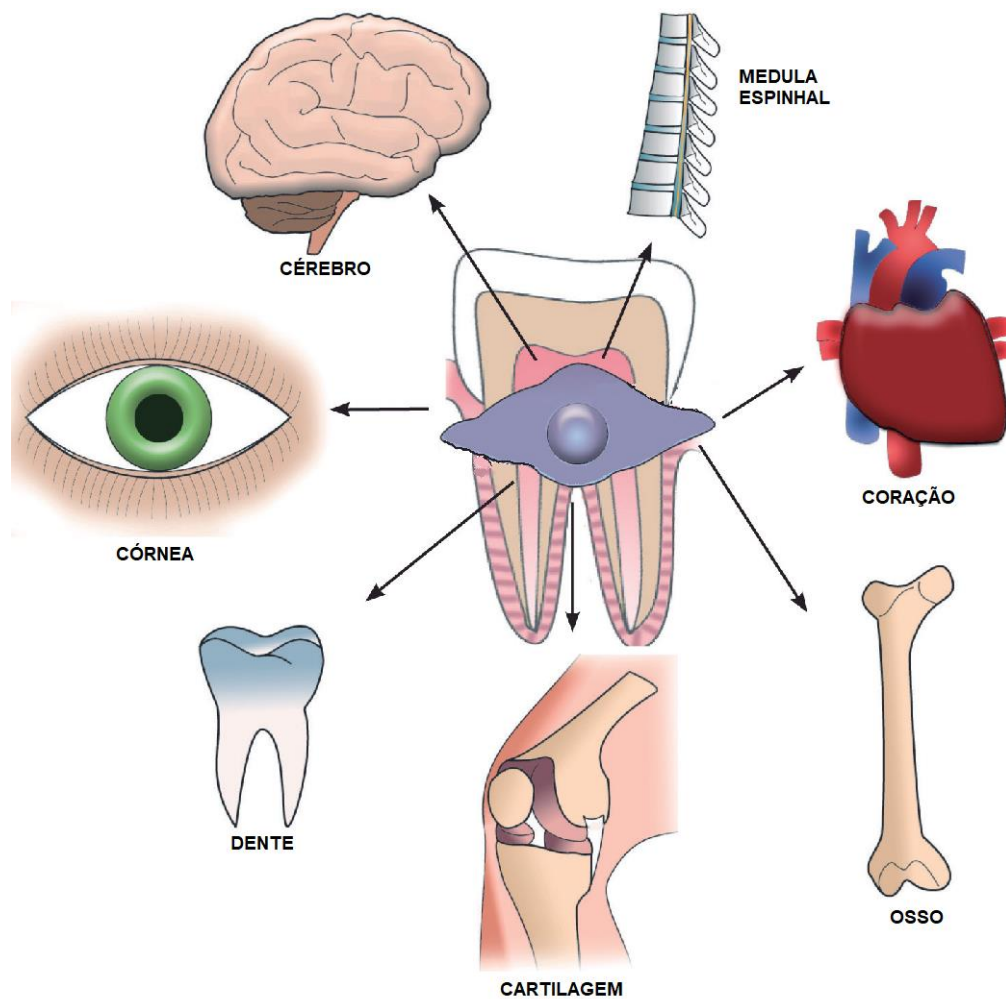
As células-tronco são consideradas modelos adequados para a nanotoxicologia, porque, além de possuírem características fisiológicas de células humanas, podem fornecer diferentes *backgrounds* genéticos para testes de novos NMs e nanoproductos (HANDRAL et al., 2016).

Dentre os tipos de células-tronco existentes, destacam-se as mesenquimais derivadas da polpa dentária humana que podem ser isoladas de tecido



adulto e possuem morfologia semelhante a fibroblastos, aderência a uma superfície plástica e formam colônias quando cultivadas *in vitro* (MARTENS et al., 2013).

Apresentam multipotencialidade *in vitro* com capacidade de se diferenciar em várias linhagens de células (Figura 4), como odontoblastos, osteoblastos, células neurais, condrócitos, adipócitos, mioblastos, fibroblastos e células endoteliais (NUTI et al., 2016).



**Figura 4 – Esquema das células-tronco isoladas da polpa dentária humana mostrando a capacidade de diferenciação em diferentes tipos celulares. Fonte: Adaptado de: BOJIC et al. (2014)**

As células-tronco da polpa dentária humana são muito utilizadas na engenharia de tecidos devido à sua fácil acessibilidade, não necessitando de intervenção cirúrgica, possibilidade de criopreservação e sua ativação imunogênica induzida (BANSAL; JAIN, 2015). Devido a sua extração eficiente e à alta capacidade de diferenciação em osteoblastos, as células-tronco mesenquimais da polpa dentária

são uma alternativa para uso na engenharia de tecidos ósseos (D'AQUINO et al., 2008). Essas células são capazes de formar tecidos ósseos *in vivo* com potencial de ser uma fonte para reconstruções maxilofaciais e ortopédicas ou mesmo outras reconstruções além da cavidade oral (YASUI et al., 2016; ZAKRZEWSKI et al., 2019).

A tecnologia de cultivo *in vitro* de células-tronco permite em grande parte a substituição de estudos com animais por meio da utilização de culturas de monocamadas de células ou na produção de modelos de tecidos *in vitro*. Essas novas plataformas para testes toxicológicos tem o potencial de melhorar a eficácia dos testes pré-clínicos (LIU et al., 2013), além de fornecer um novo paradigma para estudos de bioinformática, biologia celular, epigenética (YILING HONG; CHAN; BEGUM, 2019), bem como aplicações na medicina regenerativa e engenharia de tecidos (CAPLAN, 2019; STOLTZ et al., 2015).

#### **1.4 NFC APLICADA A ENGENHARIA DE TECIDOS**

Dentre as inúmeras áreas que podem ser beneficiadas pela nanotecnologia, destacam-se a engenharia de tecidos e a medicina regenerativa. A engenharia de tecidos é conhecida como um campo interdisciplinar que aplica os princípios da engenharia e das ciências da vida ao desenvolvimento de substitutos biológicos que visa melhorar, manter, restaurar e tratar funções teciduais com mau funcionamento causadas por doenças genéticas ou traumas (DHANDAYUTHAPANI et al., 2011). Essas lesões são de difícil tratamento e o fornecimento exógeno de uma matriz polimérica de suporte em associação com células-tronco surge como solução promissora para o reparo tecidual. A medicina regenerativa engloba numerosas estratégias, incluindo o uso de biomateriais e células, bem como várias combinações dos mesmos, para substituir estrutural e funcionalmente o tecido ausente, ou para contribuir com a cicatrização tecidual (MAO; MOONEY, 2015), incluindo pele, osso, cartilagem, nervos e músculo (AKHAVAN, 2016; CHAUDHARI et al., 2016; MARKSTEDT et al., 2015; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ et al., 2015; SHEIKH et al., 2015).

A engenharia do tecido ósseo é considerada uma das áreas mais amplamente estudada. A perda óssea pode ser causada por neoplasia, defeitos congênitos, trauma, cirurgia reconstrutiva ou doença periodontal, que é um grande

problema de saúde em todo o mundo (CHEN et al., 2015; GUTIÉRREZ-HERNÁNDEZ et al., 2017; PIGOSSI et al., 2015; YAMAGUCHI et al., 2016).

Biomateriais, produzidos a partir de materiais de compostos naturais, são frequentemente usados em cultura de células e engenharia de tecidos, pois eles possuem importantes propriedades mecânicas como as da matriz extracelular (MEC) (CASTRO; O'BRIEN; ZHANG, 2014; WANG et al., 2015). Esses biomateriais são utilizados como *scaffolds* (arcabouços) biodegradáveis para o cultivo das células por mimetizarem a MEC. Isso ocorre pois os biomateriais possuem uma arquitetura com características estruturais que vão da escala nano a macrométrica (MOHAN et al., 2015).

A MEC natural é construída a partir de diversas biomoléculas de tamanhos nanométricos, como colágeno e glicosaminoglicanos e, geralmente, exibe sua topografia em nanoescala (YANG et al., 2017). Assim, a incorporação de NMs na matriz de polímeros produz uma nanotopografia que pode influenciar o material biológico interligado, melhorando a adesão celular e o espalhamento das células para posterior proliferação e diferenciação (SHI; WANG; YANG, 2016). Dessa forma, os *scaffolds* com características semelhantes da MEC proporcionam um microambiente tridimensional adequado para a ligação celular, dão origem a tecidos ou órgãos específicos e representam uma ferramenta fundamental para a engenharia de tecidos e medicina regenerativa (DAYEM et al., 2016).

As nanofibras exibem uma semelhança com a rede de fibrilas de colágeno da MEC que apresentam cerca de 50 a 500 nm de diâmetro com tamanho de fibra que promove a distribuição de poros homogêneos na matriz (PINA; OLIVEIRA; REIS, 2015). Entre os vários NMs fibrosos, as NFCs de algodão, além de serem extraídas de fontes naturais renováveis, exibem excelentes propriedades mecânicas, devido à sua dimensão nanoscópica. Ainda, possuem alta cristalinidade, juntamente com maior área de superfície e melhores propriedades interfaciais possibilitando seu uso no reforço de filmes poliméricos (DUFRESNE, 2017).

Essas propriedades das NFCs, aumentam seu potencial uso na engenharia de tecidos (KAMEL, 2007). Adicionalmente, a NFC, devido às suas excelentes propriedades mecânicas e potencial citocompatibilidade, pode ser um material promissor para adesão e proliferação celular, já que as células aderem e se organizam bem em torno de fibras com dimensões menores que o diâmetro das células (CZAJA et al., 2007; PINA; OLIVEIRA; REIS, 2015). O número de trabalhos interessados na

produção de nanobiocompósitos contendo celulose na escala nanométrica como reforço em matrizes poliméricas tem crescido cada vez mais (ABDUL KHALIL et al., 2017; BHAT et al., 2017).

Chen et al. (2016) realizaram um estudo sobre a regeneração óssea em calvária de rato utilizando *scaffold* de NFC combinada com hidroxiapatita e fibroína de seda e os resultados mostraram que esse *scaffold* apresentou grande potencial no reparo de defeitos ósseos (CHEN et al., 2016b). Similarmente, em trabalhos anteriores, WAN et al. (2006), mostraram que *scaffolds* contendo NFC e hidroxiapatita pode servir para a regeneração do tecido ósseo. No entanto, até o momento ainda não foram realizados estudos avaliando o potencial de NFC de algodão associadas a matrizes poliméricas em induzirem a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais humanas.

#### **1.4.1 DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO INDUZIDA POR NANOMATERIAS**

Células-tronco mesenquimais humanas são células multipotentes pré-teciduals encontradas em diferentes tecidos como dentes de leite, gordura, músculo ou medula óssea (PITTENGER et al., 1999). Possuem alta capacidade de auto-renovação e diferenciação em vários tipos de células de um mesmo folheto embrionário (SOENEN et al., 2014). Por isso são amplamente usadas em estudos de regeneração de tecidos (ASATRIAN et al., 2015; GRAYSON et al., 2015; HACKENBERG et al., 2011; PACELLI et al., 2017). A modulação da diferenciação e adesão celular é fundamental para o desenvolvimento da engenharia de tecidos. A indução da diferenciação envolve moduladores da transcrição gênica, fatores de transcrição, fatores de crescimento, proteínas quinases e receptores celulares (LEWANDOWSKI; KOLANOWSKI; KURPISZ, 2017; OLVERA et al., 2017). O padrão ouro para essa indução *in vitro* é a utilização de meios de cultura e suplementos específicos. Por exemplo, para diferenciação osteogênica, os meios de cultura são suplementados com dexametasona e ácido ascórbico (PADUANO et al., 2016; TIMASHEV et al., 2016). Para superar essa limitação é importante projetar um ambiente de cultivo capaz de sustentar a diferenciação óssea sem o uso desses

suplementos. Isso é importante quando se visa a utilização dessas células em *scaffolds in vivo* (AMARAL et al., 2019).

Há um interesse considerável no uso de NMs para modular o comportamento de células-tronco e para outras aplicações terapêuticas na regeneração de tecidos (DAYEM et al., 2016). Os mecanismos pelos quais os NMs induzem a diferenciação de células-tronco ainda estão sendo investigados. Até o momento sabe-se que o aumento de pontos de contato proporcionado pelos materiais na nanoescala promove a adesão, a proliferação e mudanças na expressão celular das células (SOUSA; CARIDADE; MANO, 2017; STEVENS; GEORGE, 2005; ZHUKOVA et al., 2017). A nanotopografia do *scaffold*, caracterizada pela presença de poros, cavidades e elevações nanométricas, forma uma rede tridimensional para o desenvolvimento dos tecidos (WU et al., 2013). Esses efeitos têm sido atribuídos ao fato da diferenciação das células-tronco ser controlada pelo microambiente circundante, que contém características químicas, físicas e mecânicas específicas para cada tipo de tecido.

Os NMs possuem propriedades mecânicas, físicas e químicas que os tornam bioativos, mimetizando a MEC natural para modular a diferenciação celular. Quando as células interagem com componentes da MEC, incluindo os NMs, as células estabelecem pontos de ancoragem e adesão. A principal família de proteínas transmembranares que mediam essas interações célula-MEC é conhecida como integrinas (GIANCOTTI; ERKKI, 1999) e estão envolvidas no processo de mecanotransdução induzidas por NMs. Neste tipo de transdução, a célula converte um estímulo mecânico em uma resposta bioquímica (AMBRIZ; DE LANEROLLE; AMBROSIO, 2018), conseqüentemente, há uma modificação intracelular de pequenas moléculas, proteínas e fatores de crescimento essenciais para diferenciação celular (DAYEM et al., 2016).

Outro fator que influencia no fenótipo celular é a organização do seu citoesqueleto. O rearranjo do citoesqueleto pode ser causado por vários estímulos, como quimiocinas, fatores de crescimento, diferenças na rigidez de um substrato, dentre outros (AMBRIZ; DE LANEROLLE; AMBROSIO, 2018). Esses estímulos induzem a reorganização do citoesqueleto e, conseqüentemente, modificações na morfologia da célula e no formato do núcleo, influenciando na organização cromossômica e na expressão gênica (DALBY; GADEGAARD; OREFFO, 2014; PINA; OLIVEIRA; REIS, 2015; SCHLUETER et al., 2006). Nesse contexto, a reorganização

da actina é necessária durante a adesão, proliferação e diferenciação das células-tronco (RODRÍGUEZ-FUENTES et al., 2015). Esses processos são estimulados pelas propriedades mecânicas dos *scaffolds*.

Outros estudos relataram que os NMs podem atravessar a membrana plasmática afetando vias de sinalização celular e induzindo a diferenciação (ILIE et al., 2012; ZHANG et al., 2015). As vias celulares podem diferir dependendo do NM, receptores de membrana e tipo celular (ZHANG et al., 2018b). As características físico-químicas dos NMs têm uma grande influência no mecanismo de diferenciação (Figura 5). Portanto, a utilização de diferentes tipos de NMs abre várias possibilidades de implantação de plataformas de diferenciação celular.

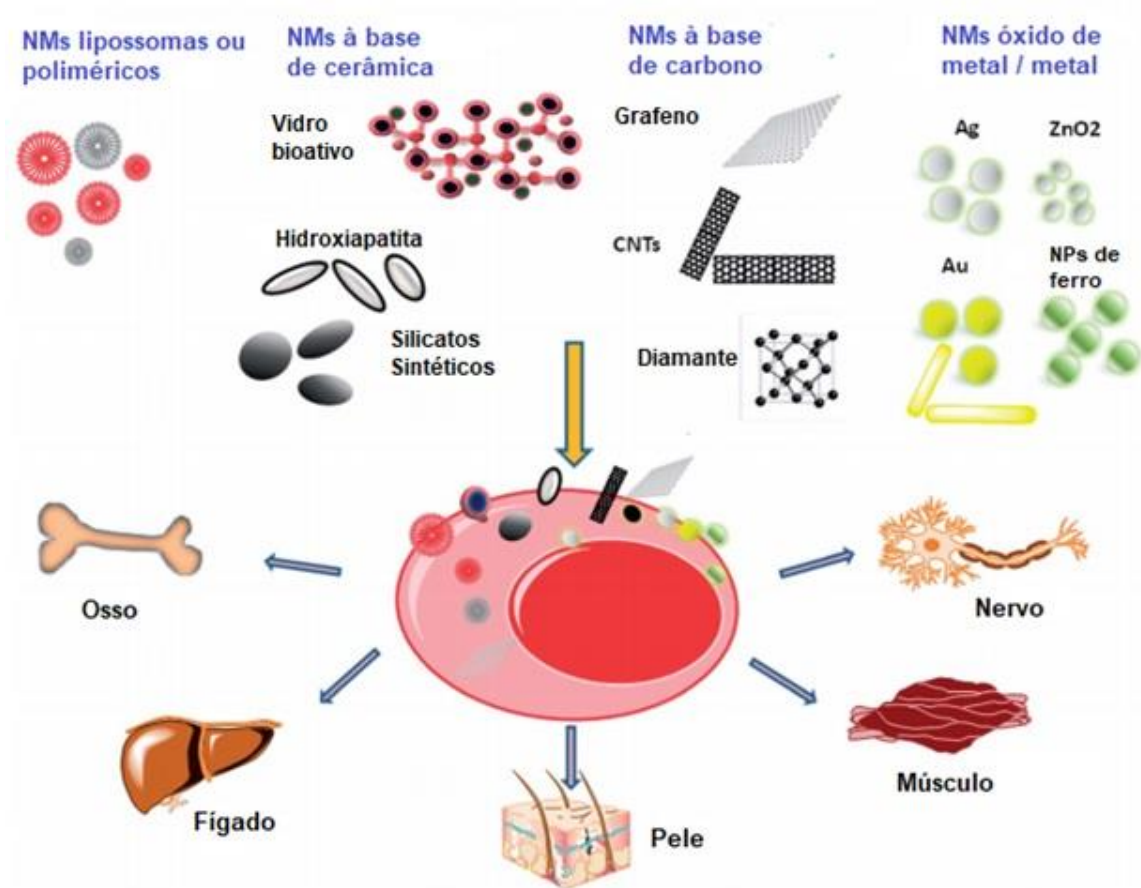


Figura 5 - Ilustração esquemática das interações dos nanomateriais com células-tronco. Essas interações podem estimular a diferenciação de células-tronco em uma variedade de tecidos, incluindo, entre outros, nervos, músculos, pele, fígado e ossos. Fonte: Adaptado de: Zhou et al. (2018).

NMs em formas de fibras, como, por exemplo, as NFCs, são utilizados em *scaffolds* para mimetizar as fibras de colágeno presentes na MEC (STEVENS; GEORGE, 2005). O colágeno é um dos principais componentes da matriz extracelular do tecido ósseo, e sua arquitetura nanofibrosa tem sido notada por desempenhar papel na função de adesão, crescimento e diferenciação celular em culturas de tecidos (HUTMACHER, 2000; LIU; MA, 2004). Nanotopografias que mimetizam a MEC demonstram ser capazes de induzir a diferenciação óssea (DALBY et al., 2007; LEE et al., 2010) e também manter a capacidade de autorenovação de células-tronco (MCMURRAY et al., 2011). Portanto, as NFCs de algodão podem ter o potencial de aplicação na diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais.

#### **1.4.2 DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA**

A diferenciação osteogênica é um processo que envolve a diferenciação de células-tronco mesenquimais em osteoblastos maduros e é caracterizada pela mineralização da matriz por hidróxido de fosfato de cálcio e síntese de proteínas relacionadas à matriz óssea (SANTOS et al., 2011).

Os osteoblastos são células responsáveis pela formação da matriz óssea e se originam de células-tronco mesenquimais imaturas, os pré-osteoblastos, que também podem se diferenciar e dar origem a condrócitos, células musculares, tendíneas e adipócitos (GRONTHOS, 2019). As células-tronco mesenquimais sofrem várias etapas de transcrição para se diferenciarem em osteoblastos. Uma vez que as células osteoprogenitoras começam a se diferenciar em osteoblastos, elas começam a expressar uma série de marcadores genéticos e secretam o colágeno do tipo I, essencial para a mineralização (LUTTRELL et al., 2019).

Runx-2 é um fator de transcrição associado à diferenciação de osteoblastos, a sua super expressão nas células-tronco mesenquimais promove a diferenciação em osteoblastos imaturos, e inibe a diferenciação em linhagens adipogênicas (KOMORI, 2017), através da via de sinalização da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), que por sua vez ativa outros genes de expressão específicos de osteoblastos, responsáveis por traduzir as proteínas osterix (OSX),

osteopontina (OPN), osteocalcina (OCN), e sialoproteína óssea (BSP), e colágeno tipo I alfa (Col-1  $\alpha$ ) essencial para a funcionalidade dos osteoblastos (LIU et al., 2019b).

A proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2) pertence à superfamília de proteínas do fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ), é responsável pela expressão de proteínas estruturais ósseas, como Col-1 $\alpha$  e OCN, atuando como uma molécula de sinalização célula-célula durante a formação e o reparo ósseo. Ambos, BMP-2 e Runx-2 têm efeitos sinérgicos para promover a osteogênese (MAHMOUD et al., 2019).

Estudos recentes mostraram que os NMs livres ou em *scaffolds* podem apresentar propriedades osteogênicas, ou seja, terem a capacidade de formar o tecido ósseo por estimular a deposição de matriz extracelular (NIU et al., 2019); podem possuir atividade osteoindutora capaz de induzir a célula-tronco mesenquimal a se diferenciar em osteoblasto (YUAN et al., 2019); e também serem osteocondutores, capazes de propiciar a migração e proliferação de células ósseas (TAO et al., 2019).

NIU et al., (2019) reportaram que os NMs de vidro bioativo com molibdênio aumentaram a capacidade osteogênica e de mineralização de células-tronco do tecido adiposo. Também, um estudo de MAHMOUD et al., (2019) mostrou que NMs contendo ouro e hidroxiapatita apresentaram atividade osteoindutora em células-tronco mesenquimais de medula óssea de ratos.

Um estudo realizado com três tamanhos diferentes de nanopartículas de ouro demonstrou que a diferenciação osteogênica ocorre de maneira dependente do tamanho da nanopartícula produzida (ZHANG et al., 2017). Adicionalmente, os NMs podem estimular vias de sinalização específicas nas células-tronco, resultando em sua osteoindução (YANG et al., 2013a; YI et al., 2010).

Os biomateriais produzidos com materiais em escala nanométrica tem aplicações para engenharia de tecidos devido à sua semelhança com a natureza nanoestruturada do microambiente tecidual (DAYEM et al., 2016). NMs em formas de fibras, como, por exemplo, as NFCs, são utilizados em *scaffolds* para mimetizar as fibras de colágeno presentes na MEC (STEVENS; GEORGE, 2005). A utilização de *scaffolds* com nanofibras promoveram melhor adesão celular, proliferação e expressões fenotípicas funcionais do que os tipos tradicionais de *scaffolds* que não utilizam materiais em escala nanométrica (XIE et al., 2016).

Nanotopografias que mimetizam a MEC demonstram ser capazes de induzir a diferenciação óssea (DALBY et al., 2007; LEE et al., 2010) e também manter



a capacidade de autorenovação de células-tronco (MCMURRAY et al., 2011). Dentre os biomateriais utilizados para esse fim, destacam-se os filmes de quitosana que são osteocondutores podendo aumentar a formação de nódulos mineralizantes *in vitro* e *in vivo* (MUZZARELLI et al., 1994; SHEIKH et al., 2015). Portanto, NMs como as NFCs de algodão associadas ou não à filmes de quitosana podem ter o potencial de induzir a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais humanas cultivadas *in vitro*.

### 1.4.3 TECIDO ÓSSEO

O osso é um órgão rígido que fornece suporte e proteção física a vários órgãos vitais do corpo, além de desempenhar papéis na homeostase mineral, hematopoiese e função endócrina (BURR, 2019a). Macroscopicamente, o tecido ósseo pode ser classificado como compacto, constituído de partes sem cavidades; e o esponjoso com muitas cavidades intercomunicantes, porém, ambos apresentam a mesma estrutura histológica (BURR, 2019b).

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo organizado composto por elementos da MEC, como colágeno e proteoglicanos, bem como elementos inorgânicos (fosfato e cálcio que formam cristais de hidroxiapatita) que possuem as características de materiais nanométricos e células especializadas (as células osteoprogenitoras, os osteócitos, os osteoblastos e os osteoclastos) (MORGAN; BARNES; EINHORN, 2013). O mineral inorgânico proporciona rigidez à estrutura, enquanto o colágeno, proporciona resiliência e ductilidade (REZNIKOV et al., 2018).

As células osteoprogenitoras são derivadas do tecido mesenquimal durante o desenvolvimento embrionário. Elas têm a capacidade de se diferenciar em vários tipos celulares e podem modificar suas características morfológicas e fisiológicas em resposta a estímulos específicos (TRAMMELL; KROMAN, 2013). Os osteoblastos se originam de células-tronco mesenquimais e podem ser o produto de células osteoprogenitoras ou células do revestimento ósseo que podem se diferenciar. Essas células são encontradas revestindo a superfície periosteal ou endosteal do tecido ósseo (WICKRAMASINGHE; PORWIT; ERBER, 2011). Sintetizam a parte orgânica

da MEC (colágeno tipo 1, glicoproteínas e proteoglicanos) e concentram, na matriz inorgânica, fosfato de cálcio participando da mineralização da matriz óssea.

Osteócitos são outro tipo de célula óssea derivados dos osteoblastos que foram cercados e envoltos por sua própria matriz óssea secretada e residem nas lacunas, que permeiam o osso lamelar, comunicando-se com outros osteócitos via canaliculos por junções de gap facilitando a comunicação entre as células ósseas e mantendo a integridade óssea (LIAN; STEIN, 2008). Os osteoclastos são células multinucleadas derivados da fusão de monócitos e macrófagos. Estão presentes nas lacunas e tem função de reabsorver a matriz óssea, reabsorvem o osso cortical e o trabecular, através de secreções químicas enzimáticas e ácidas (PARVIZI; KIM, 2010).

Estima-se que no corpo humano adulto, todo o esqueleto seja renovado a cada 7 anos (CHEN et al., 2016a). A formação óssea pelos osteoblastos e a reabsorção pelos osteoclastos são processos fortemente regulados, responsáveis pela remodelação óssea contínua (BURR, 2019a). Os osteoclastos conduzem o processo de reabsorção e remodelação do tecido ósseo e substituição pelo osso lamelar (LEE; BANCE, 2019), uma estrutura mais altamente organizada com camadas alternadas de matriz extracelular mineralizada, cuja estrutura fornece ao osso sua resistência mecânica (BOSKEY; ROBEY, 2013).

Existem numerosas proteínas não colagenosas no osso que regulam e direcionam a construção e manutenção da matriz extracelular. A osteocalcina é produzida por osteoblastos e osteócitos e sua função está relacionada ao aumento da ligação do cálcio e controle da deposição mineral (RUPPEL; MILLER; BURR, 2008). Por esse motivo, é usada como um marcador de formação óssea, embora também tenha papel na regulação dos osteoclastos e seus precursores (GURKAN; AKKUS, 2008). A osteonectina está localizada em locais de deposição mineral, onde se liga à hidroxiapatita, colágeno e vitronectina, e pode promover a nucleação de novos cristais minerais. Também pode desempenhar um papel na proliferação de osteoblastos (BURR, 2019a).

Em geral, o tecido ósseo tem a propriedade intrínseca de se reparar, mas há muitas circunstâncias em que a regeneração óssea total não ocorre e requer estimulação externa (QASIM; CHAE; LEE, 2019). Portanto, milhões de pessoas com defeitos ósseos requerem enxerto ósseo ou substituto. Devido à alta demanda por cirurgia, o valor de mercado para enxertos ósseos e materiais relacionados a

implantes chegou a US\$ 2,4 bilhões em 2016 e deverá atingir US \$ 11,5 bilhões em 2025 (GRAFTS et al., 2019).

Dessa forma, a engenharia de tecidos tem investido na pesquisa e na criação de novas técnicas de fabricação de materiais em escala nanométrica, como nanofibras e *scaffolds* nanofibrosos (NGIAM et al., 2010) com o objetivo explorar as características funcionais e materiais em nanoescala do tecido ósseo natural, a fim de modular as funções celulares para obter ideal reparo ósseo.

#### 1.4.4 MINERALIZAÇÃO ÓSSEA

O colágeno secretado forma os osteóides, os osteoblastos fazem com que os sais de cálcio e o fósforo precipitem do sangue e se liguem ao osteóide recém-formado para mineralizar o tecido ósseo (QIU; CUI; WANG, 2019). O osteóide é um tecido orgânico não mineralizado que, eventualmente, sofre calcificação e é depositado como lamelas ou camadas na matriz óssea (BONEWALD, 2013). A fosfatase alcalina (ALP) é uma glicoproteína secretada por osteoblastos para desempenhar um papel na mineralização do osteóide e seus níveis aumentam durante a formação óssea (BARRAGAN-ADJEMIAN et al., 2006), sendo, um marcador da atividade óssea e da mineralização.

A ALP é usada como um biomarcador para a formação óssea porque hidrolisa os pirofosfatos, que inibem a deposição mineral pela ligação a cristais minerais. Essa hidrólise permite o crescimento normal dos cristais, levando à mineralização normal (BURR, 2019b).

O colágeno não induz diretamente a deposição mineral na matriz óssea; no entanto, serve como um arcabouço favorecendo a deposição mineral inicial e a organização do crescimento de cristais, fornecendo orientação adequada para os nucleadores da mineralização. Os cristais são constituídos por íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Pi}$  que se organizam formando a estrutura cristalina da hidroxiapatita. Além da estrutura das fibras de colágeno e da disponibilidade de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Pi}$ , sabe-se que o processo de mineralização óssea é favorecido por osteoblastos por meio da produção da enzima ALP que age sobre substratos como o pirofosfato, a partir do qual libera-se  $\text{Pi}$  para mineralização (MORGAN; BARNES; EINHORN, 2013).

### 1.4.5 NANOBIOCOMPÓSITOS

Nas últimas décadas, biomateriais, especialmente materiais de compostos naturais, são frequentemente usados em cultura de células e engenharia de tecidos, pois eles possuem importantes propriedades mecânicas como as da MEC (WANG et al., 2015). Dentre os biomateriais existentes destaca-se a quitosana que é um polímero natural, biodegradável, biocompatível, não antigênico, biofuncional e com propriedades antimicrobianas (HOSSEINI et al., 2015). É insolúvel em água, solventes orgânicos e bases aquosas e é solúvel, após agitação, em ácidos como soluções de ácido nítrico, perclórico, fosfórico (RINAUDO, 2006; SANKARARAMAKRISHNAN; SANGHI, 2006), clorídrico, fórmico, cítrico, láctico e ácido acético (BÉGIN; VAN CALSTEREN, 1999; ZANETTE et al., 2019).

A quitosana é produzida pela desacetilação (Figura 6) da quitina, que é o segundo polissacarídeo natural mais abundante depois da celulose (MAHANTA; MAITI, 2016; SALARI et al., 2018). A quitosana é um polissacarídeo linear natural estruturalmente semelhante à celulose (Figura 7), composto de unidades monoméricas ligada a  $\beta$ -1,4 e N-acetilglicosamina, diferindo da celulose na posição C-2, onde possui o grupo  $\text{NH}_2$  em vez do grupo  $\text{OH}$  como na celulose (RUDALL; KENCHINGTON, 1973; YOUSSEF et al., 2015).

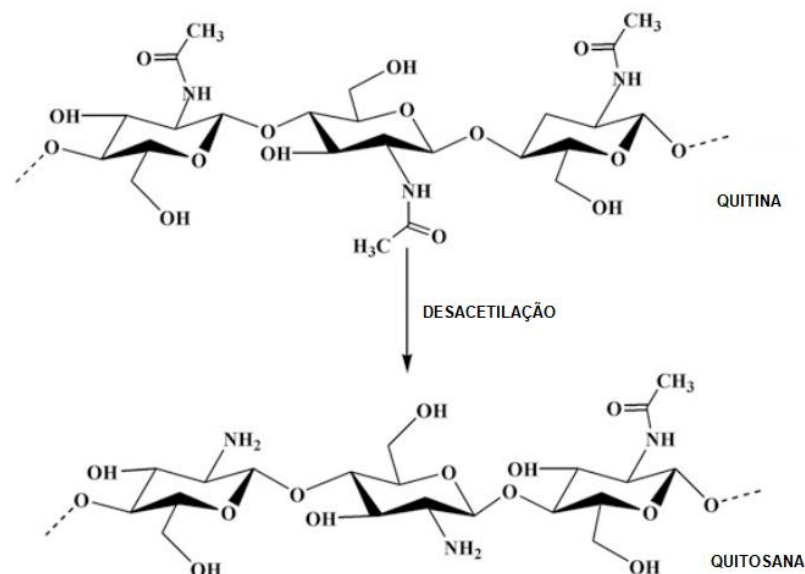


Figura 6 – Esquema da desacetilação da quitina. Fonte: Adaptado de : MAHANTA; MAITI (2016)

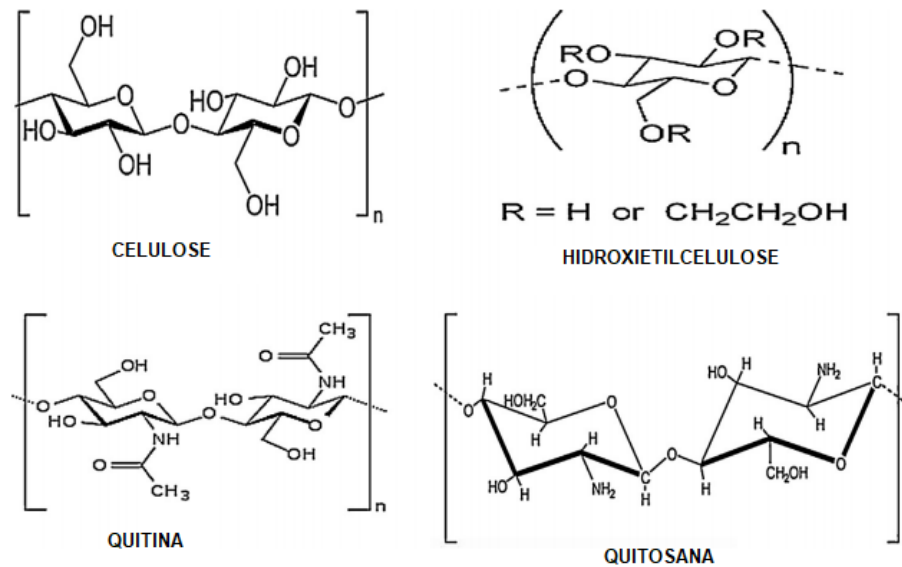


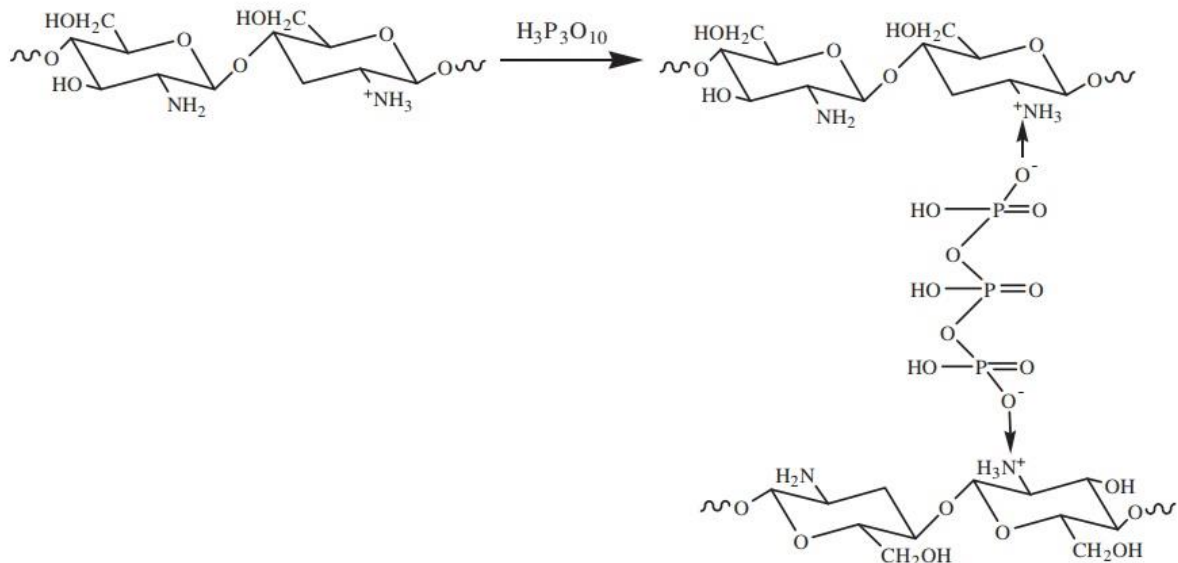
Figura 7 - Estrutura química da celulose, hidroxietilcelulose, quitina e quitosana. Fonte: Adaptado de: YOUSSEF et al. (2015)

A quitosana é comumente utilizada para a produção de *scaffolds* biocompósitos por apresentar excelentes propriedades de formação de filme (SALARI et al., 2018). Os filmes compósitos à base de quitosana possuem várias aplicações na engenharia de tecidos (AHSAN et al., 2018; MUZZARELLI, 2009; RAGETLY et al., 2010; VENKATESAN; KIM, 2010). As aplicações biomédicas recentes incluem a utilização da quitosana para a engenharia de tecidos, bem como a cirurgia, regeneração, e como componente de materiais de implante (LI et al., 2015b; MEYER et al., 2016).

Porém, em meios ácidos, a protonação dos grupos amina resulta na dissolução parcial da quitosana, causando deterioração dos filmes produzidos (SHENVI; ISMAIL; ISLOOR, 2014). Assim, o processo de reticulação é frequentemente usado para melhorar a estabilidade química da quitosana (AL-NEMRAWI; ALSHARIF; DAVE, 2018). Dependendo da natureza do agente reticulante, a quitosana pode ser reticulada covalente ou ionicamente (GIERSZEWSKA; OSTROWSKA-CZUBENKO, 2016).

Para reticulação covalente, produtos químicos como glutaraldeído e glicoxal são mais frequentemente utilizados, porém, esses agentes químicos causam efeitos indesejáveis à saúde humana (SHENVI; ISMAIL; ISLOOR, 2014). Para evitar a possível toxicidade dos reagentes, a reticulação iônica é utilizada. O tripolifosfato de

sódio (TPP) é um poliânion e pode interagir fisicamente com a quitosana catiônica por forças eletrostáticas (GIERSZEWSKA; OSTROWSKA-CZUBENKO; CHRZANOWSKA, 2018). Em soluções ácidas, o grupamento  $\text{NH}_2$  da molécula de quitosana é protonado para formar o íon  $\text{NH}_3^+$ , que interage com o grupamento fosfato aniônico do TPP por interação iônica formando o filme (Figura 8) (SHENVI; ISMAIL; ISLOOR, 2014).



**Figura 8 - Representação esquemática da reticulação de quitosana com TPP. Fonte: (SHENVI; ISMAIL; ISLOOR, 2014)**

Apesar disso, os filmes de quitosana são mecanicamente fracos e instáveis (LI et al., 2005). A incorporação de outros polímeros na matriz composta de quitosana pode ser um método eficaz para superar tais características e para a obtenção de filmes com funções e propriedades desejadas (HU; WANG; WANG, 2016).

Os nanobiocompósitos são obtidos quando uma matriz polimérica é reforçada com NMs para melhorar ou modificar as propriedades específicas do material final (SABA; JAWAID; ASIM, 2016; SABA; TAHIR; JAWAID, 2014). Suas propriedades são muito influenciadas pelas propriedades únicas do NM adicionado como por exemplo o aumento da rigidez e da área superficial (MANDAL; CHAKRABARTY, 2015). Os NMs são considerados uma alternativa promissora para a produção de nanobiocompósitos devido à sua capacidade de induzir proliferação e diferenciação celular (CRISAN et al., 2015).

Atualmente, filmes poliméricos nanobiocompósitos são utilizados para várias aplicações médicas e biotecnológicas, como veículos de entrega de moléculas, biossensores e engenharia de tecidos (CASTRO et al., 2019; HASNAIN; NAYAK, 2019; ZARE et al., 2019). Especificamente, filmes baseados em biopolímeros como a quitosana têm sido produzidos e amplamente utilizados para fins biomédicos (KACZMAREK et al., 2017; SIRIPATRAWAN; VITCHAYAKITTI, 2016).

Recentemente, muitos métodos têm sido descritos para a preparação de nanobiocompósitos de polímeros, incluindo mistura por fusão, polimerização intercalada *in situ*, técnica de evaporação de sol-gel e de solvente (RANE et al., 2018). Entre os métodos, a técnica de evaporação de solventes é o método mais simples e prático para a síntese de nanobiocompósitos sem a necessidade de equipamentos especializados (BHAT et al., 2017; JAMEELA; SUMA; JAYAKRISHNAN, 2012; SABA; TAHIR; JAWAID, 2014). Nessa técnica, a mistura dos compósitos poliméricos envolve a dispersão de NMs em uma solução polimérica por agitação energética, evaporação controlada do solvente e, finalmente, a fundição do filme compósito, assim a cadeia polimérica do NM é aprisionada entre as cadeias do outro polímero utilizado, preservando o estado de dispersão dos NMs (BHAT et al., 2017).

A evaporação do solvente é o método de processamento mais adequado, pois preserva o estado de dispersão das nanopartículas nesse meio, bem como os grupos hidroxila da superfície. Esse processo de evaporação lenta fornece materiais de desempenho mecânico mais alto em comparação com outras técnicas de processamento (DUFRESNE, 2017).

As NFCs de diferentes fontes estão ganhando mais importância no desenvolvimento de novos biomateriais principalmente baseados na aplicação biomédica, para fabricação de nanobiocompósitos (KHATTAB; ABDEL-HADY; DAHMAN, 2017; SABA; JAWAID, 2017). Pelas características apresentadas, os filmes nanobiocompósitos produzidos com quitosana e NFC podem fornecer um suporte estrutural inicial para o crescimento e diferenciação das células-tronco mesenquimais com potencial uso na engenharia de tecidos, mais especificamente na regeneração óssea.

## 1.5 OBJETIVO GERAL

Avaliar a caracterização e a citocompatibilidade e bioatividade osteogênica das nanofibras de celulose de algodão e de filmes nanobiocompósitos reforçados com nanofibras de celulose no cultivo *in vitro* de células-tronco mesenquimais humanas para aplicações em reparo ósseo.



## 1.6 REFERÊNCIAS

- Abdul Khalil, H. P. S., Davoudpour, Y., Islam, M. N., Mustapha, A., Sudesh, K., Dungani, R., & Jawaid, M. (2014). Production and modification of nanofibrillated cellulose using various mechanical processes: A review. *Carbohydrate Polymers*, 99, 649–665. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.069>
- Abdul Khalil, H. P. S., Saurabh, C. K., Asniza, M., Tye, Y. Y., Nurul Fazita, M. R., Syakir, M. I., ... Suraya, N. L. M. (2017). *Nanofibrillated cellulose reinforcement in thermoset polymer composites. Cellulose-Reinforced Nanofibre Composites: Production, Properties and Applications*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100957-4.00001-2>
- Abitbol, T., Rivkin, A., Cao, Y., Nevo, Y., Abraham, E., Ben-Shalom, T., ... Shoseyov, O. (2016). Nanocellulose, a tiny fiber with huge applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 39(1), 76–88. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.01.002>
- Achilli, C., Ciana, A., & Minetti, G. (2018). Immortalized HEK 293 Kidney Cell Lines as Models of Renal Cells: Friends or Foes? *Journal of Controversies in Biomedical Research*, 4(1), 6–9. <https://doi.org/10.15586/jcbmr.2018.26>
- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), 163–176. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876>
- Ahlinder, L., Ekstrand-Hammarström, B., Geladi, P., & Österlund, L. (2013). Large uptake of titania and iron oxide nanoparticles in the nucleus of lung epithelial cells as measured by Raman imaging and multivariate classification. *Biophysical Journal*, 105(2), 310–319. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.06.017>
- Ahmadian, H., Hashemi, E., Akhavan, O., Shamsara, M., Hashemi, M., Farmany, A., & Joupari, M. D. (2017). Apoptotic and anti-apoptotic genes transcripts patterns of graphene in mice. *Materials Science and Engineering C*, 71, 460–464. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.09.073>
- Ahsan, S. M., Thomas, M., Reddy, K. K., Sooraparaju, S. G., Asthana, A., & Bhatnagar, I. (2018). Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 110, 97–109. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.140>
- Akhavan, O. (2016). *Graphene scaffolds in progressive nanotechnology/stem cell-*

- based tissue engineering of the nervous system. Journal of Materials Chemistry B* (Vol. 4). <https://doi.org/10.1039/c6tb00152a>
- Al-Nemrawi, N. K., Alsharif, S. S. M., & Dave, R. H. (2018). Preparation of chitosan-tpg nanoparticles: The influence of chitosan polymeric properties and formulation variables. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, *10*(5), 60–65. <https://doi.org/10.22159/ijap.2018v10i5.26375>
- Alarifi, S., Ali, H., Alkahtani, S., & Alessia, M. S. (2017). Regulation of apoptosis through bcl-2/bax proteins expression and DNA damage by nano-sized gadolinium oxide. *International Journal of Nanomedicine*, *12*, 4541–4551. <https://doi.org/10.2147/IJN.S139326>
- Amaral, D. LAS, Zanette, R. S., Almeida, C. G., Almeida, L. B., Oliveira, L. F. de, Marcomini, R. F., ... Munk, M. (2019). In vitro evaluation of barium titanate nanoparticle/alginate 3D scaffold for osteogenic human stem cell differentiation. *Biomedical Materials*, *14*(035011), 0–22. Retrieved from <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1748-605X/ab0a52>
- Ambriz, X., de Lanerolle, P., & Ambrosio, J. R. (2018). The Mechanobiology of the Actin Cytoskeleton in Stem Cells during Differentiation and Interaction with Biomaterials. *Stem Cells International*, *2018*, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2018/2891957>
- Anspach, L., Unger, R. E., Brochhausen, C., Gibson, M. I., Klok, H. A., Kirkpatrick, C. J., & Freese, C. (2016). Impact of polymer-modified gold nanoparticles on brain endothelial cells: exclusion of endoplasmic reticulum stress as a potential risk factor. *Nanotoxicology*, *10*(9), 1341–1350. <https://doi.org/10.1080/17435390.2016.1214761>
- Ao, C., Niu, Y., Zhang, X., He, X., Zhang, W., & Lu, C. (2017). Fabrication and characterization of electrospun cellulose/nano-hydroxyapatite nanofibers for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, *97*, 568–573. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.091>
- Arora, S., Rajwade, J. M., & Paknikar, K. M. (2012). Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *258*(2), 151–165. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.11.010>
- Asare, N., Duale, N., Slagsvold, H. H., Lindeman, B., Olsen, A. K., Gromadzka-Ostrowska, J., ... Instanes, C. (2016). Genotoxicity and gene expression modulation of silver and titanium dioxide nanoparticles in mice. *Nanotoxicology*,

- 10(3), 312–321. <https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1071443>
- Asatrian, G., Pham, D., Hardy, W. R., James, A. W., & Peault, B. (2015). Stem cell technology for bone regeneration: Current status and potential applications. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, 8, 39–48. <https://doi.org/10.2147/SCCAA.S48423>
- Atha, D. H., Nagy, A., Steinbrück, A., Dennis, A. M., Hollingsworth, J. A., Dua, V., ... Nelson, B. C. (2017). Quantifying engineered nanomaterial toxicity: Comparison of common cytotoxicity and gene expression measurements. *Journal of Nanobiotechnology*, 15(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12951-017-0312-3>
- Azizi Samir, M. A. S., Alloin, F., & Dufresne, A. (2005). Review of Recent Research Into Cellulose Whiskers, Their Properties and Their Application in Nanocomposite Field. *Biomacromolecules*, 6(2), 612–626. <https://doi.org/10.1021/bm0493685>
- Bandyopadhyay, S., Peralta-Videa, J. R., Hernandez-Viezcas, J. A., Montes, M. O., Keller, A. A., & Gardea-Torresdey, J. L. (2012). Microscopic and spectroscopic methods applied to the measurements of nanoparticles in the environment. *Applied Spectroscopy Reviews*, 47(3), 180–206. <https://doi.org/10.1080/05704928.2011.637186>
- Bansal, R., & Jain, A. (2015). Current overview on dental stem cells applications in regenerative dentistry. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, 6(1), 29–34. <https://doi.org/10.4103/0976-9668.149074>
- Barragan-Adjemian, C., Nicolella, D., Dusevich, V., Dallas, M. R., Eick, J. D., & Bonewald, L. F. (2006). Mechanism by which MLO-A5 late osteoblasts/early osteocytes mineralize in culture: Similarities with mineralization of lamellar bone. *Calcified Tissue International*, 79(5), 340–353. <https://doi.org/10.1007/s00223-006-0107-2>
- Beck, S., & Bouchard, J. (2014). Auto-Catalyzed acidic desulfation of cellulose nanocrystals. *Nordic Pulp & Paper Research Journal*, 29(1), 6–14. <https://doi.org/10.3183/NPPRJ-2014-29-01-p006-014>
- Bégin, A., & Van Calsteren, M. R. (1999). Antimicrobial films produced from chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 26(1), 63–67. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(99\)00064-1](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(99)00064-1)
- Belyanina, I., Kolovskaya, O., Zamay, S., Gargaun, A., Zamay, T., & Kichkailo, A. (2017). Targeted magnetic nanotheranostics of cancer. *Molecules*, 22(6), 1–19. <https://doi.org/10.3390/molecules22060975>

- Bendale, Y., Bendale, V., & Paul, S. (2017). Evaluation of cytotoxic activity of platinum nanoparticles against normal and cancer cells and its anticancer potential through induction of apoptosis. *Integrative Medicine Research*, 6(2), 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.imr.2017.01.006>
- Bhandari, J., Mishra, H., Mishra, P. K., Wimmer, R., Ahmad, F. J., & Talegaonkar, S. (2017). Cellulose nanofiber aerogel as a promising biomaterial for customized oral drug delivery. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 2021–2031. <https://doi.org/10.2147/IJN.S124318>
- Bhat, A. H., Dasan, Y. K., Khan, I., Soleimani, H., & Usmani, A. (2017). *Application of nanocrystalline cellulose: Processing and biomedical applications. Cellulose-Reinforced Nanofibre Composites: Production, Properties and Applications*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100957-4.00009-7>
- Bojic, S., Volarevic, V., Ljubic, B., & Stojkovic, M. (2014). Dental stem cells--characteristics and potential. *HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY*, 29(6), 699–706. <https://doi.org/10.14670/HH-29.699>
- Bondarenko, O., Juganson, K., Ivask, A., Kasemets, K., Mortimer, M., & Kahru, A. (2013). Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: A critical review. *Archives of Toxicology*, 87(7), 1181–1200. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1079-4>
- Bonewald, L. F. (2013). Osteocyte Biology. In *Osteoporosis* (Fourth Edi, pp. 209–234). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415853-5.00010-8>
- Boonrungsiman, S., Suchaoin, W., Chetprayoon, P., Viriya-empikul, N., Aueviriyavit, S., & Maniratanachote, R. (2017). Shape and surface properties of titanate nanomaterials influence differential cellular uptake behavior and biological responses in THP-1 cells. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 9, 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.12.014>
- Boskey, A. L., & Robey, P. G. (2013). *The Regulatory Role of Matrix Proteins in Mineralization of Bone. Osteoporosis: Fourth Edition* (Fourth Edi). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415853-5.00011-X>
- Buerki-Thurnherr, T., Schaepper, K., Aengenheister, L., & Wick, P. (2018). Developmental Toxicity of Nanomaterials: Need for a Better Understanding of Indirect Effects. *Chemical Research in Toxicology*, acs.chemrestox.8b00177. editorial. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00177>
- Burr, D. B. (2019a). Bone Morphology and Organization. In *Basic and Applied Bone*

- Biology* (Second Edi, pp. 3–26). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813259-3.00001-4>
- Burr, D. B. (2019b). *Bone Morphology and Organization. Basic and Applied Bone Biology* (Second Edi). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813259-3.00001-4>
- 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>
- Bydlowski, S. P., Debes, A. A., Maselli, L. M. F., & Janz, F. L. (2009). Biological characteristics of mesenchymal stem cells. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 31(SUPPL. 1), 25–35. <https://doi.org/10.1590/S1516-84842009005000038>
- Bystrzejewska-Piotrowska, G., Golimowski, J., & Urban, P. L. (2009). Nanoparticles: Their potential toxicity, waste and environmental management. *Waste Management*, 29(9), 2587–2595. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2009.04.001>
- Caplan, A. I. (2019). *Mesenchymal Stem Cells in Regenerative Medicine INTRODUCTION AND HISTORY. Universidad Javeriana* (Vol. 85:15). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809880-6.00015-1>
- Castro, N. J., O'Brien, C. M., & Zhang, L. G. (2014). Biomimetic Biphasic 3-D Nanocomposite Scaffold for Osteochondral Regeneration. *American Institute of Chemical Engineers Journal*, 60(2), 432–442. <https://doi.org/10.1002/aic>
- Castro, P. M., Sarmiento, B., Madureira, A. R., & Pintado, M. E. (2019). Organic nanocomposites for the delivery of bioactive molecules. In *Natural Polysaccharides in Drug Delivery and Biomedical Applications* (pp. 471–493). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817055-7.00020-0>
- Chang, E. H., Harford, J. B., Eaton, M. A. W., Boisseau, P. M., Dube, A., Hayeshi, R., ... Lee, D. S. (2015). Nanomedicine: Past, present and future - A global perspective. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 468(3), 511–517. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.10.136>
- Chaudhari, A. A., Vig, K., Baganizi, D. R., Sahu, R., Dixit, S., Dennis, V., ... Pillai, S. R. (2016). Future prospects for scaffolding methods and biomaterials in skin tissue engineering: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12). <https://doi.org/10.3390/ijms17121974>
- Chen, H., Zeng, Y., Liu, W., Zhao, S., Wu, J., & Du, Y. (2013). Multifaceted applications

- of nanomaterials in cell engineering and therapy. *Biotechnology Advances*, 31(5), 638–653. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.08.002>
- Chen, Q., Shou, P., Zheng, C., Jiang, M., Cao, G., Yang, Q., ... Shi, Y. (2016). Fate decision of mesenchymal stem cells: Adipocytes or osteoblasts? *Cell Death and Differentiation*, 23(7), 1128–1139. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.168>
- Chen, W., Abe, K., Uetani, K., Yu, H., Liu, Y., & Yano, H. (2014). Individual cotton cellulose nanofibers: Pretreatment and fibrillation technique. *Cellulose*, 21(3), 1517–1528. <https://doi.org/10.1007/s10570-014-0172-z>
- Chen, X., Zhou, R., Chen, B., & Chen, J. (2016). Nanohydroxyapatite/cellulose nanocrystals/silk fibroin ternary scaffolds for rat calvarial defect regeneration. *RSC Advances*, 6(42), 35684–35691. <https://doi.org/10.1039/c6ra02038k>
- Chithrani, B. D., & Chan, W. C. W. (2007). Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Letters*, 7(6), 1542–1550. <https://doi.org/10.1021/nl070363y>
- Chithrani, B. D., Ghazani, A. A., & Chan, W. C. W. (2006). Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Letters*, 6(4), 662–668. <https://doi.org/10.1021/nl052396o>
- Cho, E. C., Xie, J., Wurm, P. A., & Xia, Y. (2009). Understanding the Role of Surface Charges in Cellular Adsorption versus Internalization by Selectively Removing Gold Nanoparticles on the Cell Surface with a I 2 / KI Etchant 2009. *Nano Lett.*, 9(3), 1080–1084. <https://doi.org/10.1021/nl803487r>
- Christodoulou, I., Goulielmaki, M., Devetzi, M., Panagiotidis, M., Koliakos, G., & Zoumpourlis, V. (2018). Mesenchymal stem cells in preclinical cancer cytotherapy: A systematic review. *Stem Cell Research and Therapy*, 9(1), 1–38. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-1078-8>
- Ciappellano, S. G., Tedesco, E., Venturini, M., & Benetti, F. (2016). In vitro toxicity assessment of oral nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 106, 381–401. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.08.007>
- Clift, M. J. D., Foster, E. J., Vanhecke, D., Studer, D., Wick, P., Gehr, P., ... Weder, C. (2011). Investigating the interaction of cellulose nanofibers derived from cotton with a sophisticated 3D human lung cell coculture. *Biomacromolecules*, 12(10), 3666–3673. <https://doi.org/10.1021/bm200865j>
- Cohen, J., Cohen, J. M., Teegarden, J. G., & Demokritou, P. (2014). An integrated approach for in vitro dosimetry of engineered nanomaterials An integrated

- approach for the in vitro dosimetry of engineered nanomaterials, *11*(1), 1–12.  
<https://doi.org/10.1186/1743-8977-11-20>
- Cosentino, K., & García-Sáez, A. J. (2017). Bax and Bak Pores: Are We Closing the Circle? *Trends in Cell Biology*, *27*(4), 266–275.  
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.11.004>
- Crisan, L., Crisan, B., Soritau, O., Baciut, M., Biris, A. R., Baciut, G., & Lucaciu, O. (2015). In vitro study of biocompatibility of a graphene composite with gold nanoparticles and hydroxyapatite on human osteoblasts. *Journal of Applied Toxicology*, *35*(10), 1200–1210. <https://doi.org/10.1002/jat.3152>
- Czaja, W. K., Young, D. J., Kawecki, M., & R. Malcolm Brown, J. (2007). The Future Prospects of Microbial Cellulose in Biomedical Applications, *8*(1), 1–12.  
<https://doi.org/10.1021/BM060620D>
- d’Aquino, R., Papaccio, G., Laino, G., & Graziano, A. (2008). Dental Pulp Stem Cells: A Promising Tool for Bone Regeneration. *Stem Cell Reviews*, *4*(1), 21–26.  
<https://doi.org/10.1007/s12015-008-9013-5>
- D’Mello, S. R., Cruz, C. N., Chen, M. L., Kapoor, M., Lee, S. L., & Tyner, K. M. (2017). The evolving landscape of drug products containing nanomaterials in the United States. *Nature Nanotechnology*, *12*(6), 523–529.  
<https://doi.org/10.1038/nnano.2017.67>
- Dalby, M. J., Gadegaard, N., Tare, R., Andar, A., Riehle, M. O., Herzyk, P., ... Oreffo, R. O. C. (2007). The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Nature Materials*, *6*(12), 997–1003.  
<https://doi.org/10.1038/nmat2013>
- Dayem, A. A., Choi, H. Y., Yang, G. M., Kim, K., Saha, S. K., Kim, J. H., & Cho, S. G. (2016). The potential of nanoparticles in stem cell differentiation and further therapeutic applications. *Biotechnology Journal*, *11*(12), 1550–1560.  
<https://doi.org/10.1002/biot.201600453>
- Dayem, A. A., Hossain, M. K., Lee, S. Bin, Kim, K., Saha, S. K., Yang, G. M., ... Cho, S. G. (2017). The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(1), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms18010120>
- Dhandayuthapani, B., Yoshida, Y., Maekawa, T., & Kumar, D. S. (2011). Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review. *International Journal of Polymer Science*, *2011*(ii). <https://doi.org/10.1155/2011/290602>

- 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>
- Dufresne, A. (2017). Cellulose nanomaterial reinforced polymer nanocomposites. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 29, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2017.01.004>
- Eichhorn, S. J., Dufresne, A., Aranguren, M., Marcovich, N. E., Capadona, J. R., Rowan, S. J., ... Peijs, T. (2010). Review: Current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites. *Journal of Materials Science* (Vol. 45). <https://doi.org/10.1007/s10853-009-3874-0>
- Faghihzadeh, F., Anaya, N. M., Schifman, L. A., & Oyanedel-Craver, V. (2016). Fourier transform infrared spectroscopy to assess molecular-level changes in microorganisms exposed to nanoparticles. *Nanotechnology for Environmental Engineering*, 1(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s41204-016-0001-8>
- Fahma, F., Iwamoto, S., Hori, N., Iwata, T., & Takemura, A. (2011). Effect of pre-acid-hydrolysis treatment on morphology and properties of cellulose nanowhiskers from coconut husk. *Cellulose*, 18(2), 443–450. <https://doi.org/10.1007/s10570-010-9480-0>
- Falagan-Lotsch, P., Grzincic, E. M., & Murphy, C. J. (2016). One low-dose exposure of gold nanoparticles induces long-term changes in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(47), 13318–13323. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616400113>
- Farré, M., Gajda-Schrantz, K., Kantiani, L., & Barceló, D. (2009). Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(1), 81–95. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2458-1>
- Flauzino Neto, W. P., Silvério, H. A., Dantas, N. O., & Pasquini, D. (2013). Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from agro-industrial residue - Soy hulls. *Industrial Crops and Products*, 42(1), 480–488. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.06.041>
- Foley, S., Crowley, C., Smaih, M., Bonfils, C., Erlanger, B. F., Seta, P., & Larroque, C. (2002). Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294(1), 116–119. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00445-X](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00445-X)
- Gade, P., Manjegowda, S. B., Nallar, S. C., Maachani, U. B., Cross, A. S., &



- Kalvakolanu, D. V. (2014). Regulation of the Death-Associated Protein Kinase 1 Expression and Autophagy via ATF6 Requires Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1. *Molecular and Cellular Biology*, *34*(21), 4033–4048. <https://doi.org/10.1128/mcb.00397-14>
- Gao, C., Feng, P., Peng, S., & Shuai, C. (2017). Carbon nanotube, graphene and boron nitride nanotube reinforced bioactive ceramics for bone repair. *Acta Biomaterialia*, *61*, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.05.020>
- García, A., Gandini, A., Labidi, J., Belgacem, N., & Bras, J. (2016). Industrial and crop wastes: A new source for nanocellulose biorefinery. *Industrial Crops and Products*, *93*, 26–38. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.06.004>
- Giancotti, F. G., & Erkki, R. (1999). Integrin Signaling. *Science*, *285*(5430), 1028–1033. <https://doi.org/10.1126/science.285.5430.1028>
- Gierszewska, M., & Ostrowska-Czubenko, J. (2016). Equilibrium swelling study of crosslinked chitosan membranes in water, buffer and salt solutions. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its Derivatives*, *21*, 55–62. <https://doi.org/10.15259/PCACD.21.05>
- Gierszewska, M., Ostrowska-Czubenko, J., & Chrzanowska, E. (2018). pH-responsive chitosan/alginate polyelectrolyte complex membranes reinforced by tripolyphosphate. *European Polymer Journal*, *101*, 282–290. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.02.031>
- Godwin, H., Nameth, C., Avery, D., Bergeson, L. L., Bernard, D., Beryt, E., ... Nel, A. E. (2015). Nanomaterial categorization for assessing risk potential to facilitate regulatory decision-making. *ACS Nano*, *9*(4), 3409–3417. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b00941>
- Grafts, B., Size, S. M., Summary, R., Insights, I., Affairs, S., Nations, U., & Division, P. (2019). Bone Grafts and Substitutes Market Size, Share & Trends Analysis Report By Material Type (Natural, Synthetic), By Application Type (Spinal Fusion, Craniomaxillofacial, Long Bone), By Region, And Segment Forecasts, 2018 - 2025. Retrieved January 9, 2020, from <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/bone-grafts-substitutes-market>
- Grayson, W. L., Bunnell, B. A., Martin, E., Frazier, T., Hung, B. P., & Gimble, J. M. (2015). Stromal cells and stem cells in clinical bone regeneration. *Nature Reviews Endocrinology*, *11*(3), 140–150. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.234>

- Gronthos, S. (2019). Features of Mesenchymal Stem Cells. In *A Roadmap to Non-Hematopoietic Stem Cell-based Therapeutics* (pp. 15–38). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811920-4.00002-1>
- Gurkan, U. A., & Akkus, O. (2008). The mechanical environment of bone marrow: A review. *Annals of Biomedical Engineering*, 36(12), 1978–1991. <https://doi.org/10.1007/s10439-008-9577-x>
- Hackenberg, S., Scherzed, A., Kessler, M., Hummel, S., Technau, A., Froelich, K., ... Kleinsasser, N. (2011). Silver nanoparticles: Evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells. *Toxicology Letters*, 201(1), 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.12.001>
- Handral, H. K., Tong, H. J., Islam, I., Sriram, G., Rosa, V., & Cao, T. (2016). Pluripotent stem cells: An in vitro model for nanotoxicity assessments. *Journal of Applied Toxicology*, 36(10), 1250–1258. <https://doi.org/10.1002/jat.3347>
- Hansjosten, I., Rapp, J., Reiner, L., Vatter, R., Fritsch-Decker, S., Peravali, R., ... Weiss, C. (2018). Microscopy-based high-throughput assays enable multi-parametric analysis to assess adverse effects of nanomaterials in various cell lines. *Archives of Toxicology*, 92(2), 633–649. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2106-7>
- Hasnain, M. S., & Nayak, A. K. (2019). Nanocomposites for improved orthopedic and bone tissue engineering applications. In *Applications of Nanocomposite Materials in Orthopedics* (pp. 145–177). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813740-6.00008-9>
- Hill, M. J., Mahmoudi, M., & Abadi, P. P. S. S. (2019). *Cardiovascular Regenerative Medicine*. (V. Serpooshan & S. M. Wu, Eds.), *Cardiovascular Regenerative Medicine*. Cham: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-20047-3>
- Hosseini, S. F., Rezaei, M., Zandi, M., & Farahmandghavi, F. (2015). Fabrication of bio-nanocomposite films based on fish gelatin reinforced with chitosan nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 44, 172–182. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.09.004>
- Hougaard, K. S., Campagnolo, L., Chavatte-Palmer, P., Tarrade, A., Rousseau-Ralliard, D., Valentino, S., ... Cassee, F. R. (2015). A perspective on the developmental toxicity of inhaled nanoparticles. *Reproductive Toxicology*, 56, 118–140. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.05.015>

- Hu, D., Wang, H., & Wang, L. (2016). Physical properties and antibacterial activity of quaternized chitosan/carboxymethyl cellulose blend films. *LWT - Food Science and Technology*, *65*, 398–405. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.033>
- Hughes, P., Marshall, D., Reid, Y., Parkes, H., & Gelber, C. (2007). The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: How much more data do we need? *BioTechniques*, *43*(5), 575–586. <https://doi.org/10.2144/000112598>
- Hussain, S. M., Warheit, D. B., Ng, S. P., Comfort, K. K., Grabinski, C. M., & Braydich-Stolle, L. K. (2015). At the crossroads of nanotoxicology in vitro: Past achievements and current challenges. *Toxicological Sciences*, *147*(1), 5–16. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv106>
- Hutmacher, D. W. (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, *21*(24), 2529–2543. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00121-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00121-6)
- Ilie, I., Ilie, R., Mocan, T., Bartos, D., & Mocan, L. (2012). Influence of nanomaterials on stem cell differentiation: Designing an appropriate nanobiointerface. *International Journal of Nanomedicine*, *7*, 2211–2225. <https://doi.org/10.2147/IJN.S29975>
- Ivask, A., Kurvet, I., Kasemets, K., Blinova, I., Aruoja, V., Suppi, S., ... Kahru, A. (2014). Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells in vitro. *PLoS ONE*, *9*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102108>
- Jain, K. K. (2008). Nanomedicine: Application of nanobiotechnology in medical practice. *Medical Principles and Practice*, *17*(2), 89–101. <https://doi.org/10.1159/000112961>
- Jameela, S. R., Suma, N., & Jayakrishnan, A. (2012). Protein release from poly( $\epsilon$ -caprolactone) microspheres prepared by melt encapsulation and solvent evaporation techniques: A comparative study. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, *8*(6), 457–466. <https://doi.org/10.1163/156856297X00380>
- Jantunen, A. P. K., Gottardo, S., Rasmussen, K., & Crutzen, H. P. (2018). An inventory of ready-to-use and publicly available tools for the safety assessment of nanomaterials. *NanoImpact*, *12*, 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2018.08.007>
- Jemec, A., Mesarič, T., Sopotnik, M., Sepčić, K., & Drobne, D. (2016). *Nanomaterial Characterization*. (R. Tantra, Ed.), *Nanomaterial Characterization: An*

- Introduction*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.  
<https://doi.org/10.1002/9781118753460>
- Johnston, H., Pojana, G., Zuin, S., Jacobsen, N. R., Moller, P., Loft, S., ... Stone, V. (2013). Engineered nanomaterial risk. Lessons learnt from completed nanotoxicology studies: Potential solutions to current and future challenges. *Critical Reviews in Toxicology*, 43(1), 1–20.  
<https://doi.org/10.3109/10408444.2012.738187>
- Jorfi, M., & Foster, E. J. (2015). Recent advances in nanocellulose for biomedical applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(14), 1–19.  
<https://doi.org/10.1002/app.41719>
- Juliano, R. (2013). Nanomedicine: Is the wave cresting? *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(3), 171–172. <https://doi.org/10.1038/nrd3958>
- Kaczmarek, B., Sionkowska, A., Łukowicz, K., & Maria Osyczka, A. (2017). The cells viability study on the composites of chitosan and collagen with glycosaminoglycans isolated from fish skin. *Materials Letters*, 206, 166–168.  
<https://doi.org/10.1016/j.matlet.2017.07.022>
- Kah, M., Kookana, R. S., Gogos, A., & Bucheli, T. D. (2018). A critical evaluation of nanopesticides and nanofertilizers against their conventional analogues. *Nature Nanotechnology*, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41565-018-0131-1>
- Kamel, S. (2007). Nanotechnology and its applications in lignocellulosic composites, a mini review. *Express Polymer Letters*, 1(9), 546–575.  
<https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2007.78>
- Khan, S. H., Fulekar, M. H., & Pathak, B. (2015). Nanotoxicology - Health and Environmental Impacts: A Review. *Journal of Environmental Nanotechnology*, 4(3), 55–73. <https://doi.org/10.13074/jent.2015.09.153165>
- Khattab, M. M., Abdel-Hady, N. A., & Dahman, Y. (2017). *Cellulose nanocomposites: Opportunities, challenges, and applications. Cellulose-Reinforced Nanofibre Composites: Production, Properties and Applications*. Elsevier Ltd.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100957-4.00021-8>
- Klemm, D., Kramer, F., Moritz, S., Lindström, T., Ankerfors, M., Gray, D., & Dorris, A. (2011). Nanocelluloses: A new family of nature-based materials. *Angewandte Chemie - International Edition*, 50(24), 5438–5466.  
<https://doi.org/10.1002/anie.201001273>
- Komori, T. (2017). Roles of Runx2 in Skeletal Development. In Y. Groner, Y. Ito, P.

- Liu, J. C. Neil, N. A. Speck, & A. van Wijnen (Eds.), *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 962, pp. 83–93). Singapore: Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-3233-2\\_6](https://doi.org/10.1007/978-981-10-3233-2_6)
- Lahiani, M. H., Gokulan, K., Williams, K., Khodakovskaya, M. V., & Khare, S. (2017). Graphene and carbon nanotubes activate different cell surface receptors on macrophages before and after deactivation of endotoxins. *Journal of Applied Toxicology*, *37*(11), 1305–1316. <https://doi.org/10.1002/jat.3477>
- Lai, D. Y. (2017). Limited Usefulness of In Vitro Toxicity Data in Hazard Identification of Nanomaterials, *1*(2), 5–8.
- Lee, J. H., Rim, N. G., Jung, H. S., & Shin, H. (2010). Control of osteogenic differentiation and mineralization of human mesenchymal stem cells on composite nanofibers containing poly[lactic-co- (glycolic acid)] and hydroxyapatite. *Macromolecular Bioscience*, *10*(2), 173–182. <https://doi.org/10.1002/mabi.200900169>
- Lee, J. W. Y., & Bance, M. L. (2019). Physiology of Osseointegration. *Otolaryngologic Clinics of North America*, *52*(2), 231–242. <https://doi.org/10.1016/j.otc.2018.11.004>
- Lee, H. V., Hamid, S. B. A., Zain, S. K., Lee, H. V., Hamid, S. B. A., & Zain, S. K. (2014). Conversion of Lignocellulosic Biomass to Nanocellulose: Structure and Chemical Process. *The Scientific World Journal*, *2014*, 1–20. <https://doi.org/10.1155/2014/631013>
- Lewandowski, J., Kolanowski, T. J., & Kurpisz, M. (2017). Techniques for the induction of human pluripotent stem cell differentiation towards cardiomyocytes. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, *11*(5), 1658–1674. <https://doi.org/10.1002/term.2117>
- Lewinski, N., Colvin, V., & Drezek, R. (2008). Cytotoxicity of nanoparticles. *Small*, *4*(1), 26–49. <https://doi.org/10.1002/smll.200700595>
- Li, N., Sioutas, C., Cho, A., Schmitz, D., Misra, C., Sempf, J., ... Nel, A. (2003). Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environmental Health Perspectives*, *111*(4), 455–460. <https://doi.org/10.1289/ehp.6000>
- Li, W., Zhao, X., & Liu, S. (2013). Preparation of entangled nanocellulose fibers from APMP and its magnetic functional property as matrix. *Carbohydrate Polymers*, *94*(1), 278–285. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.052>

- Li, X., Liu, W., Sun, L., Aifantis, K. E., Yu, B., Fan, Y., ... Watari, F. (2015). Effects of physicochemical properties of nanomaterials on their toxicity. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 103(7), 2499–2507. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35384>
- Li, Y., Cui, X. L., Chen, Q. S., Yu, J., Zhang, H., Gao, J., ... Zhang, G. Q. (2018). Cationic liposomes induce cytotoxicity in HepG2 via regulation of lipid metabolism based on whole-transcriptome sequencing analysis. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 19(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s40360-018-0230-5>
- Li, Y. H., Cheng, C. Y., Wang, N. K., Tan, H. Y., Tsai, Y. J., Hsiao, C. H., ... Yeh, L. K. (2015). Characterization of the modified chitosan membrane cross-linked with genipin for the cultured corneal epithelial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 126, 237–244. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.12.029>
- Li, Z., Ramay, H. R., Hauch, K. D., Xiao, D., & Zhang, M. (2005). Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 26(18), 3919–3928. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.09.062>
- Lian, J. B., & Stein, G. S. (2008). *Osteoblast Biology OF THE OSTEOLAST PHENOTYPE: Organization* (Third Edit). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370544-0.50008-2>
- Lin, P. C., Lin, S., Wang, P. C., & Sridhar, R. (2014). Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnology Advances*, 32(4), 711–726. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.006>
- Lin, Y. C., Boone, M., Meuris, L., Lemmens, I., Van Roy, N., Soete, A., ... Callewaert, N. (2014). Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nature Communications*, 5(11). <https://doi.org/10.1038/ncomms5767>
- Liu, T., Liang, H., Liu, L., Gong, Y., Ding, Y., Liao, G., & Cao, Y. (2019). Influence of pristine and hydrophobic ZnO nanoparticles on cytotoxicity and endoplasmic reticulum (ER) stress-autophagy-apoptosis gene expression in A549-macrophage co-culture. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 167(June 2018), 188–195. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.018>
- Liu, W., Deng, Y., Liu, Y., Gong, W., & Deng, W. (2013). Stem Cell Models for Drug Discovery and Toxicology Studies. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 27(1), 17–27. <https://doi.org/10.1002/jbt.21470>
- LIU, X., & MA, P. X. (2004). Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Bone*,

- 32(3), 477–486. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31829>. ELECTROSPINNING
- Liu, Y., Sun, X., Zhang, X., Wang, X., Zhang, C., & Zheng, S. (2019). RUNX2 mutation impairs osteogenic differentiation of dental follicle cells. *Archives of Oral Biology*, *97*, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.10.029>
- Liu, Z. J., Zhuge, Y., & Velazquez, O. C. (2009). Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, *106*(6), 984–991. <https://doi.org/10.1002/jcb.22091>
- Lokanathan, A. R., Kontturi, E., Linder, M. B., Rojas, O. J., Ikkala, O., & Gröschel, A. H. (2017). Nanocellulose-Based Materials in Supramolecular Chemistry. In *Comprehensive Supramolecular Chemistry II* (Vol. 9, pp. 351–364). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12531-4>
- Lu, P., & Hsieh, Y. Lo. (2012). Preparation and characterization of cellulose nanocrystals from rice straw. *Carbohydrate Polymers*, *87*(1), 564–573. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.022>
- Luttrell, L. M., Dar, M. S., Gesty-Palmer, D., El-Shewy, H. M., Robinson, K. M., Haycraft, C. J., & Barth, J. L. (2019). Transcriptomic characterization of signaling pathways associated with osteoblastic differentiation of MC-3T3E1 cells. *PLoS ONE*, *14*(1), 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204197>
- Mahanta, A. K., & Maiti, P. (2016). Chitin and Chitosan for Regenerative Medicine. *Chitin and Chitosan for Regenerative Medicine*, 123–148. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2511-9>
- Mahapatra, C., Singh, R. K., Lee, J. H., Jung, J., Hyun, J. K., & Kim, H. W. (2017). Nano-shape varied cerium oxide nanomaterials rescue human dental stem cells from oxidative insult through intracellular or extracellular actions. *Acta Biomaterialia*, *50*, 142–153. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.12.014>
- Mahfoudhi, N., & Boufi, S. (2017). *Nanocellulose: A challenging nanomaterial towards environment remediation. Cellulose-Reinforced Nanofibre Composites: Production, Properties and Applications*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100957-4.00012-7>
- Mahmoud, N. S., Ahmed, H. H., Mohamed, M. R., Amr, K. S., Aglan, H. A., Ali, M. A. M., & Tantawy, M. A. (2019). Role of nanoparticles in osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Cytotechnology*, *0123456789*. <https://doi.org/10.1007/s10616-019-00353-y>
- Mandal, A., & Chakrabarty, D. (2015). Characterization of nanocellulose reinforced

- semi-interpenetrating polymer network of poly(vinyl alcohol) & polyacrylamide composite films. *Carbohydrate Polymers*, 134, 240–250. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.093>
- Mao, A. S., & Mooney, D. J. (2015). Regenerative medicine: Current therapies and future directions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(47), 14452–14459. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508520112>
- Mao, Z., Zhou, X., & Gao, C. (2013). Influence of structure and properties of colloidal biomaterials on cellular uptake and cell functions. *Biomaterials Science*, 1(9), 896–911. <https://doi.org/10.1039/c3bm00137g>
- MarketsandMarkets. (2019). Nanocellulose Market by Type (Microfibrillated Cellulose, Cellulose Nanocrystals), Application (Pulp& paper, Composites & packaging, Biomedical & pharmaceuticals, Electronics & sensors), and Region (Europe, North America, APAC) - Global Forecast to 2023. Retrieved November 18, 2019, from <http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/nano-cellulose-market-56392090.html>
- Markstedt, K., Mantas, A., Tournier, I., Martínez Ávila, H., Hägg, D., & Gatenholm, P. (2015). 3D bioprinting human chondrocytes with nanocellulose-alginate bioink for cartilage tissue engineering applications. *Biomacromolecules*, 16(5), 1489–1496. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00188>
- Martens, W., Bronckaers, A., Politis, C., Jacobs, R., & Lambrichts, I. (2013). Dental stem cells and their promising role in neural regeneration: An update. *Clinical Oral Investigations*, 17(9), 1969–1983. <https://doi.org/10.1007/s00784-013-1030-3>
- Mathew, A. P., Oksman, K., Pierron, D., & Harmand, M. F. (2012). Fibrous cellulose nanocomposite scaffolds prepared by partial dissolution for potential use as ligament or tendon substitutes. *Carbohydrate Polymers*, 87(3), 2291–2298. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.10.063>
- McMurray, R. J., Gadegaard, N., Tsimbouri, P. M., Burgess, K. V., McNamara, L. E., Tare, R., ... Dalby, M. J. (2011). Nanoscale surfaces for the long-term maintenance of mesenchymal stem cell phenotype and multipotency. *Nature Materials*, 10(8), 637–644. <https://doi.org/10.1038/nmat3058>
- Meyer, C., Stenberg, L., Gonzalez-Perez, F., Wrobel, S., Ronchi, G., Udina, E., ... Haastert-Talini, K. (2016). Chitosan-film enhanced chitosan nerve guides for long-distance regeneration of peripheral nerves. *Biomaterials*, 76, 33–51. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.10.040>



- Mohan, T., Hribernik, S., Kargl, R., & Stana-Kleinschek, K. (2015). Nanocellulosic Materials in Tissue Engineering Applications. *Cellulose - Fundamental Aspects and Current Trends*. <https://doi.org/10.5772/61344>
- Monteiro-Riviere, N. A., Inman, A. O., & Zhang, L. W. (2009). Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *234*(2), 222–235. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.09.030>
- Moreira, S., Silva, N. B., Almeida-Lima, J., Rocha, H. A. O., Medeiros, S. R. B., Alves, C., & Gama, F. M. (2009). BC nanofibres: In vitro study of genotoxicity and cell proliferation. *Toxicology Letters*, *189*(3), 235–241. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.06.849>
- Morgan, E. F., Barnes, G. L., & Einhorn, T. A. (2013). The Bone Organ System. In *Osteoporosis* (Fourth Edi, pp. 3–20). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415853-5.00001-7>
- Mu, Q., Jiang, G., Chen, L., Zhou, H., Fourches, D., Tropsha, A., & Yan, B. (2014). Chemical basis of interactions between engineered nanoparticles and biological systems. *Chemical Reviews*, *114*(15), 7740–7781. <https://doi.org/10.1021/cr400295a>
- Munk, M., Brandão, H. M., Nowak, S., Mouton, L., Gern, J. C., Guimaraes, A. S., ... Brayner, R. (2015). Direct and indirect toxic effects of cotton-derived cellulose nanofibres on filamentous green algae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *122*, 399–405. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.09.001>
- Munk, M., Brandão, H. M., Yéprémian, C., Couté, A., Ladeira, L. O., Raposo, N. R. B., & Brayner, R. (2017). Effect of Multi-walled Carbon Nanotubes on Metabolism and Morphology of Filamentous Green Microalgae. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *73*(4), 649–658. <https://doi.org/10.1007/s00244-017-0429-2>
- Munk, M., Camargo, L. S. A., Quintão, C. C. R., Silva, S. R., Souza, E. D., Raposo, N. R. B., ... Brandão, H. M. (2016). Biocompatibility assessment of fibrous nanomaterials in mammalian embryos. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, *12*(5), 1151–1159. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.01.006>
- Muzzarelli, R. A. A., Mattioli-Belmonte, M., Tietz, C., Biagini, R., Ferioli, G., Brunelli, M. A., ... Biagini, G. (1994). Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan. *Biomaterials*, *15*(13), 1075–1081.

- [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(94\)90093-0](https://doi.org/10.1016/0142-9612(94)90093-0)
- Muzzarelli, Riccardo A.A. (2009). Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydrate Polymers*, 76(2), 167–182. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.11.002>
- Nasir, M., Hashim, R., Sulaiman, O., & Asim, M. (2017). *Nanocellulose: Preparation methods and applications. Cellulose-Reinforced Nanofibre Composites: Production, Properties and Applications*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100957-4.00011-5>
- Nel, A. E., Nasser, E., Godwin, H., Avery, D., Bahadori, T., Bergeson, L., ... Wong, J. (2014). A Multi-Stakeholder Perspective on the Use of Alternative Test Strategies for Nanomaterial Safety Assessment, 7(8), 6422–6433. <https://doi.org/10.1021/nn4037927.A>
- Ngiam, M., Liao, S., Patil, A. J., Cheng, Z., Chan, C. K., & Ramakrishna, S. (2010). The fabrication of nano-hydroxyapatite on PLGA and PLGA/collagen nanofibrous composite scaffolds and their effects in osteoblastic behavior for bone tissue engineering. *Bone*, 45(1), 4–16. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2009.03.674>
- Nguyen, D., Hgg, D. A., Forsman, A., Ekholm, J., Nimkingratana, P., Brantsing, C., ... Simonsson, S. (2017). Cartilage Tissue Engineering by the 3D Bioprinting of iPS Cells in a Nanocellulose/Alginate Bioink. *Scientific Reports*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00690-y>
- Ni, H., Zeng, S., Wu, J., Cheng, X., Luo, T., Wang, 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>
- Nickerson, R. F., & Habrle, J. A. (1947). Cellulose Intercrystalline Structure. *Industrial & Engineering Chemistry*, 39(11), 1507–1512. <https://doi.org/10.1021/ie50455a024>
- Niu, W., Guo, Y., Xue, Y., Chen, M., Wang, M., Cheng, W., & Lei, B. (2019). Monodisperse Branched Molybdenum-Based Bioactive Nanoparticles Significantly Promote Osteogenic Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells. *Particle and Particle Systems Characterization*, 36(7), 1–10. <https://doi.org/10.1002/ppsc.201900105>
- Nuti, N., Corallo, C., Chan, B. M. F., Ferrari, M., & Gerami-Naini, B. (2016). Multipotent Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells: a Literature Review. *Stem Cell*

- Reviews and Reports*, 12(5), 511–523. <https://doi.org/10.1007/s12015-016-9661-9>
- Oberdörster, G., Castranova, V., Asgharian, B., & Sayre, P. (2015). Inhalation exposure to carbon nanotubes (CNT) and carbon nanofibers (CNF): Methodology and Dosimetry. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews*, 18(3–4), 121–212. <https://doi.org/10.1080/10937404.2015.1051611>
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., & Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives*, 113(7), 823–839. <https://doi.org/10.1289/ehp.7339>
- Oh, N., & Park, J. H. (2014). Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *International Journal of Nanomedicine*, 9(SUPPL.1), 51–63. <https://doi.org/10.2147/IJN.S26592>
- Olvera, D., Sathy, B. N., Carroll, S. F., & Kelly, D. J. (2017). Modulating microfibrillar alignment and growth factor stimulation to regulate mesenchymal stem cell differentiation. *Acta Biomaterialia*, 64, 148–160. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.10.010>
- Pacelli, S., Basu, S., Whitlow, J., Chakravarti, A., Acosta, F., Varshney, A., ... Paul, A. (2017). Strategies to develop endogenous stem cell-recruiting bioactive materials for tissue repair and regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 120, 50–70. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.07.011>
- Paduano, F., Marrelli, M., White, L. J., Shakesheff, K. M., & Tatullo, M. (2016). Odontogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells on Hydrogel Scaffolds Derived from Decellularized Bone Extracellular Matrix and Collagen Type I. *PLOS ONE*, 11(2), e0148225. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148225>
- Pan, R., Xu, X., Sun, R., Wang, Z., Lindh, J., Edström, K., ... Nyholm, L. (2018). Nanocellulose Modified Polyethylene Separators for Lithium Metal Batteries. *Small*, 1704371, 1–9. <https://doi.org/10.1002/smll.201704371>
- Park, M., Lee, D., Shin, S., & Hyun, J. (2015). Effect of negatively charged cellulose nanofibers on the dispersion of hydroxyapatite nanoparticles for scaffolds in bone tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 130, 222–228. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.04.014>
- Parvizi, J., & Kim, G. K. (2010). Osteoclasts. In J. Parvizi & G. K. Kim (Eds.), *High Yield Orthopaedics* (pp. 337–339). Philadelphia: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978->

1-4160-0236-9.00174-7

- Pereira, M. M., Raposo, N. R. B., Brayner, R., Teixeira, E. M., Oliveira, V., Quintão, C. C. R., ... Brandão, H. M. (2013a). Cytotoxicity and expression of genes involved in the cellular stress response and apoptosis in mammalian fibroblast exposed to cotton cellulose nanofibers. *Nanotechnology*, 24(7). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/24/7/075103>
- Pereira, M. M., Raposo, N. R. B., Brayner, R., Teixeira, E. M., Oliveira, V., Quintão, C. C. R., ... Brandão, H. M. (2013b). Cytotoxicity and expression of genes involved in the cellular stress response and apoptosis in mammalian fibroblast exposed to cotton cellulose nanofibers. *Nanotechnology*, 24(7). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/24/7/075103>
- Pina, S., Oliveira, J. M., & Reis, R. L. (2015). Natural-based nanocomposites for bone tissue engineering and regenerative medicine: A review. *Advanced Materials*, 27(7), 1143–1169. <https://doi.org/10.1002/adma.201403354>
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., ... Marshak, D. R. (1999). Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells, 284(April), 143–148.
- Pons, T., Uyeda, H. T., Medintz, I. L., & Mattoussi, H. (2006). Hydrodynamic dimensions, electrophoretic mobility, and stability of hydrophilic quantum dots. *Journal of Physical Chemistry B*, 110(41), 20308–20316. <https://doi.org/10.1021/jp065041h>
- Pooyan, P., Kim, I. T., Jacob, K. I., Tannenbaum, R., & Garmestani, H. (2013). Design of a cellulose-based nanocomposite as a potential polymeric scaffold in tissue engineering. *Polymer (United Kingdom)*, 54(8), 2105–2114. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2013.01.030>
- Popov, A. L., Popova, N. R., & Irina I. Selezneva, Azamat Y. Akkizov, V. K. I. (2016). Cerium oxide nanoparticles stimulate proliferation of primary mouse embryonic fibroblasts in vitro. *Materials Science and Engineering, C* 68, 406–413.
- Qasim, M., Chae, D. S., & Lee, N. (2019). Advancements and frontiers in nano-based 3d and 4d scaffolds for bone and cartilage tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 4333–4351. <https://doi.org/10.2147/IJN.S209431>
- Qiu, Z.-Y., Cui, Y., & Wang, X.-M. (2019). Natural Bone Tissue and Its Biomimetic. In *Mineralized Collagen Bone Graft Substitutes* (Vol. 10, pp. 1–22). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-102717-2.00001-1>

- Radomska, A., Leszczyszyn, J., & Radomski, M. (2016). The Nanopharmacology and Nanotoxicology of Nanomaterials: New Opportunities and Challenges. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 25(1), 151–162. <https://doi.org/10.17219/acem/60879>
- Ragety, G. R., Griffon, D. J., Lee, H. B., Fredericks, L. P., Gordon-Evans, W., & Chung, Y. S. (2010). Effect of chitosan scaffold microstructure on mesenchymal stem cell chondrogenesis. *Acta Biomaterialia*, 6(4), 1430–1436. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.10.040>
- Rane, A. V., Kanny, K., Abitha, V. K., & Thomas, S. (2018). *Methods for Synthesis of Nanoparticles and Fabrication of Nanocomposites. Synthesis of Inorganic Nanomaterials*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-101975-7.00005-1>
- Reyes, A. P., Martínez Torres, A., Carreón Castro, M. D. P., Rodríguez Talavera, J. R., Muñoz, S. V., Aguilar, V. M. V., & Torres, M. G. (2016). Novel poly(3-hydroxybutyrate-g-vinyl alcohol) polyurethane scaffold for tissue engineering. *Scientific Reports*, 6(August), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep31140>
- Reznikov, N., Bilton, M., Lari, L., Stevens, M. M., & Kröger, R. (2018). Fractal-like hierarchical organization of bone begins at the nanoscale. *Science*, 360(6388). <https://doi.org/10.1126/science.aao2189>
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 31(7), 603–632. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
- Robles-García, M. A., Rodríguez-Félix, F., Márquez-Ríos, E., Aguilar, J. A., Barrera-Rodríguez, A., Aguilar, J., ... Del-Toro-Sánchez, C. L. (2016). Applications of Nanotechnology in the Agriculture, Food, and Pharmaceuticals. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 16(8), 8188–8207. <https://doi.org/10.1166/jnn.2016.12925>
- Rodríguez-Fuentes, N., Reynoso-Ducoing, O., Rodríguez-Hernández, A., Ambrosio-Hernández, J. R., Piña-Barba, M. C., Zepeda-Rodríguez, A., ... Alcántara-Quintana, L. E. (2015). Isolation of Human Mesenchymal Stem Cells and their Cultivation on the Porous Bone Matrix. *Journal of Visualized Experiments*, (96), 2211. <https://doi.org/10.3791/51999>
- Rodríguez-Vázquez, M., Vega-Ruiz, B., Ramos-Zúñiga, R., Saldaña-Koppel, D. A., & Quiñones-Olvera, L. F. (2015). Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for

- Tissue Engineering in Regenerative Medicine. *BioMed Research International*, 2015, 821279. <https://doi.org/10.1155/2015/821279>
- Romo-Urbe, A., Meneses-Acosta, A., & Domínguez-Díaz, M. (2017). Viability of HEK 293 cells on poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) biosynthesized from a mutant *Azotobacter vinelandii* strain. Cast film and electrospun scaffolds. *Materials Science and Engineering C*, 81(July), 236–246. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.07.045>
- RUDALL, K. M., & KENCHINGTON, W. (1973). the Chitin System. *Biological Reviews*, 48(4), 597–633. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185x.1973.tb01570.x>
- Ruppel, M. E., Miller, L. M., & Burr, D. B. (2008). The effect of the microscopic and nanoscale structure on bone fragility. *Osteoporosis International*, 19(9), 1251–1265. <https://doi.org/10.1007/s00198-008-0579-1>
- Rycroft, T., Trump, B., Poinsette-Jones, K., & Linkov, I. (2018). Nanotoxicology and nanomedicine: making development decisions in an evolving governance environment. *Journal of Nanoparticle Research*, 20(2). <https://doi.org/10.1007/s11051-018-4160-3>
- Saba, N., & Jawaid, M. (2017). *Recent advances in nanocellulose-based polymer nanocomposites. Cellulose-Reinforced Nanofibre Composites: Production, Properties and Applications*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100957-4.00004-8>
- Saba, N., Jawaid, M., & Asim, M. (2016). Nanoclay Reinforced Polymer Composites. *Singapore: Springer*, 1–28. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-1953-1>
- Saba, N., Tahir, P. M., & Jawaid, M. (2014). A review on potentiality of nano filler/natural fiber filled polymer hybrid composites. *Polymers*, 6(8), 2247–2273. <https://doi.org/10.3390/polym6082247>
- Sahu, S. C. (2016). Altered global gene expression profiles in human gastrointestinal epithelial Caco2 cells exposed to nanosilver. *Toxicology Reports*, 3, 262–268. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2016.01.012>
- Salari, M., Sowti Khiabani, M., Rezaei Mokarram, R., Ghanbarzadeh, B., & Samadi Kafil, H. (2018). Development and evaluation of chitosan based active nanocomposite films containing bacterial cellulose nanocrystals and silver nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 84, 414–423. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.05.037>
- Sankararamkrishnan, N., & Sanghi, R. (2006). Preparation and characterization of a

- novel xanthated chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 66(2), 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.02.035>
- Santos, J. L., Pandita, D., Rodrigues, J., Pêgo, A. P., Granja, P. L., & Tomás, H. (2011). Non-viral gene delivery to mesenchymal stem cells: Methods, strategies and application in bone tissue engineering and regeneration. *Current Gene Therapy*, 11(1), 46–57. <https://doi.org/10.2174/156652311794520102>
- Sapsford, K. E., Tyner, K. M., Dair, B. J., Deschamps, J. R., & Medintz, I. L. (2011). AuNP130-Analyzing nanomaterial bioconjugates: A review of current and emerging purification and characterization techniques. *Analytical Chemistry*, 83(12), 4453–4488. <https://doi.org/10.1021/ac200853a>
- Savić, R., Luo, L., Eisenberg, A., & Maysinger, D. (2003). Micellar nanocontainers distribute to defined cytoplasmic organelles. *Science*, 300(5619), 615–618. <https://doi.org/10.1126/science.1078192>
- Sharma, M., Nikota, J., Halappanavar, S., Castranova, V., Rothen-Rutishauser, B., & Clippinger, A. J. (2016). Predicting pulmonary fibrosis in humans after exposure to multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs). *Archives of Toxicology*, 90(7), 1605–1622. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1742-7>
- Sheikh, Z., Najeeb, S., Khurshid, Z., Verma, V., Rashid, H., & Glogauer, M. (2015). Biodegradable materials for bone repair and tissue engineering applications. *Materials*, 8(9), 5744–5794. <https://doi.org/10.3390/ma8095273>
- Shenvi, S., Ismail, A. F., & Isloor, A. M. (2014). Preparation and characterization study of PPEES/chitosan composite membrane crosslinked with tripolyphosphate. *Desalination*, 344, 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2014.02.026>
- Shi, L., Wang, K., & Yang, Y. (2016). Adhesion-based tumor cell capture using nanotopography. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 147, 291–299. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.08.008>
- Silvério, H. A., Flauzino Neto, W. P., Dantas, N. O., & Pasquini, D. (2013). Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from corncob for application as reinforcing agent in nanocomposites. *Industrial Crops and Products*, 44, 427–436. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.10.014>
- Siripatrawan, U., & Vitchayakitti, W. (2016). Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis. *Food Hydrocolloids*, 61, 695–702. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.001>
- Snyder-Talkington, B. N., Dong, C., Zhao, X., Dymacek, J., Porter, D. W., Wolfarth, M.

- G., ... Guo, N. L. (2015). Multi-walled carbon nanotube-induced gene expression in vitro: Concordance with in vivo studies. *Toxicology*, 328, 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.12.012>
- Soenen, S. J., Manshian, B. B., Himmelreich, U., Demeester, J., Braeckmans, K., & De Smedt, S. C. (2014). The performance of gradient alloy quantum dots in cell labeling. *Biomaterials*, 35(26), 7249–7258. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.05.023>
- Sousa, M. P., Caridade, S. G., & Mano, J. F. (2017). Control of Cell Alignment and Morphology by Redesigning ECM-Mimetic Nanotopography on Multilayer Membranes. *Advanced Healthcare Materials*, 6(15), 1601462. <https://doi.org/10.1002/adhm.201601462>
- Stahl, W., Junghans, A., De Boer, B., Driomina, E. S., Briviba, K., & Sies, H. (1998). Carotenoid mixtures protect multilamellar liposomes against oxidative damage: Synergistic effects of lycopene and lutein. *FEBS Letters*, 427(2), 305–308. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00434-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00434-7)
- Stevens, M. M., & George, J. H. (2005). Exploring and engineering the cell surface interface. *Science*, 310(5751), 1135–1138. <https://doi.org/10.1126/science.1106587>
- Stoltz, J. F., De Isla, N., Li, Y. P., Bensoussan, D., Zhang, L., Huselstein, C., ... He, Y. (2015). Stem Cells and Regenerative Medicine: Myth or Reality of the 21st Century. *Stem Cells International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/734731>
- Sushma, Kumar, H., Ahmad, I., & Dutta, P. K. (2018). In-vitro toxicity induced by quartz nanoparticles: Role of ER stress. *Toxicology*, 404–405, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.05.001>
- Tao, O., Wu, D. T., Pham, H. M., Pandey, N., & Tran, S. D. (2019). Nanomaterials in craniofacial tissue regeneration: A review. *Applied Sciences (Switzerland)*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/app9020317>
- Thimiri Govinda Raj, D. B., & Khan, N. A. (2016). Designer nanoparticle: nanobiotechnology tool for cell biology. *Nano Convergence*, 3(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s40580-016-0082-x>
- Tidjarat, S., Winotapun, W., Opanasopit, P., Ngawhirunpat, T., & Rojanarata, T. (2014). Uniaxially aligned electrospun cellulose acetate nanofibers for thin layer chromatographic screening of hydroquinone and retinoic acid adulterated in cosmetics. *Journal of Chromatography A*, 1367, 141–147.



- <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.09.043>
- Timashev, P., Kuznetsova, D., Koroleva, A., Prodanets, N., Deiwick, A., Piskun, Y., ... Bagratashvili, V. (2016). Novel biodegradable star-shaped polylactide scaffolds for bone regeneration fabricated by two-photon polymerization. *Nanomedicine*, 11(9), 1041–1053. <https://doi.org/10.2217/nnm-2015-0022>
- Trammell, L. H., & Kroman, A. M. (2013). *Bone and Dental Histology. Research Methods in Human Skeletal Biology*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385189-5.00013-3>
- Urruzola, I., Robles, E., Serrano, L., & Labidi, J. (2014). Nanopaper from almond (*Prunus dulcis*) shell. *Cellulose*, 21(3), 1619–1629. <https://doi.org/10.1007/s10570-014-0238-y>
- van der Zande, M., Undas, A. K., Kramer, E., Monopoli, M. P., Peters, R. J., Garry, D., ... Bouwmeester, H. (2016). Different responses of Caco-2 and MCF-7 cells to silver nanoparticles are based on highly similar mechanisms of action. *Nanotoxicology*, 10(10), 1431–1441. <https://doi.org/10.1080/17435390.2016.1225132>
- Vance, M. E., Kuiken, T., Vejerano, E. P., McGinnis, S. P., Hochella, M. F., & Hull, D. R. (2015). Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 6(1), 1769–1780. <https://doi.org/10.3762/bjnano.6.181>
- Venkatesan, J., & Kim, S.-K. (2010). Chitosan Composites for Bone Tissue Engineering—An Overview. *Marine Drugs*, 8(8), 2252–2266. <https://doi.org/10.3390/md8082252>
- Walkey, C. D., Olsen, J. B., Guo, H., Emili, A., & Chan, W. C. W. (2012). Nanoparticle size and surface chemistry determine serum protein adsorption and macrophage uptake. *Journal of the American Chemical Society*, 134(4), 2139–2147. <https://doi.org/10.1021/ja2084338>
- Wan, Y. Z., Hong, L., Jia, S. R., Huang, Y., Zhu, Y., Wang, Y. L., & Jiang, H. J. (2006). Synthesis and characterization of hydroxyapatite-bacterial cellulose nanocomposites. *Composites Science and Technology*, 66(11–12), 1825–1832. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2005.11.027>
- Wang, C., Xie, X. D., Huang, X., Liang, Z. H., & Zhou, C. R. (2015). A quantitative study of MC3T3-E1 cell adhesion, morphology and biomechanics on chitosan-collagen blend films at single cell level. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*,

132, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.04.037>

- Wickramasinghe, S., Porwit, A., & Erber, W. (2011). Normal bone marrow cells: development and cytology. In *Blood and Bone Marrow Pathology* (Second Edition, pp. 19–44). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-3147-2.00002-X>
- Wu, K. C., Tseng, C. L., Wu, C. C., Kao, F. C., Tu, Y. K., C So, E., & Wang, Y. K. (2013). Nanotechnology in the regulation of stem cell behavior. *Science and Technology of Advanced Materials*, 14(5). <https://doi.org/10.1088/1468-6996/14/5/054401>
- Xie, J., Peng, C., Zhao, Q., Wang, X., Yuan, H., Yang, L., ... Zhang, Y. (2016). Osteogenic differentiation and bone regeneration of iPSC-MSCs supported by a biomimetic nanofibrous scaffold. *Acta Biomaterialia*, 29, 365–379. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.10.007>
- Xun, H., Ma, X., Chen, J., Yang, Z., Liu, B., Gao, X., ... Pang, J. (2017). Zinc oxide nanoparticle exposure triggers different gene expression patterns in maize shoots and roots. *Environmental Pollution*, 229, 479–488. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.05.066>
- Yang, H., Liu, C., Yang, D., Zhang, H., & Xi, Z. (2009). Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: The role of particle size, shape and composition. *Journal of Applied Toxicology*, 29(1), 69–78. <https://doi.org/10.1002/jat.1385>
- Yang, K., Cao, W., Hao, X., Xue, X., Zhao, J., Liu, J., ... Liang, X. J. (2013). Metallofullerene nanoparticles promote osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells through BMP signaling pathway. *Nanoscale*, 5(3), 1205–1212. <https://doi.org/10.1039/c2nr33575a>
- Yang, L. Y., Gao, J. L., Gao, T., Dong, P., Ma, L., Jiang, F. L., & Liu, Y. (2016). Toxicity of polyhydroxylated fullerene to mitochondria. *Journal of Hazardous Materials*, 301, 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.08.046>
- Yang, X., Bakaic, E., Hoare, T., & Cranston, E. D. (2013). Injectable polysaccharide hydrogels reinforced with cellulose nanocrystals: Morphology, rheology, degradation, and cytotoxicity. *Biomacromolecules*, 14(12), 4447–4455. <https://doi.org/10.1021/bm401364z>
- Yang, Y., Wang, K., Gu, X., & Leong, K. W. (2017). Biophysical Regulation of Cell Behavior—Cross Talk between Substrate Stiffness and Nanotopography. *Engineering*, 3(1), 36–54. <https://doi.org/10.1016/J.ENG.2017.01.014>

- Yasui, T., Mabuchi, Y., Toriumi, H., Ebine, T., Niibe, K., Houlihan, D. D., ... Matsuzaki, Y. (2016). Purified Human Dental Pulp Stem Cells Promote Osteogenic Regeneration. *Journal of Dental Research*, 95(2), 206–214. <https://doi.org/10.1177/0022034515610748>
- Yi, C., Liu, D., Fong, C.-C., Zhang, J., & Yang, M. (2010). Gold Nanoparticles Promote Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells through p38 MAPK Pathway. *ACS Nano*, 4(11), 6439–6448. <https://doi.org/10.1021/nn101373r>
- Yiling Hong, Chan, N., & Begum, A. N. (2019). Deriving Neural Cells from Pluripotent Stem Cells for Nanotoxicity Testing. In Q. Zhang (Ed.), *Nanotoxicity. Methods in Molecular Biology* (Vol. 1894, pp. 73–102). New York, NY: Humana Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-044529-8.50007-0>
- Youssef, A. M., Abou-Yousef, H., El-Sayed, S. M., & Kamel, S. (2015). Mechanical and antibacterial properties of novel high performance chitosan/nanocomposite films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 76, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.02.016>
- Yu, M., Yang, R., Huang, L., Cao, X., Yang, F., & Liu, D. (2012). Preparation and characterization of bamboo nanocrystalline cellulose. *BioResources*, 7(2), 1802–1812. <https://doi.org/10.15376/biores.7.2.1802-1812>
- Yuan, L., Qi, X., Qin, G., Liu, Q., Zhang, F., Song, Y., & Deng, J. (2019). Effects of gold nanostructures on differentiation of mesenchymal stem cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 184(September), 110494. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110494>
- Zakrzewski, W., Szymonowicz, M., Rybak, Z., & Dobrzyński, M. (2019). Stem cells: Past, present, and future. *Stem Cell Research and Therapy*, 10(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>
- Zamani, R., Aval, S. F., Pilehvar-soltanahmadi, Y., Nejati-koshki, K., Zarghami, N., Sciences, A. M., & Res, D. (2017). Recent Advances in Cell Electrospinning of Natural and Synthetic Nanofibers for Regenerative Medicine Electrospinning Techniques and Electrospun Potential of Nanofibers for Regenerative Medicine Application.
- Zanette, R. S. S., de Almeida, L. B. F., Souza, N. L. G. D., de Almeida, C. G., de Oliveira, L. F. C., de Matos, E. M., ... Munk, M. (2019). Cotton cellulose nanofiber/chitosan nanocomposite: characterization and evaluation of cytocompatibility. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 30(16), 1489–

1504. <https://doi.org/10.1080/09205063.2019.1646627>
- Zare, E. N., Makvandi, P., Ashtari, B., Rossi, F., Motahari, A., & Perale, G. (2019). Progress in Conductive Polyaniline-Based Nanocomposites for Biomedical Applications: A Review. *Journal of Medicinal Chemistry*, *acs.jmedchem.9b00803*. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00803>
- Zhang, B., Yan, W., Zhu, Y., Yang, W., Le, W., Chen, B., ... Cheng, L. (2018a). Nanomaterials in Neural-Stem-Cell-Mediated Regenerative Medicine: Imaging and Treatment of Neurological Diseases. *Advanced Materials*, *30*(17), 1705694. <https://doi.org/10.1186/s12951-017-0310-5>
- Zhang, B., Yan, W., Zhu, Y., Yang, W., Le, W., Chen, B., ... Cheng, L. (2018b). Nanomaterials in Neural-Stem-Cell-Mediated Regenerative Medicine: Imaging and Treatment of Neurological Diseases. *Advanced Materials*, *30*(17), 1–23. <https://doi.org/10.1002/adma.201705694>
- Zhang, R., Lee, P., Lui, V. C. H., Chen, Y., Liu, X., Lok, C. N., ... Wong, K. K. Y. (2015). Silver nanoparticles promote osteogenesis of mesenchymal stem cells and improve bone fracture healing in osteogenesis mechanism mouse model. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, *11*(8), 1949–1959. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.07.016>
- Zhang, Y., Kong, N., Zhang, Y., Yang, W., & Yan, F. (2017). Size-dependent effects of gold nanoparticles on osteogenic differentiation of human periodontal ligament progenitor cells. *Theranostics*, *7*(5), 1214–1224. <https://doi.org/10.7150/thno.17252>
- Zhao, J., Wang, Z., White, J. C., & Xing, B. (2014). Graphene in the aquatic environment: Adsorption, dispersion, toxicity and transformation. *Environmental Science and Technology*, *48*(17), 9995–10009. <https://doi.org/10.1021/es5022679>
- Zhou, X., Yuan, L., Wu, C., Cheng chen, C. chen, Luo, G., Deng, J., & Mao, Z. (2018). Recent review of the effect of nanomaterials on stem cells. *RSC Advances*, *8*(32), 17656–17676. <https://doi.org/10.1039/C8RA02424C>
- Zhukova, Y., Hiepen, C., Knaus, P., Osterland, M., Prohaska, S., Dunlop, J. W. C., ... Skorb, E. V. (2017). The Role of Titanium Surface Nanostructuring on Preosteoblast Morphology, Adhesion, and Migration. *Advanced Healthcare Materials*, *6*(15), 1601244. <https://doi.org/10.1002/adhm.201601244>

## **2 CAPÍTULO 1: PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOFIBRAS DE CELULOSE (NFCs) DE ALGODÃO E ANÁLISE DA CITOCOMPATIBILIDADE E INDUÇÃO DE DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS**

### **2.1 INTRODUÇÃO**

Os rápidos avanços na engenharia de NMs tiveram um grande impacto em campos como eletrônica, agricultura e medicina (D'MELLO et al., 2017; KAH et al., 2018; PAN et al., 2018). Entre os muitos tipos diferentes de NMs, as NFCs derivadas da biomassa renovável têm atraído atenção especial devido às suas propriedades físicas, químicas e mecânicas únicas. As NFCs são os domínios cristalinos das fibras de celulose que podem ser aplicadas na indústria de cosméticos (TIDJARAT et al., 2014), entrega de medicamentos (BHANDARI et al., 2017) e aplicações clínicas, especialmente engenharia de tecidos e medicina regenerativa (AO et al., 2017; PARK et al., 2015).

No entanto, o número crescente de produtos que contêm NFC levou a preocupações quanto ao potencial risco para a saúde humana após a exposição do consumidor. As mesmas propriedades que tornam os NMs únicos, como dimensões em nanoescala, grande área superficial e forma particular, podem contribuir para seu perfil toxicológico. A celulose em nanoescala tem uma alta proporção entre seu comprimento e diâmetro que se assemelha a fibras que tem sido associada aos efeitos colaterais de outros NMs fibrosos (BOONRUNGSIMAN et al., 2017; SHARMA et al., 2016).

Pouco se sabe sobre como os NMs fibrosos se comportam quando em contato com células de mamíferos. Os estudos atuais sobre os efeitos toxicológicos das NFCs de algodão ainda são escassos. Alguns trabalhos sobre a citotoxicidade da NFC de algodão foram relatados anteriormente em células de mamíferos, por exemplo, células pulmonares humanas (CLIFT et al., 2011) e células de fibroblastos bovinos (PEREIRA et al., 2013b), enquanto outras foram testadas em embriões bovinos (MUNK et al., 2016). No entanto, a maioria dos estudos em nanotoxicologia foi realizada usando linhagens celulares diferenciadas. Enquanto alguns mecanismos

tóxicos podem ser universais, outros podem variar de maneira específica dependendo do tipo celular.

Recentemente, houve um interesse considerável no uso de NMs para modular o comportamento de células-tronco e para outras aplicações terapêuticas na regeneração tecidual (LIU et al., 2019; NI et al., 2019). Portanto, seus efeitos nas células-tronco humanas precisam ser investigados. Em particular, uma lacuna ainda a ser preenchida diz respeito a estudos para avaliar alterações mediadas pelas NFCs de algodão em genes específicos de células-tronco humanas e no potencial de diferenciação osteogênica. Em resposta a qualquer estresse ambiental, as células podem mudar rapidamente seu perfil de expressão gênica. Alguns estudos mostraram que os NMs podem afetar a expressão gênica de modelos de células de roedores (ASARE et al., 2016; POPOV; POPOVA; IRINA I. SELEZNEVA, AZAMAT Y. AKKIZOV, 2016; XU et al., 2014). No entanto, ainda são escassos estudos para analisar se os NMs podem alterar a expressão gênica de células humanas (RONZANI et al., 2014; VAN DER ZANDE et al., 2016) e, especialmente para NFC, inexistentes em células humanas. A avaliação da expressão gênica pode determinar quais vias celulares são alteradas pela exposição aos NMs (FALAGAN-LOTSCH; GRZINCIC; MURPHY, 2016; SNYDER-TALKINGTON et al., 2015; YAN et al., 2014). Para esse fim, alguns genes são utilizados como biomarcadores do ciclo celular, apoptose e estresse celular (ANSPACH et al., 2016; FALAGAN-LOTSCH; GRZINCIC; MURPHY, 2016; SAHU, 2016).

Os NMs também podem induzir alterações na diferenciação celular (YANG et al., 2017). Foi relatado que algumas nanopartículas, como as de ouro (YI et al., 2010), óxido de ferro (SHRESTHA et al., 2015), sílica (YANG et al., 2017), e NFC associadas à um *scaffold* afetam a diferenciação osteogênica de células-tronco (CHEN et al., 2015; CURVELLO; RAGHUWANSHI; GARNIER, 2019; RASHAD et al., 2018).

Porém, o efeito na indução da diferenciação osteogênica das células-tronco mesenquimais humanas após exposição às NFCs de algodão em suspensão ainda não foram investigados. Assim, para garantir uma aplicação segura em aplicações biomédicas, os efeitos da NFC de algodão na viabilidade das células-tronco humanas, na expressão gênica e na capacidade de indução de diferenciação osteogênica devem ser avaliados.

## 2.2 OBJETIVOS

### 2.2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a citocompatibilidade e o efeito na indução da diferenciação osteogênica *in vitro* das NFCs de algodão em células tronco-mesenquimais humanas.

### 2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a carga de superfície das nanofibras de celulose (NFCs) de algodão;
- Caracterizar as NFCs de algodão quanto ao tamanho, morfologia e composição química;
- Avaliar a viabilidade celular de células-tronco mesenquimais expostas *in vitro* às NFCs de algodão;
- Investigar o potencial efeito das NFCs de algodão no estado antioxidante das células-tronco mesenquimais humanas cultivadas *in vitro*;
- Quantificar a expressão de genes biomarcadores de controle da apoptose e estresse celular em células-tronco mesenquimais expostas *in vitro* às NFCs de algodão;
- Avaliar a capacidade de indução de diferenciação de células-tronco mesenquimais humanas após exposição às NFCs de algodão.

## 2.3 MATERIAL E MÉTODOS

Na Figura 9 abaixo é apresentado um esquema do experimento 1 deste projeto.

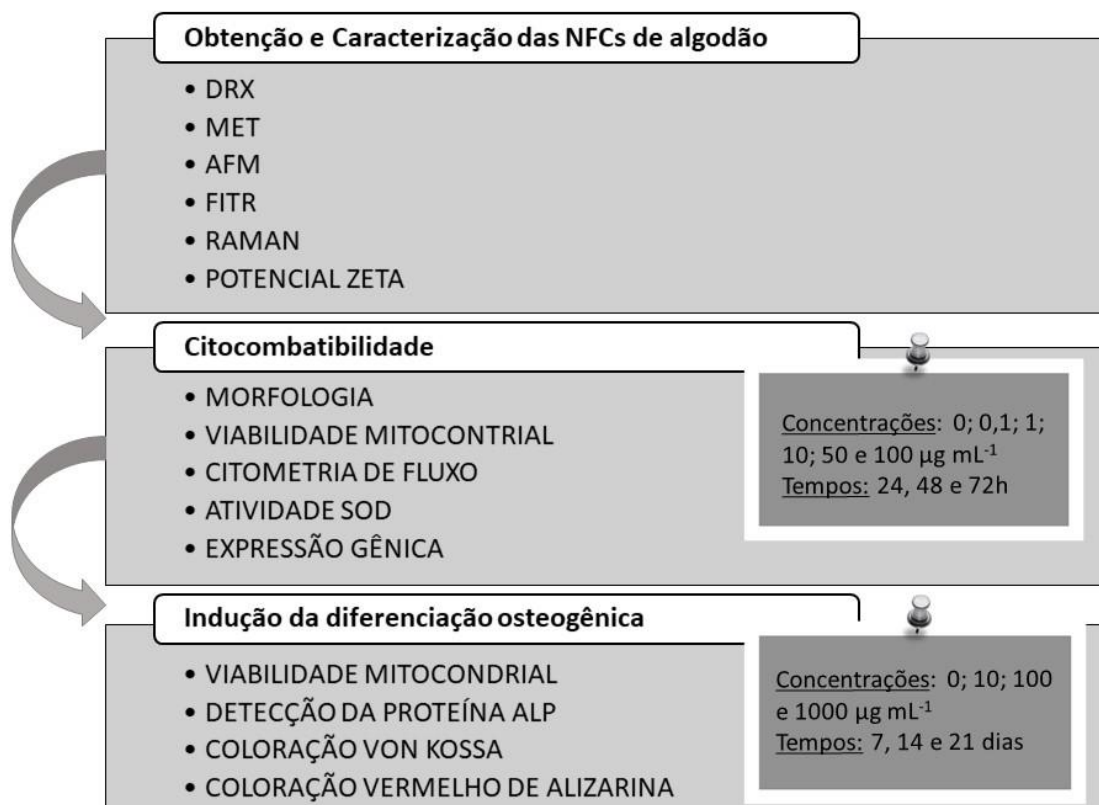


Figura 9 – Representação esquemática da metodologia realizada no Capítulo 1

### 2.3.1 OBTENÇÃO DAS NFCs DE ALGODÃO

As NFCs foram produzidas no Laboratório de Nanotecnologia para o Agronegócio (Embrapa Instrumentação, São Carlos, SP). Resumidamente, as fibras foram cortadas finamente em um moinho de facas, passadas em uma peneira de 10 malhas, desparafinadas com etanol:ciclo-hexano 1:1 (v/v) durante 12 h em um aparelho Soxhlet e depois lavadas vigorosamente com água. As amostras desparafinadas foram secas durante 12 h a 100° C em forno de circulação de ar. Cerca



de 5 g de fibras foram dispersas em 100 mL de ácido sulfúrico a 6,5 M a 45° C e agitadas vigorosamente durante 75 min. Em seguida, foram adicionados 500 mL de água destilada fria para interromper a reação. O ácido sulfúrico foi parcialmente removido da suspensão resultante por centrifugação (Centrifuge Spectrafuge 6C, Edison, EUA) a 8000 x g durante 15 min. Os grupos sulfato não reativos foram removidos por centrifugação seguida por diálise. Uma vez desulfatadas, as fibras foram ressuspensas em água e dialisadas com uma membrana de celulose tubular (76 mm, D9402- Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) até atingir pH 6-7. A suspensão resultante foi sonicada (sonda Branson 450, Branson Ultrasonics, EUA) por 5 min (em banho de gelo) e armazenada em refrigerador.

### **2.3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NFCs DE ALGODÃO**

#### **2.3.2.1 ANÁLISE DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)**

A análise de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi realizada a partir de uma solução diluída das NFCs de algodão e sonicada por 5 min. Uma gota dessa suspensão resultante foi depositada em uma microrrede (*grides*) de cobre revestida de carbono (400 mesh, Ted Pella - N° 01822), e seca a temperatura ambiente. Após secas, as amostras foram coradas com uma solução de contraste a 1,5% de acetato de uranilo.

As imagens de MET foram obtidas usando um microscópio eletrônico de transmissão Philips CM200 com uma tensão de aceleração de 80 kV. As dimensões (comprimento e diâmetro) foram calculadas com o programa ImageJ.

### **2.3.2.2 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)**

As NFC de algodão foram dispersas em água ultra pura por agitação seguida de ondas ultrassônicas (UP200S, Hielscher). Uma gota dessa suspensão foi colocada em uma mica. Em seguida, a amostra foi desidratada sob atmosfera de nitrogênio.

As imagens de AFM foram realizadas no modo não contato em um Nanosurf easyScan 2 (Nanosurf Instruments) no ar. As amplitudes de oscilação livres do cantilever foram tipicamente 50 mV e o tamanho de varrimento da sonda do microscópio foi de 5x5  $\mu\text{m}$ . A resolução da AFM foi de 512 x 512 pixels. O comprimento e o raio da ponta foram de 225  $\mu\text{m}$  e <10 nm, respectivamente.

### **2.3.2.3 ANÁLISE DE DIFRAÇÃO POR RAIOS X (DRX)**

A análise de Difração de Raios X (DRX) foi usada para examinar a estrutura cristalina das NFCs. Os padrões de DRX da NFC foram registrados usando um difratômetro X'Pert PRO (Malver PANalytical, Worcestershire, Reino Unido) com radiação  $\text{Co K}\alpha$ . O difratômetro foi calibrado usando uma amostra padrão de Si. As amostras de nanomateriais foram colocadas em um suporte de Si (ausência de picos de Si).

### **2.3.2.4 ESPECTROSCOPIA RAMAN**

As medições de Raman foram realizadas com um espectrômetro Bruker RFS 100 (Bruker, EUA) excitado com um laser  $\text{Nd}^{3+}$  / YAG operando a 1064 nm, equipado com um detector InGaAs arrefecido com nitrogênio líquido. Os espectros foram adquiridos com uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Uma média de 1024 varreduras foram coletadas com uma potência de laser de 80 mW.

### **2.3.2.5 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)**

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier foram obtidos com um espectrômetro ALPHA FTIR Bruker (Bruker, EUA) na região de número de onda 3500-500  $\text{cm}^{-1}$  no modo ATR-IR. O método de reflexão total atenuada foi aplicado para as medidas com uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e 128 varreduras.

### **2.3.2.6 POTENCIAL ZETA (PZ)**

A presença de cargas superficiais das NFCs de algodão foi estimada via análise do Potencial Zeta (PZ) por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) (Zetasizer Nano ZS; Malvern). As NFCs de algodão foram dispersas (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) em meio de cultura de células *Dulbecco Modified Eagle's Medium* (DMEM; Sigma, EUA) suplementado com antibióticos (LGCBio, Reino Unido), contendo 100 U  $\text{mL}^{-1}$  de penicilina, 100 mg  $\text{mL}^{-1}$  de estreptomicina e 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) (HyClone, EUA) e, depois, expostas a ondas ultrassônicas por 2 ciclos de 1 min cada (ciclo 1, amplitude 100) utilizando um ultrassom (UP200S, Hielscher).

### **2.3.3 CULTURA CELULAR *IN VITRO***

As células-tronco mesenquimais isoladas a partir da polpa dentária humana de dentes decíduos esfoliados utilizadas foram obtidas do Biobanco Genética Humana e Terapia Celular (GENETEC) do Laboratório de Genética, Departamento de Biologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP 022/2015) e previamente caracterizadas (FERREIRA et al., 2019; ZANETTE, 2016).

As células-tronco mesenquimais humanas foram cultivadas *in vitro* com meio de cultivo celular contendo meio DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) acrescido de antibióticos contendo penicilina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) 100 U mL<sup>-1</sup>, estreptomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) 100 mg mL<sup>-1</sup> e SFB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a 10% (v/v). As células foram incubadas em estufa incubadora (Modelo 4130, Thermo Fisher, EUA) em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C. O meio de cultivo foi trocado a cada três dias.

### **2.3.4 AVALIAÇÃO DA CITOCOMPATIBILIDADE**

#### **2.3.4.1 DISPERSÃO DAS NFCs DE ALGODÃO EM MEIO DE CULTURA CELULAR**

As NFCs de algodão foram esterilizadas por luz ultravioleta (UV) durante 20 min. Para o preparo da suspensão estoque na concentração 1000 µg mL<sup>-1</sup>, foram adicionadas NFCs de algodão ao meio de cultura celular DMEM, suplementado com 10% (v/v) SFB e antibióticos contendo penicilina 100 U mL<sup>-1</sup>, estreptomicina 100 mg mL<sup>-1</sup>. A amostra foi dispersa por sonicação com 2 ciclos de 1 min (ciclo 1, amplitude 100) utilizando ultrassom (UP200S, Hielscher), para a completa dispersão das NFCs. Em seguida, as suspensões utilizadas nos testes foram preparadas a partir da suspensão estoque nas concentrações de 0,1; 1; 10; 50 e 100 µg mL<sup>-1</sup>. Para o controle negativo, foi utilizado o mesmo meio de cultura celular sem as NFCs de algodão (0 µg mL<sup>-1</sup>).

#### **2.3.4.2 MORFOLOGIA CELULAR**

As células foram cultivadas em placa de 6 poços a uma densidade de 2 x 10<sup>4</sup> células por poço em 3 mL de meio de cultivo. Após atingir 60% de confluência, o sobrenadante da cultura foi removido com auxílio de pipetador e, então, foi adicionado o meio de cultura contendo as NFCs de algodão nas diferentes concentrações (0,1;

10; 50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). A morfologia celular foi observada após 24, 48 e 72 h de exposição sob um microscópio de luz invertido (Nikon TS100F, Melville) com aumento de 100x e as imagens foram geradas de pelo menos 6 campos aleatórios usando o software AxionVision 4.9.1.

#### **2.3.4.3 ENSAIO DE VIABILIDADE MITOCONDRIAL**

O ensaio de MTT (brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) (Sigma, EUA) foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, foram cultivadas  $5 \times 10^3$  células por poço ( $n=9$  para cada tratamento) com 200  $\mu\text{l}$  de meio de cultivo em placa de 96 poços, por 24 h para aderência das células. Após esse tempo, 200  $\mu\text{l}$  de meio de cultivo contendo diferentes concentrações de NFC de algodão (0; 0,1; 10; 50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) foram adicionados em cada poço e incubadas durante 24, 48 e 72 h. Após cada tempo, o meio de cultura foi removido e lavado 3 vezes com PBS 1x (Tampão fosfato-salino) (Gibco Laboratories, Reino Unido) e, então, as células foram incubadas com 5  $\text{mg mL}^{-1}$  de MTT em condições normais de cultura por 4 h. A viabilidade mitocondrial foi marcada pela conversão do sal de tetrazólio MTT a um formazan pelas desidrogenases mitocondriais. A absorbância foi registrada a 570 nm utilizando um espectrofotômetro (Varioskan Flash Multimode Reader, Thermo Fisher Scientific, EUA) após lise celular em solução de ácido clorídrico a 0,4 M em isopropanol (200  $\mu\text{l}$  por poço). Três experimentos independentes em noveplicata cada foram realizados.

#### **2.3.4.4 CITOMETRIA DE FLUXO**

A citometria de fluxo foi realizada para análises da viabilidade celular e do ciclo celular. Primeiramente, as células foram cultivadas em placas de 6 poços com uma densidade de  $2 \times 10^4$  células/poço ( $n=3$  para cada tratamento) e tratadas com várias concentrações de NFC de algodão (0, 0,1, 1, 10, 50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) por 24, 48 e 72 h. Após cada tempo de exposição, o meio de cultura foi removido e as células

foram lavadas duas vezes com 1 mL da solução salina tamponada com fosfato (PBS 1x) (pH 7,2) (Gibco Laboratories, Reino Unido) e, em seguida, tratadas com tripsina a 0,25% (v/v) e 0,5 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 3 min para permitir a desagregação celular. A tripsina foi desativada com meio DMEM suplementado com soro fetal bovino a 10% (v/v). As células foram coletadas por centrifugação a 5.000 × g.

Para a análise da viabilidade celular, foi adicionado à suspensão de células iodeto de propídio (PI) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a uma concentração final de 50 µg mL<sup>-1</sup>.

Para análise do ciclo celular, as células foram lavadas em PBS 1x e fixadas em etanol 70% (v/v) gelado a 4° C por pelo menos duas horas. Depois disso, as células fixadas foram centrifugadas a 2.000 × g por 5 min e lavadas duas vezes em PBS 1x. Foram adicionados 100 µg mL<sup>-1</sup> de RNase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e incubadas à temperatura ambiente por 15 min e, em seguida, foram adicionados 50 µg mL<sup>-1</sup> de PI.

Em ambos ensaios, as amostras foram analisadas pelo CytoFLEX S (Backman Coulter). Foram realizadas três repetições com triplicata cada, contando 10.000 células por triplicata. Os dados foram analisados no software CytExpert (Backman Coulter).

#### **2.3.4.5 ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)**

A atividade da superóxido desmutase (SOD) foi medida utilizando o kit SOD Assay de acordo com as instruções do fabricante (cod:19160 - (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Esse ensaio usa a xantina e a xantina oxidase para gerarem radicais superóxidos que reagem com 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-pfeniltetrazoliumclorido para produzir formazan. Esta reação forma formazan, o qual absorve luz à 450 nm. A inibição da produção do cromógeno é proporcional à atividade da SOD presente na amostra.

Resumidamente, as células foram cultivadas em placa de 96 poços a uma densidade de 5 × 10<sup>3</sup> (n=3 para cada tratamento) células por poço e tratadas com diferentes concentrações de NFC de algodão (0; 0,1; 10; 50 e 100 µg mL<sup>-1</sup>) por 24, 48

e 72 h. A atividade da SOD foi medida misturando os reagentes do kit com 20 µl do meio de cultura. Após incubação por 20 min a 37° C, a absorbância foi medida a 450 nm em espectrofotômetro (Varioskan Flash Multimode Reader, Thermo Fisher Scientific). Três experimentos independentes em triplicata cada foram realizados. A atividade da enzima SOD (% taxa de inibição) foi calculada utilizando a seguinte equação do kit:

$$\text{Atividade SOD (\% da taxa de inibição)} = \frac{[(\text{Abranco 1} - \text{Abranco 3}) - \text{Aamostra} - \text{Abranco 2}]}{(\text{Abranco 1} - \text{Abranco 3})} \times 100$$

### 2.3.4.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foram produzidos de acordo com An et al. (1999), Savli et al. (2003) e Nayak et al. (2014) como descrito na Tabela 1 e sintetizados pela Sigma Chemical Co (St Louis, MO, USA).

**Tabela 1 - Sequências dos *primers* usadas para análise de expressão gênica relativa por reação em cadeia da polimerase em tempo real.**

Gene	Sequência do <i>primer</i> (5´ - 3´)	Temperatura pareamento (°C)	Tamanho do produto (pb)	Nº de acesso no GenBank	Referência
GAPDH	F: AGTGGGTGTCGCTGTTGAAGT R: AACGTGTCAGTGGTGGACCTG	60	160	AK299972.1	(AN et al., 1999)
APTR	F: CAGGGAACACATTCCTTTGC R: TGGGAAAGCTGTTTACTGCG	60	135	AY306126.1	(AN et al., 1999)
DAPK1	F: CAGTGTGTTGCTCTAGGAAG R: GGGACTGCCACAAATGATGAG	60	196	DQ436495.1	(SAVLI et al., 2003)
HSPA5	F: GGAAAGAAGGTTACCCATGC R: CCGTAGGCTCGTTGATGAT	60	127	NM_005347.4	(NAYAK et al., 2014)
ATF4	F: CCAACAACAGCAAGGAGGAT R: GTGTCATCCAACGTGGTCAG	60	145	NM_001675.4	(NAYAK et al., 2014)
BAX	F: TGCTTCAGGGTTTCATCCAG R: GGCGGCAATCATCCTCTG	68	170	NM_001291428.1	(SAVLI et al., 2003)
BCL2	F: AGGAAGTGAACATTCGGTGAC R: GCTCAGTTCAGGACCAGGC	68	146	NM_000633.2	(SAVLI et al., 2003)

### 2.3.4.6.1 EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (cDNA)

As células foram tratadas com meio de cultura contendo diferentes concentrações de NFC de algodão (0; 0,1; 10; 50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) por 48 h e o RNA total foi extraído de  $2 \times 10^5$  células por grupo ( $n=3$  para cada tratamento) usando o Kit RNeasy Micro (Qiagen, Alemanha) de acordo com instruções do fabricante e tratadas com Dnase (Qiagen, Alemanha). Resumidamente, a lise celular foi feita com o tampão RLT® com 10% (v/v) de  $\beta$ -mercaptoetanol (Gibco Brl Life Technologies, EUA). O lisado foi homogeneizado com solução etanólica a 70% e transferido para uma coluna de obtenção do RNA. O tampão RW1® foi adicionado para a lavagem e, posteriormente, foi feita a incubação com 10  $\mu\text{l}$  de DNase por 15 min. Em seguida, foi realizada novamente a lavagem com os tampões RW1® e RPE®. E, então, foi adicionada a solução etanólica a 80% à coluna, onde o RNA fica aderido, e centrifugada por 5 min em temperatura ambiente para secar a membrana. Foram utilizados 14  $\mu\text{l}$  de água livre de RNase para eluição, gerando um volume final de aproximadamente 12  $\mu\text{l}$  de RNA por reação.

O cDNA foi gerado a partir do RNA total por transcrição reversa usando o Kit Supermix First-Strand Synthesis Supermix (Invitrogen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizados 5  $\mu\text{l}$  de RNA em cada reação de síntese de cDNA. Uma reação contendo RNA, primer oligo dT, tampão de pareamento e água livre de RNase/DNase foi realizada, incubando-se estes reagentes por 5 min a 65° C. Em seguida, 10  $\mu\text{l}$  de 2X First-Strand reaction mix® e 2  $\mu\text{l}$  SuperScript III RNaseOUT® (Enzyme mix®) foram adicionados à reação e, então, incubada a 50°C por 50 min, seguido de 85°C por 5 min. O volume final foi de 20  $\mu\text{l}$  de cDNA por reação.

A quantificação de RNA e de cDNA de cada grupo foi realizada utilizando 1  $\mu\text{l}$  de cada amostra em espectrofotômetro (Nanodrop, Wilmington, EUA). O cDNA de cada grupo experimental permaneceu estocado em freezer à temperatura de -20°C, até posterior utilização.



### 2.3.4.6.2 PCR EM TEMPO REAL

A quantificação relativa foi realizada em seis repetições usando PCR em tempo real (Applied Biosystems 7500). As reações foram preparadas utilizando o kit Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA), acrescido de par de *primers*, água livre de nucleases e cDNA. A quantidade de cDNA utilizada nas reações variou de acordo com a concentração ótima identificada em experimentos preliminares para cada transcrito analisado.

Para os genes *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH), *Adenine Phosphoribosyltransferase* (APTR), *Retinoblastoma protein* (RB1), *Death Associated Protein Kinase 1* (DAPK1), 150 ng de cDNA por reação foram utilizados. Enquanto que para genes *Heat Shock Protein Family A member 5* (HSPA5), *Activating Transcription Factor 4* (ATF4), BCL2 e *BCL2 associated X protein* (BAX), foram utilizados 600 ng de cDNA por reação. O molde de cDNA foi desnaturado a 95 °C durante 10 min, seguido por 45 ciclos de 95 °C durante 15 s, o anelamento durante 30 s e, então, alongado a 60 °C durante 30 s. As temperaturas de anelamento dos *primers* específicas de cada gene estão descritas na Tabela 1. Após cada ensaio de PCR, foi realizada uma análise da curva de *melt* para confirmar que foi gerado um produto específico único. Os controles negativos, incluindo a reação de PCR sem ácidos nucléicos, foram também realizados com cada grupo de amostras. As expressões dos genes GAPDH e APTR foram usadas como controles endógenos de referência e o grupo controle (0 µg mL<sup>-1</sup> de NFC de algodão) foi usado como calibrador.

A eficiência do primer para cada reação foi calculada usando o software LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003). Somente os pontos com coeficiente de correlação entre 0,999 e 1 foram utilizados para o cálculo da eficiência. Desta forma, foi possível obter a eficiência de cada reação individualmente. A quantificação relativa foi realizada utilizando-se o método do *Cycle Threshold* (CT) comparativo, com os resultados expressos em relação ao gene de referência endógena e um grupo calibrador (grupo controle). A ferramenta de software *Relative Expression Software Tool* (REST®) (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002), que possui o modelo estatístico *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation* TEST® (versão 384 - Beta, 2005) foi utilizada para quantificar a expressão de mRNA de cada gene alvo.

### **2.3.4.6.3 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE**

Os géis de agarose contendo  $0,1 \mu\text{L mL}^{-1}$  de corante SYBR® Safe DNA Stain (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) foram preparados usando  $2 \text{ g mL}^{-1}$  de agarose em tampão tris-borato-EDTA (TBE). Os produtos de PCR em tempo real foram misturados com o Gel Loading Dye Green (Blirt SA DNA-Gdańsk, Polónia) e colocados nos poços ao lado de um marcador de tamanho de bandas DNA de 50 pb (Life Technologies, Inc., EUA). A electroforese foi submetida a 110 V e as bandas foram visualizadas em um transiluminador com luz UV (Imager GelDoc-It, Analytik Jena, EUA).

## **2.3.5 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA**

### **2.3.5.1 DISPERSÃO DAS NFCs DE ALGODÃO E CULTURA CELULAR *IN VITRO***

As NFCs de algodão foram esterilizadas por luz ultravioleta (UV) durante 20 min e dispersas meio de cultura celular DMEM com dois tipos de suplementação diferente: o meio basal composto por meio DMEM suplementado com 10% (v/v) SFB e antibióticos contendo penicilina  $100 \text{ U mL}^{-1}$ , estreptomicina  $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ; e o meio indutor osteogênico (RIBEIRO et al., 2017) composto por meio DMEM suplementado com 10% (v/v) de SFB e antibióticos contendo penicilina  $100 \text{ U mL}^{-1}$ , estreptomicina  $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $\beta$ -glicerol-fosfato 10 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), ácido arcórbico 0,2 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e dexametasona  $1 \mu\text{M}$  (Calbiochem, SanDiego, CA, EUA).

As NFCs de algodão foram adicionadas aos dois meios de cultura celular suplementados para o preparo da suspensão estoque na concentração de  $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Cada amostra foi dispersa por sonicação com 2 ciclos de 1 min (ciclo 1, amplitude 100) utilizando ultrassom (UP200S, Hielscher), para a completa dispersão das NFCs. Em seguida, as suspensões utilizadas nos testes foram preparadas a partir da suspensão estoque nas concentrações de 10, 100 e  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Para o controle

negativo, foram utilizados os mesmos meios de cultura celular (basal e indutor) sem as NFCs de algodão ( $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

As células-tronco mesenquimais humanas foram cultivadas *in vitro* com meio de cultivo celular descritos acima e foram incubadas durante 21 dias em estufa incubadora (Modelo 4130, Thermo Fisher, EUA) em atmosfera umidificada contendo 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ \text{C}$ . Os meios de cultivo foram trocados a cada três dias.

### **2.3.5.2 VIABILIDADE MITOCONDRIAL**

Para avaliar o potencial citotóxico das NFCs de algodão nas concentrações utilizadas durante o tempo de indução de diferenciação osteogênica das células-tronco mesenquimais humanas, o ensaio de MTT (brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, foram cultivadas  $5 \times 10^3$  células por poço ( $n=3$  para cada tratamento) com  $200 \mu\text{l}$  de meio de cultivo em placa de 96 poços, por 24 h para aderência das células. Após esse tempo, os meios de cultivo basal e indutor osteogênico contendo diferentes concentrações de NFC de algodão ( $0$ ;  $10$ ;  $100$  e  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foram adicionados em cada poço e trocados a cada três dias, durante 21 dias. Nos dias 7, 14 e 21, o meio foi removido, os poços lavados com PBS 1x e as células foram incubadas com  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  de MTT em condições normais de cultura por 4 h e, então foi feita a lise celular com solução de ácido clorídrico a  $0,4 \text{ M}$  em isopropanol ( $200 \mu\text{l}$  por poço). A absorbância foi registrada a  $570 \text{ nm}$  utilizando um espectrofotômetro (Varioskan Flash Multimode Reader, Thermo Fisher Scientific, EUA). Dois experimentos independentes em triplicata cada foram realizados.

### **2.3.5.3 ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA (ALP) INTRACELULAR**

A atividade da Fosfatase Alcalina (ALP) intracelular foi avaliada usando o kit BCIP/NBT (Invitrogen, EUA - N6547). Este ensaio é baseado em uma reação cromogênica iniciada pela clivagem do grupo fosfato de BCIP (Fosfato de 5-bromo-4-

cloro-3-indolil) pela ALP que está presente nas células. Essa reação produz um próton, que é reduzido pelo NBT (Nitro azul tetrazólio) formando um precipitado roxo insolúvel.

Resumidamente,  $5 \times 10^4$  células ( $n=3$ ) foram plaqueadas em placas de 24 poços com meio DMEM suplementado com 10% (v/v) SFB e antibióticos contendo penicilina  $100 \text{ U mL}^{-1}$ , estreptomicina  $100 \text{ mg mL}^{-1}$ , para a aderência das células. Após 24 h o meio foi retirado e trocado pelos meios de cultura basal ou meio indutor osteogênico contendo diferentes concentrações de NFC de algodão (0; 10; 100 e  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e incubadas durante 21 dias.

Para quantificar a atividade da ALP intracelular, o sobrenadante de cada poço foi removido e a camada celular foi lavada duas vezes com PBS 1x. Em seguida,  $100 \mu\text{l}$  de solução BCIP/NBT, preparada de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante, foram adicionados a cada poço. Após 2 h de incubação, as células foram observadas por microscopia óptica. Os precipitados roxos insolúveis foram solubilizados com  $300 \mu\text{l}$  de SDS (dodecilsulfato de sódio) a 10% (p/v) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e incubados por 18 h. As medições da densidade óptica foram realizadas em espectrofotômetro a 595 nm (SpectraMax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

#### **2.3.5.4 TÉCNICA DE COLORAÇÃO VON KOSSA**

Para identificar se as células-tronco mesenquimais humanas produziram nódulos mineralizados *in vitro* após incubação com NFCs nas concentrações de 10, 100 e  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ , foi realizada a coloração von Kossa (SHAHROUSVAND et al., 2017a). Para tanto, o meio de cultura foi removido e foi acrescentada em cada poço a solução de paraformaldeído a 4% para fixação durante 15 min. A solução foi removida e as células foram lavadas com PBS 1x por 10 min adicionais. As células foram coradas com solução de nitrato de prata a 5% (p/v), com exposição à luz ultravioleta durante 60 min. As células foram novamente lavadas com PBS 1x por 10 min, e, então, imersas em solução de tiosulfato de sódio a 5% (p/v) por 3 minutos. Os poços foram lavados com PBS 1x por 1 min e corados com solução de 0,5 % (p/v) de safranina por 3 min e novamente lavados com PBS 1x por 1 min. As imagens foram feitas utilizando

um microscópio de luz invertido (Primovert, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) com câmera acoplada (Axiocam ERc 5s) usando o software Zen 2.3 lite (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

### **2.3.5.5 TÉCNICA DE COLORAÇÃO VERMELHO DE ALIZARINA**

A deposição de cálcio foi avaliada por coloração com Vermelho de alizarina S. Resumidamente, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 15 min e coradas com solução de vermelho de alizarina S a 2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) (pH 4,1) por 15 min em temperatura ambiente. Após a lavagem e secagem ao ar, as imagens foram feitas com microscópio de luz invertido (Primovert, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) com câmera acoplada (Axiocam ERc 5s) usando o software Zen 2.3 lite (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

### **2.3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Todos os dados representam a média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) de pelo menos dois experimentos independentes. Os dados foram analisados pelo one-way ANOVA e as diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste de comparação múltipla de Tukey. Foi utilizado o programa GraphPad Prism 7.0. Análises de expressão gênica relativa foram realizadas pelo software REST (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002) usando um teste de randomização de realocação fixa emparelhada e foram baseadas na eficiência do *primer*. Diferenças foram consideradas significantes quando  $p < 0,05$ .

## 2.4 RESULTADOS

### 2.4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NFCs DE ALGODÃO

A partir da análise da MET (Figura 10a) e AFM (Figura 10b), as NFCs de algodão apresentaram forma de fibras alongadas semelhantes a agulhas, com diâmetros de cerca de 20 nm, enquanto o seu comprimento variou de 85 a 200 nm. Na Figura 10b de AFM alguns feixes podem ser observados devido à agregação durante a secagem das dispersões na superfície da mica. Os padrões de Difração de Raio-X (DRX) da Figura 11 indicam que a NFC possui uma estrutura monoclinica pura. Os padrões de difração da NFC mostram estrutura de celulose I com picos em ângulos  $2\theta$  de aproximadamente  $22^\circ$  e  $35^\circ$  (REDDY; YANG, 2009).

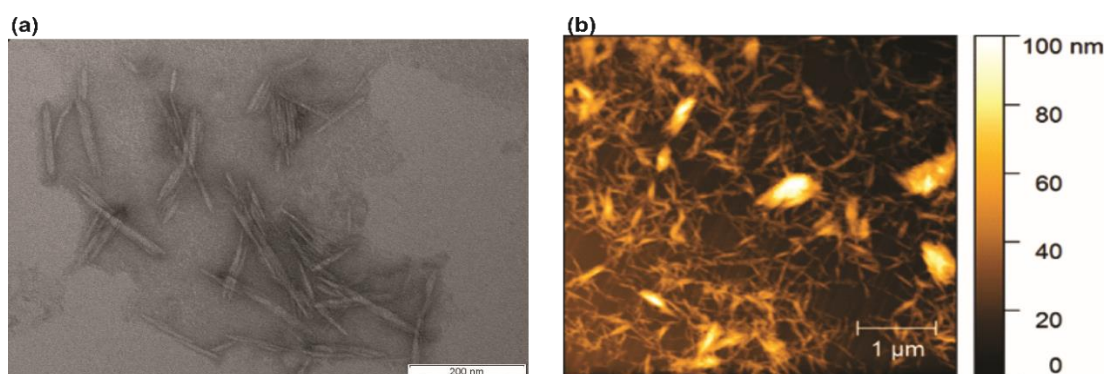


Figura 10 - Imagens das nanofibras de celulose (NFCs) de algodão. (a) Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). A ampliação foi de 110 x. A barra de escala é de 200 nm. (b) Imagens de Microscopia de Força Atômica (AFM) das NFCs após secagem em uma superfície de mica. A barra de escala é 1  $\mu\text{m}$ .

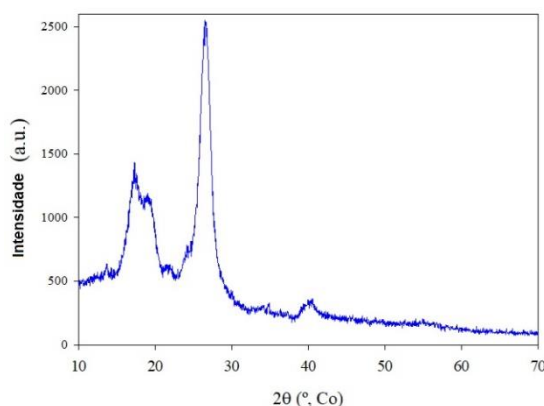
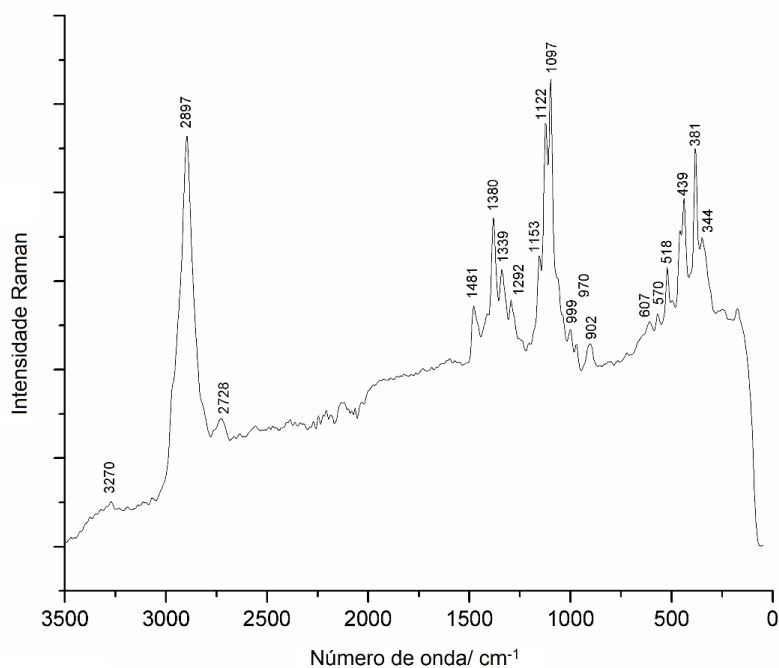


Figura 11 - Padrão de Difração de Raio X da nanofibra de celulose (NFC) de algodão.

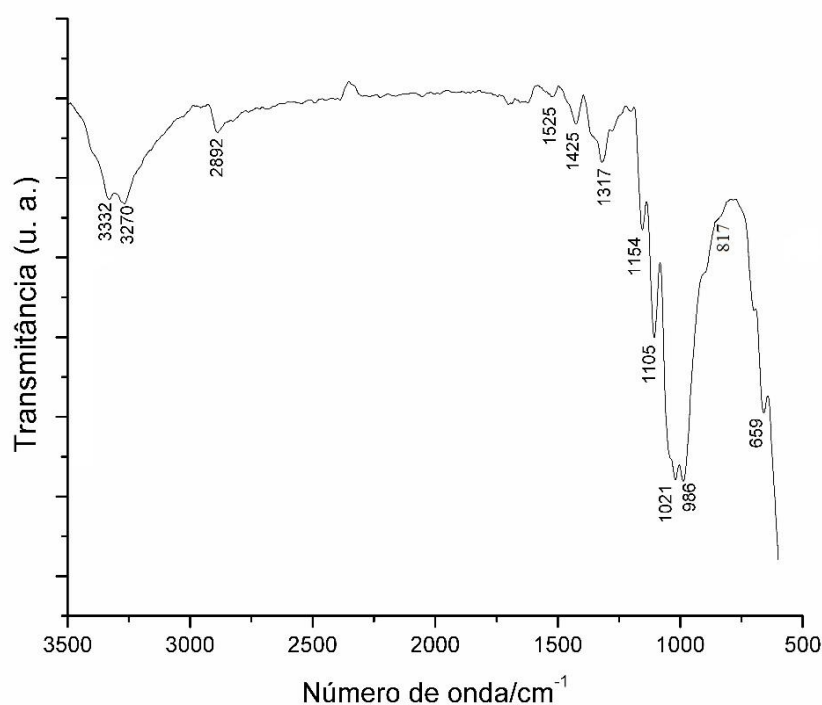
A espectroscopia Raman foi usada para caracterizar a composição das bandas das NFCs de algodão que pode ser observada na Figura 12. As bandas da faixa de 1292-2897  $\text{cm}^{-1}$  podem ser atribuídas a: estiramento ( $\text{CH}_2$ ) a 2897  $\text{cm}^{-1}$ , em vibração de flexão plana ( $\text{CH}$ ) + vibração fora do plano ( $\text{CH}_2$ ) a 1481  $\text{cm}^{-1}$  e em vibração de flexão plana ( $\text{OH}\dots\text{H}$ ) a 1292  $\text{cm}^{-1}$ . A faixa de 1097  $\text{cm}^{-1}$  na molécula de celulose foi atribuída a trechos de ligação de C-O e C-C, enquanto a 380  $\text{cm}^{-1}$  foi atribuída à vibração do anel piranóide fora do plano (ZAJAÇ et al., 2015).



**Figura 12 - Caracterização das nanofibras de celulose (NFCs) de algodão utilizando espectroscopia Raman.**

Segundo Proniewicz et al. (2001) e Fischer et al. (2005), a intensidade das bandas de 381  $\text{cm}^{-1}$  e 1481  $\text{cm}^{-1}$  representa a ordem de cristalinidade da celulose. O alargamento dessas bandas pode estar associado a uma maior quantidade de desordem estrutural. Não foram observados a banda a 1462  $\text{cm}^{-1}$  atribuída à celulose amorfa.

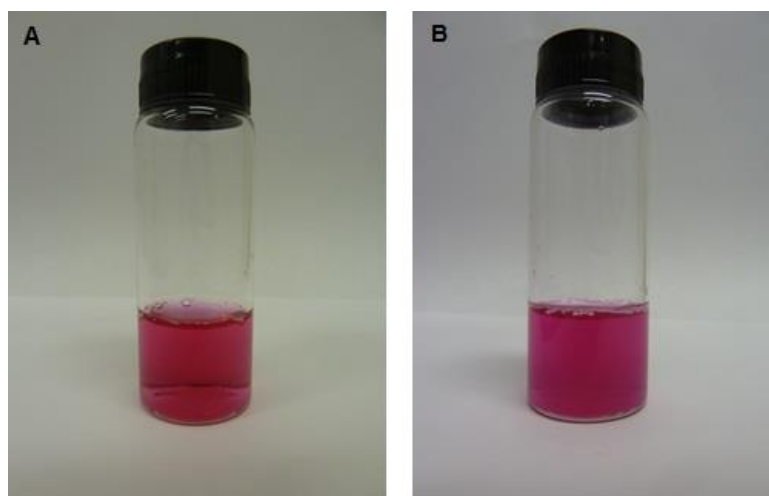
O espectro do FTIR das NFCs de algodão (Figura 13) mostra uma banda a  $1425\text{ cm}^{-1}$  atribuída a uma vibração de curvatura  $\text{CH}_2$  simétrica. Essa faixa, segundo Ciolacu; Ciolacu; Popa (2011), também é conhecida como “banda de cristalinidade”, cuja intensidade reflete o grau de cristalinidade das amostras. As bandas de aparência na região de  $1317\text{--}986\text{ cm}^{-1}$  podem estar associadas às vibrações típicas dos anéis piranóides. Segundo Zajac et al. (2015), a banda de absorção a  $3332\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída à ligação de hidrogênio intramolecular  $3\text{-OH}\dots\text{O-5}$ , enquanto a banda em  $659\text{ cm}^{-1}$  corresponde à flexão fora do plano dos modos  $\text{OH}\dots\text{O}$  da hidroxila envolvida na ligação  $\text{OH}\dots\text{O}$ . As bandas que ocorrem na região de  $3270\text{ cm}^{-1}$  são características do hidrogênio intramolecular ligado aos alomorfos da celulose, a celulose I $\beta$  (POLETTI; ORNAGHI JÚNIOR; ZATTERA, 2014). As bandas existentes na região de  $817\text{ cm}^{-1}$  podem ser atribuídas ao alongamento da ligação S-O devido à presença de grupos sulfato na superfície da NFC (GASPAR et al., 2014). A ausência da banda na região de  $890\text{ cm}^{-1}$  atribuída ao alongamento de  $\text{C-O-C}$  nas ligações  $\beta\text{-(1}\rightarrow\text{4)}$ -glicosídicas, indicou que as amostras amorfas não ocorreram.



**Figura 13 - Caracterização das nanofibras de celulose (NFCs) de algodão utilizando espectroscopia de FTIR.**



Para investigar as cargas superficiais das NFCs, as NFCs de algodão foram sonicadas e dispersas homogeneamente em meio de cultura DMEM suplementado como SFB e antibióticos (Figura 14) e apresentaram cargas superficiais negativas por DLS ( $-10$  mV). O Potencial Zeta negativo pode ser atribuído à esterificação das hidroxilas superficiais, com grupamentos sulfatos (aniônicos) durante o processo de produção das NFCs (MUQEET et al., 2017; RUIZ-PALOMERO; SORIANO; VALCÁRCEL, 2016).



**Figura 14 – Aspecto visual de suspensão líquida estoque das nanofibras de celulose (NFCs) de algodão ( $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) antes (A) e depois (B) de sonicadas em meio de cultura celular DMEM.**

#### **2.4.2 EFEITO DAS NFCs DE ALGODÃO NA MORFOLOGIA E VIABILIDADE CELULAR**

As células-tronco mesenquimais humanas são alongadas com a morfologia tipicamente parecida com a de fibroblastos. Essas células-tronco, quando expostas às NFCs de algodão por 24, 48 e 72 h, não apresentaram alterações em sua morfologia típica em qualquer concentração testada ( $0,1$ ;  $10$ ;  $50$  e  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), e nem na proliferação com o aumento do tempo de exposição (de 24 h até 72 h), como observada pela microscopia de luz invertida (Figura 15) e comparada com o grupo controle ( $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

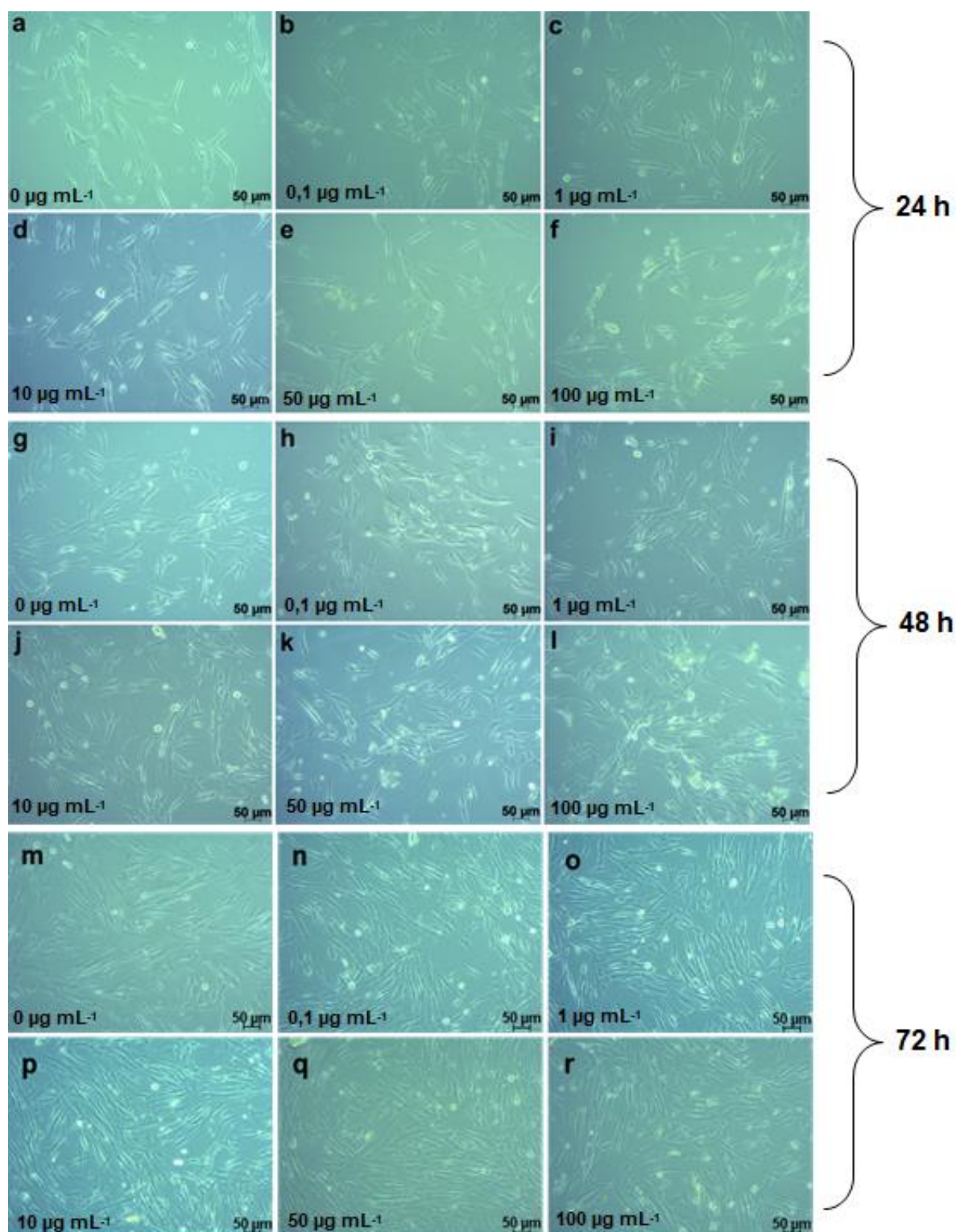


Figura 15 - Análise da morfologia celular usando um microscópio óptico invertido. As células-tronco mesenquimais humanas foram incubadas com nanofibras de celulose (NFCs) de algodão por 24 h (a-f), 48 h (g-l) e 72 h (m-r) nas concentrações: 0 (controle veicular) (a, g, m), 0,1 (b, h, n), 1 (c, i, o), 10 (d, j, p), 50 (e, k, q), 100 (f, l, r)  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Ampliação 100 $\times$ . Barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ .

A exposição das células às NFCs de algodão também não teve efeito sobre a viabilidade mitocondrial (Figura 16). Além disso, os resultados da Figura 17 mostram um aumento na absorvância com o aumento do tempo de exposição (24, 48 e 72 h). Assim, a NFC de algodão não afetou a proliferação celular das células-tronco mesenquimais humanas nessas condições testadas, corroborando com as imagens de microscopia de luz invertida (Figura 15).

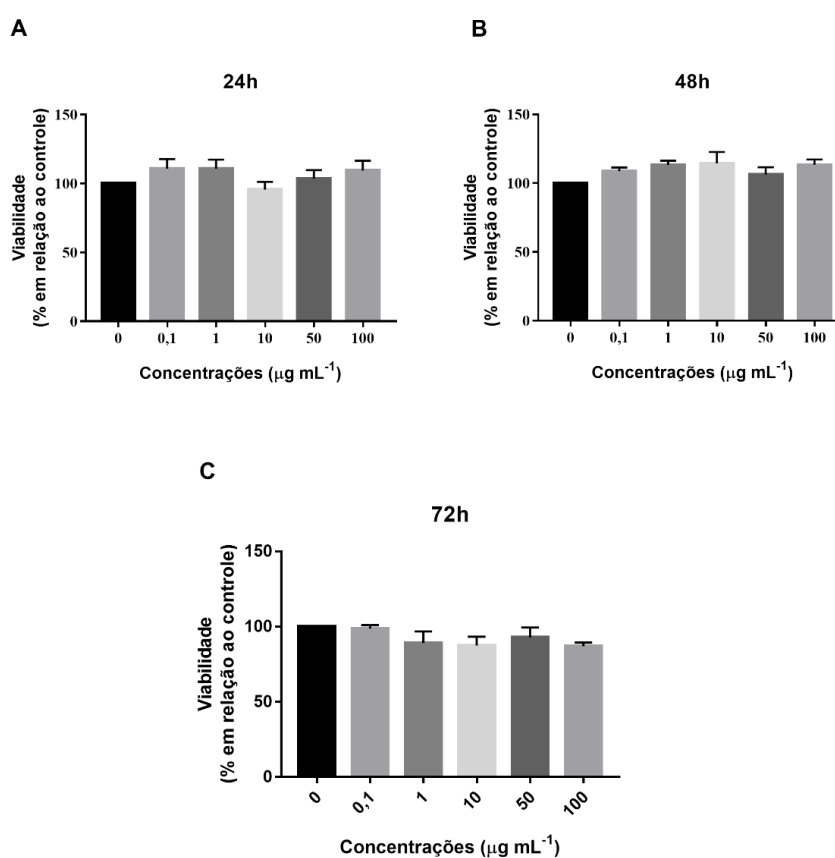
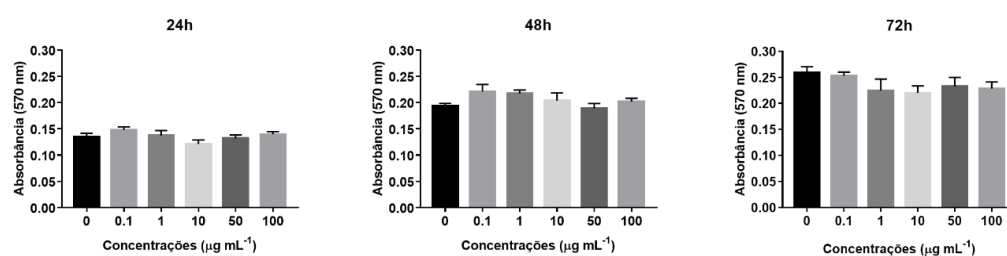
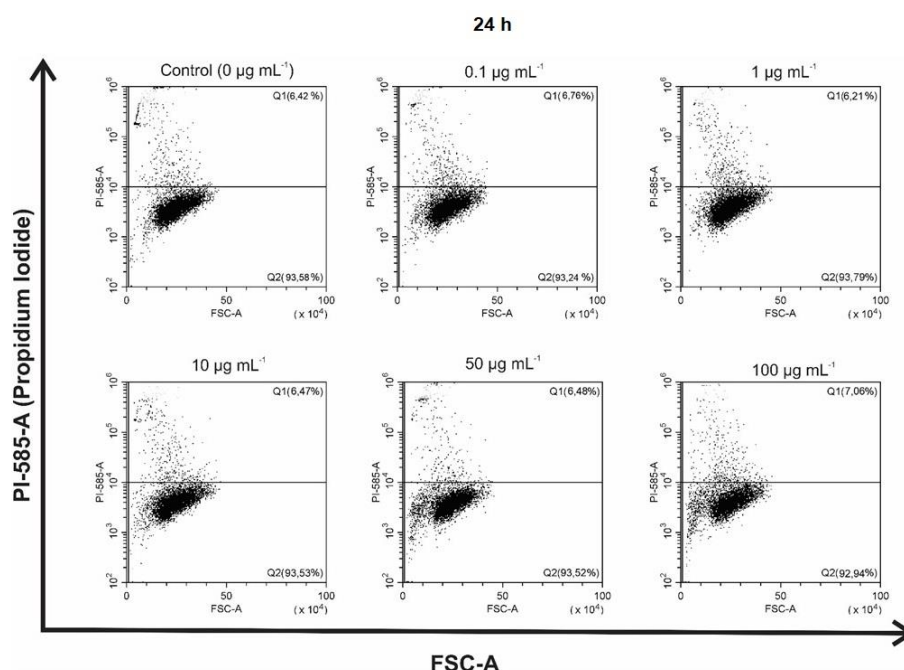


Figura 16 - Viabilidade mitocondrial das células-tronco mesenquimais humanas expostas à diferentes concentrações de nanofibras de celulose (NFCs) de algodão (0,1; 1; 10; 50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) em diferentes tempos 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C) baseado no ensaio de MTT. Os valores estão representados pela média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes ( $p > 0,05$ ).

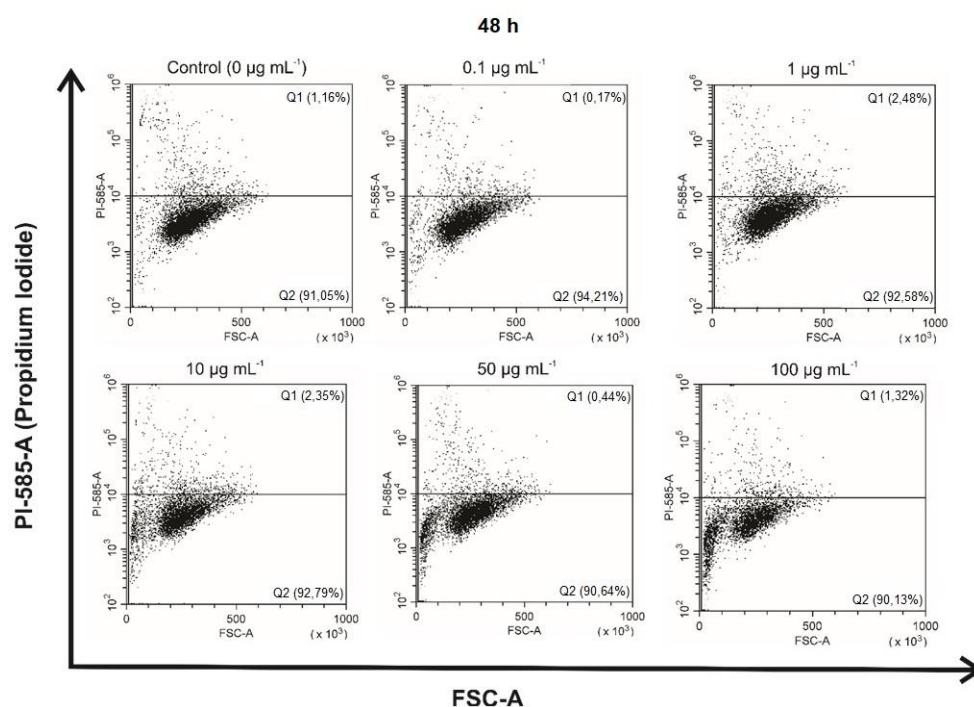


**Figura 17 - Proliferação celular das células-tronco mesenquimais humanas expostas às nanofibras de celulose (NFC) de algodão com diferentes concentrações (0,1; 1; 10; 50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) por 24, 48 e 72 h com base no ensaio de MTT. A proliferação foi medida com o ensaio de MTT e os resultados são dados pelas médias de absorção. Os valores estão representados pela média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes ( $p > 0,05$ ), não houve diferença significativa.**

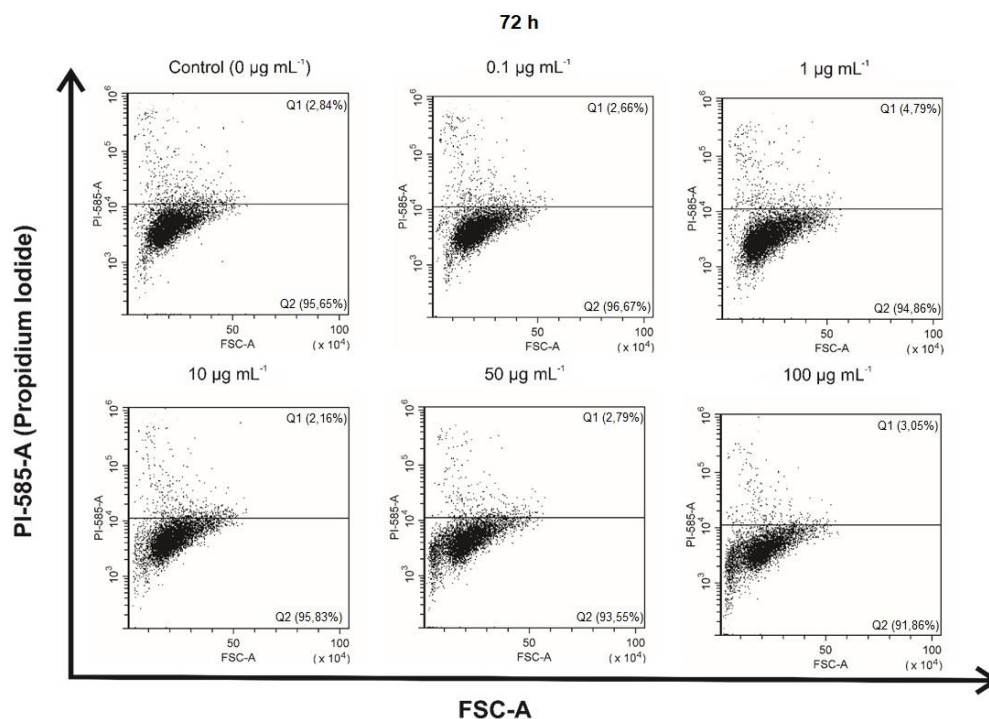
Os resultados de viabilidade celular obtidos pelo ensaio de citometria de fluxo usando o PI foram de acordo com os do MTT. A porcentagem de células vivas não foi afetada em nenhuma das concentrações testadas em cada período de tempo 24 (Figura 18), 48 (Figura 19) e 72 h (Figura 20) em comparação ao grupo controle ( $p > 0,05$ ). Assim, as NFCs do algodão não afetaram a proliferação e viabilidade celular das células-tronco mesenquimais humanas.



**Figura 18 - Análise por citometria de fluxo de células-tronco mesenquimais humanas tratadas com diferentes concentrações de nanofibras de celulose de algodão por 24 h, e depois coradas com iodeto de propídio. O quadrante superior em cada painel mostra a população de células mortas e o quadrante inferior mostra a população de células vivas. FSC-A, *Forward Scatter Signal* (tamanho da célula). PI-585-A, parâmetro de fluorescência para iodeto de propídio. Os valores são as médias  $\pm$  SEM de três experimentos independentes ( $p > 0,05$ ).**



**Figura 19 - Análise por citometria de fluxo de células-tronco mesenquimais humanas tratadas com diferentes concentrações de nanofibras de celulose de algodão por 48 h, e depois coradas com iodeto de propídio. O quadrante superior em cada painel mostra a população de células mortas e o quadrante inferior mostra a população de células vivas. FSC-A, *Forward Scatter Signal* (tamanho da célula). PI-585-A, parâmetro de fluorescência para iodeto de propídio. Os valores são as médias  $\pm$  SEM de três experimentos independentes ( $p > 0,05$ ).**



**Figura 20 - Análise por citometria de fluxo de células-tronco mesenquimais humanas tratadas com diferentes concentrações de nanofibras de celulose de algodão por 72h, e depois coradas com iodeto de propídio. O quadrante superior em cada painel mostra a população de células mortas e o quadrante inferior mostra a população de células vivas. FSC-A, *Forward Scatter Signal* (tamanho da célula). PI-585-A, parâmetro de fluorescência para iodeto de propídio. Os valores são as médias  $\pm$  SEM de três experimentos independentes ( $p > 0,05$ ).**

### 2.4.3 ANÁLISE DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para verificar se as NFC de algodão alteram as fases G1, S e G2-M do ciclo celular, foi realizada a análise por citometria de fluxo em células-tronco mesenquimais humanas. A distribuição do ciclo celular não apresentou alteração significativa ( $p > 0,05$ ), entre todas as concentrações testadas, quando comparadas ao controle, nos tempos de 24, 48 e 72 h (Figura 21).

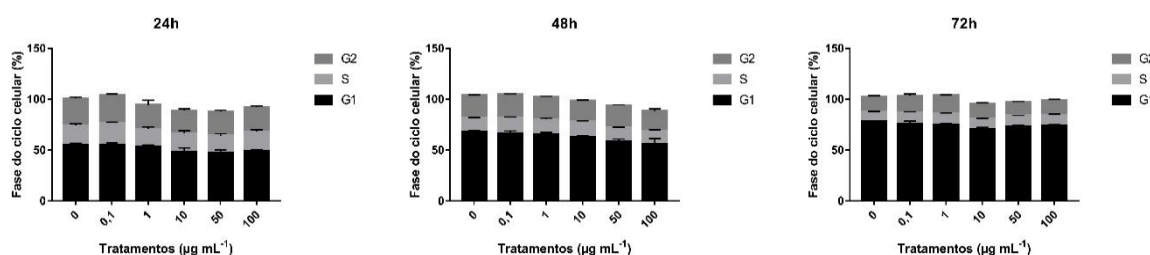
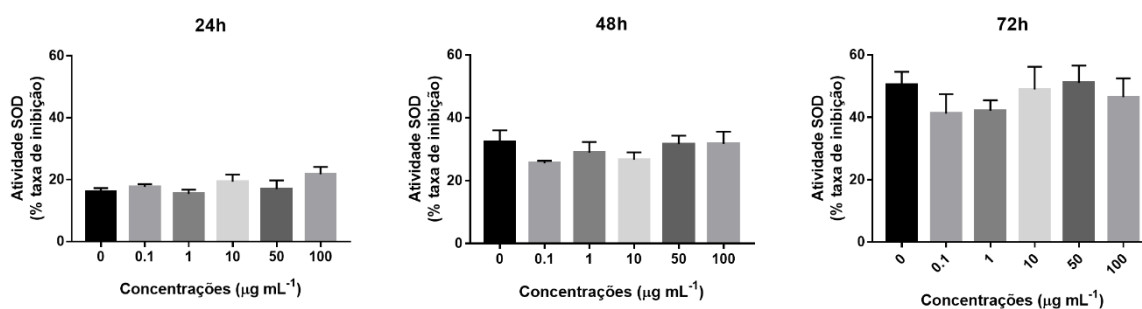


Figura 21 – O gráfico mostra a porcentagem relativa de células do genótipo indicado nas fases G1, S e G2 do ciclo celular em células-tronco mesenquimais humanas tratadas com diferentes concentrações de nanofibras de celulose de algodão (0, 0,1, 1, 10, 50 e 100 µg mL<sup>-1</sup>) por 24, 48 e 72 h.

### 2.4.4 ESTADO ANTIOXIDANTE DAS CÉLULAS EXPOSTAS À NFC DE ALGODÃO

Para investigar a capacidade das NFCs de algodão em alterar o estado antioxidante das células-tronco mesenquimais humanas, o nível da atividade da enzima antioxidativa SOD (em termos de porcentagem de inibição) foi determinado. Não foi encontrada diferença ( $p > 0,05$ ) nos níveis da atividade da enzima SOD extracelular em comparação com o controle não tratado (0 µg mL<sup>-1</sup>) (Figura 22), dentro dos tempos de exposição (24, 48 e 72 h) testados.



**Figura 22 - Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD).** As células-tronco mesenquimais humanas foram tratadas com 0; 0,1; 1; 10; 50 e 100 µg mL<sup>-1</sup> de nanofibras de celulose (NFCs) de algodão por 24, 48 e 72 h e então, a atividade de SOD no meio de cultura foi detectada por fluorescência utilizando o kit SOD Assay. Nenhuma diferença ( $p > 0,05$ ) foi encontrada em comparação com o controle não tratado (0 µg mL<sup>-1</sup>). Os resultados estão representados pela média  $\pm$  SEM (barras verticais) de três experimentos independentes realizados em triplicata.

#### 2.4.5 MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM CÉLULAS EXPOSTAS ÀS NFCs DE ALGODÃO

O ensaio da PCR em tempo real foi realizado para avaliar se a exposição às NFCs de algodão induziu as células-tronco mesenquimais humanas a modular seus perfis de expressão gênica. As análises revelaram que os níveis de expressão dos genes de estresse (ATF4) e apoptose (DAPK1 e BAX) foram alterados pela exposição às NFCs (Figura 23). Para o gene ATF4, a expressão relativa foi sub-regulada na concentração 0,1 µg mL<sup>-1</sup> ( $0,55 \pm 0,22$ ,  $p = 0,004$ ), 1 µg mL<sup>-1</sup> ( $0,57 \pm 0,21$ ,  $p = 0,001$ ), 50 µg mL<sup>-1</sup> ( $0,60 \pm 0,32$ ,  $p = 0,025$ ) e 100 µg mL<sup>-1</sup> ( $0,48 \pm 0,18$ ,  $p = 0,001$ ), exceto para 10 µg mL<sup>-1</sup> ( $0,66 \pm 0,19$ ,  $p = 0,06$ ), que não foi diferente ( $p > 0,05$ ) em relação ao grupo controle. O mesmo ocorreu para o gene DAPK1, a expressão relativa foi sub-regulada na concentração 0,1 µg mL<sup>-1</sup> ( $0,54 \pm 0,21$ ,  $p = 0,001$ ), 1 µg mL<sup>-1</sup> ( $0,50 \pm 0,18$ ,  $p = 0,001$ ), 50 µg mL<sup>-1</sup> ( $0,58 \pm 0,29$ ,  $p = 0,02$ ) e 100 µg mL<sup>-1</sup> ( $0,53 \pm 0,20$ ,  $p = 0,004$ ), exceto para 10 µg mL<sup>-1</sup> ( $0,60 \pm 0,19$ ,  $p = 0,055$ ), que não foi diferente ( $p > 0,05$ ) quando comparado ao grupo controle.

Por outro lado, uma diminuição na expressão gênica de BAX foi observada após exposição às NFCs de algodão em 0,1 ( $0,46 \pm 0,19$ ,  $p = 0,02$ ) e 1 ( $0,56 \pm 0,18$ ,  $p = 0,04$ ) µg mL<sup>-1</sup>, exceto em 10 ( $0,80 \pm 0,23$ ,  $p = 0,4$ ), 50 ( $0,88 \pm 0,43$ ,  $p = 0,5$ ) e 100 µg mL<sup>-1</sup> ( $0,72 \pm 0,24$ ,  $p = 0,14$ ).

As expressões relativas dos genes HSPA5 e BCL2 não foram afetadas ( $p < 0,05$ ) em todas as concentrações de NFCs de algodão testadas.

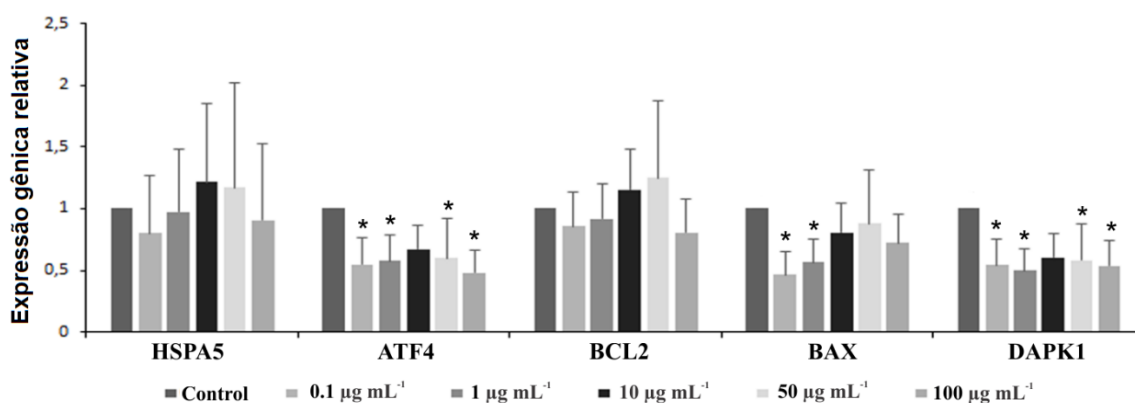


Figura 23 - Expressão relativa (média  $\pm$  SEM) dos transcritos *Heat shock protein family A member 5* (HSPA5), *activating transcription factor 4* (ATF4), *BCL2*, *BCL2 associated X protein* (BAX), e *Death associated protein kinase 1* (DAPK1) em células-tronco mesenquimais humanas incubadas com 0 (grupo controle); 0,1; 1; 10; 50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de nanofibras de celulose (NFCs) de algodão por 48h. Expressão relativa = 1,00 ( $p > 0,05$ ; média  $\pm$  SEM).

A fim de verificar a especificidade dos resultados da PCR em tempo real, foi realizada a análise dos produtos dos transcritos amplificados por PCR em gel de agarose. A Figura 24 mostra os produtos específicos da PCR em tempo real com o tamanho de banda esperado para cada gene analisado.

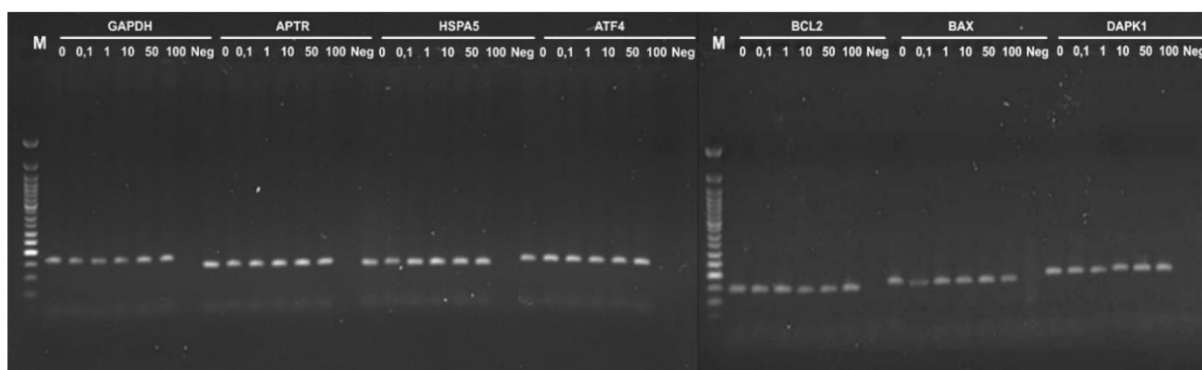


Figura 24 - Eletroforese em gel de agarose mostrando produtos específicos da PCR em tempo real com o tamanho das bandas esperado para cada gene. "M" representa o marcador de tamanho das bandas de DNA, "0" representa o grupo de controle sem nanofibras de celulose (NFCs) de algodão, "0,1; 1; 10; 50 e 100" representa os grupos tratados com NFC de algodão ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e "Neg" representa o controle negativo (reação sem cDNA).



Para estudar o balanço entre os transcritos que regulam a apoptose, foi avaliada a razão BAX/BCL2 para as células-tronco mesenquimais humanas tratadas com NFCs de algodão. A relação BAX/BCL2 aumenta proporcionalmente com o aumento da concentração das NFCs de algodão testadas (Tabela 2). No entanto, as razões de expressão de RNAm de BAX e BCL2 em todos os tratamentos testados foram inferiores a 1 (Tabela 2).

**Tabela 2 - Relação entre as expressões de mRNA de BAX / BCL2 em células-tronco mesenquimais humanas expostas a nanofibras de celulose de algodão.**

Tratamentos	BAX <sup>a</sup>	BCL2 <sup>a</sup>	Razão BAX/BCL2 <sup>b</sup>
Controle	1	1	1
0,1 µg mL <sup>-1</sup> NFC	0,46 ± 0,19	0,86 ± 0,27	0,54
1 µg mL <sup>-1</sup> NFC	0,56 ± 0,18	0,92 ± 0,28	0,61
10 µg mL <sup>-1</sup> NFC	0,81 ± 0,24	1,15 ± 0,33	0,70
50 µg mL <sup>-1</sup> NFC	0,88 ± 0,43	1,25 ± 0,62	0,71
100 µg mL <sup>-1</sup> NFC	0,72 ± 0,24	0,81 ± 0,26	0,89

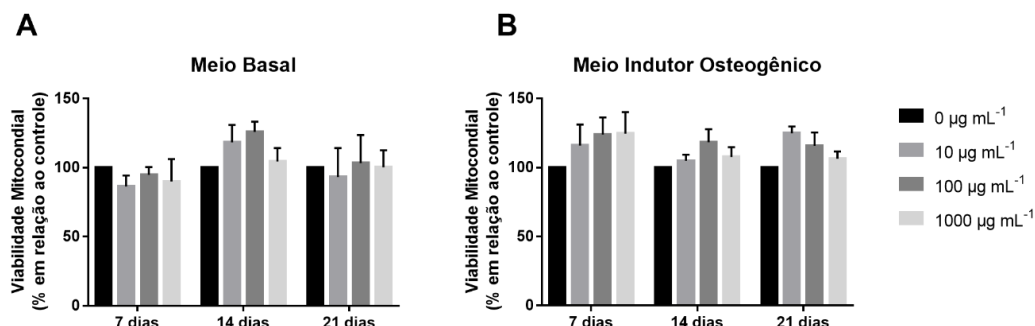
<sup>a</sup>Os valores de expressão de BAX e BCL2 em células-tronco mesenquimais humanas expostas à nanofibras de celulose de algodão foram quantificados pelo ensaio de PCR em tempo real mostrados na Figura 13 utilizando o software REST.

<sup>b</sup>Razão BAX/BCL2 < 1 caracteriza que as células-tronco mesenquimais humanas são resistentes à morte celular induzida por nanofibras de celulose (NFCs) de algodão e uma relação BAX/BCL2 > 1 indica que células-tronco mesenquimais humanas são sensíveis à morte celular induzida por NFCs de algodão. Os dados foram expressos como razão da expressão relativa (média ± SEM).

#### **2.4.6 CAPACIDADE DE DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA DAS CÉLULAS EXPOSTAS ÀS NFCs DE ALGODÃO**

Inicialmente, para avaliar o potencial efeito citotóxico das NFCs de algodão nas células-tronco mesenquimais humanas durante o tempo de diferenciação osteogênica (7, 14 e 21 dias), foi realizado o ensaio de MTT (Figura 25) e não foi encontrada diferença ( $p > 0,05$ ) sobre a viabilidade mitocondrial, quando cultivadas

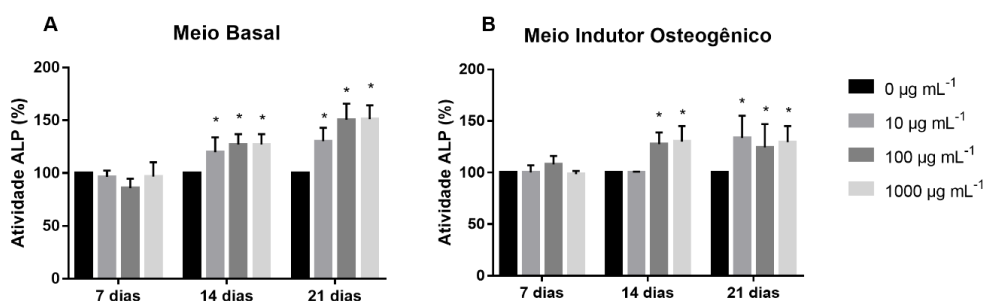
tanto em meio basal (Figura 25A), quanto em meio indutor (Figura 25B) nas concentrações 10, 100 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de NFCs quando comparadas com o controle (0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) dentro dos tempo testados.



**Figura 25 - Viabilidade mitocondrial das células-tronco mesenquimais expostas à diferentes concentrações de nanofibras de celulose (NFCs) de algodão (0, 10, 100 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) durante 7, 14 e 21 dias cultivadas em meio basal (A) e em meio de indução osteogênica (B) baseado no ensaio de MTT. Os valores estão representados pela média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes ( $p > 0,05$ ).**

Após, foi observado que a exposição das células-tronco mesenquimais humanas às NFCs de algodão alterou a atividade da fosfatase alcalina (Figura 26). Após 14 e 21 dias de cultivo em meio basal (Figura 26A), somente na presença das NFCs de algodão, houve aumento ( $p < 0,05$ ) na atividade da ALP nas concentrações de 10, 100 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  quando comparada com o controle (0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Por outro lado, quando cultivadas em meio indutor osteogênico (Figura 26B) houve aumento ( $p < 0,05$ ) após 14 dias de cultivo, somente quando utilizadas as maiores concentrações de NFCs de algodão (100 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Após 21 dias, esse aumento da atividade da ALP ( $p < 0,05$ ) foi observado em todas as concentrações de NFCs testadas (10, 100 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).



**Figura 26 - Atividade da Fosfatase Alcalina intracelular das células-tronco mesenquimais humanas expostas à diferentes concentrações de nanofibras de celulose (NFCs) de algodão (0, 10, 100 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) durante 7, 14 e 21 dias cultivadas em meio basal (A) e em meio de indução osteogênica (B). Os valores estão representados pela média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes (\* $p < 0,05$ ).**

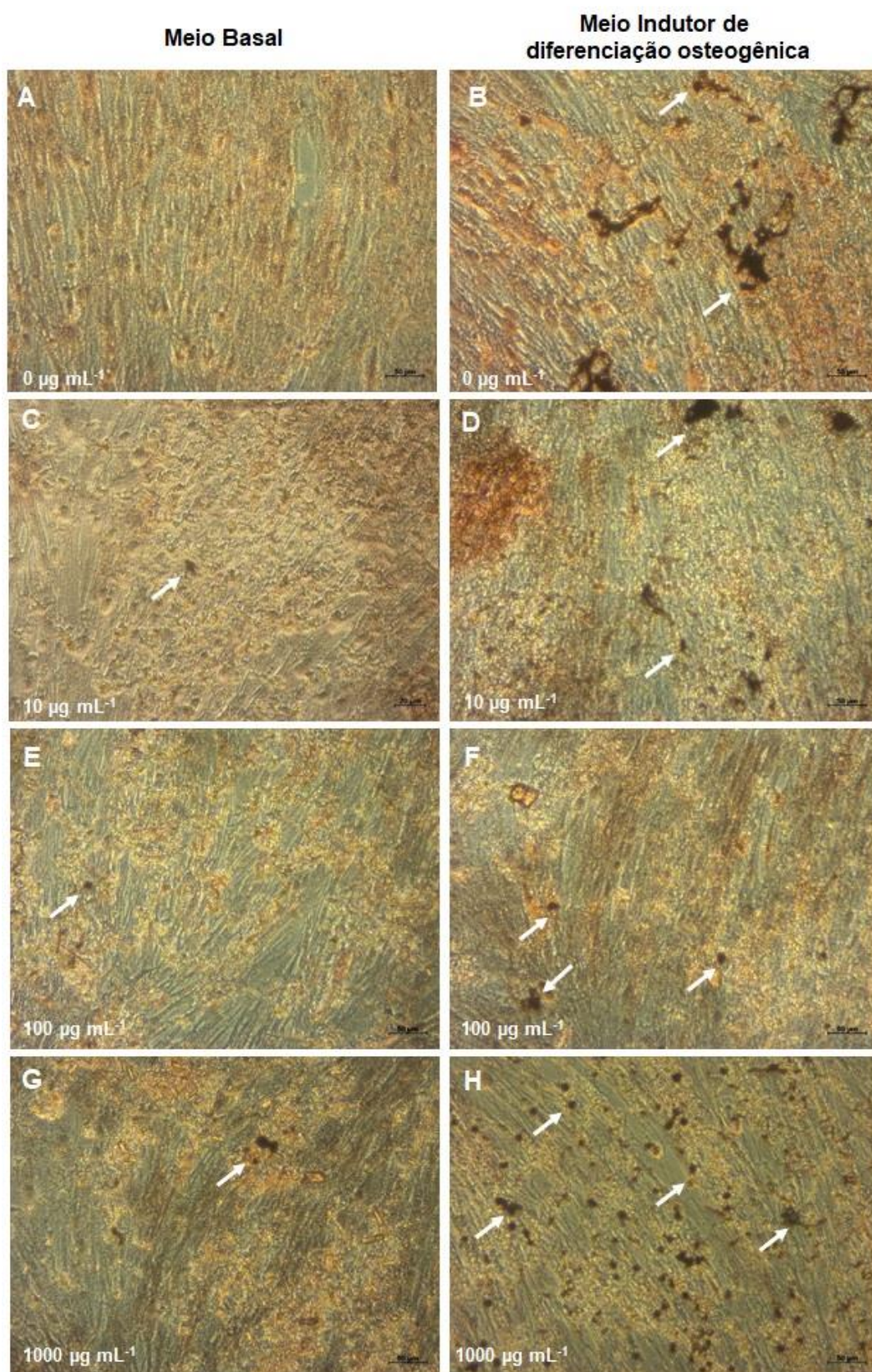
Os nódulos da matriz mineralizada representam marcadores fenotípicos de osteoblastos, uma vez que indicam diferenciação osteogênica bem-sucedida das células-tronco mesenquimais (MAHMOUD et al., 2019). Portanto, o efeito osteogênico das NFCs de algodão nas células-tronco mesenquimais humanas foi investigado pelo ensaio de coloração von Kossa (Figura 27) e com vermelho de alizarina S (Figura 28).

Após 21 dias de cultura, foram detectados pontos enegrecidos pela coloração von Kossa que representam prováveis locais de deposição dos nódulos mineralizantes (Figura 27, setas brancas). Os nódulos de mineralização foram detectados em menor quantidade quando as células foram cultivadas com NFC de algodão sem a presença de indutores osteogênicos (meio basal) (Figura 27 C, D, E), enquanto, no meio de cultivo de indução osteogênica, os nódulos mineralizantes foram observados em maiores quantidades (Figura 27 D, F, H).

Adicionalmente, as células-tronco mesenquimais humanas apresentaram deposição de nódulos de cálcio após 21 dias de cultura na presença das NFCs de algodão tanto em meio de cultura basal (Figura 28 C, E, G) quanto em meio de indução osteogênica (Figura 28 D, F, H), como indicado pela coloração com vermelho de alizarina S.

Vale ressaltar que, a presença de nódulos mineralizantes pela coloração von Kossa e a deposição de nódulos de cálcio pela coloração com vermelho de alizarina S foram visualmente mais frequentes quando as células-tronco foram cultivadas nas maiores concentrações (100 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de NFCs de algodão.

Os grupos controles contendo células-tronco cultivadas no meio basal e sem NFCs não apresentaram nódulos mineralizantes (Figura 27 A) nem deposição de nódulos de cálcio (Figura 28A).



**Figura 27 -** Imagens representativas por microscopia de luz da coloração von Kossa das células-tronco mesenquimais humanas expostas à diferentes concentrações de NFC de algodão (0, 10, 100 e 1000 µg mL<sup>-1</sup>) por 21 dias em meio basal e em meio indutor osteogênico. Seta branca indica nódulos de mineralização. Ampliação 200x. Barra de escala = 50 µm.

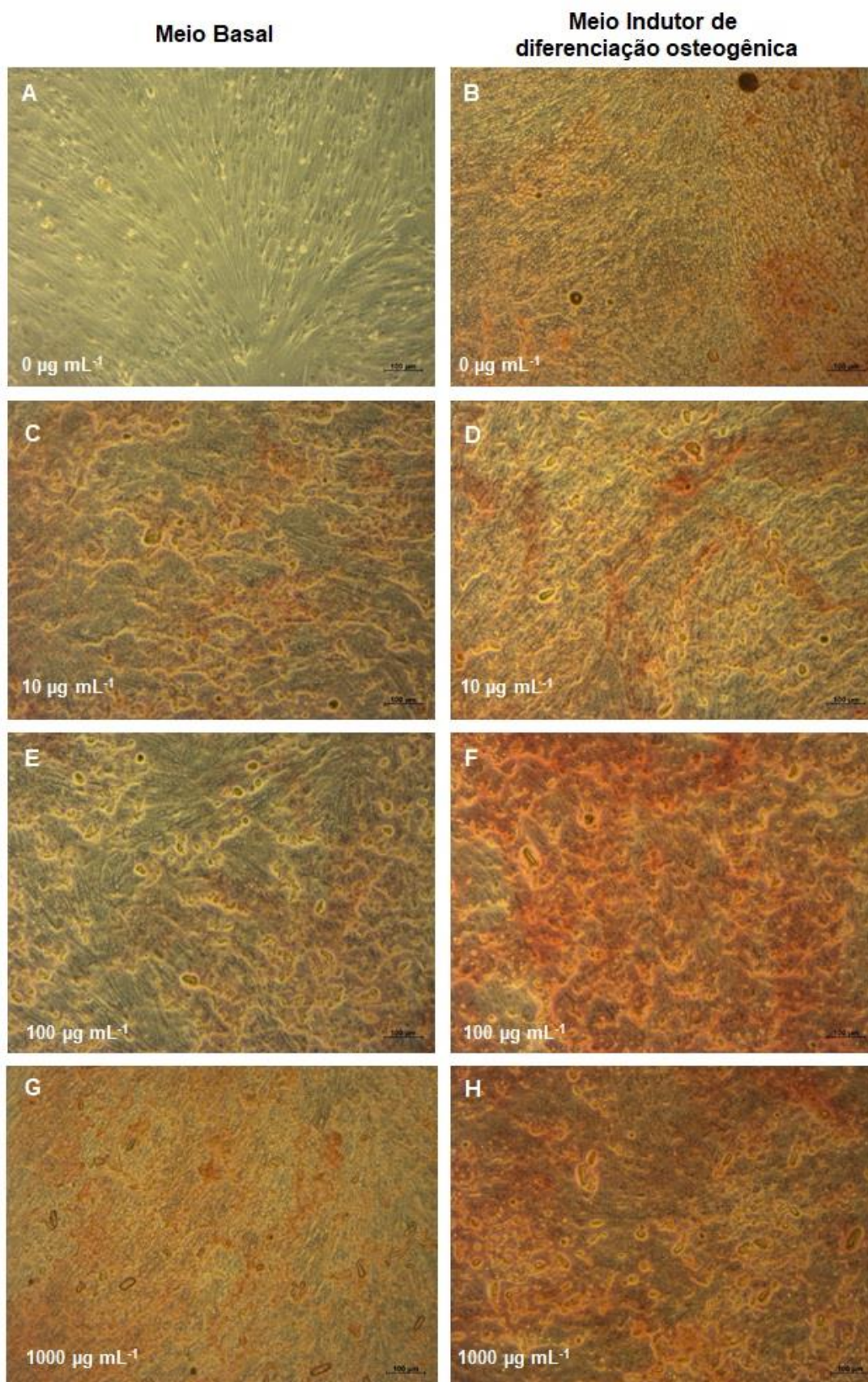


Figura 28 - Imagens representativas por microscopia de luz da coloração com Vermelho de Alizarina S das células-tronco mesenquimais humanas expostas à diferentes concentrações de NFC de algodão (0, 10, 100 e 1000 µg mL<sup>-1</sup>) por 21 dias em meio basal e em meio indutor osteogênico. Ampliação 100x. Barra de escala = 100 µm.

## 2.5 DISCUSSÃO

As NFCs são polímeros abundantes na natureza, com diversas propriedades aplicáveis incluindo biocompatibilidade, estabilidade térmica e química e podem ser obtidas de fontes renováveis tais como o algodão (ZHANG et al., 2017).

A extração das NFCs de algodão de alta pureza é difícil quando se utiliza apenas uma etapa de quaisquer métodos, químicos ou mecânicos (CHEN et al., 2014). Sendo assim, para obtenção das NFCs de algodão foi realizado o método de obtenção por hidrólise ácida utilizando o ácido sulfúrico seguida do método mecânico de sonicação.

O potencial Zeta da NFC de algodão foi avaliado para prever a estabilidade coloidal da suspensão. É sabido que partículas com valores de potencial Zeta acima de 30mV (em módulo) são consideradas estáveis (JIANG et al., 2013). No presente estudo, o potencial Zeta foi de -10mV. O método de preparação de NFC de algodão envolve uma etapa de hidrólise com ácido sulfúrico que induz a formação de grupos sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) na superfície do NM, adicionando-se assim uma carga superficial negativa, corroborando com o valor encontrado do potencial Zeta. Em concordância com o encontrado nesse estudo, o potencial Zeta da NFC produzida pela hidrólise com ácido sulfúrico foi negativo (VARANASI et al., 2018).

Adicionalmente, os espectros de FTIR da NFC de algodão mostraram um pico em  $3305\text{ cm}^{-1}$ , que é uma característica do grupo de alongamento OH (TIBOLLA et al., 2017) que adicionam cargas negativas ao NM. Portanto, a NFC de algodão exibiu uma superfície com carga negativa devido à presença de grupos hidroxila e sulfato. Apesar do baixo valor de potencial Zeta (-10 mV), logo após a sonicação observou-se uma dispersão visualmente homogênea. Assim, a energia fornecida ao sistema pela sonicação associada as cargas existentes facilitou a dispersão da NFC de algodão nos sistemas aquosos, provavelmente devido a repulsão eletrostática (LIN; DUFRESNE, 2014; SACUI et al., 2014).

A hidrólise ácida facilita o processo mecânico de produção das NFCs, uma vez que remove regiões amorfas de fibras de celulose o que aumenta a cristalinidade das fibras (ABDUL KHALIL et al., 2017). Como comprovado pelas análises de Raman e FTIR, a síntese das NFCs de algodão envolveu a hidrólise de regiões de celulose amorfa e resultou em partículas com alto grau de cristalinidade com diâmetros e

comprimentos na escala nanométrica, além da morfologia fusiforme pelas análises feitas por MET e AFM.

Apesar da promissora aplicação das NFCs de algodão em várias áreas, incluindo o campo biomédico, ainda há preocupações sobre seus possíveis efeitos tóxicos em células-tronco, principalmente em células humanas. Por isso, antes do desenvolvimento dos nanobiocompósitos aplicados a diferenciação osteogênica, foram realizados ensaios para avaliar a citocompatibilidade de NFCs de algodão em células-tronco mesenquimais humanas.

A morfologia celular pode ser afetada pela exposição a agentes citotóxicos e reflete diretamente às lesões celulares, além disso, mudanças na morfologia celular têm sido consideradas como um indicador direto na avaliação da citotoxicidade (DUAN et al., 2013). Sabe-se que muitos tipos diferentes de NMs afetam a morfologia celular (HAVRDOVA et al., 2016; SOENEN et al., 2014). Nesse estudo, as células cultivadas na presença das NFCs de algodão mostraram um padrão morfológico similar às células do grupo controle (semelhante a fibroblastos), formando uma monocamada confluyente de células esparsas. Adicionalmente, as funções celulares básicas parecem não ser afetadas pelo contato com as NFCs de algodão, uma vez que a morfologia celular não foi alterada.

Estes resultados morfológicos corroboram com os ensaios de proliferação e atividade mitocondrial, confirmando que as NFCs de algodão não exibiram comportamento citotóxico para as células-tronco mesenquimais humanas dentro das condições testadas. Por outro lado, estudos prévios demonstraram uma redução significativa na viabilidade celular em fibroblastos bovinos cultivados *in vitro* (PEREIRA et al., 2013b) e em cultura tridimensional de células pulmonares humanas (CLIFT et al., 2011) quando expostos às NFCs de algodão. No entanto, poucos estudos foram realizados abordando os níveis de exposição e o potencial de toxicidade das NFCs de algodão. A relação entre a exposição aos NMs e a indução de efeitos tóxicos é, no entanto, dependente do tipo de célula (LUENGO et al., 2013) e ainda não muito bem compreendida.

Estudos anteriores mostraram que os NMs influenciam na progressão do ciclo celular (DZIEDZIC et al., 2016; POPOV et al., 2017; SUN; KANEHIRA; TANIGUCHI, 2016), portanto, o efeito da NFC de algodão no ciclo celular nas células-tronco mesenquimais humanas foi examinado usando análise por citometria de fluxo.

O resultado das populações celulares de cada fase mostrou que as NFCs de algodão não alteraram as fases G1, S e G2 desse tipo celular após 24, 48 ou 72h de exposição.

Além disso, foi avaliado o potencial das NFCs de algodão induzirem estresse oxidativo em células-tronco mesenquimais humanas. Para isso, foi utilizado o ensaio da atividade da SOD. A enzima SOD é uma das mais importantes enzimas antioxidantes, pois catalisa a dismutação do superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Essa ação é crucial para proteger as células contra os efeitos prejudiciais das espécies reativas de oxigênio (ERO), regulando as atividades biológicas, como inflamação, função imunológica, autorrenovação das células-tronco, carcinogênese e envelhecimento (HOLMSTRÖM; FINKEL, 2014).

As enzimas antioxidantes, como a SOD, funcionam por cascatas enzimáticas, levando à desintoxicação dos oxidantes. No entanto, dependendo de suas concentrações, natureza química, origem (fisiológica ou não fisiológica), localização (intra ou extracelular), tempo de exposição e estabilidade, os oxidantes podem ser biologicamente benéficos ou prejudiciais (MOUTHUY et al., 2016).

No presente estudo, a NFC de algodão não aumentou a atividade da enzima SOD. Como a SOD atua no sistema de defesa antioxidante, eliminando os radicais superóxido, evitando assim a peroxidação lipídica da membrana celular de maneira controlada (NISKA et al., 2015), os resultados sugerem que as NFCs de algodão não parecem induzir efeitos toxicológicos mediados pelo estresse oxidativo em células-tronco mesenquimais humanas.

Semelhante ao encontrado, trabalhos anteriores não relataram efeito sobre a produção de EROs após tratamento com NMs (HILDEBRAND et al., 2010; HOHNHOLT; GEPPERT; DRINGEN, 2011; REMYA et al., 2016). No entanto, alguns estudos relataram uma associação entre estresse oxidativo e exposição a NMs (DELAVAL et al., 2017; SUSHMA et al., 2018; XU et al., 2013). A indução de EROs por NMs foi atribuída à sua natureza química ou devido a interações NMs-células (BAI et al., 2017; YANG et al., 2009).

O ensaio da PCR em tempo real foi realizado para entender se o funcionamento molecular de uma célula muda na presença das NFCs de algodão. Para investigar o potencial mecanismo molecular relacionado à citotoxicidade, as alterações dos transcritos de estresses do retículo endoplasmático (ATF4, HSPA5) e apoptose (DAPK1, BCL2 e BAX) foram determinadas após a exposição às NFCs de algodão.



No presente estudo, demonstramos pela primeira vez que células-tronco mesenquimais humanas tratadas com NFC de algodão tiveram padrões de expressão gênica alterados. Tal descoberta está de acordo com estudos anteriores, mostrando que os outros NMs podem induzir a diminuição da expressão de genes em macrófagos de camundongos, células monocíticas humanas e células da granulosa ovariana de galinha (RONZANI et al., 2014; YAZDIMAMAGHANI; MOOS; GHANDEHARI, 2018; ZHAO et al., 2015).

As análises de expressão gênica possibilitam a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes às respostas em células-tronco humanas expostas à NMs. Em trabalhos anteriores, verificou-se que muitos genes envolvidos na resposta ao estresse ou nas vias de morte celular estão alterados em resposta às nanopartículas de dióxido de titânio (GAO et al., 2013), nanopartículas de prata (FATEMI TABATABAIE et al., 2017) e a NFC de algodão (PEREIRA et al., 2013b).

Entre as vias de morte celular, a apoptose é um processo de morte celular programada, sendo em parte regulada pela família de proteínas BCL2 (ALARIFI et al., 2017). Algumas dessas proteínas, como a BAX, são pró-apoptóticas, enquanto a BCL2 são anti-apoptóticas (SIDDIQUI; AHAD; AHSAN, 2015). Essas proteínas formam poros oligoméricos na membrana externa da mitocôndria, que libera ou não o citocromo C no citosol (CHIPUK; GREEN, 2008; GOPINATH et al., 2010). A produção dessas proteínas é controlada por seus genes, assim, o equilíbrio entre as proporções de proteínas BAX e BCL2 determina a sensibilidade das células a estímulos apoptóticos.

A superexpressão de BCL2 prolonga a sobrevivência de células, enquanto a superexpressão de BAX aumenta o processo de apoptose (MEI et al., 2005). O gene DAPK1 também está relacionado à atividade apoptótica, porém por via distinta do BAX (SAVLI et al., 2003). No presente estudo, apesar da sub regulação de BAX e DAPK1, não pareceu ter efeito significativo na apoptose celular, uma vez que a viabilidade celular foi mantida após contato com as NFCs de algodão. Ainda, a abundância dos transcritos para BCL2 não foi alterada, sugerindo que não houve estímulo para as vias de sobrevivência celular. A proporção de proteína BCL2 para BAX determina a sobrevivência celular ( $BAX/BCL2 < 1$ ) ou morte ( $BAX / BCL2 > 1$ ). Neste estudo, a proporção BAX/BCL2 foi inferior a 1 em todos os tratamentos. Assim, este resultado indica que as NFCs de algodão não induziram o processo de morte celular em células-tronco mesenquimais humanas.

Quirós et al. (2017) mostraram que o gene ATF4 contribui para a sobrevivência celular, ativando a expressão de genes citoprotetores, que reprogramam o metabolismo celular por meio da ativação da resposta integrada ao estresse. No presente estudo, os níveis de ATF4 foram alterados nas células-tronco mesenquimais humanas, indicando estresse celular após a exposição às NFCs de algodão.

As mudanças nos níveis de RNAm são influenciadas por mudanças nas taxas de transcrição ou degradação que depende da estabilidade do RNAm em resposta ao estresse (SHALEM et al., 2008). Assim, o nível de expressão gênica reflete um balanço entre a produção de RNAm e sua degradação. No presente estudo, sugere-se que os transcritos BAX, DAPK e ATF4 podem ter a abundância alterada devido às taxas de degradação ou tradução do RNAm modificadas pela exposição às NFCs de algodão. No entanto, mais estudos são necessários para examinar os mecanismos de sub-regulação desses genes em células-tronco mesenquimais humanas expostas às NFCs de algodão e sua implicação na nanotoxicidade.

Apesar da detecção de citotoxicidade não ter sido observada pelas NFCs de algodão, o nível da expressão dos genes relacionados ao estresse e apoptose foi alterado. Assim, abordagens de expressão gênica podem ser usadas para avaliar os efeitos tóxicos à nível molecular do uso de NMs. Os resultados da análise da expressão gênica sugere mudanças na produção celular de genes específicos, que podem identificar alterações sutis em uma célula-tronco humana após a exposição às NFCs de algodão.

Nanopartículas em suspensão aquosa demonstram possuir a capacidade de induzir diferenciação específica de células-tronco sem agentes indutores no meio de cultura. Entretanto, existem poucos estudos utilizando NMs à base de celulose como aditivos no meio de cultura para induzir a diferenciação osteogênica, especificamente para as NFCs de algodão. SHAHROUSVAND et al., (2017b) mostraram que nanocristais de celulose fosfo-calcificados proporcionaram osteocondutividade e tiveram um efeito positivo na diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais humanas.

A fosfatase alcalina é uma enzima que está presente na membrana do osteoblasto e participa da síntese e mineralização da matriz óssea (JAFARY; HANACHI; GORJIPOUR, 2017). O aumento da atividade dessa enzima é considerada um marcador precoce de diferenciação de células-tronco em pré-osteoblastos e

osteoblastos (HASHEMIBENI et al., 2013). No presente estudo observou-se um aumento gradual e progressivo da atividade dessa enzima no 14<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dias nas células co-cultivadas com as NFCs sugerindo uma diferenciação osteogênica. Similarmente, HA et al. (2014) demonstraram que nanopartículas de sílica promoveram maior atividade da fosfatase alcalina de células-tronco murinas.

A capacidade de deposição de cálcio tem sido apontada como um indicativo de maturação do osteoblasto (GANDHIMATHI et al., 2019). Para esse fim as colorações de von Kossa e vermelho de Alizarina são úteis para a avaliação da mineralização da matriz extracelular, pois indicam a deposição de cálcio. No presente estudo, os dados dessas técnicas de coloração corroboraram com os resultados encontrados da atividade da fosfatase alcalina, o que sugere uma indução de diferenciação osteogênica mediada pelas NFCs. Os mecanismos pelos quais os NMs induzem a diferenciação celular não são completamente conhecidos. As vias de sinalização celular para induzir a diferenciação osteogênica podem diferir dependendo do tipo de NM. As características físico-químicas dos NMs têm uma grande influência no mecanismo de diferenciação, a carga e as porções químicas específicas também são importantes para os NMs direcionarem a diferenciação de células-tronco (ZHANG et al., 2018).

No presente estudo, pode-se sugerir que a interação física entre as NFCs e as células-tronco tenha promovido a diferenciação. GALINDO; CHAI; TAGAYA, (2019) demonstraram que a formação de cristais de hidroxiapatita (fosfato de cálcio cristalino) inicia-se pela interação entre íons  $\text{Ca}^{2+}$  e íons negativos presentes na superfície de polímeros. Os dados de potencial Zeta revelaram que as NFC possuem carga de superfície negativa (-10 mV) devido a presença de grupos sulfatos ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) observados pelas as bandas de FTIR. Portanto, esses grupos funcionais podem ter atraído íons  $\text{Ca}^{2+}$  colaborando para formação dos nódulos de mineralização. Ainda, as NFCs podem ter interagido com receptores de membrana, como as integrinas, estimulando uma cascata de sinalização intracelular com mudança na expressão gênica, e, posterior diferenciação celular (DAYEM et al., 2016). No entanto, estudos futuros são necessários para a compreensão dos exatos mecanismos de indução de diferenciação osteogênica e deposição de matriz mineralizada estimulada pelas NFCs.

Assim, pela primeira vez, foi demonstrado que de modo geral, as NFCs são citocompatíveis e induzem a diferenciação osteogênica de células-tronco

mesenquimais humanas derivadas da polpa dentária. O uso de NMs livres para indução de diferenciação osteogênica *in vitro* de células-tronco pode ser aplicada a terapia celular, uma vez que se pode pré-determinar o destino da célula, diminuindo as chances de desenvolvimento de tumores, após o transplante de células, já que a tumorigenicidade de qualquer transplante de células-tronco continua sendo uma grande preocupação para aplicações clínicas (DENG et al., 2018). Entretanto, mais estudos devem ser realizados para o desenvolvimento de novas abordagens para a aplicação desse NM na terapia celular e engenharia tecidual.

## 2.6 CONCLUSÃO

Este estudo apresenta a primeira evidência de que as NFCs de algodão alteraram a expressão de genes relacionados à resposta ao estresse celular e à regulação da apoptose. No entanto, a exposição às NFCs de algodão não alterou a morfologia, viabilidade, ciclo celular ou o estado oxidativo das células-tronco mesenquimais humanas. Ademais, as NFCs induziram a diferenciação osteogênica nas células-tronco.

Assim, as NFCs de algodão apresentam potencial para uso na área biomédica, em função da sua capacidade de produção de nanobiocompósitos como indutores de diferenciação osteogênica aplicados a terapia celular e regeneração tecidual.

## 2.7 REFERÊNCIAS

- Abdul Khalil, H. P. S., Saurabh, C. K., Asniza, M., Tye, Y. Y., Nurul Fazita, M. R., Syakir, M. I., Suraya, N. L. M. (2017). *Nanofibrillated cellulose reinforcement in thermoset polymer composites. Cellulose-Reinforced Nanofibre Composites: Production, Properties and Applications*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100957-4.00001-2>
- Alarifi, S., Ali, H., Alkahtani, S., & Alessia, M. S. (2017). Regulation of apoptosis through bcl-2/bax proteins expression and DNA damage by nano-sized gadolinium oxide. *International Journal of Nanomedicine*, 12(3), 4541–4551. <https://doi.org/10.2147/IJN.S139326>
- An, H.-X., Beckmann, M. W., Reifenberger, G., Bender, H. G., & Niederacher, D. (1999). Gene Amplification and Overexpression of CDK4 in Sporadic Breast Carcinomas Is Associated with High Tumor Cell Proliferation. *The American Journal of Pathology*, 154(1), 113–118. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65257-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65257-1)
- Anspach, L., Unger, R. E., Brochhausen, C., Gibson, M. I., Klok, H. A., Kirkpatrick, C. J., & Freese, C. (2016). Impact of polymer-modified gold nanoparticles on brain endothelial cells: exclusion of endoplasmic reticulum stress as a potential risk factor. *Nanotoxicology*, 10(9), 1341–1350. <https://doi.org/10.1080/17435390.2016.1214761>
- Ao, C., Niu, Y., Zhang, X., He, X., Zhang, W., & Lu, C. (2017). Fabrication and characterization of electrospun cellulose/nano-hydroxyapatite nanofibers for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 97, 568–573. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.091>
- Asare, N., Duale, N., Slagsvold, H. H., Lindeman, B., Olsen, A. K., Gromadzka-Ostrowska, J., ... Instanes, C. (2016). Genotoxicity and gene expression modulation of silver and titanium dioxide nanoparticles in mice. *Nanotoxicology*, 10(3), 312–321. <https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1071443>
- Bai, D.-P., Zhang, X.-F., Zhang, G.-L., Huang, Y.-F., & Gurunathan, S. (2017). Zinc oxide nanoparticles induce apoptosis and autophagy in human ovarian cancer cells. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 12, 6521–6535. <https://doi.org/10.2147/IJN.S140071>

- Bhandari, J., Mishra, H., Mishra, P. K., Wimmer, R., Ahmad, F. J., & Talegaonkar, S. (2017). Cellulose nanofiber aerogel as a promising biomaterial for customized oral drug delivery. *International Journal of Nanomedicine*, *12*, 2021–2031. <https://doi.org/10.2147/IJN.S124318>
- Boonrungsiman, S., Suchaoin, W., Chetprayoon, P., Viriya-empikul, N., Aueviriyavit, S., & Maniratanachote, R. (2017). Shape and surface properties of titanate nanomaterials influence differential cellular uptake behavior and biological responses in THP-1 cells. *Biochemistry and Biophysics Reports*, *9*, 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.12.014>
- Chen, C., Li, H., Pan, J., Yan, Z., Yao, Z., Fan, W., & Guo, C. (2015). Biodegradable composite scaffolds of bioactive glass/chitosan/carboxymethyl cellulose for hemostatic and bone regeneration. *Biotechnology Letters*, *37*(2), 457–465. <https://doi.org/10.1007/s10529-014-1697-9>
- Chen, W., Abe, K., Uetani, K., Yu, H., Liu, Y., & Yano, H. (2014). Individual cotton cellulose nanofibers: Pretreatment and fibrillation technique. *Cellulose*, *21*(3), 1517–1528. <https://doi.org/10.1007/s10570-014-0172-z>
- Chipuk, J. E., & Green, D. R. (2008). How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends in Cell Biology*, *18*(4), 157–164. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.01.007>
- Ciolacu, D., Ciolacu, F., & Popa, V. I. (2011). Amorphous Cellulose – Structure and Characterization. *Cellulose Chemistry and Technology*, *45*(1–2), 13–21. <https://doi.org/10.1163/156856198X00740>
- Clift, M. J. D., Foster, E. J., Vanhecke, D., Studer, D., Wick, P., Gehr, P., ... Weder, C. (2011). Investigating the interaction of cellulose nanofibers derived from cotton with a sophisticated 3D human lung cell coculture. *Biomacromolecules*, *12*(10), 3666–3673. <https://doi.org/10.1021/bm200865j>
- Curvello, R., Raghuvanshi, V. S., & Garnier, G. (2019). Engineering nanocellulose hydrogels for biomedical applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, *267*, 47–61. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.03.002>
- D'Mello, S. R., Cruz, C. N., Chen, M. L., Kapoor, M., Lee, S. L., & Tyner, K. M. (2017). The evolving landscape of drug products containing nanomaterials in the United States. *Nature Nanotechnology*, *12*(6), 523–529. <https://doi.org/10.1038/nnano.2017.67>
- Dayem, A. A., Choi, H. Y., Yang, G. M., Kim, K., Saha, S. K., Kim, J. H., & Cho, S. G.

- (2016). The potential of nanoparticles in stem cell differentiation and further therapeutic applications. *Biotechnology Journal*, 11(12), 1550–1560. <https://doi.org/10.1002/biot.201600453>
- Delaval, M., Wohlleben, W., Landsiedel, R., Baeza-Squiban, A., & Boland, S. (2017). Assessment of the oxidative potential of nanoparticles by the cytochrome c assay: assay improvement and development of a high-throughput method to predict the toxicity of nanoparticles. *Archives of Toxicology*, 91(1), 163–177. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1701-3>
- Deng, J., Zhang, Y., Xie, Y., Zhang, L., & Tang, P. (2018). Cell Transplantation for Spinal Cord Injury: Tumorigenicity of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Stem/Progenitor Cells. *Stem Cells International*, 2018, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2018/5653787>
- Duan, J., Yu, Y., Li, Y., Yu, Y., Li, Y., Zhou, X., ... Sun, Z. (2013). Toxic Effect of Silica Nanoparticles on Endothelial Cells through DNA Damage Response via Chk1-Dependent G2/M Checkpoint. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062087>
- Dziedzic, A., Kubina, R., Bułdak, R. J., Skonieczna, M., & Cholewa, K. (2016). Silver nanoparticles exhibit the dose-dependent anti-proliferative effect against human squamous carcinoma cells attenuated in the presence of berberine. *Molecules*, 21(3). <https://doi.org/10.3390/molecules21030365>
- Falagan-Lotsch, P., Grzincic, E. M., & Murphy, C. J. (2016). One low-dose exposure of gold nanoparticles induces long-term changes in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(47), 13318–13323. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616400113>
- Fatemi Tabatabaie, S. R., Mehdiabadi, B., Mori Bakhtiari, N., & Tabandeh, M. R. (2017). Silver nanoparticle exposure in pregnant rats increases gene expression of tyrosine hydroxylase and monoamine oxidase in offspring brain. *Drug and Chemical Toxicology*, 40(4), 440–447. <https://doi.org/10.1080/01480545.2016.1255952>
- Ferreira, L. S., Diniz, I. M. A., Maranduba, C. M. S., Miyagi, S. P. H., Rodrigues, M. F. S. D., Moura-Netto, C., & Marques, M. M. (2019). Short-term evaluation of photobiomodulation therapy on the proliferation and undifferentiated status of dental pulp stem cells. *Lasers in Medical Science*, 34(4), 659–666. <https://doi.org/10.1007/s10103-018-2637-z>



- Fischer, S., Schenzel, K., Fischer, K., & Diepenbrock, W. (2005). Applications of FT Raman spectroscopy and micro spectroscopy characterizing cellulose and cellulosic biomaterials. *Macromolecular Symposia*, 223, 41–56. <https://doi.org/10.1002/masy.200550503>
- Galindo, T. G. P., Chai, Y., & Tagaya, M. (2019). Hydroxyapatite nanoparticle coating on polymer for constructing effective biointeractive interfaces. *Journal of Nanomaterials*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/6495239>
- Gandhimathi, Quek, Ezhilarasu, Ramakrishna, Bay, & Srinivasan. (2019). Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells with Silica-Coated Gold Nanoparticles for Bone Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20), 5135. <https://doi.org/10.3390/ijms20205135>
- Gao, G., Ze, Y., Zhao, X., Sang, X., Zheng, L., Ze, X., ... Zhang, X. (2013). Titanium dioxide nanoparticle-induced testicular damage, spermatogenesis suppression, and gene expression alterations in male mice. *Journal of Hazardous Materials*, 258–259, 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.04.046>
- Gaspar, D., Fernandes, S. N., De Oliveira, A. G., Fernandes, J. G., Grey, P., Pontes, R. V., ... Fortunato, E. (2014). Nanocrystalline cellulose applied simultaneously as the gate dielectric and the substrate in flexible field effect transistors. *Nanotechnology*, 25(9). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/25/9/094008>
- Gopinath, P., Gogoi, S. K., Sanpui, P., Paul, A., Chattopadhyay, A., & Ghosh, S. S. (2010). Signaling gene cascade in silver nanoparticle induced apoptosis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 77(2), 240–245. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.01.033>
- Ha, S. W., Sikorski, J. A., Weitzmann, M. N., & Beck, G. R. (2014). Bio-active engineered 50nm silica nanoparticles with bone anabolic activity: Therapeutic index, effective concentration, and cytotoxicity profile in vitro. *Toxicology in Vitro*, 28(3), 354–364. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.12.001>
- Hashemibeni, B., Jafary, F., Esmaeil, N., Goharian, V., Feizi, G., Heidari, F., ... Zarkesh, S. H. (2013). Comparison of Phenotypic Characterization between Differentiated Osteoblasts from Stem Cells and Calvaria Osteoblasts In vitro. *International Journal of Preventive Medicine*, 4(2), 180–186. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3604850/>
- Havrdova, M., Hola, K., Skopalik, J., Tomankova, K., Petr, M., Cepe, K., ... Zboril, R. (2016). Toxicity of carbon dots-Effect of surface functionalization on the cell

- viability, reactive oxygen species generation and cell cycle. *Carbon*, 99, 238–248. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2015.12.027>
- Hildebrand, H., Kühnel, D., Potthoff, A., Mackenzie, K., Springer, A., & Schirmer, K. (2010). Evaluating the cytotoxicity of palladium/magnetite nano-catalysts intended for wastewater treatment. *Environmental Pollution*, 158(1), 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.08.021>
- Hohnholt, M. C., Geppert, M., & Dringen, R. (2011). Treatment with iron oxide nanoparticles induces ferritin synthesis but not oxidative stress in oligodendroglial cells. *Acta Biomaterialia*, 7(11), 3946–3954. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.06.052>
- Holmström, K. M., & Finkel, T. (2014). Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(6), 411–421. <https://doi.org/10.1038/nrm3801>
- Jafary, F., Hanachi, P., & Gorjipour, K. (2017). Osteoblast differentiation on collagen scaffold with immobilized alkaline phosphatase. *International Journal of Organ Transplantation Medicine*, 8(4), 195–202.
- Jiang, Y., Zhang, H., Wang, Y., Chen, M., Ye, S., Hou, Z., & Ren, L. (2013). Modulation of Apoptotic Pathways of Macrophages by Surface-Functionalized Multi-Walled Carbon Nanotubes. *PLoS ONE*, 8(6), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065756>
- Kah, M., Kookana, R. S., Gogos, A., & Bucheli, T. D. (2018). A critical evaluation of nanopesticides and nanofertilizers against their conventional analogues. *Nature Nanotechnology*, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41565-018-0131-1>
- Lin, N., & Dufresne, A. (2014). Surface chemistry, morphological analysis and properties of cellulose nanocrystals with gradiented sulfation degrees. *Nanoscale*, 6(10), 5384–5393. <https://doi.org/10.1039/c3nr06761k>
- Liu, X., Yang, Z., Sun, J., Ma, T., Hua, F., & Shen, Z. (2019). A brief review of cytotoxicity of nanoparticles on mesenchymal stem cells in regenerative medicine. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 14, 3875–3892. <https://doi.org/10.2147/IJN.S205574>
- Luengo, Y., Nardecchia, S., Morales, M. P., & Serrano, M. C. (2013). Different cell responses induced by exposure to maghemite nanoparticles. *Nanoscale*, 5(23), 11428–11437. <https://doi.org/10.1039/c3nr02148c>
- Mahmoud, N. S., Ahmed, H. H., Mohamed, M. R., Amr, K. S., Aglan, H. A., Ali, M. A.

- M., & Tantawy, M. A. (2019). Role of nanoparticles in osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Cytotechnology*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s10616-019-00353-y>
- Mei, Z., Li, X., Wu, Q., Hu, S., & Yang, X. (2005). The research on the anti-inflammatory activity and hepatotoxicity of triptolide-loaded solid lipid nanoparticle. *Pharmacological Research*, 51(4), 345–351. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2004.10.007>
- Mouthuy, P. A., Snelling, S. J. B., Dakin, S. G., Milković, L., Gašparović, A. Č., Carr, A. J., & Žarković, N. (2016). Biocompatibility of implantable materials: An oxidative stress viewpoint. *Biomaterials*, 109, 55–68. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.09.010>
- Munk, M., Camargo, L. S. A., Quintão, C. C. R., Silva, S. R., Souza, E. D., Raposo, N. R. B., ... Brandão, H. M. (2016). Biocompatibility assessment of fibrous nanomaterials in mammalian embryos. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 12(5), 1151–1159. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.01.006>
- Muqheet, M., Malik, H., Mahar, R. B., Ahmed, F., Khatri, Z., & Carlson, K. (2017). Cationization of Cellulose Nanofibers for the Removal of Sulfate Ions from Aqueous Solutions. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 56(47), 14078–14088. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.7b03739>
- Nayak, R. R., Bernal, W. E., Lee, J. W., Kearns, M. J., & Cheung, V. G. (2014). Stress-induced changes in gene interactions in human cells. *Nucleic Acids Research*, 42(3), 1757–1771. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt999>
- Ni, C., Zhou, J., Kong, N., Bian, T., Zhang, Y., Huang, X., ... Yan, F. (2019). Gold nanoparticles modulate the crosstalk between macrophages and periodontal ligament cells for periodontitis treatment. *Biomaterials*, 206(January), 115–132. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.03.039>
- Niska, K., Pyszka, K., Tukaj, C., Wozniak, M., Radomski, M. W., & Inkielewicz-Stepniak, I. (2015). Titanium dioxide nanoparticles enhance production of superoxide anion and alter the antioxidant system in human osteoblast cells. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 1095–1107. <https://doi.org/10.2147/IJN.S73557>
- Pan, R., Xu, X., Sun, R., Wang, Z., Lindh, J., Edström, K., ... Nyholm, L. (2018). Nanocellulose Modified Polyethylene Separators for Lithium Metal Batteries. *Small*, 1704371, 1–9. <https://doi.org/10.1002/smll.201704371>

- Park, M., Lee, D., Shin, S., & Hyun, J. (2015). Effect of negatively charged cellulose nanofibers on the dispersion of hydroxyapatite nanoparticles for scaffolds in bone tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 130, 222–228. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.04.014>
- Pereira, M. M., Raposo, N. R. B., Brayner, R., Teixeira, E. M., Oliveira, V., Quintão, C. C. R., ... Brandão, H. M. (2013a). Cytotoxicity and expression of genes involved in the cellular stress response and apoptosis in mammalian fibroblast exposed to cotton cellulose nanofibers. *Nanotechnology*, 24(7). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/24/7/075103>
- Pereira, M. M., Raposo, N. R. B., Brayner, R., Teixeira, E. M., Oliveira, V., Quintão, C. C. R., ... Brandão, H. M. (2013b). Cytotoxicity and expression of genes involved in the cellular stress response and apoptosis in mammalian fibroblast exposed to cotton cellulose nanofibers. *Nanotechnology*, 24(7). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/24/7/075103>
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30(9), e36. <https://doi.org/10.1093/nar/30.9.e36>
- Poletto, M., Ornaghi Júnior, H. L., & Zattera, A. J. (2014). Native cellulose: Structure, characterization and thermal properties. *Materials*, 7(9), 6105–6119. <https://doi.org/10.3390/ma7096105>
- Popov, A. L., Popova, N. R., & Irina I. Selezneva, Azamat Y. Akkizov, V. K. I. (2016). Cerium oxide nanoparticles stimulate proliferation of primary mouse embryonic fibroblasts in vitro. *Materials Science and Engineering, C* 68, 406–413.
- Popov, A. L., Tatarnikova, O. G., Popova, N. R., Selezneva, I. I., Akkizov, A. Y., Ermakov, A. M., ... Ivanov, V. K. (2017). Ce<sub>1-x</sub>Gd<sub>x</sub>O<sub>y</sub> Nanoparticles Stimulate Proliferation of Dental Pulp Stem Cells *In Vitro*. *Nano Hybrids and Composites*, 13, 26–31. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/nhc.13.26>
- Proniewicz, L. M., Paluszkiewicz, C., Weselucha-Birczyńska, A., Majcherczyk, H., Barański, A., & Konieczna, A. (2001). FT-IR and FT-Raman study of hydrothermally degraded cellulose. *Journal of Molecular Structure*, 596(1–3), 163–169. [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(01\)00706-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(01)00706-2)
- Quirós, P. M., Prado, M. A., Zamboni, N., D'Amico, D., Williams, R. W., Finley, D., ... Auwerx, J. (2017). Multi-omics analysis identifies ATF4 as a key regulator of the

- mitochondrial stress response in mammals. *Journal of Cell Biology*, 216(7), 2027–2045. <https://doi.org/10.1083/jcb.201702058>
- Ramakers, C., Ruijter, J. M., Lekanne Deprez, R. H., & Moorman, A. F. M. (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*, 339(1), 62–66. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)01423-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)01423-4)
- Rashad, A., Mohamed-Ahmed, S., Ojansivu, M., Berstad, K., Yassin, M. A., Kivijärvi, T., ... Mustafa, K. (2018). Coating 3D Printed Polycaprolactone Scaffolds with Nanocellulose Promotes Growth and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Biomacromolecules* (Vol. 19). <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b01194>
- Reddy, N., & Yang, Y. (2009). Natural cellulose fibers from soybean straw. *Bioresource Technology*, 100(14), 3593–3598. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.09.063>
- Remya, N. S., Syama, S., Sabareeswaran, A., & Mohanan, P. V. (2016). Toxicity, toxicokinetics and biodistribution of dextran stabilized Iron oxide Nanoparticles for biomedical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 511(1), 586–598. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.06.119>
- Ribeiro, V. P., Silva-Correia, J., Nascimento, A. I., da Silva Morais, A., Marques, A. P., Ribeiro, A. S., ... Reis, R. L. (2017). Silk-based anisotropical 3D biotextiles for bone regeneration. *Biomaterials*, 123, 92–106. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.01.027>
- Ronzani, C., Safar, R., Diab, R., Chevrier, J., Paoli, J., Abdel-Wahhab, M. A., ... Joubert, O. (2014). Viability and gene expression responses to polymeric nanoparticles in human and rat cells. *Cell Biology and Toxicology*, 30(3), 137–146. <https://doi.org/10.1007/s10565-014-9275-4>
- Ruiz-Palomero, C., Soriano, M. L., & Valcárcel, M. (2016). Sulfonated nanocellulose for the efficient dispersive micro solid-phase extraction and determination of silver nanoparticles in food products. *Journal of Chromatography A*, 1428, 352–358. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.06.023>
- Sacui, I. A., Nieuwendaal, R. C., Burnett, D. J., Stranick, S. J., Jorfi, M., Weder, C., ... Gilman, J. W. (2014). Comparison of the properties of cellulose nanocrystals and cellulose nanofibrils isolated from bacteria, tunicate, and wood processed using acid, enzymatic, mechanical, and oxidative methods. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 6(9), 6127–6138. <https://doi.org/10.1021/am500359f>
- Sahu, S. C. (2016). Altered global gene expression profiles in human gastrointestinal

- epithelial Caco2 cells exposed to nanosilver. *Toxicology Reports*, 3, 262–268. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2016.01.012>
- Savli, H., Sirma, S., Nagy, B., Aktan, M., Dincol, G., & Ozbek, U. (2003). Real-time PCR analysis of the apoptosis related genes in ATRA treated APL t ( 15 ; 17 ) patients, 35(5), 454–459.
- Shahrousvand, E., Shahrousvand, M., Ghollasi, M., Seyedjafari, E., Jouibari, I. S., babaei, A., & Salimi, A. (2017). Preparation and evaluation of polyurethane/cellulose nanowhisker bimodal foam nanocomposites for osteogenic differentiation of hMSCs. *Carbohydrate Polymers*, 171, 281–291. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.05.027>
- Shahrousvand, M., Tabar, F. A., Shahrousvand, E., Babaei, A., Hasani-Sadrabadi, M. M., Sadeghi, G. M. M., ... Salimi, A. (2017). High aspect ratio phospho-calcified rock candy-like cellulose nanowhiskers of wastepaper applicable in osteogenic differentiation of hMSCs. *Carbohydrate Polymers*, 175, 293–302. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.001>
- Shalem, O., Dahan, O., Levo, M., Martinez, M. R., Furman, I., Segal, E., & Pilpel, Y. (2008). Transient transcriptional responses to stress are generated by opposing effects of mRNA production and degradation. *Molecular Systems Biology*, 4(223). <https://doi.org/10.1038/msb.2008.59>
- Sharma, M., Nikota, J., Halappanavar, S., Castranova, V., Rothen-Rutishauser, B., & Clippinger, A. J. (2016). Predicting pulmonary fibrosis in humans after exposure to multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs). *Archives of Toxicology*, 90(7), 1605–1622. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1742-7>
- Shrestha, S., Jiang, P., Sousa, M. H., Morais, P. C., Mao, Z., & Gao, C. (2015). Citrate-capped iron oxide nanoparticles impair the osteogenic differentiation potential of rat mesenchymal stem cells. *Journal of Materials Chemistry B*, 4(2), 245–256. <https://doi.org/10.1039/c5tb02007g>
- Siddiqui, W. A., Ahad, A., & Ahsan, H. (2015). The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update. *Archives of Toxicology*, 89(3), 289–317. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1448-7>
- Snyder-Talkington, B. N., Dong, C., Zhao, X., Dymacek, J., Porter, D. W., Wolfarth, M. G., ... Guo, N. L. (2015). Multi-walled carbon nanotube-induced gene expression in vitro: Concordance with in vivo studies. *Toxicology*, 328, 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.12.012>

- Soenen, S. J., Manshian, B. B., Himmelreich, U., Demeester, J., Braeckmans, K., & De Smedt, S. C. (2014). The performance of gradient alloy quantum dots in cell labeling. *Biomaterials*, 35(26), 7249–7258. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.05.023>
- Sun, Q., Kanehira, K., & Taniguchi, A. (2016). Low doses of TiO<sub>2</sub>-polyethylene glycol nanoparticles stimulate proliferation of hepatocyte cells. *Science and Technology of Advanced Materials*, 17(1), 669–676. <https://doi.org/10.1080/14686996.2016.1239499>
- Sushma, Kumar, H., Ahmad, I., & Dutta, P. K. (2018). In-vitro toxicity induced by quartz nanoparticles: Role of ER stress. *Toxicology*, 404–405, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.05.001>
- Tibolla, H., Pelissari, F. M., Rodrigues, M. I., & Menegalli, F. C. (2017). Cellulose nanofibers produced from banana peel by enzymatic treatment: Study of process conditions. *Industrial Crops and Products*, 95, 664–674. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.11.035>
- Tidjarat, S., Winotapun, W., Opanasopit, P., Ngawhirunpat, T., & Rojanarata, T. (2014). Uniaxially aligned electrospun cellulose acetate nanofibers for thin layer chromatographic screening of hydroquinone and retinoic acid adulterated in cosmetics. *Journal of Chromatography A*, 1367, 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.09.043>
- van der Zande, M., Undas, A. K., Kramer, E., Monopoli, M. P., Peters, R. J., Garry, D., ... Bouwmeester, H. (2016). Different responses of Caco-2 and MCF-7 cells to silver nanoparticles are based on highly similar mechanisms of action. *Nanotoxicology*, 10(10), 1431–1441. <https://doi.org/10.1080/17435390.2016.1225132>
- Varanasi, S., Henzel, L., Mendoza, L., Prathapan, R., Batchelor, W., Tabor, R., & Garnier, G. (2018). Pickering Emulsions Electrostatically Stabilized by Cellulose Nanocrystals. *Frontiers in Chemistry*, 6(September), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00409>
- Xu, Jiegou, Futakuchi, M., Alexander, D. B., Fukamachi, K., Numano, T., Suzui, M., ... Tsuda, H. (2014). Nanosized zinc oxide particles do not promote DHPN-induced lung carcinogenesis but cause reversible epithelial hyperplasia of terminal bronchioles. *Archives of Toxicology*, 88(1), 65–75. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1086-5>

- Xu, Jing, Li, Z., Xu, P., Xiao, L., & Yang, Z. (2013). Nanosized copper oxide induces apoptosis through oxidative stress in podocytes. *Archives of Toxicology*, 87(6), 1067–1073. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0925-0>
- Yan, Z., Xu, L., Han, J., Wu, Y. J., Wang, W., Yao, W., & Wu, W. (2014). Transcriptional and posttranscriptional regulation and endocytosis were involved in zinc oxide nanoparticle-induced interleukin-8 overexpression in human bronchial epithelial cells. *Cell Biology and Toxicology*, 30(2), 79–88. <https://doi.org/10.1007/s10565-014-9270-9>
- Yang, H., Liu, C., Yang, D., Zhang, H., & Xi, Z. (2009). Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: The role of particle size, shape and composition. *Journal of Applied Toxicology*, 29(1), 69–78. <https://doi.org/10.1002/jat.1385>
- Yang, X., Liu, X., Li, Y., Huang, Q., He, W., Zhang, R., ... Benayahu, D. (2017). The negative effect of silica nanoparticles on adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Materials Science and Engineering C*, 81, 341–348. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.07.042>
- Yazdimamaghani, M., Moos, P. J., & Ghandehari, H. (2018). Global gene expression analysis of macrophage response induced by nonporous and porous silica nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 14(2), 533–545. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.11.021>
- Yi, C., Liu, D., Fong, C.-C., Zhang, J., & Yang, M. (2010). Gold Nanoparticles Promote Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells through p38 MAPK Pathway. *ACS Nano*, 4(11), 6439–6448. <https://doi.org/10.1021/nn101373r>
- Zajęc, A., Hanuza, J., Wandas, M., & Dymińska, L. (2015). Determination of N-acetylation degree in chitosan using Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 134, 114–120. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.06.071>
- Zanette, R. de S. S. (2016). *Produção de matrizes biológicas a partir de valvas cardíacas de suínos e recelularização com células tronco da polpa dentária humana*. Universidade Federal de Juiz de Fora. Retrieved from <https://repositorio.ufjf.br/jspui/handle/ufjf/2337>
- Zhang, B., Yan, W., Zhu, Y., Yang, W., Le, W., Chen, B., ... Cheng, L. (2018). Nanomaterials in Neural-Stem-Cell-Mediated Regenerative Medicine: Imaging and Treatment of Neurological Diseases. *Advanced Materials*, 30(17), 1–23.



<https://doi.org/10.1002/adma.201705694>

- Zhang, X., Mei, J., Wang, S., Zheng, Y., Cui, C., Pan, J., & Li, C. (2017). The recyclable cotton cellulose nanofibers/ZnO/CuS nanocomposites with enhanced visible light photocatalytic activity. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 28(6), 4669–4675. <https://doi.org/10.1007/s10854-016-6106-9>
- Zhao, Y., Li, L., Zhang, P.-F., Shen, W., Liu, J., Yang, F.-F., ... Hao, Z.-H. (2015). Differential Regulation of Gene and Protein Expression by Zinc Oxide Nanoparticles in Hen's Ovarian Granulosa Cells: Specific Roles of Nanoparticles. *Plos One*, 10(10), e0140499. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140499>

### 3 CAPÍTULO 2: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CITOCOMPATIBILIDADE DO NANOBIOCOMPÓSITO DE NANOFIBRA DE CELULOSE DE ALGODÃO/QUITOSANA EM CÉLULAS HEK293

#### 3.1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, nanobiocompósitos de diferentes materiais foram utilizados para uma variedade de aplicações médicas e biotecnológicas, como veículos para liberação de moléculas, biossensores e engenharia de tecidos (AMARAL et al., 2019; GUO et al., 2018; MARUDOVA; YOROV, 2019). Os materiais compósitos podem ser de diferentes opções de materiais, como polímeros sintéticos ou naturais. Os biopolímeros naturais têm enormes vantagens em comparação aos polímeros sintéticos, pois são materiais renováveis, amplamente disponíveis, acessíveis e biodegradáveis (ABRAL et al., 2019; HALIMATUL et al., 2019; ILYAS et al., 2018a). Um dos compósitos biopoliméricos que se destaca é o baseado em quitosana, que tem sido fabricado e investigado por muitos grupos de pesquisa nos últimos anos (LIU et al., 2016; MARUDOVA; YOROV, 2019; PALEM et al., 2018). Diferentes tipos de células, proteínas, hormônios, ácidos nucleicos e drogas podem ser incorporados a esses compósitos, tornando-os aplicáveis a vários campos das Ciências da Saúde (MARUDOVA; YOROV, 2019).

No entanto, estudos *in vitro* mostram que, dependendo das propriedades morfológicas e físico-químicas do compósito de quitosana, baixas taxas de adesão celular, disseminação e proliferação são observadas (CARVALHO et al., 2017; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ et al., 2015). As propriedades dos filmes compósitos de quitosana dependem da sua morfologia, que é afetada pelo peso molecular, grau de N-acetilação, evaporação do solvente, reticulação das cadeias e mecanismo de regeneração da amina livre (CASARIEGO et al., 2009; YOUSSEF et al., 2015).

A incorporação de NMs na matriz polimérica produz uma nanotopografia e rugosidade na superfície que podem influenciar o

comportamento celular, melhorando a adesão celular, espalhamento e proliferação (LALWANI et al., 2015; SHI; WANG; YANG, 2016). Assim, o uso de NMs pode produzir compósitos com propriedades favoráveis para a cultura de células e tecidos.

Entre os NMs incorporados em uma matriz polimérica, os materiais celulósicos em nanoescala têm despertado muito interesse. Isso ocorre devido às suas propriedades diferenciadas incluindo nano-dimensão, grande área superficial, alta proporção, cristalinidade, baixa densidade e boa resistência mecânica (ILYAS et al., 2019a; ILYAS; SAPUAN; ISHAK, 2018). A NFC pode ser obtida de uma variedade de fontes biológicas renováveis, incluindo animais tunicados (CAO et al., 2017), bactérias (JIA et al., 2017), madeira (GONG; WANG; CHEN, 2017), sisal (SONG et al., 2018), palma (ILYAS et al., 2019b) e algodão (PEREIRA et al., 2013).

O algodão é uma importante fonte de fibras, pertence à família Malvaceae e é uma das principais culturas do mundo (OECD/FAO, 2016). O teor de celulose da fibra de algodão é muito maior do que o de animais tunicados, madeira e outras plantas (LI et al., 2013). Portanto, o algodão é a fonte de celulose mais facilmente acessível do que as outras. Além disso, as fibras de algodão são conhecidas por sua alta cristalinidade e rigidez em comparação com os diferentes tipos de NFC (CHEN et al., 2014).

Sendo assim, a NFC de algodão tem atraído a atenção como um potencial NM para reforçar compósitos de matriz polimérica (WANG et al., 2019). A NFC de algodão possui propriedades semelhantes às do colágeno, como direcionalidade, que podem ser importantes para a adesão, disseminação e proliferação celular (POOYAN et al., 2013). Devido às suas propriedades físico-químicas e à grande área superficial, as NFCs podem permitir um maior número de pontos de contato entre as células e as respectivas superfícies nanobiocompósitos.

Adicionalmente, como material leve (a densidade da celulose cristalina é de 1,5 a 1,6 g cm<sup>-3</sup>), possui as características para ser um agente de reforço dos nanobiocompósitos (DUFRESNE, 2017). Além disso, a modificação na superfície de materiais poliméricos com NFC pode melhorar a microestrutura e propriedades mecânicas (ILYAS et al., 2018b, 2018c; SANYANG et al., 2017).

As NFC celulose devem, portanto, atuar como um material de reforço em uma matriz polimérica (DUFRESNE, 2017).

No entanto, existem poucas pesquisas sobre a ação combinada da nanofibra extraída da algodoeira na melhoria das propriedades físico-químicas e biológicas de filme nanobiocompósitos de quitosana. Ainda é necessário preencher uma lacuna com estudos que investigam o potencial de adesão celular mediada por NFC de algodão e sua citocompatibilidade com células humanas. Nesse contexto, relatos raros abordaram a NFC de algodão para uso na produção de nanobiocompósitos para aplicações biomédicas (CHEN; HUANG; HSU, 2019; DE FRANCE et al., 2019).

Poucos estudos abordando a toxicidade de nanobiocompósitos à base de NFC foram relatados. Os trabalhos geralmente avaliaram a NFC de outras fontes ou a NFC combinada com outros NMs (FRIEND et al., 2019; KANIMOZHI et al., 2018; MI et al., 2016; YU et al., 2019). Isso pode alterar a resposta da célula ao nanobiocompósito. Portanto, não há informações adicionais sobre o cultivo de células humanas no nanobiocompósito à base de NFC de algodão.

A linhagem celular de rim embrionário humano (HEK293) é bem caracterizada e foi escolhida para os ensaios de citocompatibilidade, dado ao amplo uso dessas células em ensaios de toxicidade de nanobiocompósitos (KOUSER et al., 2018).

## **3.2 OBJETIVOS**

### **3.2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar as características físico-químicas do nanobiocompósito NFC/quitosana e sua citocompatibilidade com células renais embrionárias humanas (HEK293).

### **3.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Investigar a composição, morfologia e nanotopografia do filme de quitosana e do nanobiocompósito de NFC/quitosana;
- Avaliar as taxas de degradação e intumescimento do filme de quitosana e do nanobiocompósito de NFC/quitosana;
- Analisar a área de adesão e proliferação das células HEK293 na superfície dos nanobiocompósito;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* do filme de quitosana e do nanobiocompósito de NFC/quitosana em células HEK293.

### 3.3 MATERIAL E MÉTODOS

Na Figura 29 abaixo é apresentado um esquema do experimento 2 deste projeto.

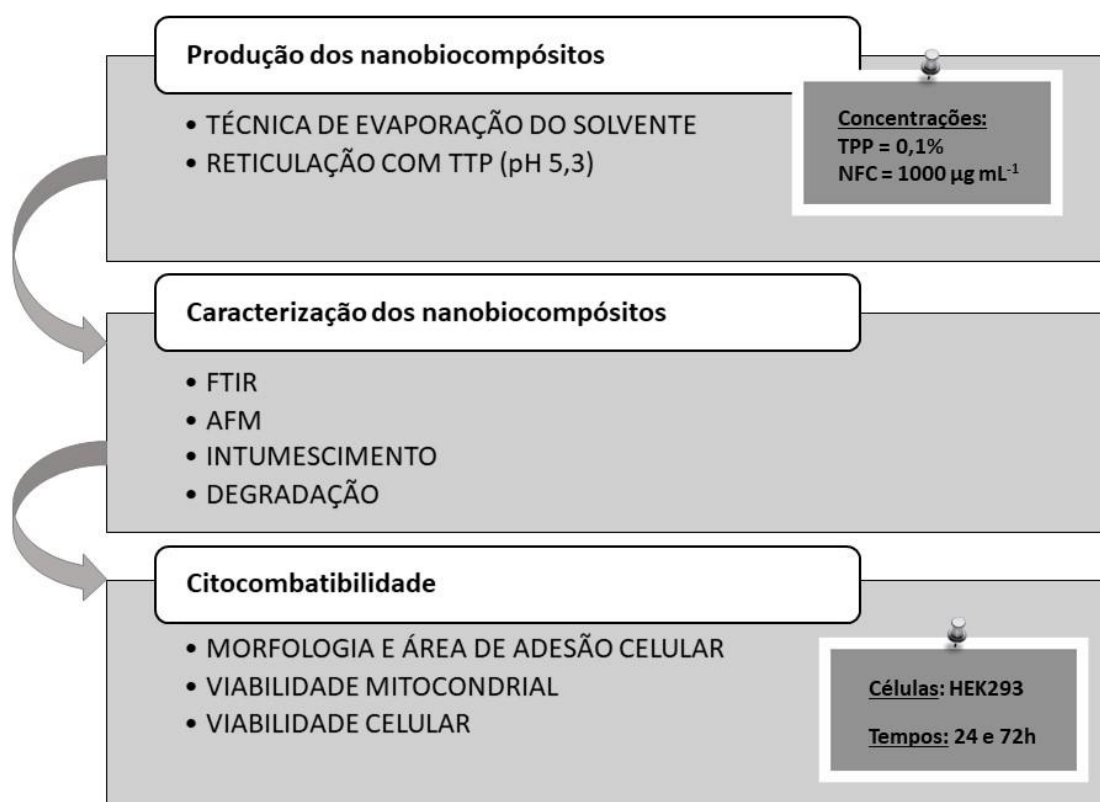


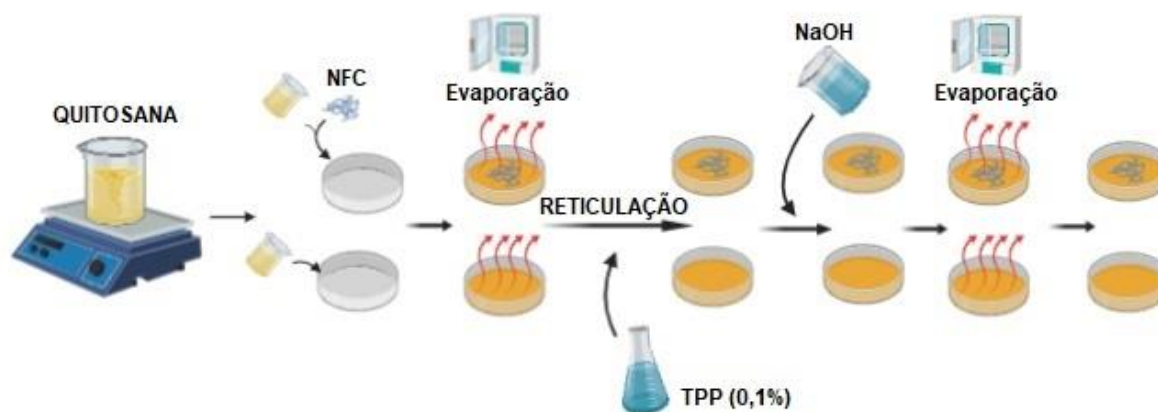
Figura 29 - Representação esquemática da metodologia realizada no Capítulo 2.

#### 3.3.1 PREPARAÇÃO DOS FILMES DE QUITOSANA E NANOBIOCOMPÓSITOS NFC/QUITOSANA

O filme de quitosana (QT) (Peso molecular: baixo, grau de desacetilação: 75-85% - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e o nanobiocompósito de NFC/quitosana foram preparados pela técnica de evaporação do solvente (Figura 30). A solução de quitosana (1% p/v) foi preparada dissolvendo a quitosana em solução diluída em água

destilada de ácido acético (1% v/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), sob constante agitação magnética. Após 24h, o nanobiocompósito de NFC/quitosana foi preparado dispersando a NFC ( $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) na solução de quitosana. A solução de quitosana e a suspensão NFC/quitosana foram transferidas para as placas de polipropileno e mantidas em estufa (Fanem, Guarulhos, SP, Brasil) por 24 h a  $37^\circ \text{C}$  para a evaporação do solvente.

Os filmes secos não reticulados de quitosana obtidos e o nanobiocompósito de NFC/quitosana foram reticulados pela técnica de gelificação iônica em solução de 0,1% (p/v) de tripolifosfato de sódio (TPP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) aquoso (pH 5,3), durante 2 h, em temperatura ambiente e lavados 2 vezes em água destilada. Posteriormente, o pH dos filmes e dos nanobiocompósitos foram neutralizados com solução de hidróxido de sódio (NaOH) (Dinâmica Química Contemporânea Ltda, Diadema, Brasil) 1M por 30 min e lavados 2 vezes em água destilada. Em seguida foram secos novamente em estufa por 24 h a  $37^\circ \text{C}$ .



**Figura 30 – Esquema da preparação do filme de quitosana e do nanobiocompósito de nanofibras de celulose/quitosana, contendo  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  de NFC, pela técnica de evaporação de solvente.**

Os filmes de quitosana e os nanobiocompósitos de NFC/quitosana foram esterilizados em luz ultravioleta (UV) durante 40 min para a realização dos ensaios de cultivo celular.

### **3.3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOBIOCOMPÓSITOS NFC/QUITOSANA**

#### **3.3.2.1 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)**

As NFC de algodão pura, a quitosana pura, o filme de quitosana e o nanobiocompósito NFC/quitosana não reticulados e após serem reticulados com tripolifosfato de sódio (TPP) aquoso (0,1%, pH 5,3) foram observados por espectroscopia FTIR. As amostras foram colocadas em um suporte de Si (ausência de picos de Si). Os espectros de FTIR foram obtidos com um espectrômetro ALPHA FT-IR Bruker (Bruker, Reinstetten, Alemanha) na região de número de onda de 4000-600  $\text{cm}^{-1}$ . O método de reflexão total atenuada foi aplicado às medidas com uma resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$  e 64 varreduras.

#### **3.3.2.2 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)**

A nanotopografia da superfície do filme de quitosana e do nanobiocompósito NFC/quitosana ( $n = 6$ ) foram estudadas usando um Microscópio de Força Atômica (AFM) (Nanosurf easyScan 2 STM, Suíça). As imagens topográficas (altura) foram digitalizadas no modo de toque. As amplitudes de oscilação livre do cantilever foram tipicamente de 50 mV e o tamanho de varredura da sonda do microscópio era de 3x3  $\mu\text{m}$ . A rugosidade da superfície foi caracterizada pelo AFM em termos de rugosidade média ( $R_a$ ) usando o software Gwyddion v2.32, disponível gratuitamente na Internet e suportado pelo Instituto Checo de Metrologia (CZECH REPUBLIC, 2019).



### 3.3.2.3 COMPORTAMENTO DE INTUMESCÊNCIA DO NANOBIOCOMPÓSITO NFC/ QUITOSANA

Para determinar a razão de intumescimento *in vitro*, inicialmente foi medida a massa do filme de quitosana e das amostras de nanobiocompósito de NFC/quitosana (6 cm de diâmetro por 1 mm de altura; n = 3) secos. Em seguida, o filme de quitosana e o nanobiocompósito foram imersos em 10 mL de PBS (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil) 1x (pH 7,4) e mantidos à temperatura ambiente (25 °C ± 1 °C). Após intervalos regulares de tempo, as massas dos filmes de quitosana e dos nanobiocompósitos úmidos foram determinadas usando uma balança eletrônica (Mettler Toledo AB204-S, Ohio, EUA). O experimento foi realizado até o momento em que não foi observado maior inchaço do filme de quitosana e nanobiocompósito de NFC/quitosana. O grau da razão de intumescimento do filme de quitosana e nanobiocompósito NFC/quitosana foi calculado usando a seguinte equação:

$$\text{Intumescimento (\%)} = \frac{W_2 - W_1}{W_1} \times 100$$

Na qual,  $W_1$  é a massa da amostra inicial (seca); e  $W_2$ , a massa da amostra após imersão (inchada).

### 3.3.2.4 COMPORTAMENTO DE DEGRADAÇÃO DO NANOBIOCOMPÓSITO NFC/ QUITOSANA

Para determinar a taxa de degradação *in vitro*, inicialmente foi medida a massa do filme de quitosana e das amostras de nanobiocompósitos de NFC/quitosana (6 cm de diâmetro por 1 mm de altura; n = 3) secos usando uma balança eletrônica (Mettler Toledo AB204-S, Ohio, EUA). Em seguida, o filme de quitosana e o nanobiocompósito foram imersos em 10 mL de PBS 1x (pH 7,4) por 24 e 72 h. Após esses tempos, as amostras foram secas em estufa por 24h a 37° C e, então, foram determinadas as massas dos filmes de quitosana e do nanobiocompósito secos. A

taxa de degradação do filme de quitosana e nanobiocompósito NFC/quitosana foi calculada usando a seguinte equação:

$$\text{Taxa de degradação (\%)} = \frac{W_1 - W_3}{W_1} \times 100$$

Na qual,  $W_1$  é a massa da amostra inicial (seca); e  $W_3$ , a massa da amostra seca após imersão.

### **3.3.3 AVALIAÇÃO DA CITOCOMPATIBILIDADE**

#### **3.3.3.1 CULTURA DE CÉLULAS**

Para avaliar a citotoxicidade do filme de quitosana e do nanobiocompósito NFC/quitosana, foram realizados os ensaios de contato direto com uma monocamada de células HEK293 (ATCC®) *in vitro* em meio de cultivo celular contendo meio DMEM (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, EUA) acrescido de antibióticos contendo penicilina (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, EUA) 100 U mL<sup>-1</sup>, estreptomicina (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, EUA) 100 mg mL<sup>-1</sup> e soro fetal bovino (SFB) (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, EUA) a 10% (v/v). As células foram incubadas em estufa incubadora (Modelo 4130, Thermo Fisher, EUA) em atmosfera humidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C durante 24 e 72 h para posterior realização dos ensaios de citotoxicidade.

#### **3.3.3.2 MORFOLOGIA E PROPAGAÇÃO CELULAR**

Para avaliar a área de adesão e proliferação celular, a morfologia das células aderentes HEK293 que proliferaram nos materiais foram examinadas usando microscopia de luz. Resumidamente, 5x10<sup>4</sup> células/poço foram cultivadas uniformemente em filme de quitosana, nanobiocompósito de NFC/quitosana (1000 µg

mL<sup>-1</sup> de NFC) e placa de poliestireno (controle negativo) em placas de 24 poços (n = 9 para cada tratamento) e cultivadas em incubadora (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) a 37° C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 h e 72 h.

Após a cultura, a área de adesão e a morfologia das células foram avaliadas em microscópio de luz invertida (Zeiss Primo Vert, Oberkochen, Alemanha). A área celular foi medida para quantificar a propagação celular (RHEE et al., 2007) após análise de um total de 100 células em triplicata com auxílio do software Image J (ABRÀMOFF; MAGALHÃES; RAM, 2005) e os resultados foram plotados como área celular (µm<sup>2</sup>) por campo.

### **3.3.3.3 ENSAIO DE VIABILIDADE MITOCONDRIAL**

A viabilidade metabólica da mitocôndria foi estimada pelo ensaio de MTT (brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. As células (5 x 10<sup>3</sup> células/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços (n = 9 para cada tratamento) sob o filme de quitosana e sob nanobiocompósito NFC/quitosana (1000 µg mL<sup>-1</sup> de NFC) e em placa de poliestireno (controle negativo) e mantidas em incubadora a 37° C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 h e 72 h.

O experimento foi realizado 3 vezes com 9 repetições para cada tratamento. A absorbância foi medida usando um leitor de microplacas (Varioskan, Thermo Fisher Scientific, EUA) a 570 nm.

### **3.3.3.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR**

Para avaliar a viabilidade celular, as células HEK293 foram cultivadas sob o filme de quitosana e sob nanobiocompósito NFC/quitosana (1000 µg mL<sup>-1</sup> de NFC) e em placa de poliestireno (controle negativo) em placas de 24 poços a uma densidade de 5 x 10<sup>4</sup> células/poço (n = 3 para tratamento) por 24 e 72 h.

Em seguida, as células foram tratadas com 0,25% (p/v) de tripsina-0,53 mM EDTA (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, EUA) por 3 min para permitir que as células se separassem dos compósitos. A tripsina foi desativada com meio DMEM suplementado com 10% de SFB. As células foram coletadas por centrifugação a 5000 × g. O iodeto de propídio (PI) (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, EUA) foi adicionado à suspensão celular a uma concentração final de 50 µg mL<sup>-1</sup>. As frações das células vivas e mortas foram analisadas por citometria de fluxo (CytoFLEX S, Beckman Coulter, Pasadena, CA, EUA). Foram realizadas três repetições em triplicata, contando 10.000 células por repetição. Os dados foram analisados no software CytExpert (Beckman Coulter).

#### **3.3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados foram analisados por ANOVA e as diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. As diferenças entre os diferentes grupos foram consideradas estatisticamente significantes em  $p < 0,05$ . Os resultados foram apresentados como média aritmética ± erro padrão da média.

### 3.4 RESULTADOS

#### 3.4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOBIOCOMPÓSITOS NFC/QUITOSANA

Para estudar a estrutura química, foi realizada a espectrometria de FTIR do filme de quitosana e do nanobiocompósito NFC/quitosana (Figura 31). Várias bandas características de NFC foram localizadas em  $3305\text{ cm}^{-1}$  (esticamento -OH),  $2903\text{ cm}^{-1}$  (esticamento -CH<sub>2</sub>),  $1365\text{ cm}^{-1}$  (combinação -CH<sub>2</sub>),  $1108\text{ cm}^{-1}$  (COC do anel glicosil) e  $897\text{ cm}^{-1}$  (COC da ligação  $\beta$ -glicosídica) (TIBOLLA et al., 2017).

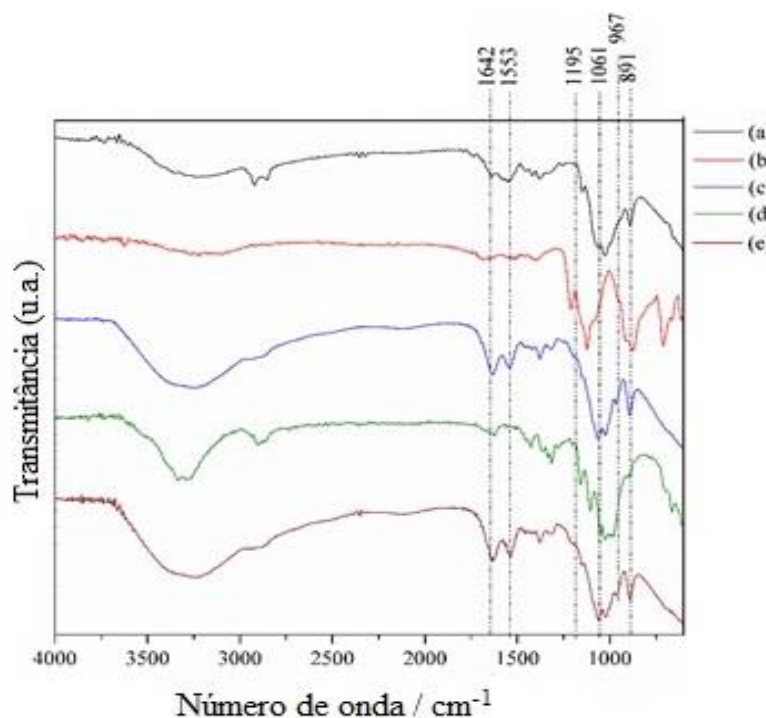
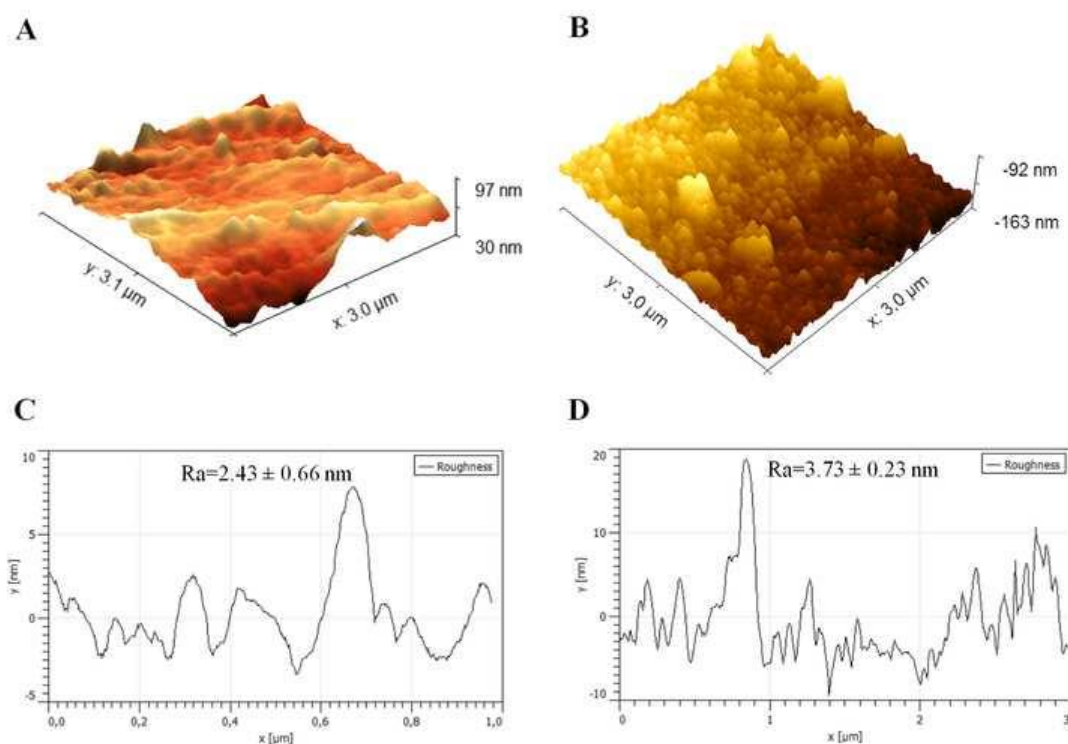


Figura 31 - Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) do (a) filme de quitosana sem reticular, (b) tripolifosfato de sódio (TPP), (c) filme de quitosana reticulado, (d) nanofibras de celulose de algodão e (e) nanobiocompósito NFC/quitosana reticulado.

Comparando os espectros de quitosana antes e após a reticulação com o TPP, é possível observar algumas mudanças que comprovam esse processo. A presença das bandas em  $1195$  e  $967\text{ cm}^{-1}$  no espectro de quitosana reticulado, que não estava presente no espectro do filme de quitosana sem reticular, pode ser atribuída a  $\nu$  (PO<sub>3</sub>) e  $\nu$  (POP), respectivamente, e indica a presença do TPP à estrutura do filme de quitosana reticulado (YU et al., 2013). Da mesma forma, essas

modificações espectrais também ocorrem no nanobiocompósito de NFC/quitosana reticulado. Comparada ao filme de quitosana e ao nanobiocompósito NFC/quitosana, a modificação dos espectros entre  $3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$  indicou interação da NFC com a quitosana, sugerindo que as interações ocorreram entre o grupo sulfato da superfície da NFC e os grupos  $\text{-NH}_2$  da quitosana.

A Figura 32 mostra as análises de AFM do filme de quitosana e das superfícies dos nanobiocompósitos de NFC/quitosana empregadas para o crescimento celular. As imagens da topografia do filme de quitosana e nanobiocompósito NFC/quitosana (Figuras 32A, B) mostram a presença de cavidades e elevações nanométricas. Os valores médios de rugosidade ( $R_a$ ) foram de  $2,43 \pm 0,66\text{ nm}$  do filme de quitosana (Figura 32C) e aumentaram para um valor de  $R_a$  de  $3,73 \pm 0,23\text{ nm}$  para o nanobiocompósito NFC/quitosana (Figura 32D).



**Figura 32** – Imagens tridimensional da topografia por Microscopia de Força Atômica (AFM) de filmes de quitosana (A) e nanobiocompósito de NFC/quitosana (B). Área de digitalização  $3 \times 3\ \mu\text{m}^2$ . Análise de AFM da rugosidade da superfície do filme de quitosana (C) e do nanobiocompósito NFC/quitosana (D).  $R_a$  indica a média da rugosidade da superfície.

### 3.4.2 INTUMESCIMENTO E DEGRADAÇÃO DO NANOBIOCOMPÓSITO NFC/QUITOSANA

A taxa de intumescimento do filme de quitosana e nanobiocompósito de NFC/quitosana é mostrada na Figura 33. As taxas de intumescimento dos dois materiais em PBS (1x) aumentaram com o tempo. No entanto, após 24 h, a taxa de intumescimento do nanobiocompósito NFC/quitosana (363,45%) foi menor ( $p < 0,05$ ) que do filme de quitosana pura (375,85%).

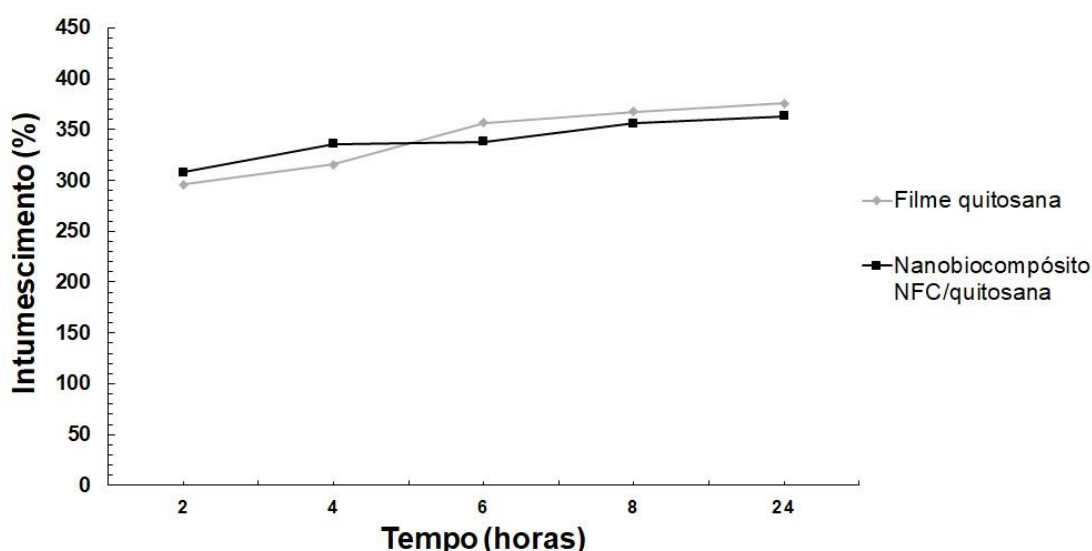


Figura 33 – Percentual de intumescimento do filme de quitosana e do nanobiocompósito NFC/quitosana em solução salina tamponada com fosfato (PBS 1x) em relação ao tempo.

A Figura 34 mostra o percentual de degradação *in vitro* nos tempos de 24, 48 e 72 h em pH 7,4 do filme de quitosana e do nanobiocompósito NFC/quitosana. O filme de quitosana mostrou maior perda significativa de massa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o nanobiocompósito NFC/quitosana dentro de todos os tempos avaliados (24, 48 e 72 h). O nanobiocompósito NFC/quitosana só apresentou significativa perda de massa ( $p < 0,05$ ) após 72 h, enquanto o filme de quitosana teve significativa perda de massa a partir de 24 h em imersão.

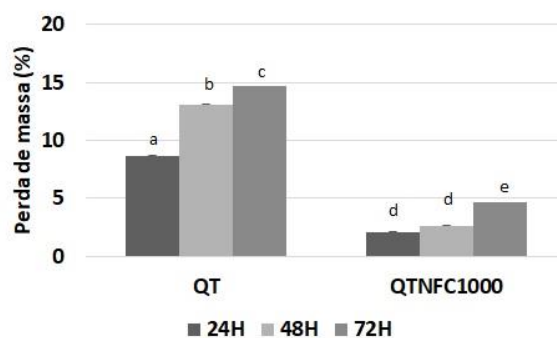


Figura 34 - Percentual da perda de massa *in vitro* nos tempos de 24, 48 e 72 h em pH 7,4 do filme de quitosana (QT) e do nanobiocompósito NFC/quitosana (QTNFC1000).

### 3.4.3 ESTUDOS DE CITOCOMPATIBILIDADE

A Figura 35A mostra as imagens de microscopia de luz das células HEK293 que foram cultivadas durante 72 h sobre o filme de quitosana e nanobiocompósito NFC/quitosana. O espalhamento celular foi quantificado medindo a área das células após 72 h de cultivo (Figura 35B). A área celular das células HEK293 em filmes de quitosana ( $165,25 \pm 11,83 \mu\text{m}^2$ ) e em superfícies de NFC/quitosana ( $164,18 \pm 22,94 \mu\text{m}^2$ ) foi maior ( $p < 0,001$ ) do que na superfície da placa de poliestireno ( $126,28 \pm 19,54 \mu\text{m}^2$ ).

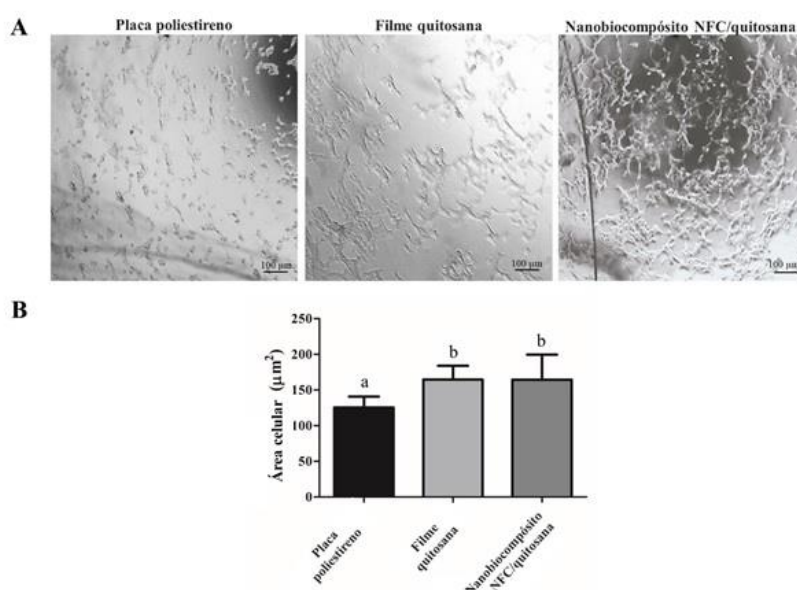


Figura 35 – (A) Imagens de microscopia de luz de células de rim embrionário humano 293 (HEK293) após 72 h em filme de quitosana e em nanobiocompósito NFC/quitosana. (B) Quantificação da área celular ( $\mu\text{m}^2$ ) para células de cada grupo (média  $\pm$  DP). Os dados foram obtidos a partir de imagens microscópicas de luz e analisados com o software Image J. Letras diferentes significam diferença estatística ( $p < 0,001$ ).



No ensaio de MTT, a absorbância dos cristais de formazan formados é proporcional ao número de células com atividade metabólica. Como mostrado na Figura 36, os resultados indicam que não houve redução significativa no metabolismo celular em comparação com o controle ( $p > 0,05$ ).

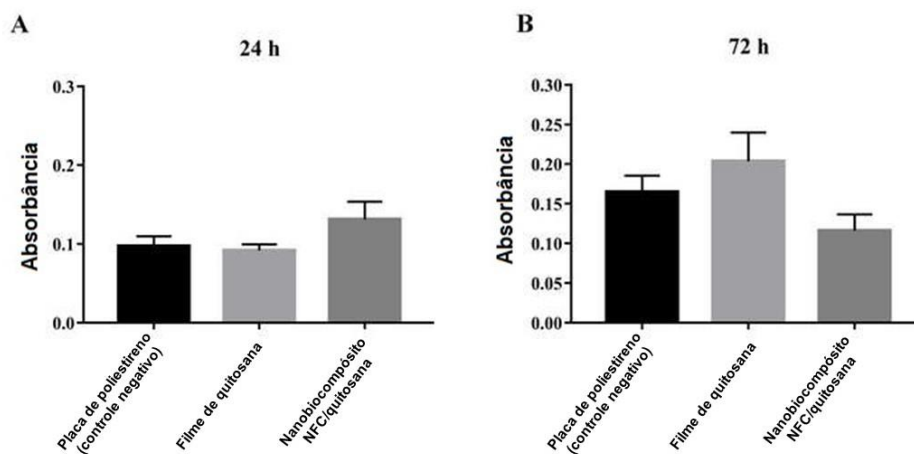


Figura 36 - Proliferação celular avaliada pelo ensaio de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) após 24 (A) e 72 h (B) de cultura em placa de poliestireno (controle), filme de quitosana e nanobiocompósito de NFC/quitosana. Cada valor representa a média  $\pm$  (SEM) ( $n = 6$ ). Os valores não foram estatisticamente significativos ( $p > 0,05$ ).

Para investigar as possíveis alterações na viabilidade celular foram realizados ensaios de citometria de fluxo com marcação com iodeto de propídio que se intercala ao DNA, desde que a membrana celular esteja danificada. De acordo com Figura 37, a porcentagem de células vivas não foi afetada ( $p > 0,05$ ) após 24 h quando cultivadas em filme de quitosana ( $93 \pm 1,52\%$ ) e em nanobiocompósito NFC/quitosana ( $92,82 \pm 1,49\%$ ) em comparação ao controle negativo (placa de poliestireno) ( $90,19 \pm 0,72\%$ ). Entretanto, após 72 h, a viabilidade celular foi reduzida ( $p < 0,05$ ) no filme de quitosana ( $26,78 \pm 5,63\%$ ) e no nanobiocompósito NFC/quitosana ( $18,25 \pm 1,25\%$ ) quando comparado ao controle negativo ( $88,94 \pm 3,84\%$ ).

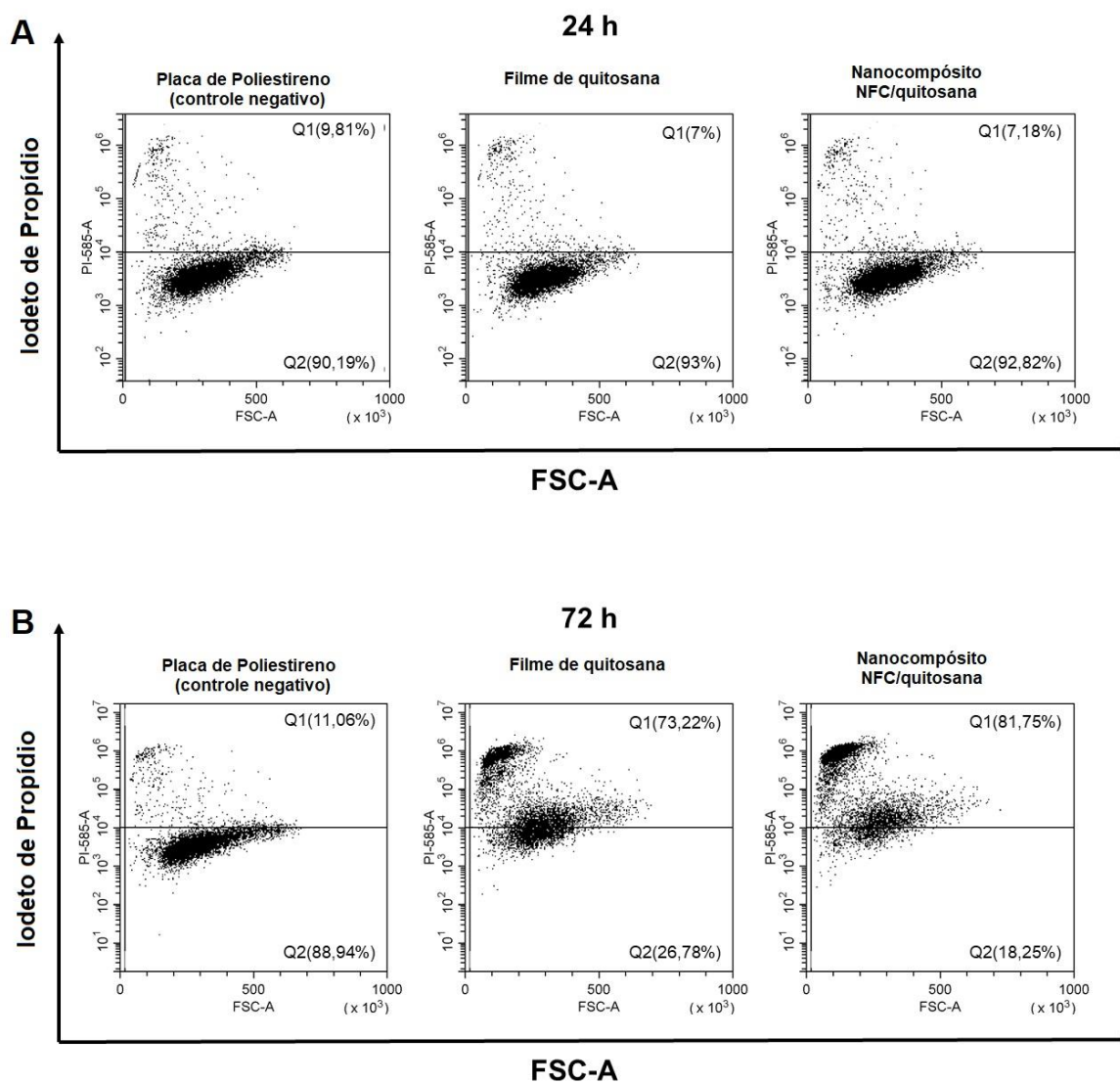


Figura 37 - Gráfico de dispersão por citometria de fluxo: iodeto de propídio (PI-585-A) versus dispersão direta (FSC-A) de células HEK293 após 24 e 72 h em filme de quitosana e em nanobiocompósito NFC/quitosana. Q1 mostra a porcentagem de células não viáveis coradas com iodeto de propídio. Foram analisados 10.000 eventos.

### 3.5 DISCUSSÃO

O objetivo deste capítulo foi investigar as características físico-químicas do nanobiocompósito NFC/quitosana e sua compatibilidade com células HEK293, uma vez que, os resultados do capítulo anterior (Capítulo 1) mostraram que as NFCs de algodão foram citocompatíveis. Além disso, a incorporação de NFCs na matriz polimérica de quitosana pode influenciar a rugosidade da superfície e a propriedade de intumescimento e degradação do nanobiocompósito, bem como a área de adesão e proliferação celular. Inicialmente, o nanobiocompósito de NFC/quitosana foi sintetizado e caracterizado. As membranas reticuladas foram preparadas em pH ácido (pH 5,4), o que leva à protonação do grupo amina da quitosana (SHENVI; ISMAIL; ISLOOR, 2014). A reticulação ocorre entre a porção amina protonada  $\text{NH}_3^+$  da quitosana e a porção  $\text{P-O}^-$  do grupamento fosfato (SURESHKUMAR et al., 2010). De acordo com a espectroscopia de FTIR, os diferentes espectros antes e após a reticulação utilizando o TPP, comprovam esse processo.

Para avaliar a capacidade de absorção de água do nanobiocompósito, a taxa de intumescimento foi analisada. A adição da NFC ao filme de quitosana diminuiu o intumescimento do nanobiocompósito. ZHOU; WU (2011) mostraram que a taxa de intumescimento é controlada pela capacidade hidrofílica dos grupos funcionais dos nanocompósitos. Possivelmente, a interação entre a NFC e a matriz de quitosana pode ter diminuído a disponibilidade dos grupos funcionais que interagem com a água, levando ao menor grau de intumescimento do nanobiocompósito. Além disso, a adição da NFC reduziu a taxa de degradação do nanobiocompósito apesar de, ainda assim, ser observada uma significativa perda de massa em 72 h. As NFC de algodão podem ser liberadas do nanobiocompósito, quando imerso em meio aquoso, uma vez que nanopartículas podem ser liberadas de *scaffolds* devido à taxa de degradação (XIA et al., 2018).

A análise de AFM revelou que o nanobiocompósito NFC/quitosana apresentou maior rugosidade em comparação com a superfície do filme de quitosana pura. A topografia da superfície de biomateriais poliméricos é importante para a adesão celular e espalhamento do citoesqueleto das células (WANG et al., 2016). Estudos anteriores relataram que o substrato de crescimento em nanoescala é fundamental para manter as células funcionais em cultura (DALBY; GADEGAARD;

OREFFO, 2014; MCMURRAY et al., 2011). GOREHAM et al. (2013) mostraram que as superfícies da nanotopografia favorecem a adesão celular de fibroblastos e osteoblastos humanos. No presente estudo, para investigar se a nanotopografia pode influenciar o crescimento celular das células HEK293, foi analisado o espalhamento da área celular. A partir da análise microscópica, é possível observar que as células apresentaram maior área de espalhamento celular quando cultivadas em filme quitosana e nanobiocompósito NFC/quitosana, quando comparadas com aquelas cultivadas na superfície da placa de poliestireno. Semelhante ao observado neste estudo, tem sido demonstrado que a topografia do nanobiocompósito influencia o espalhamento celular (CHEN et al., 2012, 2018; HU et al., 2017). As superfícies micro e nanotexturizadas podem favorecer interações diretas entre protruções celulares e a superfície do biomaterial. As células interagem com a matriz polimérica, resultando em diferentes graus de adesão e espalhamento (WANG et al., 2016). Da mesma forma, KIM et al. (2017) demonstraram que a nanotopografia afetou o formato da célula. Assim, é possível levantar a hipótese de que o nanobiocompósito NFC/quitosana possui pistas nanotopográficas que influenciam a morfologia celular.

A arquitetura do nanobiocompósito NFC/quitosana pode direcionar o comportamento das células HEK293, fornecendo uma superfície de topografia à qual as células respondem. As interações físicas entre o nanobiocompósito e a célula regulam a proliferação celular em materiais biocompatíveis. Para investigar a proliferação de células HEK293 cultivadas em nanobiocompósitos de NFC/quitosana, foi realizado o ensaio de MTT. Os testes de MTT se baseia no metabolismo mitocondrial e avalia especificamente a atividade das desidrogenases mitocondriais. Neste estudo, os resultados sugerem que a atividade da redutase mitocondrial nas células não diminuiu com a exposição ao filme de quitosana e ao nanobiocompósito NFC/quitosana após 24 ou 72 h. Resultados semelhantes também foram obtidos por SANDRI et al. (2017) e SANTOS et al. (2017). Assim, os resultados mostraram que os nanobiocompósitos não reduzem o metabolismo celular e a proliferação das células HEK293. Por outro lado, a viabilidade celular pode ser alterada pela exposição das células aos materiais. A análise por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídio foi utilizada para medir a porcentagem de células vivas após o cultivo no filme de quitosana e nanobiocompósito NFC/quitosana. O iodeto de propídio é um corante fluorescente que é excluído das células vivas com membranas intactas, enquanto penetra na membrana danificada e se liga aos ácidos nucléicos intercalando entre as

bases. No presente estudo, nenhum efeito citotóxico do filme de quitosana e do nanobiocompósito NFC/quitosana foi observado após 24 h de exposição. No entanto, em exposição prolongada, 72 h de cultura celular, o filme de quitosana e o nanobiocompósito de NFC/quitosana diminuíram a viabilidade celular. Curiosamente, os resultados do MTT não demonstraram declínio da atividade mitocondrial após 72 h. Estudos anteriores relataram que diferentes condições de estresse ambiental podem aumentar o metabolismo mitocondrial (KNUPP; ARVAN; CHANG, 2019). Sugere-se, então, que pode ter havido uma atividade mitocondrial compensatória em células estressadas após um longo período de tempo em contato com os materiais poliméricos.

A reticulação está diretamente relacionada com a concentração do TPP e a quantidade de quitosana (PAN et al., 2019), a concentração de TPP utilizada (0,1%) pode não ter sido suficiente para interagir com todas as aminas protonadas  $\text{NH}_3^+$  livres da quitosana. Foi relatado anteriormente que os grupos amina catiônicos de quitosana podem causar danos à membrana celular (FANGKANGWANWONG et al., 2016). Isso ocorre devido à interação eletrostática entre a carga positiva da quitosana com a carga negativa da proteína integrina (HSU et al., 2013). No presente estudo, a morte celular causada pelo filme de quitosana e nanobiocompósito NFC/quitosana após 72 h de cultivo foi, provavelmente, o resultado de uma interrupção da capacidade elétrica da membrana celular devido à exposição prolongada. Outro aspecto a ser considerado é que a morte celular foi mais pronunciada no nanobiocompósito NFC/quitosana em comparação ao filme de quitosana pura. Da mesma forma, trabalhos anteriores mostraram que a NFC pode causar toxicidade em células de mamíferos (ČOLIĆ et al., 2015; PEREIRA et al., 2013). As propriedades químicas e físicas exclusivas, como o tamanho pequeno, a forma e a alta reatividade dos NMs que permitem suas aplicações em diversas áreas também podem torná-los potencialmente tóxicos para alguns tipos celulares. Os principais mecanismos de citotoxicidade dos NMs são a indução do estresse oxidativo celular, danos à membrana celular, rompimento de organelas e alterações na expressão gênica (ČOLIĆ et al., 2015; JIANG et al., 2013; PEREIRA et al., 2013; YU et al., 2019). Além disso, a citotoxicidade dos NMs pode ocorrer de modo tempo dependente (GUPTA; XIE, 2018). Assim, no presente estudo, os resultados obtidos pela citometria de fluxo podem ser devidos à baixa concentração utilizada de TPP combinada à taxa de liberação da celulose em nanoescala da matriz de quitosana durante à exposição prolongada.

### 3.6 CONCLUSÃO

Os dados de caracterização mostraram que as NFCs aumentaram a nanotopografia e diminuíram as taxas de intumescimento e degradação do nanobiocompósito NFC/quitosana. Em experimentos de avaliação de bioatividade, o nanobiocompósito NFC/quitosana promoveu a proliferação celular e o aumento da área das células. Adicionalmente, os nanobiocompósitos foram citocompatíveis, exceto após 72 h de cultura. Portanto, a superfície do nanobiocompósito NFC/quitosana pode fornecer uma interface bioativa para promover o crescimento celular. Contudo, estudos adicionais são necessários para melhorar a citocompatibilidade por períodos prolongados de cultura *in vitro*.

### 3.7 REFERÊNCIAS

- Abral, H., Basri, A., Muhammad, F., Fernando, Y., Hafizulhaq, F., Mahardika, M., ... Stephane, I. (2019). A simple method for improving the properties of the sago starch films prepared by using ultrasonication treatment. *Food Hydrocolloids*, *93*, 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.02.012>
- Abràmoff, M. D., Magalhães, P. J., & Ram, S. J. (2005). Image processing with ImageJ Part II. *Biophotonics International*, *11*(7), 36–43. <https://doi.org/10.1117/1.3589100>
- Amaral, D. LAS, Zanette, R. S., Almeida, C. G., Almeida, L. B., Oliveira, L. F. de, Marcomini, R. F., ... Munk, M. (2019). In vitro evaluation of barium titanate nanoparticle/alginate 3D scaffold for osteogenic human stem cell differentiation. *Biomedical Materials*, *14*(035011), 0–22. Retrieved from <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1748-605X/ab0a52>
- Cao, L., Yuan, D., Xu, C., & Chen, Y. (2017). Biobased, self-healable, high strength rubber with tunicate cellulose nanocrystals. *Nanoscale*, *9*(40), 15696–15706. <https://doi.org/10.1039/c7nr05011a>
- Carvalho, C. R., López-Cebral, R., Silva-Correia, J., Silva, J. M., Mano, J. F., Silva, T. H., ... Oliveira, J. M. (2017). Investigation of cell adhesion in chitosan membranes for peripheral nerve regeneration. *Materials Science and Engineering C*, *71*, 1122–1134. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.100>
- Casariego, A., Souza, B. W. S., Cerqueira, M. A., Teixeira, J. A., Cruz, L., Díaz, R., & Vicente, A. A. (2009). Chitosan/clay films' properties as affected by biopolymer and clay micro/nanoparticles' concentrations. *Food Hydrocolloids*, *23*(7), 1895–1902. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.02.007>
- Chen, R. De, Huang, C. F., & Hsu, S. hui. (2019). Composites of waterborne polyurethane and cellulose nanofibers for 3D printing and bioapplications. *Carbohydrate Polymers*, *212*, 75–88. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.02.025>
- Chen, Weiqiang, Han, S., Qian, W., Weng, S., Yang, H., Sun, Y., ... Fu, J. (2018).

- Nanotopography regulates motor neuron differentiation of human pluripotent stem cells. *Nanoscale*, *10*(7), 3556–3565. <https://doi.org/10.1039/c7nr05430k>
- Chen, Weiqiang, Villa-Diaz, L. G., Sun, Y., Weng, S., Kim, J. K., Lam, R. H. W., ... Fu, J. (2012). Nanotopography influences adhesion, spreading, and self-renewal of Human embryonic stem cells. *ACS Nano*, *6*(5), 4094–4103. <https://doi.org/10.1021/nn3004923>
- Chen, Wenshuai, Abe, K., Uetani, K., Yu, H., Liu, Y., & Yano, H. (2014). Individual cotton cellulose nanofibers: Pretreatment and fibrillation technique. *Cellulose*, *21*(3), 1517–1528. <https://doi.org/10.1007/s10570-014-0172-z>
- 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>
- Czech Republic. (2019). Gwyddion software user guide, version 2.28 [Internet]. Retrieved July 12, 2019, from <http://gwyddion.net/> [40] Kouser R, Vashist A, Zafaryab M, et al. Biocompatible and mechanically robust%0Ananocomposite hydrogels for potential applications in tissue engineering. *Mater Sci Eng%0AC Mater Biol Appl*. 2018;*84*:168-179.%0A[41] Rhee S, Jiang
- Dalby, M. J., Gadegaard, N., & Oreffo, R. O. C. (2014). Harnessing nanotopography and integrin-matrix interactions to influence stem cell fate. *Nature Materials*, *13*(6), 558–569. <https://doi.org/10.1038/nmat3980>
- De France, K. J., Babi, M., Vapaavuori, J., Hoare, T., Moran-Mirabal, J., & Cranston, E. D. (2019). 2.5D Hierarchical Structuring of Nanocomposite Hydrogel Films Containing Cellulose Nanocrystals. *ACS Applied Materials and Interfaces*, *11*, 6325–6335. research-article. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b16232>
- Dufresne, A. (2017). Cellulose nanomaterial reinforced polymer nanocomposites. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, *29*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2017.01.004>
- Fangkangwanwong, J., Sae-Liang, N., Sriworarat, C., Sereemasapun, A., & Chirachanchai, S. (2016). Water-Based Chitosan for Thymine Conjugation:



- A Simple, Efficient, Effective, and Green Pathway to Introduce Cell Compatible Nucleic Acid Recognition. *Bioconjugate Chemistry*, 27(10), 2301–2306. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00251>
- Friend, D. F. L., Leyva González, M. E., Caraballo, M. M., & de Queiroz, A. A. A. (2019). Biological properties of electrospun cellulose scaffolds from biomass. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 0(0), 1–16. <https://doi.org/10.1080/09205063.2019.1636351>
- Gong, X., Wang, Y., & Chen, L. (2017). Enhanced emulsifying properties of wood-based cellulose nanocrystals as Pickering emulsion stabilizer. *Carbohydrate Polymers*, 169, 295–303. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.024>
- Goreham, R. V., Mierczynska, A., Smith, L. E., Sedev, R., & Vasilev, K. (2013). Small surface nanotopography encourages fibroblast and osteoblast cell adhesion. *RSC Advances*, 3(26), 10309–10317. <https://doi.org/10.1039/c3ra23193c>
- Guo, W., Tan, C., Shi, K., Li, J., Wang, X. X., Sun, B., ... Jiang, P. (2018). Wireless piezoelectric devices based on electrospun PVDF/BaTiO<sub>3</sub> NW nanocomposite fibers for human motion monitoring. *Nanoscale*, 10(37), 17751–17760. <https://doi.org/10.1039/c8nr05292a>
- Gupta, R., & Xie, H. (2018). Nanoparticles in Daily Life: Applications, Toxicity and Regulations. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 37(3), 209–230. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Halimatul, M. J., Sapuan, S. M., Jawaid, M., Ishak, M. R., & Ilyas, R. A. (2019). Effect of sago starch and plasticizer content on the properties of thermoplastic films: Mechanical testing and cyclic soaking-drying. *Polimery/Polymers*, 64(6), 422–431. <https://doi.org/10.14314/polimery.2019.6.5>
- Hsu, L. W., Ho, Y. C., Chuang, E. Y., Chen, C. T., Juang, J. H., Su, F. Y., ... Sung, H. W. (2013). Effects of pH on molecular mechanisms of chitosan-integrin interactions and resulting tight-junction disruptions. *Biomaterials*, 34(3), 784–793. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.09.082>
- Hu, D., Li, K., Xie, Y., Pan, H., Zhao, J., Huang, L., & Zheng, X. (2017). The combined effects of nanotopography and Sr ion for enhanced osteogenic activity of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). *Journal of*

- Biomaterials Applications*, 31(8), 1135–1147.  
<https://doi.org/10.1177/0885328217692140>
- Ilyas, R. A., Sapuan, S. M., & Ishak, M. R. (2018). Isolation and characterization of nanocrystalline cellulose from sugar palm fibres (Arenga Pinnata). *Carbohydrate Polymers*, 181, 1038–1051.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.11.045>
- Ilyas, R. A., Sapuan, S. M., Ishak, M. R., & Zainudin, E. S. (2018a). Development and characterization of sugar palm nanocrystalline cellulose reinforced sugar palm starch bionanocomposites. *Carbohydrate Polymers*, 202, 186–202.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.09.002>
- Ilyas, R. A., Sapuan, S. M., Ishak, M. R., & Zainudin, E. S. (2018b). Sugar palm nanocrystalline cellulose reinforced sugar palm starch composite: Degradation and water-barrier properties. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 368(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/368/1/012006>
- Ilyas, R. A., Sapuan, S. M., Ishak, M. R., & Zainudin, E. S. (2019). Sugar palm nanofibrillated cellulose (Arenga pinnata (Wurmb.) Merr): Effect of cycles on their yield, physic-chemical, morphological and thermal behavior. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 379–388.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.124>
- Ilyas, Rushdan Ahmad, Sapuan, S. M., Ibrahim, R., Abral, H., Ishak, M. R., Zainudin, E. S., ... Jumaidin, R. (2019). Sugar palm (Arenga pinnata (Wurmb.) Merr) cellulosic fibre hierarchy: A comprehensive approach from macro to nano scale. *Journal of Materials Research and Technology*, 8(3), 2753–2766. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2019.04.011>
- Ilyas, Rushdan Ahmad, Sapuan, S. M., Ishak, M. R., & Zainudin, E. S. (2018). Water transport properties of bio-nanocomposites reinforced by sugar palm (arenga pinnata) nanofibrillated cellulose. *Journal of Advanced Research in Fluid Mechanics and Thermal Sciences*, 51(2), 234–246.
- Jia, Y., Wang, X., Huo, M., Zhai, X., Li, F., & Zhong, C. (2017). Preparation and characterization of a novel bacterial cellulose/chitosan bio-hydrogel. *Nanomaterials and Nanotechnology*, 7, 1–8.  
<https://doi.org/10.1177/1847980417707172>

- Jiang, Y., Zhang, H., Wang, Y., Chen, M., Ye, S., Hou, Z., & Ren, L. (2013). Modulation of Apoptotic Pathways of Macrophages by Surface-Functionalized Multi-Walled Carbon Nanotubes. *PLoS ONE*, *8*(6), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065756>
- Kanimozhi, K., Khaleel Basha, S., Sugantha Kumari, V., Kaviyarasu, K., & Maaza, M. (2018). In vitro cytocompatibility of chitosan/PVA/methylcellulose – Nanocellulose nanocomposites scaffolds using L929 fibroblast cells. *Applied Surface Science*, *449*, 574–583. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.11.197>
- Kim, J., Bae, W. G., Kim, Y. J., Seonwoo, H., Choung, H. W., Jang, K. J., ... Chung, J. H. (2017). Directional Matrix Nanotopography with Varied Sizes for Engineering Wound Healing. *Advanced Healthcare Materials*, *6*(19), 1–10. <https://doi.org/10.1002/adhm.201700297>
- Knupp, J., Arvan, P., & Chang, A. (2019). Increased mitochondrial respiration promotes survival from endoplasmic reticulum stress. *Cell Death and Differentiation*, *26*(3), 487–501. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0133-4>
- Kouser, R., Vashist, A., Zafaryab, M., Rizvi, M. A., & Ahmad, S. (2018). Biocompatible and mechanically robust nanocomposite hydrogels for potential applications in tissue engineering. *Materials Science and Engineering C*, *84*, 168–179. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.11.018>
- Lalwani, G., Gopalan, A., D'Agati, M., Srinivas Sankaran, J., Judex, S., Qin, Y. X., & Sitharaman, B. (2015). Porous three-dimensional carbon nanotube scaffolds for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, *103*(10), 3212–3225. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35449>
- Li, C., Shu, S., Chen, R., Chen, B., & Dong, W. (2013). Functionalization of electrospun nanofibers of natural cotton cellulose by cerium dioxide nanoparticles for ultraviolet protection. *Journal of Applied Polymer Science*, *130*(3), 1524–1529. <https://doi.org/10.1002/app.39264>
- Liu, Y., Shen, X., Zhou, H., Wang, Y., & Deng, L. (2016). Chemical modification of chitosan film via surface grafting of citric acid molecular to promote the biomineralization. *Applied Surface Science*, *370*, 270–278. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.02.124>
- Marudova, M., & Yorov, T. (2019). Chitosan/poly(lactic acid) blends as drug

- delivery systems. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 68(1–3), 99–106.  
<https://doi.org/10.1080/00914037.2018.1525728>
- McMurray, R. J., Gadegaard, N., Tsimbouri, P. M., Burgess, K. V., McNamara, L. E., Tare, R., ... Dalby, M. J. (2011). Nanoscale surfaces for the long-term maintenance of mesenchymal stem cell phenotype and multipotency. *Nature Materials*, 10(8), 637–644. <https://doi.org/10.1038/nmat3058>
- Mi, H. Y., Jing, X., Salick, M. R., Cordie, T. M., & Turng, L. S. (2016). Carbon nanotube (CNT) and nanofibrillated cellulose (NFC) reinforcement effect on thermoplastic polyurethane (TPU) scaffolds fabricated via phase separation using dimethyl sulfoxide (DMSO) as solvent. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 62, 417–427.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2016.05.026>
- OECD/FAO. (2016). OECD-FAO Agricultural Outlook 2016-2025.  
[https://doi.org/10.1787/agr\\_outlook-2016-en](https://doi.org/10.1787/agr_outlook-2016-en)
- Palem, R. R., Saha, N., Shimoga, G. D., Kronekova, Z., Sláviková, M., & Saha, P. (2018). Chitosan–silver nanocomposites: New functional biomaterial for health-care applications. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 67(1), 1–10.  
<https://doi.org/10.1080/00914037.2017.1291516>
- Pan, C., Qian, J., Fan, J., Guo, H., Gou, L., Yang, H., & Liang, C. (2019). Preparation nanoparticle by ionic cross-linked emulsified chitosan and its antibacterial activity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 568(February), 362–370.  
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.02.039>
- Pereira, M. M., Raposo, N. R. B., Brayner, R., Teixeira, E. M., Oliveira, V., Quintão, C. C. R., ... Brandão, H. M. (2013). Cytotoxicity and expression of genes involved in the cellular stress response and apoptosis in mammalian fibroblast exposed to cotton cellulose nanofibers. *Nanotechnology*, 24(7).  
<https://doi.org/10.1088/0957-4484/24/7/075103>
- Pooyan, P., Kim, I. T., Jacob, K. I., Tannenbaum, R., & Garmestani, H. (2013). Design of a cellulose-based nanocomposite as a potential polymeric scaffold in tissue engineering. *Polymer (United Kingdom)*, 54(8), 2105–2114.

- <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2013.01.030>
- Rhee, S., Jiang, H., Ho, C. H., & Grinnell, F. (2007). Microtubule function in fibroblast spreading is modulated according to the tension state of cell-matrix interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(13), 5425–5430. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608030104>
- Rodríguez-Vázquez, M., Vega-Ruiz, B., Ramos-Zúñiga, R., Saldaña-Koppel, D. A., & Quiñones-Olvera, L. F. (2015). Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine. *BioMed Research International*, *2015*, 821279. <https://doi.org/10.1155/2015/821279>
- Sandri, G., Aguzzi, C., Rossi, S., Bonferoni, M. C., Bruni, G., Boselli, C., ... Ferrari, F. (2017). Halloysite and chitosan oligosaccharide nanocomposite for wound healing. *Acta Biomaterialia*, *57*, 216–224. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.05.032>
- Santos, T. C. dos, Rescignano, N., Boff, L., Reginatto, F. H., Simões, C. M. O., de Campos, A. M., & Mijangos, C. U. (2017). Manufacture and characterization of chitosan/PLGA nanoparticles nanocomposite buccal films. *Carbohydrate Polymers*, *173*, 638–644. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.06.014>
- Sanyang, M. L., Ilyas, R. A., Sapuan, S. M., & Jumaidin, R. (2017). Sugar palm starch-based composites for packaging applications. *Bionanocomposites for Packaging Applications*, 125–147. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-67319-6\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-67319-6_7)
- Shenvi, S., Ismail, A. F., & Isloor, A. M. (2014). Preparation and characterization study of PPEES/chitosan composite membrane crosslinked with tripolyphosphate. *Desalination*, *344*, 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2014.02.026>
- Shi, L., Wang, K., & Yang, Y. (2016). Adhesion-based tumor cell capture using nanotopography. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *147*, 291–299. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.08.008>
- Song, L., Li, Y., Xiong, Z., Pan, L., Luo, Q., Xu, X., & Lu, S. (2018). Water-Induced shape memory effect of nanocellulose papers from sisal cellulose nanofibers with graphene oxide. *Carbohydrate Polymers*, *179*(March 2017), 110–117.

- <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.09.078>
- Sureshkumar, M. K., Das, D., Mallia, M. B., & Gupta, P. C. (2010). Adsorption of uranium from aqueous solution using chitosan-tripolyphosphate (CTPP) beads. *Journal of Hazardous Materials*, 184(1–3), 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.07.119>
- Tibolla, H., Pelissari, F. M., Rodrigues, M. I., & Menegalli, F. C. (2017). Cellulose nanofibers produced from banana peel by enzymatic treatment: Study of process conditions. *Industrial Crops and Products*, 95, 664–674. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.11.035>
- Wang, J., Liu, X., Jin, T., He, H., & Liu, L. (2019). Preparation of nanocellulose and its potential in reinforced composites: A review. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 30(11), 919–946. <https://doi.org/10.1080/09205063.2019.1612726>
- Wang, X., Hu, X., Dulinska-Molak, I., Kawazoe, N., Yang, Y., & Chen, G. (2016). Discriminating the Independent Influence of Cell Adhesion and Spreading Area on Stem Cell Fate Determination Using Micropatterned Surfaces. *Scientific Reports*, 6(March), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep28708>
- Xia, Y., Chen, H., Zhang, F., Bao, C., Weir, M. D., Reynolds, M. A., ... Xu, H. H. K. (2018). Gold nanoparticles in injectable calcium phosphate cement enhance osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 14(1), 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.08.014>
- Youssef, A. M., Abou-Yousef, H., El-Sayed, S. M., & Kamel, S. (2015). Mechanical and antibacterial properties of novel high performance chitosan/nanocomposite films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 76, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.02.016>
- Yu, S. H., Wu, S. J., Wu, J. Y., Peng, C. K., & Mi, F. L. (2013). Tripolyphosphate cross-linked macromolecular composites for the growth of shape- and size-controlled apatites. *Molecules*, 18(1), 27–40. <https://doi.org/10.3390/molecules18010027>
- Yu, Z., Wang, W., Dhital, R., Kong, F., Lin, M., & Mustapha, A. (2019). Antimicrobial effect and toxicity of cellulose nanofibril/silver nanoparticle nanocomposites prepared by an ultraviolet irradiation method. *Colloids and*

*Surfaces B: Biointerfaces*, 180(March), 212–220.

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.04.054>

Zhou, C., & Wu, Q. (2011). A novel polyacrylamide nanocomposite hydrogel reinforced with natural chitosan nanofibers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*,

84(1), 155–162.

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.12.030>

## 4 CAPÍTULO 3: ANÁLISE DE CITOCOMPATIBILIDADE E BIOATIVIDADE DE NANOBIOCOMPÓSITOS CONTENDO NFCs DE ALGODÃO NO CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

### 4.1 INTRODUÇÃO

Até 2020, o mercado global de tecnologias de dispositivos biomédicos deve atingir US\$ 428,97 bilhões (MARKETSANDMARKETS, 2019). Os biomateriais utilizados em regeneração óssea devem combinar materiais bioativos e bioabsorvíveis, que imitam a função natural do osso e ativam mecanismos *in vivo* de regeneração tecidual (VENKATESAN; KIM, 2010). Neste cenário, os materiais compósitos de polímeros naturais estão se tornando cada vez mais importantes como suportes de crescimento celular para a engenharia de tecido ósseo.

Os materiais compósitos baseados em combinações de polímeros biodegradáveis são ditos como adequados para a produção de matrizes para crescimento celular na engenharia de tecidos. Esses compósitos exibem propriedades físicas, biológicas e mecânicas próximas ao tecido que se deseja construir ou reparar, bem como um comportamento de degradação previsível. A seleção apropriada de um biomaterial específico para uma dada aplicação requer uma compreensão detalhada das células e/ou da resposta do tecido alvo (VENKATESAN; KIM, 2010).

Os polímeros nanobiocompósitos podem servir como MEC biomiméticas para adesão e crescimento celular para cultura de células humanas. MEC naturais, construídas a partir de diversas macromoléculas biológicas com nanômetros de tamanho, como colágeno e glicosaminoglicanos, geralmente exibem a topografia em nanoescala (YANG et al., 2017).

A celulose bulk (originalmente maior) ou nanoestruturada tem atraído a atenção como um potencial material para reforçar compósitos de matriz polimérica (WANG et al., 2019). Kim et al (2018) mostraram que a acetato de celulose associado a  $\alpha$ -tricalcio fosfato pode ser usada na engenharia de tecidos



como um componente da MEC uma vez que osteoblastos imaturos de calvária de ratos proliferaram de forma homogênea por 3 semanas e se diferenciaram em meio indutor contendo  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  de ácido ascórbico e 10 mM de glicerofosfato (KIM et al., 2018). Adicionalmente, Rashad et al. (2018) mostraram que a NFC obtidas à partir de polpa de madeira além de promover a proliferação e a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea humana, também melhorou significativamente as propriedades hidrofílicas e a rugosidade da matriz e promoveu a adsorção de proteínas (RASHAD et al., 2018).

A NFC possui propriedades semelhantes às do colágeno, como direcionalidade, que podem ser importantes para a adesão, disseminação e proliferação celular (POOYAN et al., 2013). Esse NM possui estrutura similar aos glicosaminoglicanos que é o componente mais abundante da MEC (ABARRATEGI et al., 2010) e superfície hidrofílica, o que promove a adesão, proliferação e diferenciação celular (FRANCIS SUH; MATTHEW, 2000). Além disso, a modificação na superfície de materiais poliméricos com NFC pode melhorar as propriedades mecânicas do nanobiocompósito (ILYAS et al., 2018a, 2018b; SANYANG et al., 2017), fator importante para a engenharia de tecido ósseo.

Até o momento, não há informações sobre o crescimento e a indução da diferenciação óssea *in vitro* de células-tronco mesenquimais humanas em nanobiocompósitos à base de celulose de algodão.

## **4.2 OBJETIVOS**

### **4.2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a capacidade do nanobiocompósito de NFC/quitosana de promover a proliferação e diferenciação osteogênica das células-tronco mesenquimais humanas derivadas da polpa dentária humana de dentes decíduos esfoliados.

### **4.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analisar as propriedades físico-químicas do nanobiocompósito de NFC/quitosana.
- Avaliar a capacidade do nanobiocompósito de NFC/quitosana promover a proliferação das células-tronco mesenquimais humanas.
- Investigar a capacidade do nanobiocompósito de NFC/quitosana de promover a diferenciação osteogênica das células-tronco mesenquimais humanas.

## 4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Na Figura 38 abaixo é apresentado um esquema do experimento 3 deste projeto.

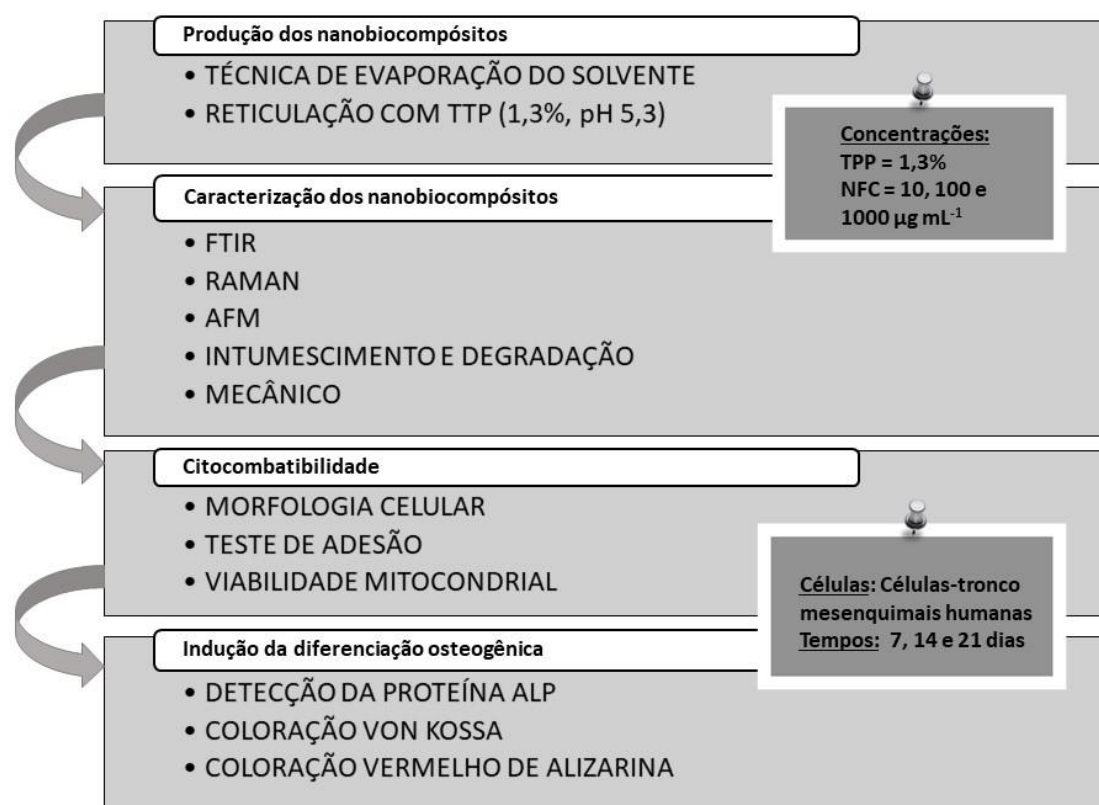


Figura 38 – Representação esquemática da metodologia realizada no Capítulo 3

### 4.3.1 PREPARAÇÃO DOS FILMES DE QUITOSANA E NANOBIOCOMPÓSITOS NFC/QUITOSANA

O filme de quitosana (QT) (Peso molecular: baixo, grau de desacetilação: 75-85% - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e o nanobiocompósito de NFC/quitosana foram preparados pela técnica de evaporação do solvente (Figura 39). A solução de quitosana (1% p/v) foi preparada dissolvendo a quitosana em solução diluída em água

destilada de ácido acético (1% v/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), sob constante agitação magnética. Após 24h, o nanobiocompósito de NFC/quitosana foi preparado dispersando a NFC em três concentrações diferentes (10, 100 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) na solução de quitosana. A solução de quitosana e as suspensões NFC/quitosana foram transferidas para as placas de polipropileno e mantidas em estufa (Fanem, Guarulhos, SP, Brasil) por 24 h a 37° C para a evaporação do solvente.

Os filmes secos não reticulados de quitosana obtidos e o nanobiocompósito de NFC/quitosana foram imersos em solução de hidróxido de sódio (NaOH) (Dinâmica Química Contemporânea Ltda, Diadema, Brasil) 1M por 1 h e lavados com água destilada. Posteriormente, foram reticulados pela técnica de gelificação iônica em solução de 1,3% (p/v) de tripolifosfato de sódio (TPP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) aquoso (pH 5,3), durante 2 h, em temperatura ambiente e lavados 2 vezes em água destilada. Posteriormente, o pH dos filmes e dos nanobiocompósitos foram neutralizados com solução de NaOH 1M por 30 min e lavados 2 vezes em água destilada. Em seguida foram secos novamente em estufa por 24 h a 37° C.

Os filmes de quitosana e os nanobiocompósitos de NFC/quitosana foram esterilizados em luz ultravioleta (UV) durante 40 min para a realização dos ensaios com cultivo celular.



Figura 39 - Esquema da preparação do filme de quitosana e dos nanobiocompósitos de nanofibras de celulose/quitosana contendo 10,100 ou 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de NFC pela técnica de evaporação de solvente.

## **4.3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOBIOCOMPÓSITOS CONTENDO NFCs DE ALGODÃO E QUITOSANA**

### **4.3.2.1 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)**

Os espectros de infravermelho com transformação de Fourier foram obtidos com um espectrômetro ALPHA FTIR Bruker na região do número de onda de 3500 a 500  $\text{cm}^{-1}$  no modo ATR-IR. O método de reflexão total atenuada foi aplicado para as medidas com uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e 128 varreduras.

### **4.3.2.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN**

As medições de Raman foram realizadas com um espectrômetro Bruker RFS 100 excitado com um laser  $\text{Nd}^{3+}$  / YAG operando a 1064 nm, equipado com um detector InGaAs resfriado com nitrogênio líquido. Os espectros foram adquiridos na resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Uma média de 1024 varreduras foram coletadas com uma potência de 80 mW.

### **4.3.2.3 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)**

As imagens AFM foram gravadas no modo de toque em um Nanosurf easyScan 2 (Nanosurf Instruments) no ar. As amplitudes de oscilação livre do cantilever eram tipicamente de 80 a 100 mV e o tamanho de varredura da sonda de microscópio era de 5x5  $\mu\text{m}$  e 10x10  $\mu\text{m}$ . A resolução do AFM era de 512x512 pixels. O comprimento e o raio da ponta foram 225  $\mu\text{m}$  e <10 nm, respectivamente.

#### 4.3.2.4 COMPORTAMENTO DE INTUMESCÊNCIA DOS NANOBIOCOMPÓSITOS NFC/ QUITOSANA

Para determinar a razão de intumescimento *in vitro*, inicialmente foi medida a massa do filme de quitosana e das amostras dos nanobiocompósitos de NFC/quitosana contendo 10, 100 ou 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de NFC (6 cm de diâmetro por 1 mm de altura; n = 3) secos. Em seguida, o filme de quitosana e os nanobiocompósitos foram imersos em 10 mL de PBS (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil) 1x (pH 7,4) e mantidos à temperatura ambiente ( $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Após intervalos regulares de tempo, as massas dos filmes de quitosana e dos nanobiocompósitos úmidos foram determinadas usando uma balança eletrônica (Mettler Toledo AB204-S, Ohio, EUA). O experimento foi realizado até o momento em que não foi observado maior inchaço do filme de quitosana e dos nanobiocompósitos de NFC/quitosana. O grau da razão de intumescimento do filme de quitosana e nanobiocompósito NFC/quitosana foi calculado usando a seguinte equação:

$$\text{Intumescimento (\%)} = \frac{W_2 - W_1}{W_1} \times 100$$

Na qual,  $W_1$  é a massa da amostra inicial (seca); e  $W_2$ , a massa da amostra após imersão (inchadas).

#### 4.3.2.5 COMPORTAMENTO DE DEGRADAÇÃO DO NANOBIOCOMPÓSITO NFC/ QUITOSANA

Para determinar a taxa de degradação *in vitro*, inicialmente foi medida a massa do filme de quitosana e das amostras de nanobiocompósitos de NFC/quitosana contendo 10, 100 ou 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de NFC (6 cm de diâmetro por 1 mm de altura; n = 3) secos usando uma balança eletrônica (Mettler Toledo AB204-S, Ohio, EUA). Em seguida, o filme de quitosana e os nanobiocompósitos foram imersos em 10 mL de

PBS 1x (pH 7,4) por 24 e 72 h. Após esses tempos, as amostras foram secas em estufa por 24h a 37° C e, então, foram determinadas as massas dos filmes de quitosana e dos nanobiocompósitos secos. A taxa de degradação do filme de quitosana e dos nanobiocompósitos NFC/quitosana (10, 100 e 1000 µg mL<sup>-1</sup> de NFC) foi calculada usando a seguinte equação:

$$\text{Taxa de degradação (\%)} = \frac{W_1 - W_3}{W_1} \times 100$$

Na qual,  $W_1$  é a massa da amostra inicial (seca); e  $W_3$ , a massa da amostra seca após imersão.

#### **4.3.2.6 PROPRIEDADES MECÂNICAS DOS NANOBIOCOMPÓSITOS NFC/QUITOSANA**

As análises das propriedades mecânicas foram realizadas na Embrapa Instrumentação, São Carlos, SP de acordo com a norma ASTM D 882-98. O módulo elástico e a resistência à tração foram determinados usando um texturômetro TA.XT Plus (Stable Micro System, Reino Unido). As dimensões das amostras eram de 40 x 5 mm, as amostras foram colocadas entre grampos de cabelo pneumáticos, com a distância entre os cliques ajustados para 20 mm, e a velocidade de tração foi ajustada para 0,8 mm/s. Os testes foram realizados a 25° C. Pelo menos cinco medições foram realizadas para cada amostra.

### 4.3.3 AVALIAÇÃO DE CITOCOMPATIBILIDADE DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS NOS NANOBIOCOMPÓSITOS NFC/QUITOSANA

#### 4.3.3.1 CULTURA CELULAR *IN VITRO*

As células-tronco mesenquimais utilizadas foram isoladas a partir da polpa dentária humana de dentes decíduos esfoliados e obtidas do Biobanco Genética Humana e Terapia Celular (GENETEC) do Laboratório de Genética, Departamento de Biologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP 022/2015). As células foram previamente caracterizadas (FERREIRA et al., 2019; ZANETTE, 2016) e cultivadas *in vitro* com meio de cultivo celular contendo meio DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) acrescido de antibióticos contendo penicilina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) 100 U mL<sup>-1</sup>, estreptomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) 100 mg mL<sup>-1</sup> e SFB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a 10% (v/v). As células foram incubadas em estufa (Modelo 4130, Thermo Fisher, EUA) em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C. O meio de cultivo foi trocado a cada três dias.

Para a realização dos experimentos de citocompatibilidade, as células-tronco mesenquimais humanas foram cultivadas sobre o filme de quitosana e sob os nanobiocompósitos de NFC/quitosana contendo 10, 100 e 1000 µg mL<sup>-1</sup> de NFC, durante 21 dias, utilizando o meio de cultura basal contendo DMEM, suplementado com 10% (v/v) SFB, 100 U mL<sup>-1</sup> de penicilina, 100 µg mL<sup>-1</sup> de estreptomicina; ou o meio indutor osteogênico (RIBEIRO et al., 2017) contendo DMEM, 10<sup>-7</sup> M dexametasona (Calbichem, San Diego, CA), 50 µM 2-fosfato ácido ascórbico (Merck, Darmstadt, Alemanha), 2 mM β-glicerolfosfato (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e suplementado com 10% (v/v) SFB, 100 U mL<sup>-1</sup> de penicilina, 100 µg mL<sup>-1</sup> de estreptomicina. Os meios de cultivo foram trocados a cada três dias.



#### 4.3.3.2 MORFOLOGIA CELULAR

Para avaliar a morfologia celular, o filme de quitosana e os nanobiocompósitos NFC/quitosana (10, 100 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) foram preparados apenas no centro de cada poço da placa de 6 poços, e, então, as células foram cultivadas nos poços em contato com ambos (a placa de poliestireno e o filme de quitosana ou nanobiocompósito NFC/quitosana) com meio de cultura basal.

A morfologia celular foi observada após 24h de exposição sob um microscópio de luz invertido (Primovert, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) com aumento de 100x e as imagens foram geradas de pelo menos 6 campos aleatórios na câmara aclopada (AxioCam ERc 5s) usando o software Zen 2.3 lite (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

#### 4.3.3.3 ADESÃO CELULAR

As células foram plaqueadas em placas de 24 poços,  $3 \times 10^4$  células por poço ( $n=3$  para cada tratamento), com meio de cultura basal, em contato direto em monocamada com o filme de quitosana, com os nanobiocompósitos de NFC/quitosana e com a placa de poliestireno (controle negativo). Após 3, 6 e 24 h o meio de cultura foi totalmente retirado e centrifugado por 3 min a  $2000 \times g$  e o *pellet* ressuscitado em 50  $\mu\text{l}$  de PBS 1x. O número total de eventos (células não aderentes) de cada amostra foi contabilizado utilizando um citômetro de fluxo (CytoFLEX S, Beckman Coulter). A porcentagem das células aderentes ( $C_a$ ) foi obtida a partir do número total de células não aderidas ( $C_{na}$ ) subtraídas do número total de células plaqueadas ( $C_p$ ).

$$C_a (\%) = \frac{(C_p - C_{na})}{C_p} * 100$$

#### **4.3.3.4 ENSAIO DE VIABILIDADE MITOCONDRIAL**

O ensaio de MTT (brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, foram cultivadas  $5 \times 10^3$  células por poço (n=9 para cada tratamento) em contato direto com o filme de quitosana e os nanobiocompósitos de NFC/quitosana com 200  $\mu$ l de meio de cultivo em placa de 96 poços, por 24 h para aderência das células. Após esse tempo, os meios de cultivo basal ou indutor foram adicionados em cada poço e incubadas durante 21 dias. Nos dias 7, 14 e 21, o meio foi removido e as células foram incubadas com 5 mg mL<sup>-1</sup> de MTT em condições normais de cultura por 4 h e, então foi feita a lise celular com solução de ácido clorídrico a 0,4 M em isopropanol (200  $\mu$ l por poço). A absorbância foi registrada a 570 nm utilizando um espectrofotômetro (Varioskan Flash Multimode Reader, Thermo Fisher Scientific, EUA). Dois experimentos independentes em triplicata cada foram realizados.

#### **4.3.4 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA**

##### **4.3.4.1 ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA (ALP) INTRACELULAR**

A atividade da Fosfatase Alcalina (ALP) foi avaliada usando o kit BCIP/NBT (Fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolil/Tetrazólio azul nitro) (Invitrogen, EUA - N6547). Resumidamente,  $5 \times 10^4$  células (n=3) foram plaqueadas em placas de 24 poços em contato direto com o filme de quitosana e os nanobiocompósitos NFC/quitosana com meio de cultura basal e meio indutor osteogênico, como descrito anteriormente, durante 21 dias.

Para quantificar a atividade da ALP intracelular, o sobrenadante de cada poço foi removido e a camada celular foi lavada duas vezes com PBS 1x. Em seguida, 100  $\mu$ l de solução BCIP/NBT, preparada de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante, foram adicionados a cada poço. Após 2 h de incubação, as células foram

observadas por microscopia de luz. Os precipitados roxos insolúveis foram solubilizados com 300 µl de SDS (dodecilsulfato de sódio) a 10% (p/v) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) 10% (p/v) e incubados por 18 h. As medições da densidade óptica foram realizadas em espectrofotômetro a 595 nm (SpectraMax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

#### **4.3.4.2 TÉCNICA DE COLORAÇÃO VON KOSSA**

Para identificar se as células-tronco mesenquimais humanas produziram nódulos mineralizados *in vitro* quando cultivadas sobre os nanobiocompósitos NFC/quitosana, foi realizada a coloração von Kossa (SHAHROUSVAND et al., 2017a). Para tanto, o meio de cultura foi removido e foi acrescentada em cada poço a solução de com paraformaldeído a 4% para fixação durante 15 min. A solução foi removida e as células foram lavadas com PBS 1x por 10 min adicionais. As células foram coradas com solução de nitrato de prata a 5% (p/v), com exposição à luz ultravioleta durante 60 min. As células foram novamente lavadas com PBS 1x por 10 min, e, então, imersas em solução de tiosulfato de sódio a 5% (p/v) por 3 min e os poços foram lavados com PBS 1x por 1 min. As imagens foram feitas utilizando um microscópio de luz invertido (Primovert, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) com câmera acoplada (AxioCam ERc 5s) usando o software Zen 2.3 lite (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

#### **4.3.4.3 TÉCNICA DE COLORAÇÃO VERMELHO DE ALIZARINA**

A deposição de cálcio foi avaliada por coloração com Vermelho de Alizarina S. Resumidamente, as células cultivadas sob o filme de quitosana e sob os nanobiocompósitos NFC/quitosana após 21 dias foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 1 h e coradas com solução a vermelho de alizarina a 2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) (pH 4,1) por 15 min em temperatura ambiente. Após a lavagem e secagem ao ar, as imagens foram tiradas com microscópio de luz invertido (Primovert,

Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) com câmera aclopada (Axiocam ERc 5s) usando o software Zen 2.3 lite (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

#### **4.3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Todos os dados representaram a média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) de pelo menos dois experimentos independentes. Os dados foram analisados pelo one-way ANOVA e as diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste de comparação múltipla de Tukey. Foi utilizado o programa GraphPad Prism 7.0. Diferenças foram consideradas significantes quando  $p < 0,05$ .

## 4.4 RESULTADOS

### 4.4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOBIOCOMPÓSITOS NFC/QUITOSANA

Foram analisados os espectros de Raman e Infravermelho dos nanobiocompósitos preparados com NFCs e quitosana, reticulados com tripolifosfato de sódio (TPP). No espectro de Raman (Figura 40) as bandas nas regiões de  $1462\text{ cm}^{-1}$  [ $\delta$  (CH) +  $\omega$  (CH<sub>2</sub>) +  $\delta$  (OH)],  $1383\text{ cm}^{-1}$  (CO) +  $\nu$  (CO) +  $\nu$  (CO) +  $\nu$  (CO) +  $\delta$  (CO) +  $\delta$  (CO) +  $\delta$  ( $\phi$ ) (CH) +  $\rho$  (CH<sub>2</sub>)] e  $899\text{ cm}^{-1}$  [ $\nu$  ( $\phi$ ) +  $\rho$  (CH<sub>2</sub>)] podem ser atribuídas a um modo vibracional comum dos polímeros orgânicos de quitosana e NFC (ZAJĄC et al., 2015). Também foi observada a banda  $798\text{ cm}^{-1}$  atribuída ao modo vibracional de P-O-P presente no TPP (Figura 40e). O deslocamento da banda, originalmente em  $755\text{ cm}^{-1}$  (Figura 40c), sugere a reticulação da TPP com a quitosana (BHUMKAR; POKHARKAR, 2006).

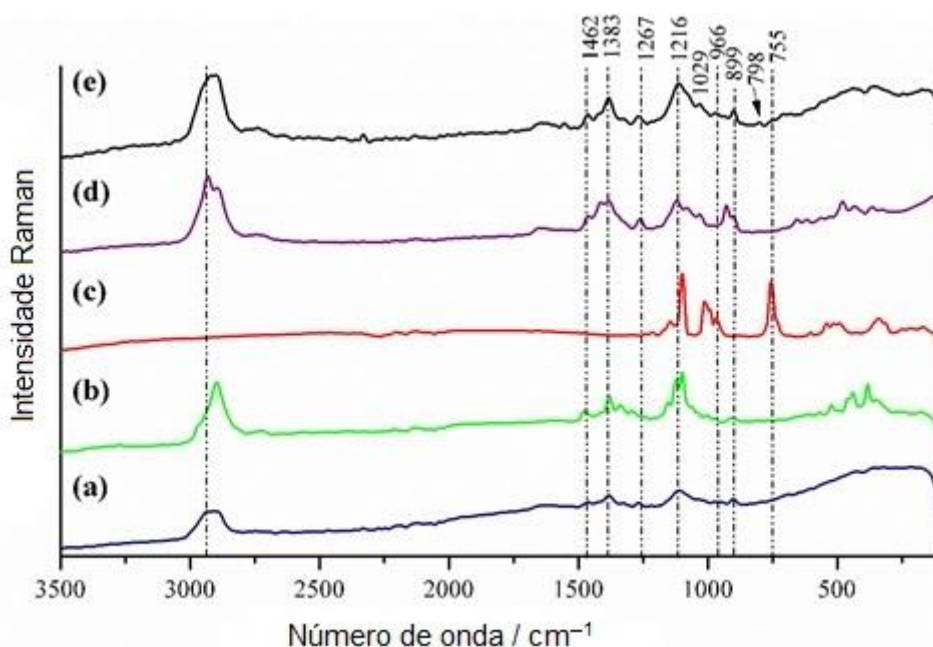
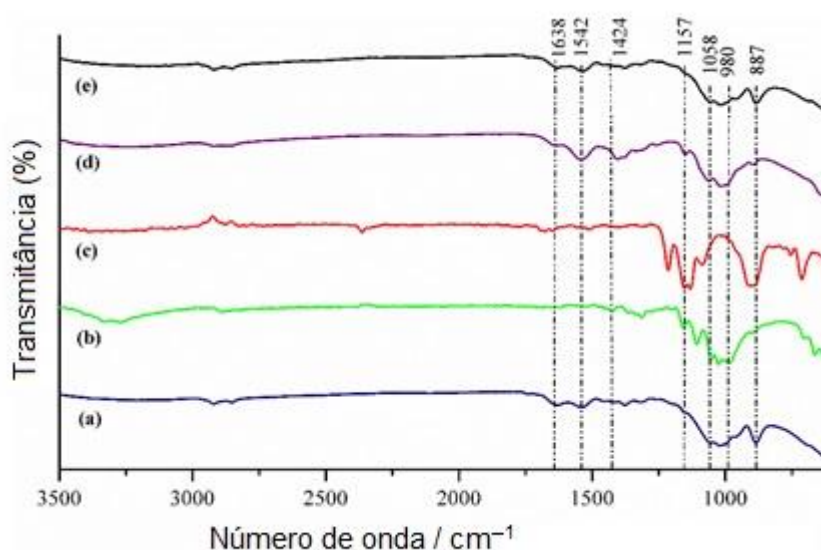


Figura 40 – Caracterização por espectroscopia Raman (a) quitosana, (b) NFC de algodão, (c) TPP, (d) Nanobiocompósito NFC/quitosana ( $100\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ), e (e) Nanobiocompósito NFC/quitosana ( $100\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ) reticulado com TPP.

O espectro de infravermelho das amostras é mostrado na Figura 41. As bandas de características de  $2929\text{ cm}^{-1}$  e  $1635\text{ cm}^{-1}$  podem ser atribuídas aos modos  $\nu(\text{CH})$  e amida  $\nu(\text{C}=\text{O})$  originalmente observadas no espectro de quitosana (SOUZA et al., 2015). A presença de uma faixa em torno de  $1108\text{ cm}^{-1}$ , característica dos éteres de celulose, indica a presença de ligações C-O-C (OLIVEIRA et al., 2015). O filme de quitosana reticulado com TPP (Figura 41e) mostrou uma banda  $1157\text{ cm}^{-1}$  representando a ligação P = O (KNAUL; HUDSON; CREBER, 1999; WANG et al., 2001; XU; DU, 2003).



**Figura 41 - Caracterização utilizando espectroscopia de FTIR (a) quitosana (b) NFC de algodão (c) TPP (d) Nanobiocompósito NFC/quitosana ( $100\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ), e (e) Nanobiocompósito NFC/quitosana ( $100\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ) reticulado com TPP.**

A análise espectral (Figura 42 e 43) mostrou que não há mudanças nos deslocamentos para os grupos químicos mais importantes nas três diferentes concentrações de NFC ( $10$ ,  $100$  e  $1000\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ), no entanto, podemos verificar uma sobreposição entre as bandas em várias regiões do espectro quando a concentração de NFC é de  $1000\ \mu\text{g mL}^{-1}$ .

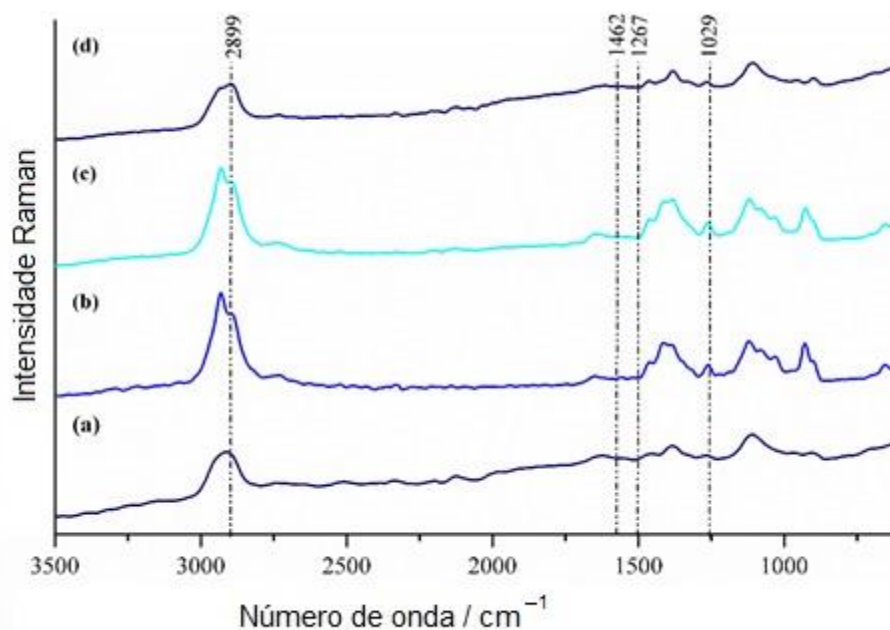


Figura 42 - Caracterização por espectroscopia Raman (a) Filme de quitosana, (b) Nanobiocompósito NFC/quitosana (10 µg mL<sup>-1</sup>), (c) Nanobiocompósito NFC/quitosana (100 µg mL<sup>-1</sup>), (d) Nanobiocompósito NFC/quitosana (1000 µg mL<sup>-1</sup>).

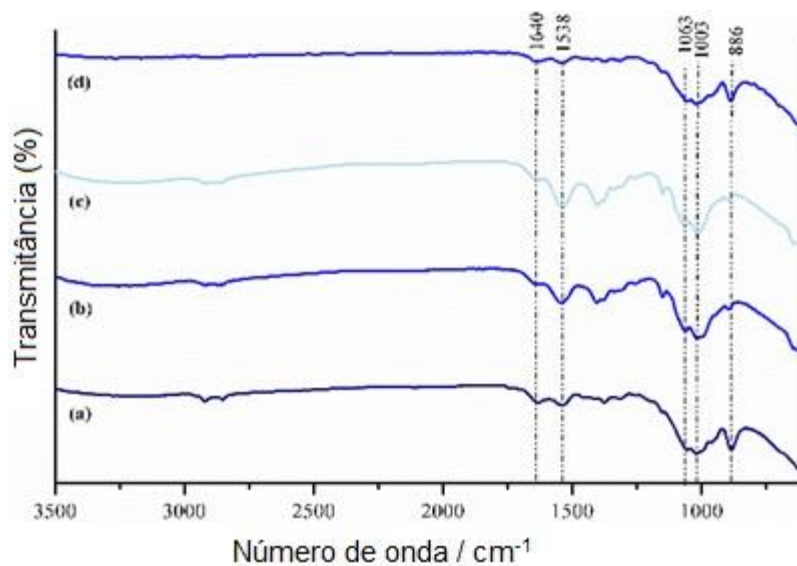
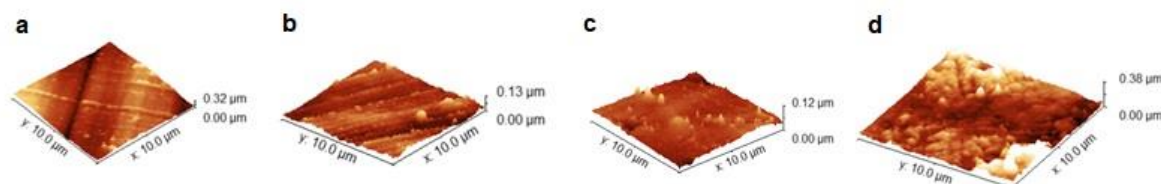


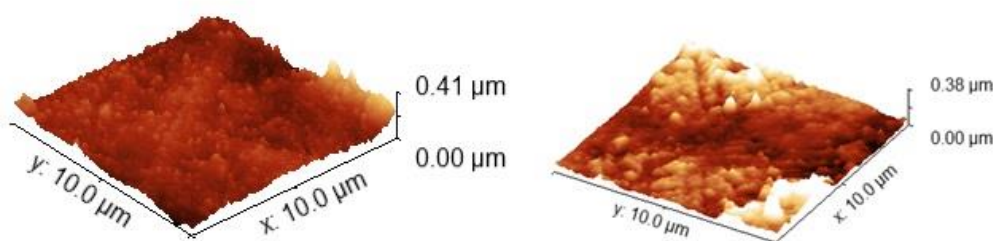
Figura 43 - Caracterização utilizando espectroscopia de FTIR do (a) Filme de quitosana, (b) Nanobiocompósito NFC/quitosana (10 µg mL<sup>-1</sup>), (c) Nanobiocompósito NFC/quitosana (100 µg mL<sup>-1</sup>), e (d) Nanobiocompósito NFC/quitosana (1000 µg mL<sup>-1</sup>).

As imagens de AFM (Figura 44) foram obtidas diretamente na superfície dos filmes, em áreas aleatórias de 10 x 10  $\mu\text{m}$ , formadas a partir do filme de quitosana e dos nanobiocompósitos NFC/quitosana.



**Figura 44 -** Imagens de Microscopia de Força Atômica obtidas do (a) filme de quitosana e dos nanobiocompósitos NFC/quitosana contendo diferentes concentrações de NFCs de algodão: (b) 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; (c) 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; (d) 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Os filmes de quitosana pura (Figura 44a) são relativamente regulares e com baixa rugosidade, enquanto a inserção de NFC torna esse filme homogeneamente rugoso com o alinhamento das NFC (Figuras 44a, 44b e 44c). A reticulação com o TPP leva a uma mudança considerável na superfície do filme (Figura 45), tornando-o altamente rugoso, com altura variável em alguns pontos entre 0,05 a 38  $\mu\text{m}$  e distribuição desigual.



**Figura 45 -** Imagens de Microscopia de Força Atômica obtidas do nanobiocompósito NFC/quitosana (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ); (a) não reticulado com TPP; (b) e reticulado com TPP.



#### 4.4.2 INTUMESCIMENTO E DEGRADAÇÃO DO NANOBIOCOMPÓSITO NFC/QUITOSANA

A taxa de intumescimento do filme de quitosana e dos nanobiocompósitos de NFC/quitosana é mostrada na Figura 46. As taxas de intumescimento em PBS (1x) de todos os materiais aumentaram com o tempo. No entanto, a taxa de intumescimento dos nanobiocompósitos NFC/quitosana contendo  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  (619,5%) de NFC foi menor ( $p < 0,05$ ) que do filme de quitosana (686,2%) e dos outros nanobiocompósitos contendo 10 e  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de NFC de algodão (716,49% e 691,71%, respectivamente). Dessa forma, o aumento da concentração de NFC presente no nanobiocompósito reduziu a taxa de intumescimento.

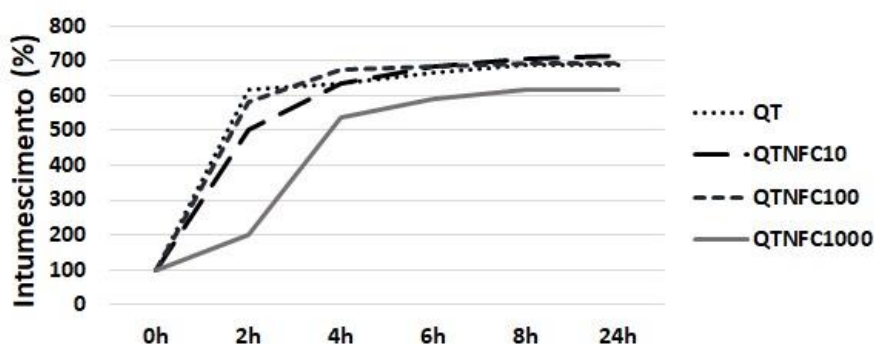


Figura 46 - Percentual de intumescimento do filme de quitosana (QT) e dos nanobiocompósitos NFC/quitosana contendo  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  (QTNFC10),  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  (QTNFC100) ou  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  (QTNFC1000) de NFC de algodão em solução salina tamponada com fosfato (PBS 1x) em relação ao tempo.

A Figura 47 mostra o padrão de biodegradação *in vitro* do filme de quitosana e dos nanobiocompósitos NFC/quitosana. A perda de massa do nanobiocompósito NFC/quitosana contendo  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  foi menor ( $p < 0,05$ ) do que a do filme de quitosana e dos outros nanobiocompósitos contendo 10 e  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de NFC de algodão. Após 7 dias do estudo, o filme de quitosana teve 5,06% de perda de massa, enquanto os nanobiocompósitos contendo 10, 100 ou  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  de NFC apresentaram valor de degradação de 3,9%, 4,1% e 2,28%, respectivamente, da massa inicial do nanobiocompósito. Após 14 dias, foi observada uma taxa de degradação de 5,78% do filme de quitosana em comparação com 4,9%, 5,14% e 3,1%

dos nanobiocompósitos NFC/quitosana contendo 10, 100 ou 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de NFC, respectivamente. Assim, o aumento da concentração de NFC presente no nanobiocompósito reduziu a taxa de degradação.

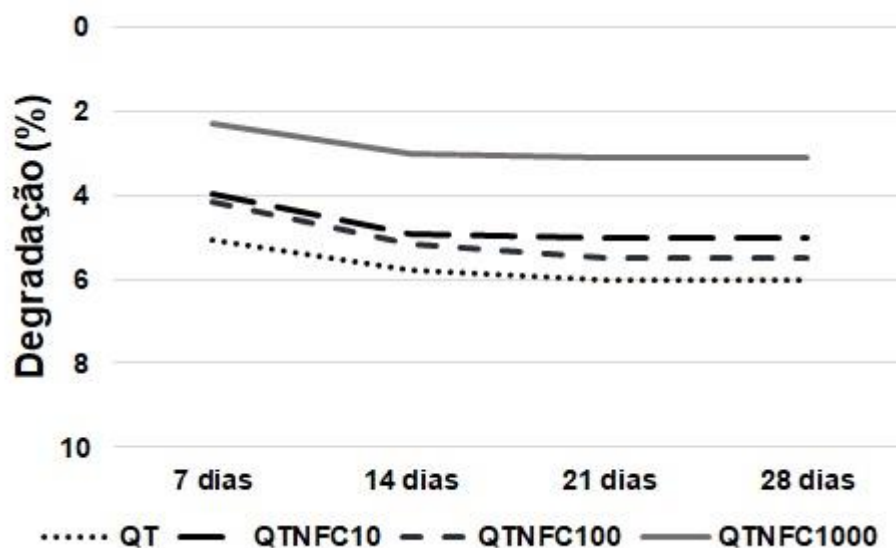


Figura 47 - Percentual de perda de massa do filme de quitosana (QT) e dos nanobiocompósitos NFC/quitosana contendo 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (QTNFC10), 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (QTNFC100) ou 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (QTNFC1000) de NFC de algodão em solução salina tamponada com fosfato (PBS 1x) em relação ao tempo.

#### 4.4.3 PROPRIEDADES REOLÓGICAS

As medidas do módulo elástico e da resistência à tração do filme de quitosana e dos nanobiocompósitos NFC/quitosana contendo 10, 100 ou 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de NFC são mostradas na Tabela 3. Os dados revelaram uma diminuição ( $p < 0,05$ ) do módulo elástico em 1000  $\mu\text{g/mL}$  NFC ( $2,035 \pm 1,544$ ) e 100  $\mu\text{g/mL}$  NFC ( $5,355 \pm 0,705$ ) quando comparado a 10  $\mu\text{g/mL}$  de NFC ( $7,523 \pm 0,740$ ) e Quitosana pura ( $7,417 \pm 0,624$ ) que não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ).

A resistência à tração na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  de NFC ( $30,789 \pm 3,583$ ) foi similar ( $P > 0,05$ ) a Quitosana pura ( $31,510 \pm 2,950$ ) e maior ( $P < 0,05$ ) quando comparada a 100  $\mu\text{g/mL}$  de NFC ( $20,995 \pm 2,645$ ) e 1000  $\mu\text{g/mL}$  de NFC ( $6,101 \pm 5,123$ ).

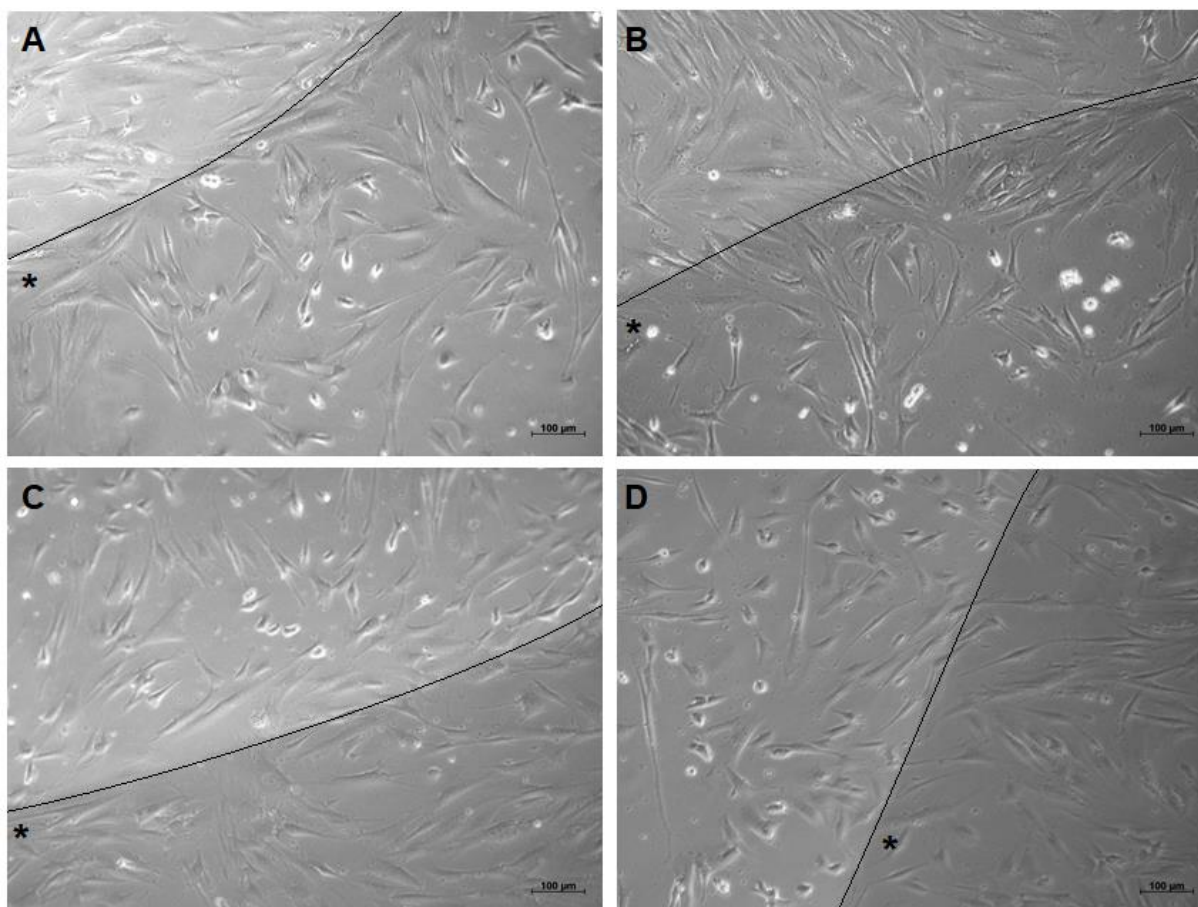
Tabela 3- Propriedades mecânicas para os nanobiocompósitos

Amostras	Módulo elástico (MPa)	Resistência a tração (Tensão Máxima) (MPa)
Filme de quitosana	7,417 ± 0,624	31,510 ± 2,950
Nanobiocompósito NFC/quitosana (10 µg mL <sup>-1</sup> )	7,523 ± 0,740	30,789 ± 3,583
Nanobiocompósito NFC/quitosana (100 µg mL <sup>-1</sup> )	5,355 ± 0,705	20,995 ± 2,645
Nanobiocompósito NFC/quitosana (1000 µg mL <sup>-1</sup> )	2,035 ± 1,544	6,101 ± 5,123

#### 4.4.4 AVALIAÇÃO DA CITOCOMPATIBILIDADE

##### 4.4.4.1 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA CELULAR, ADESÃO E VIABILIDADE MITOCRONDRIAL

As células-tronco mesenquimais humanas não apresentaram alterações na morfologia (Figura 48) e permaneceram alongadas com a forma tipicamente parecida com a de fibroblastos, após cultivadas por 24 h em meio de cultura basal sobre o filme de quitosana e sobre os nanobiocompósitos NFC/quitosana.



**Figura 48 - Análise da morfologia celular usando um microscópio óptico invertido. As células-tronco mesenquimais humanas foram cultivadas em contato direto por 24 h com ambos (A) placa de poliestireno (controle negativo) e filme de quitosana; (B) placa de poliestireno e nanobiocompósito NFC/quitosana ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ); (C) placa de poliestireno e nanobiocompósito NFC/quitosana ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ); e (D) placa de poliestireno e nanobiocompósito NFC/quitosana ( $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). A linha preta mostra a divisão dos dois tipos de superfície nos poços; asterisco mostra filme de quitosana (A) e nanobiocompósitos NFC/quitosana  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  (B, C e D, respectivamente). Ampliação  $100\times$ . Barra de escala =  $100 \mu\text{m}$ .**

Os resultados do ensaio de adesão celular (Figura 49) indicam uma boa interação celular das células-tronco mesenquimais humanas com os nanobiocompósitos NFC/quitosana ( $10$ ,  $100$  ou  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  de NFC). Após 3 h de cultura celular, verificou-se que a adesão celular nos nanobiocompósitos NFC/quitosana foi maior ( $p < 0,05$ ) do que no filme de quitosana, porém menor do que na placa de poliestireno (controle negativo) ( $p < 0,05$ ). Além disso, após 6 h de cultivo celular, persistiu o aumento da tendência de interação celular, e não foi encontrada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) na taxa de adesão entre os nanobiocompósitos NFC/quitosana quando comparados com o controle negativo. Apenas no filme de quitosana a taxa de adesão foi menor ( $p < 0,05$ ).

Após 24 h de plaqueamento celular não foi observada diferença significativa no número de células aderidas ao filme de quitosana bem como nos nanobiocompósitos NFC/quitosana quando comparados com a placa de poliestireno ( $p > 0,05$ ).

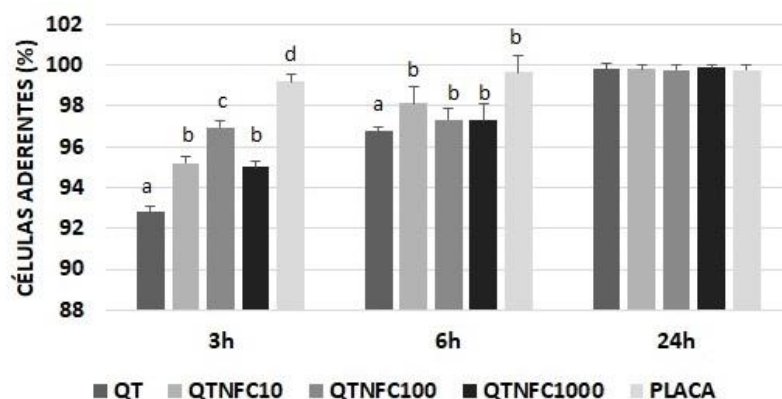


Figura 49 – Percentual de células-tronco mesenquimais humanas aderidas no filme de quitosana (QT), nos nanobiocompósitos NFC/quitosana contendo  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  (QTNFC10),  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  (QTNFC100) e  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  (QTNFC1000) de NFC de algodão e na placa de poliestireno (PLACA), após 3, 6 e 24 h de plaqueamento. Cada valor representa a média  $\pm$  (SEM) ( $n = 3$ ). Os valores  $p < 0,05$  foram estatisticamente significativos.

O cultivo das células-tronco mesenquimais humanas no filme de quitosana e nos nanobiocompósitos NFC/quitosana utilizando meio de cultura basal (Figura 50A) e meio de indução osteogênica (Figura 50B) não teve efeito ( $p > 0,05$ ) sobre a viabilidade mitocondrial durante 7, 14 e 21 dias. Assim, os nanobiocompósitos NFC/quitosana não demonstrou ser citotóxico para as células-tronco mesenquimais humanas nas condições testadas, corroborando com as imagens de microscopia de luz invertida (Figura 47).

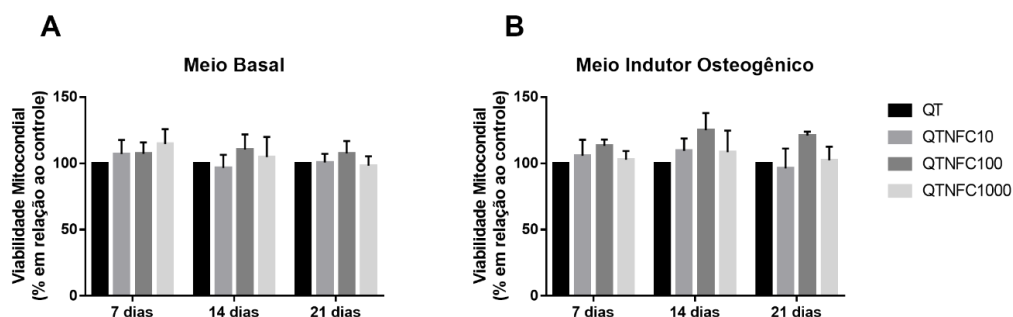


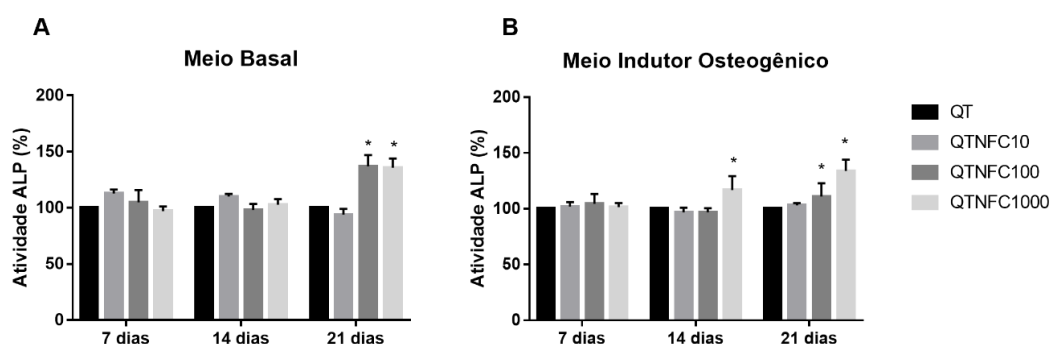
Figura 50 - Viabilidade mitocondrial das células-tronco mesenquimais humanas cultivadas sobre o filme de quitosana (QT) e sobre os nanobiocompósitos NFC/quitosana contendo  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  (QTNFC10),  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  (QTNFC100) e  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  (QTNFC1000) de NFCs de algodão durante 7, 14 e 21 dias utilizando meio basal (A) e meio de indução osteogênica (B) baseado no ensaio de MTT. Os valores estão representados pela média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes ( $p > 0,05$ ).

#### 4.4.5 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA

Para avaliar a atividade da fosfatase alcalina (ALP) intracelular (Figura 51), as células-tronco mesenquimais humanas foram cultivadas sobre os filmes de quitosana (QT) e nanobiocompósitos NFC/quitosana contendo  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  (QTNFC10),  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  (QTNFC100) e  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  (QTNFC1000) de NFCs de algodão durante 7, 14 e 21 dias utilizando meio basal (Figura 51A) e meio suplementado com fatores de indução osteogênica (Figura 51B).

Após 21 dias de cultura em meio basal (Figura 51A), a atividade da ALP das células-tronco mesenquimais humanas cultivadas sobre os nanobiocompósitos NFC/quitosana contendo maiores concentrações de NFCs de algodão ( $100$  e  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foi maior ( $p < 0,05$ ) quando comparada com o filme de quitosana. Entretanto, não houve diferença na atividade da ALP entre os tempos de 7 e 14 dias.

Quando utilizado o meio de indução osteogênica (Figura 51B), o aumento ( $p < 0,05$ ) da atividade da ALP foi observado após 14 dias de cultura em células cultivadas sobre o nanobiocompósito contendo a maior concentração de NFC de algodão ( $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Similarmente, houve aumento ( $p < 0,05$ ) da atividade da ALP nas células cultivadas sobre os nanobiocompósitos NFC/quitosana contendo maiores concentrações de NFCs de algodão ( $100$  e  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) após 21 dias de cultura (Figura 51B).



**Figura 51 - Atividade da Fosfatase Alcalina intracelular em células-tronco mesenquimais humanas cultivadas sobre os filmes de quitosana (QT) e nanobiocompósitos NFC/quitosana contendo  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  (QTNFC10),  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  (QTNFC100) e  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  (QTNFC1000) de NFCs de algodão durante 7, 14 e 21 dias utilizando meio basal (A) e meio de indução osteogênica (B). Os valores estão representados pela média  $\pm$  SEM de dois experimentos independentes ( $*p < 0,05$ )**

Após 21 dias de cultura, foram detectados pontos enegrecidos pela coloração von Kossa que representam pontos de deposição dos nódulos mineralizantes (Figura 52, setas brancas). Os nódulos de mineralização foram detectados em menores quantidades quando as células foram cultivadas sobre os nanobiocompósitos NFC/quitosana com meio basal (Figura 52 C, D, E), porém, na presença do meio com indutores osteogênicos, os nódulos mineralizantes foram observados em maiores quantidades (Figura 52 D, F, H).

Adicionalmente, as células-tronco mesenquimais humanas apresentaram deposição de nódulos de cálcio, marcados pelo Vermelho de Alizarina, após 21 dias de cultura sobre os nanobiocompósitos NFC/quitosana tanto em meio de cultura basal (Figura 53 C, E, G) quanto em meio de indução osteogênica (Figura 53 D, F, H). Entretanto, as células-tronco cultivadas nos grupos controles (sem filme de quitosana, nanobiocompósitos ou suplementos químicos indutores) não apresentaram nódulos mineralizantes (Figura 52A) nem deposição de nódulos de cálcio (Figura 53A).

Por fim, foi observado que a morfologia de algumas células-tronco mesenquimais humanas foi alterada de fusiformes para a forma poligonal após 21 dias de cultura sobre os nanobiocompósitos NFC/quitosana (Figuras 52 e 53).

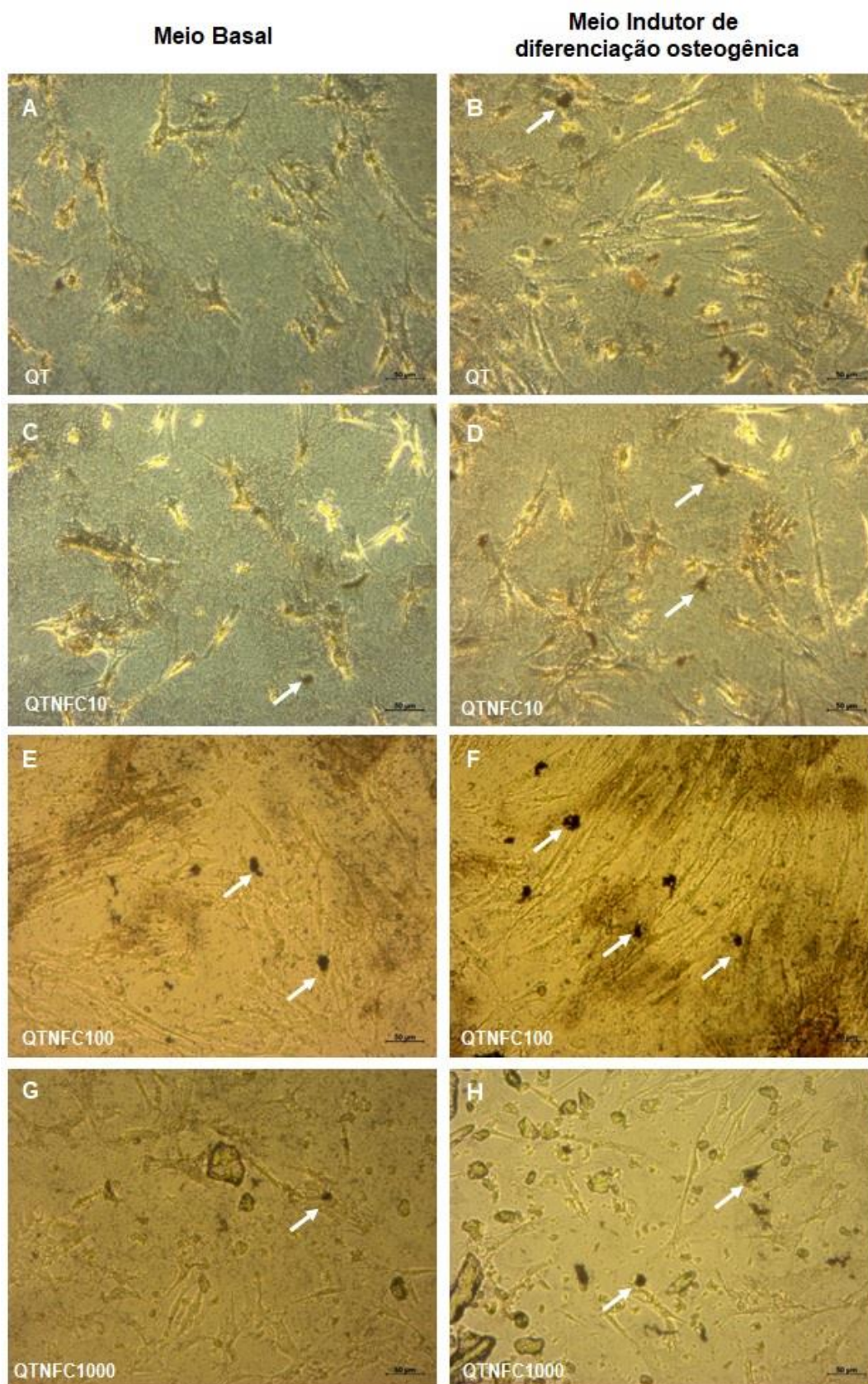
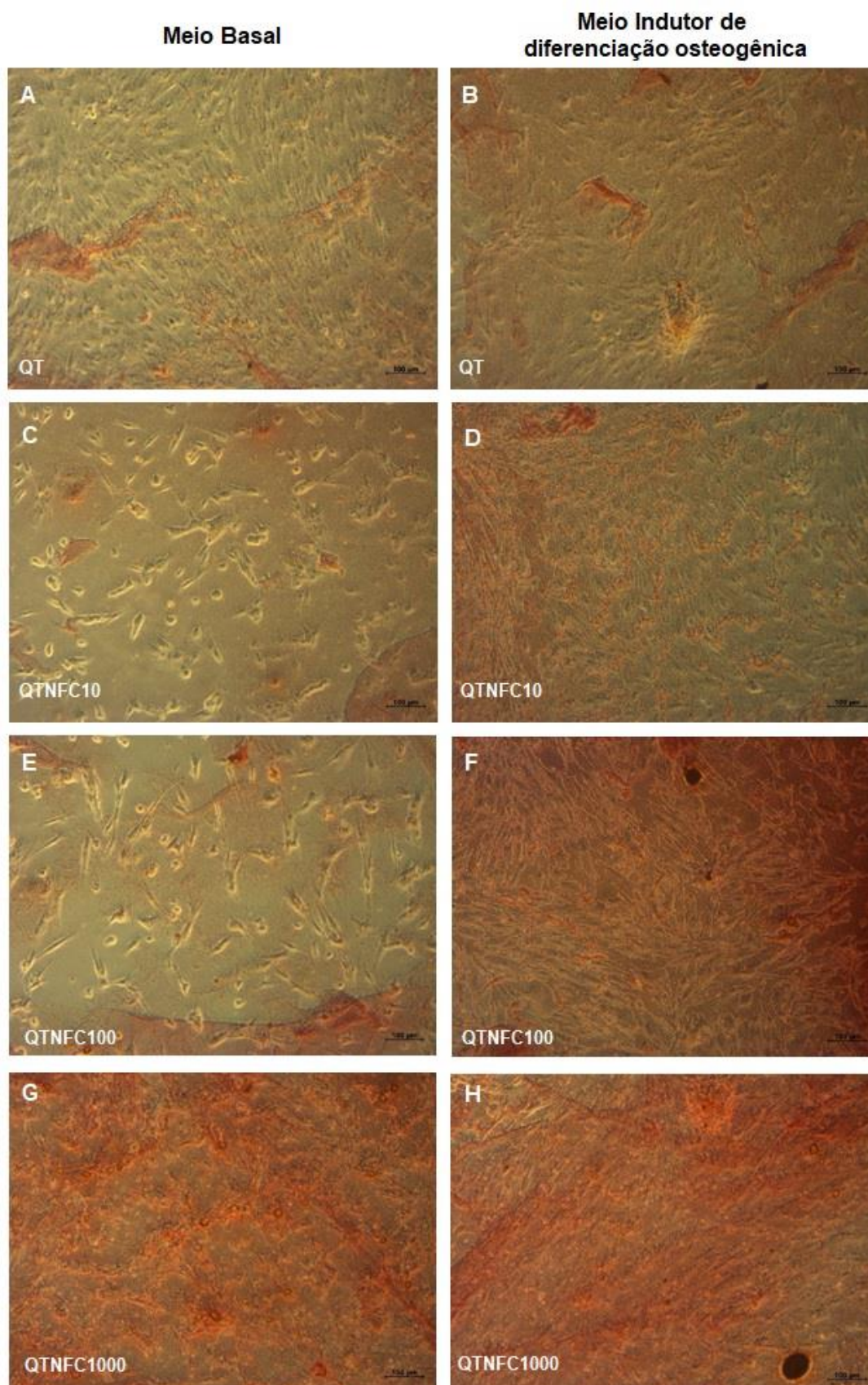


Figura 52 - Imagens por microscopia de luz da coloração von Kossa das células-tronco mesenquimais humanas cultivadas em contato direto com o filme de quitosana (A e B) e com os nanobiocompósitos NFC/quitosana contendo 10 µg mL<sup>-1</sup> (C e D), 100 µg mL<sup>-1</sup> (E e F) e 1000 µg mL<sup>-1</sup> (G e H) por 21 dias em meio basal (A, C, E e G) e em meio de indução osteogênica (B, D, F, H). Ampliação 200x. Barra de escala = 50 µm.





**Figura 53 -** Imagens por microscopia de luz da coloração com Vermelho de Alizarina S das células-tronco mesenquimais humanas cultivadas em contato direto com o filme de quitosana (A e B) e com os nanobiocompósitos NFC/quitosana contendo  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  (C e D),  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  (E e F) e  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  (G e H) por 21 dias em meio basal (A, C, E e G) e em meio de indução osteogênica (B, D, F, H). Ampliação 100x. Barra de escala = 100  $\mu\text{m}$ .

## 4.5 DISCUSSÃO

Com o intuito de otimizar a produção dos nanobiocompósitos e baseados nos resultados obtidos no capítulo anterior (Capítulo 2) foram modificadas as concentrações de TPP e NFCs de algodão utilizadas, para assim, modificar as propriedades físico-químicas dos nanobiocompósitos NFC/quitosana produzidos para proporcionar melhor citocompatibilidade e induzir a diferenciação osteogênica nas células-tronco mesenquimais humanas.

A quitosana é um biopolímero com uma ampla gama de aplicabilidade em aplicações de tecidos regenerativos devido à sua natureza biocompatível, osteoindutora, degradativa e biorreabsorvível *in vitro* (ABINAYA et al., 2019). Especialmente, a quitosana tem sido usada para aplicações de engenharia de tecidos ósseos, pois sua estrutura tem semelhança estrutural e de composição com os glicosaminoglicanos presentes na MEC que facilitam a adesão e a proliferação de células de osteoblastos e também fornecem uma estrutura porosa para osteocondução (JHALA; RATHER; VASITA, 2016). LAI et al. (2014) mostrou que a quitosana foi o componente principal para promover a diferenciação osteogênica das células-tronco mesenquimais humanas, enquanto CHEN; CHEN; LAI (2012) mostraram que a quitosana melhorou a diferenciação osteogênica.

Os NMs podem ser acoplados à quitosana para aumentar suas propriedades mecânicas e melhorar a aplicabilidade dos nanobiocompósitos no reparo de tecido ósseo (BALAGANGADHARAN; DHIVYA; SELVAMURUGAN, 2017; MATINFAR; MESGAR; MOHAMMADI, 2019). Inicialmente, os nanobiocompósitos de NFC/quitosana foram sintetizados e caracterizados utilizando diferentes concentrações de NFCs de algodão (10, 100 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e reticulados em solução de 1,3% (p/v) de TPP. Os resultados de espectroscopia confirmaram a reticulação efetiva do TPP com a quitosana e mostraram que as NFCs nas três concentrações utilizadas, interagiram com a quitosana.

Adicionalmente, as imagens de AFM mostraram que o aumento da concentração de NFCs de algodão modificou a nanotopografia e rugosidade dos nanobiocompósitos produzidos, aumentando, assim, os pontos de adesão para as células. A topografia da superfície dos biomateriais é considerada um dos parâmetros cruciais na determinação da atividade celular (YAO et al., 2019), por isso várias

técnicas de nanoengenharia são desenvolvidas para obter *scaffolds* nanofibrosos com superfície nanotopográfica para controlar a proliferação, migração e diferenciação de células-tronco (CHEN et al., 2017; ZHOU et al., 2018).

O filme de quitosana e os nanobiocompósitos NFC/quitosana contendo 10 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de NFC apresentaram aumento na taxa de intumescimento, no entanto, um aumento na concentração de NFC de algodão (1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) forneceu uma menor porcentagem de intumescimento. Isso pode ter ocorrido devido à alta capacidade de interação física da NFC no nanobiocompósito, o que diminui a captação de solução aquosa na matriz (KUMAR et al., 2019).

A taxa de intumescimento é afetada pela incorporação de NFCs e também com a variação de sua concentração, portanto, podem desempenhar um papel importante na retenção de fluidos corporais e no fornecimento de nutrientes às células (PUROHIT et al., 2019). Adicionalmente, o comportamento dos biomateriais no ensaio de intumescimento pode explicar os resultados de degradação. Presume-se que as moléculas do tampão fosfato-salino (PBS) utilizado, apliquem uma pressão externa na estrutura dos nanobiocompósitos, afastando assim as cadeias poliméricas da matriz reticulada, levando a uma leve desintegração da estrutura polimérica. Dessa forma, a maior estabilidade do nanobiocompósito pode ser benéfica para a formação de tecidos e matriz extracelular no momento da regeneração óssea (PUROHIT et al., 2019).

Adicionalmente, com a adição das NFCs em altas concentrações nos filmes de quitosana o alongamento dos nanobiocompósitos NFC/quitosana diminuiu, provavelmente devido as forças de interações entre as cadeias dos materiais (diminuindo a elasticidade). No presente estudo, observou-se que as NFCs nas concentrações de 100 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  tornaram os filmes de quitosana mais rígidos ou menos flexíveis e, conseqüentemente, menos resistentes à tração, corroborando com os dados de intumescimento e degradação.

As características mecânicas do nanobiocompósito influenciam o comportamento celular. A célula responde de forma diferente à variação na rigidez da matriz, que afeta a proliferação, viabilidade e diferenciação celular (TAN et al., 2014). A rigidez dos tecidos corporais é diferente, variando de menos de 1 kPa no cérebro e mais de 100 kPa no tecido ósseo (FEIG et al., 2018). Embora existam muitos mecanismos de interação entre a membrana celular e a superfície do nanobiocompósito, a interação fundamental que todas as células devem ter é uma

interação entre o citoesqueleto e o nanobiocompósito (MURPHY; MCDEVITT; ENGLER, 2014). As consequências dessa interação incluem uma cascata de eventos na célula, todos iniciados pelo citoesqueleto ou por estruturas que o vinculam ao material (TSIMBOURI et al., 2014).

Um desses mecanismos é a geração de forças contráteis pelas células contra um substrato. As células-tronco mesenquimais detectam a rigidez da matriz agrupando integrinas transmembranares, determinando a força de adesão e proliferação celular e ligando o citoesqueleto intracelular à MEC. Esses sinais são transduzidos para o núcleo, modulando a expressão gênica e as alterações resultantes no fenótipo celular (LEACH; WHITEHEAD, 2018). Assim, as propriedades mecânicas do filme de quitosana e dos nanobiocompósitos NFC/quitosana podem afetar o destino das células, uma vez que as células respondem a rigidez da matriz por um mecanotransdutor e alteram sua morfologia e linhagem específica ao transduzir esses sinais para o núcleo (SHAHROUSVAND et al., 2017a). Por isso, durante a diferenciação osteogênica, as células-tronco mesenquimais deixam de ter a morfologia fusiforme como fibroblastos, e passam a ter conformação poligonal. Dessa forma, mimetizar a estrutura biomecânica e biológica da MEC óssea utilizando NMs é uma estratégia eficaz para projetar e desenvolver *scaffolds* para a engenharia óssea.

O NMs fibrosos tem atraído interesse como componentes de nanobiocompósitos, pois são capazes de fornecer pistas biológicas e suporte estrutural para a regeneração de tecidos (LI et al., 2018). As fibras fornecem orientações de contato, levando a um aprimoramento na adesão celular (ALMARZA et al., 2008). Além disso, o aumento da rugosidade da superfície dos nanobiocompósitos NFC/quitosana pode ter sido adequado para o crescimento celular, função celular estimulada da osteogênese e mineralização óssea (LI et al., 2018; PARK et al., 2007). JAHANMARD et al. (2020) mostraram que a rigidez e a nanotopografia dos *scaffolds* afetam diferentemente a mineralização da matriz e a expressão dos marcadores osteogênicos, sugerindo que essas propriedades físicas regulam a osteogênese por diferentes mecanismos.

Estudos relataram que filmes com topografias nanofibras induzem a ligação, proliferação e diferenciação osteogênica de células-tronco (HOSSEINKHANI et al., 2006; MIRAKABAD et al., 2019; SMITH et al., 2009), uma vez que mimetizam as estruturas fibrosas da MEC do tecido ósseo (RAIC et al., 2019). YANG et al. (2018),

sugeriram que a superfície nanofibrosa aumentou os níveis da atividade da fosfatase alcalina e promoveu a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais de ratos. Outro trabalho mostrou que a adição de nanocristais de celulose no *scaffold* permitiu a diferenciação osteogênica em células-tronco mesenquimais humanas (DUTTA et al., 2019).

No presente estudo, os nanobiocompósitos NFC/quitosana aumentaram a atividade da ALP das células-tronco mesenquimais humanas. Os osteoblastos secretam fosfatase alcalina, que degrada os pirofosfatos inorgânicos e causa um aumento nos níveis de fosfato, ativando o processo de mineralização (SHAHROUSVAND et al., 2017b). Essa mineralização foi confirmada pelos estudos colorimétricos de von Kossa e vermelho de Alizarina que revelaram a deposição de nódulos mineralizantes.

A ativa interação entre células-tronco e MEC é fundamental para o processo de proliferação, migração e diferenciação celular. Um possível mecanismo para indução de diferenciação osteogênica das células cultivadas sobre os nanobiocompósitos NFC/quitosana pode estar relacionado à microestrutura da superfície desse biomaterial. Estudos prévios demonstraram que uma superfície nanoestruturada aumenta a adesão de proteínas contidas no soro fetal bovino, como a vitronectina e fibronectina (STEELE; JOHNSON; UNDERWOOD, 1992). Essas proteínas que também estão presentes na MEC são reconhecidas pelas integrinas, receptores importantes para a proliferação e diferenciação de células-tronco em osteoblastos (DELIGIANNI et al., 2001; WEBSTER et al., 2001). Assim, pode-se sugerir que a ligação de proteínas do meio de cultura e/ou das NFCs às integrinas promove sinais que são transmitidos para o interior das células-tronco, desencadeando os efeitos de diferenciação observados pelos ensaios da ALP, von Kossa e vermelho de Alizarina. Sugere-se, também, que os cátions da quitosana, tenham atraído o acúmulo de glicosaminoglicanos aniônicos, potencializando a diferenciação osteogênica, uma vez que os glicosaminoglicanos da MEC podem regular as citocinas e os fator de crescimento e, assim, influenciar a proliferação e diferenciação celular (MATHEWS et al., 2014). Contudo, estudos complementares são necessários para confirmar essas hipóteses.

Futuramente, para potencializar a formação do tecido ósseo, uma estratégia que pode ser utilizada é a incorporação de outros componentes na síntese dos nanobiocompósitos NFC/quitosana, para liberação controlada de fatores

osteogênicos, o que oferece um método promissor para melhorar os resultados clínicos de implantes e transplante (BALAGANGADHARAN; DHIVYA; SELVAMURUGAN, 2017).

Portanto, inicialmente, nossos resultados mostraram que os nanobiocompósitos NFC/quitosana foram citocompatíveis e permitiram a adesão celular das células-tronco mesenquimais humanas. Por fim, induziram o aumento da atividade da ALP e a produção de nódulos mineralizantes. Dessa forma, o nanobiocompósito NFC/quitosana pode ser considerado um candidato promissor para uso na engenharia de tecidos, mais especificamente para o reparo ósseo.

## 4.6 CONCLUSÃO

As NFCs de algodão aumentaram a nanotopografia e modificaram as propriedades mecânicas dos nanobiocompósitos NFC/quitosana, permitindo adesão, proliferação e diferenciação osteogênica das células-tronco mesenquimais humanas.

#### 4.7 PERSPECTIVAS

- Realização de PCR em Tempo Real para analisar a expressão de genes relacionadas a osteogênese;
- Avaliação da citocompatibilidade e o potencial de reparo ósseo dos nanobiocompósitos NFC/quitosana *in vivo*.



#### 4.8 REFERÊNCIAS

- Abarrategi, A., Lópiz-Morales, Y., Ramos, V., Civantos, A., López-Duñ, L., Marco, F., & López-Lacomba, J. L. (2010). Chitosan scaffolds for osteochondral tissue regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, *95*(4), 1132–1141. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32912>
- Abinaya, B., Prasith, T. P., Ashwin, B., Viji Chandran, S., & Selvamurugan, N. (2019). Chitosan in Surface Modification for Bone Tissue Engineering Applications. *Biotechnology Journal*, *14*(12), 1900171. <https://doi.org/10.1002/biot.201900171>
- Almarza, A. J., Yang, G., Woo, S. L. Y., Nguyen, T., & Abramowitch, S. D. (2008). Positive changes in bone marrow-derived cells in response to culture on an aligned bioscaffold. *Tissue Engineering - Part A*, *14*(9), 1489–1495. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2007.0422>
- Balagangadharan, K., Dhivya, S., & Selvamurugan, N. (2017). Chitosan based nanofibers in bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, *104*, 1372–1382. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.046>
- Bhumkar, R. D., & Pokharkar, V. B. (2006). Studies on effect of pH on cross-linking of Chitosan with sodium tripolyphosphate: A technical note. *AAPS PharmSciTech*, *7*(2), 2–7. <https://doi.org/10.1208/pt070250>
- Chen, J. P., Chen, S. H., & Lai, G. J. (2012). Preparation and characterization of biomimetic silk fibroin/chitosan composite nanofibers by electrospinning for osteoblasts culture. *Nanoscale Research Letters*, *7*, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-7-170>
- Chen, Z., Bachhuka, A., Wei, F., Wang, X., Liu, G., Vasilev, K., & Xiao, Y. (2017). Nanotopography-based strategy for the precise manipulation of osteoimmunomodulation in bone regeneration. *Nanoscale*, *9*(46), 18129–18152. <https://doi.org/10.1039/c7nr05913b>
- Deligianni, D. D., Katsala, N., Ladas, S., Sotiropoulou, D., Amedee, J., & Missirlis, Y. F. (2001). Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption. *Biomaterials*, *22*(11), 1241–1251. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00274-X](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00274-X)
- Dutta, S. D., Patel, D. K., Seo, Y. R., Park, C. W., Lee, S. H., Kim, J. W., ... Lim, K. T. (2019). In Vitro Biocompatibility of Electrospun Poly( $\epsilon$ -Caprolactone)/Cellulose

- Nanocrystals-Nanofibers for Tissue Engineering. *Journal of Nanomaterials*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/2061545>
- Feig, V. R., Tran, H., Lee, M., & Bao, Z. (2018). Mechanically tunable conductive interpenetrating network hydrogels that mimic the elastic moduli of biological tissue. *Nature Communications*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05222-4>
- Ferreira, L. S., Diniz, I. M. A., Maranduba, C. M. S., Miyagi, S. P. H., Rodrigues, M. F. S. D., Moura-Netto, C., & Marques, M. M. (2019). Short-term evaluation of photobiomodulation therapy on the proliferation and undifferentiated status of dental pulp stem cells. *Lasers in Medical Science*, 34(4), 659–666. <https://doi.org/10.1007/s10103-018-2637-z>
- Francis Suh, J. K., & Matthew, H. W. T. (2000). Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: A review. *Biomaterials*, 21(24), 2589–2598. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00126-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00126-5)
- Hosseinkhani, H., Hosseinkhani, M., Tian, F., Kobayashi, H., & Tabata, Y. (2006). Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in self-assembled peptide-amphiphile nanofibers. *Biomaterials*, 27(22), 4079–4086. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.03.030>
- Ilyas, R. A., Sapuan, S. M., Ishak, M. R., & Zainudin, E. S. (2018). Sugar palm nanocrystalline cellulose reinforced sugar palm starch composite: Degradation and water-barrier properties. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 368(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/368/1/012006>
- Ilyas, Rusdan Ahmad, Sapuan, S. M., Ishak, M. R., & Zainudin, E. S. (2018). Water transport properties of bio-nanocomposites reinforced by sugar palm (*arenga pinnata*) nanofibrillated cellulose. *Journal of Advanced Research in Fluid Mechanics and Thermal Sciences*, 51(2), 234–246.
- Jahanmard, F., Baghban Eslaminejad, M., Amani-Tehran, M., Zarei, F., Rezaei, N., Croes, M., & Amin Yavari, S. (2020). Incorporation of F-MWCNTs into electrospun nanofibers regulates osteogenesis through stiffness and nanotopography. *Materials Science and Engineering C*, 106(July 2019), 110163. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110163>
- Jhala, D., Rather, H., & Vasita, R. (2016). Polycaprolactone-chitosan nanofibers influence cell morphology to induce early osteogenic differentiation. *Biomaterials*

- Science*, 4(11), 1584–1595. <https://doi.org/10.1039/c6bm00492j>
- Kim, M., Yeo, M., Kim, M., & Kim, G. (2018). Biomimetic cellulose/calcium-deficient-hydroxyapatite composite scaffolds fabricated using an electric field for bone tissue engineering. *RSC Advances*, 8(37), 20637–20647. <https://doi.org/10.1039/c8ra03657h>
- Knaul, J. Z., Hudson, S. M., & Creber, K. A. M. (1999). Improved mechanical properties of chitosan fibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 72(13), 1721–1732. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19990624\)72:13<1721::AID-APP8>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19990624)72:13<1721::AID-APP8>3.0.CO;2-V)
- Kumar, A., Zo, S. M., Kim, J. H., Kim, S. C., & Han, S. S. (2019). Enhanced physical, mechanical, and cytocompatibility behavior of polyelectrolyte complex hydrogels by reinforcing halloysite nanotubes and graphene oxide. *Composites Science and Technology*, 175(March), 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2019.03.008>
- Lai, G. J., Shalumon, K. T., Chen, S. H., & Chen, J. P. (2014). Composite chitosan/silk fibroin nanofibers for modulation of osteogenic differentiation and proliferation of human mesenchymal stem cells. *Carbohydrate Polymers*, 111, 288–297. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.04.094>
- Leach, J. K., & Whitehead, J. (2018). Materials-Directed Differentiation of Mesenchymal Stem Cells for Tissue Engineering and Regeneration. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 4(4), 1115–1127. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00741>
- Li, W., Yang, X., Feng, S., Yang, S., Zeng, R., & Tu, M. (2018). The fabrication of biom mineralized fiber-aligned PLGA scaffolds and their effect on enhancing osteogenic differentiation of UCMSC cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 29(8). <https://doi.org/10.1007/s10856-018-6114-9>
- MarketsandMarkets. (2019). Top 10 medical device 415 technologies market by type (ivd, cardiology, diagnostic imaging, orthopedics, 416 ophthalmology, endoscopy, diabetes care, wound management, kidney/dialysis, and 417 anesthesia & respiratory care devices) - Global forecast to 20. Retrieved May 24, 2019, from <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/top-10-medical-device-technologies-96.html>
- Mathews, S., Mathew, S. A., Gupta, P. K., Bhonde, R., & Totey, S. (2014). Glycosaminoglycans enhance osteoblast differentiation of bone marrow derived

- human mesenchymal stem cells. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 8(2), 143–152. <https://doi.org/10.1002/term.1507>
- Matinfar, M., Mesgar, A. S., & Mohammadi, Z. (2019). Evaluation of physicochemical, mechanical and biological properties of chitosan/carboxymethyl cellulose reinforced with multiphasic calcium phosphate whisker-like fibers for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering C*, 100(December 2018), 341–353. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.03.015>
- Mirakabad, F. S. T., Hosseinzadeh, S., Abbaszadeh, H. A., Khoramgah, M. S., Ghanbarian, H., Ranjbari, J., & Kazemi, B. (2019). The Comparison between the Osteogenic Differentiation Potential of Clay-Polyacrylonitrile Nanocomposite Scaffold and Graphene-Polyacrylonitrile Scaffold in Human Mesenchymal Stem Cells. *Nano Biomedicine and Engineering*, 11(3), 238–253. <https://doi.org/10.5101/nbe.v11i3.p238-253>
- Murphy, W. L., McDevitt, T. C., & Engler, A. J. (2014). Materials as stem cell regulators. *Nature Materials*, 13(6), 547–557. <https://doi.org/10.1038/nmat3937>
- Oliveira, R. L., Vieira, J. G., Barud, H. S., Assunção, R. M. N., Filho, G. R., Ribeiro, S. J. L., & Messadeqq, Y. (2015). Synthesis and characterization of methylcellulose produced from bacterial cellulose under heterogeneous condition. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 26(9), 1861–1870. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150163>
- Park, K., Ju, Y. M., Son, J. S., Ahn, K. D., & Han, D. K. (2007). Surface modification of biodegradable electrospun nanofiber scaffolds and their interaction with fibroblasts. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 18(4), 369–382. <https://doi.org/10.1163/156856207780424997>
- Pooyan, P., Kim, I. T., Jacob, K. I., Tannenbaum, R., & Garmestani, H. (2013). Design of a cellulose-based nanocomposite as a potential polymeric scaffold in tissue engineering. *Polymer (United Kingdom)*, 54(8), 2105–2114. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2013.01.030>
- Purohit, S. D., Bhaskar, R., Singh, H., Yadav, I., Gupta, M. K., & Mishra, N. C. (2019). Development of a nanocomposite scaffold of gelatin–alginate–graphene oxide for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 133, 592–602. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.113>
- Raic, A., Friedrich, F., Kratzer, D., Bieback, K., Lahann, J., & Lee-Thedieck, C. (2019). Potential of electrospun cationic BSA fibers to guide osteogenic MSC

- differentiation via surface charge and fibrous topography. *Scientific Reports*, 9(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56508-6>
- Rashad, A., Mohamed-Ahmed, S., Ojansivu, M., Berstad, K., Yassin, M. A., Kivijärvi, T., ... Mustafa, K. (2018). *Coating 3D Printed Polycaprolactone Scaffolds with Nanocellulose Promotes Growth and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. Biomacromolecules* (Vol. 19). <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b01194>
- Ribeiro, V. P., Silva-Correia, J., Nascimento, A. I., da Silva Morais, A., Marques, A. P., Ribeiro, A. S., ... Reis, R. L. (2017). Silk-based anisotropical 3D biotextiles for bone regeneration. *Biomaterials*, 123, 92–106. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.01.027>
- Sanyang, M. L., Ilyas, R. A., Sapuan, S. M., & Jumaidin, R. (2017). Sugar palm starch-based composites for packaging applications. *Bionanocomposites for Packaging Applications*, 125–147. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-67319-6\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-67319-6_7)
- Shahrousvand, E., Shahrousvand, M., Ghollasi, M., Seyedjafari, E., Jouibari, I. S., babaei, A., & Salimi, A. (2017). Preparation and evaluation of polyurethane/cellulose nanowhisker bimodal foam nanocomposites for osteogenic differentiation of hMSCs. *Carbohydrate Polymers*, 171, 281–291. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.05.027>
- Shahrousvand, M., Tabar, F. A., Shahrousvand, E., Babaei, A., Hasani-Sadrabadi, M. M., Sadeghi, G. M. M., ... Salimi, A. (2017). High aspect ratio phospho-calcified rock candy-like cellulose nanowhiskers of wastepaper applicable in osteogenic differentiation of hMSCs. *Carbohydrate Polymers*, 175, 293–302. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.001>
- Smith, L. A., Liu, X., Hu, J., Wang, P., & Ma, P. X. (2009). Enhancing osteogenic differentiation of mouse embryonic stem cells by nanofibers. *Tissue Engineering - Part A*, 15(7), 1855–1864. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0227>
- Souza, N. L. G. D., Salles, T. F., Brandão, H. M., Edwards, H. G. M., & De Oliveira, L. F. C. (2015). Synthesis, vibrational spectroscopic and thermal properties of oxocarbon cross-linked Chitosan. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 26(6), 1247–1256. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150090>
- Steele, J. G., Johnson, G., & Underwood, P. A. (1992). Role of serum vitronectin and fibronectin in adhesion of fibroblasts following seeding onto tissue culture polystyrene. *Journal of Biomedical Materials Research*, 26(7), 861–884. <https://doi.org/10.1002/jbm.820260704>

- Tan, S. J., Fang, J. Y., Yang, Z., Nimni, M. E., & Han, B. (2014). The synergetic effect of hydrogel stiffness and growth factor on osteogenic differentiation. *Biomaterials*, 35(20), 5294–5306. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.02.040>
- Tsimbouri, P., Gadegaard, N., Burgess, K., White, K., Reynolds, P., Herzyk, P., ... Dalby, M. J. (2014). Nanotopographical effects on mesenchymal stem cell morphology and phenotype. *Journal of Cellular Biochemistry*, 115(2), 380–390. <https://doi.org/10.1002/jcb.24673>
- Venkatesan, J., & Kim, S.-K. (2010). Chitosan Composites for Bone Tissue Engineering—An Overview. *Marine Drugs*, 8(8), 2252–2266. <https://doi.org/10.3390/md8082252>
- Wang, J., Liu, X., Jin, T., He, H., & Liu, L. (2019). Preparation of nanocellulose and its potential in reinforced composites: A review. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 30(11), 919–946. <https://doi.org/10.1080/09205063.2019.1612726>
- Wang, X., Ma, J., Wang, Y., & He, B. (2001). Structural characterization of phosphorylated chitosan and their applications as effective additives of calcium phosphate cements. *Biomaterials*, 22(16), 2247–2255. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00413-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00413-0)
- Webster, T. J., Schadler, L. S., Siegel, R. W., & Bizios, R. (2001). Mechanisms of Enhanced Osteoblast Adhesion on Nanophase Alumina Involve Vitronectin. *Tissue Engineering*, 7(3), 291–301. <https://doi.org/10.1089/10763270152044152>
- Xu, Y., & Du, Y. (2003). Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 250(1), 215–226. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00548-3](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00548-3)
- Yang, X., Li, Y., He, W., Huang, Q., Zhang, R., & Feng, Q. (2018). Hydroxyapatite/collagen coating on PLGA electrospun fibers for osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 106(11), 2863–2870. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36475>
- Yang, Y., Wang, K., Gu, X., & Leong, K. W. (2017). Biophysical Regulation of Cell Behavior—Cross Talk between Substrate Stiffness and Nanotopography. *Engineering*, 3(1), 36–54. <https://doi.org/10.1016/J.ENG.2017.01.014>
- Yao, T., Chen, H., Baker, M. B., & Moroni, L. (2019). Effects of Fiber Alignment and Coculture with Endothelial Cells on Osteogenic Differentiation of Mesenchymal

- Stromal Cells. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 1–35. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2019.0232>
- Zajaç, A., Hanuza, J., Wandas, M., & Dymińska, L. (2015). Determination of N-acetylation degree in chitosan using Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 134, 114–120. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.06.071>
- Zanette, R. de S. S. (2016). *Produção de matrizes biológicas a partir de valvas cardíacas de suínos e recelularização com células tronco da polpa dentária humana*. Universidade Federal de Juiz de Fora. Retrieved from <https://repositorio.ufjf.br/jspui/handle/ufjf/2337>
- Zhou, X., Yuan, L., Wu, C., Cheng chen, C. chen, Luo, G., Deng, J., & Mao, Z. (2018). Recent review of the effect of nanomaterials on stem cells. *RSC Advances*, 8(32), 17656–17676. <https://doi.org/10.1039/C8RA02424C>

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Dentro das condições testadas, as NFCs **de celulose** de algodão e os nanobiocompósitos NFC/quitosana mostraram ser citocompatíveis e ter potencial de indução osteogênica nas células-tronco mesenquimais humanas. O uso combinado de células-tronco e nanobiocompósitos forneceu resultados *in vitro* que são promissores para que essa estratégia seja utilizada em reparos ósseos *in vivo*.



## APÊNDICE A

### **Artigo Publicado**

Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition

Volume 30, 2019 - Issue 16 – doi: 10.1080/09205063.2019.1646627

### **Cotton cellulose nanofiber/chitosan nanocomposite: characterization and evaluation of cytocompatibility**

Rafaella S.S. Zanette<sup>a</sup>, Leonara B.F. Almeida<sup>a</sup>, Nelson L.G.D. Souza<sup>b</sup>, Camila G. Almeida<sup>c</sup>, Luiz F.C. Oliveira<sup>d</sup>, Elyabe M. de Matos<sup>a</sup>, Juliana C. Gern<sup>c</sup>, Humberto M. Brandão<sup>c</sup> and Michele Munk<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biology, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil;

<sup>b</sup> Department of Exact Sciences and Biotechnology, Federal University of Tocantins, Chácaras, Brazil;

<sup>c</sup> Embrapa Dairy Cattle (CNPGL), Juiz de Fora, Brazil; <sup>d</sup> Department of Chemistry, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil

\*E-mail: michele.munk@ufjf.edu.br

Address: Federal University of Juiz de Fora – José Lourenço Kelmer, Campus Universitário, São Pedro, Juiz de Fora, 36036-900, Brazil. Tel.: +55 32 3311-7460

### **Abstract**

Cellulose is a renewable polymer quite abundant on the Earth and very attractive for applications in the construction of eco-friendly biomedical products. The aim of this study was to investigate the chemical-physical characteristics of cotton cellulose nanofiber (CCN)/chitosan nanocomposite and its cytocompatibility with human embryonic kidney cells. First, the chemical composition, swelling ratio and surface topography of the nanocomposite were evaluated. Cytocompatibility was then assessed through spreading, proliferation and viability of cells. The experimental results showed that the CCN was an effective nanomaterial agent for increasing the roughness surface of chitosan film. Cell proliferation and changes in cell morphology indicated that the nanocomposite led to improved cell spreading and growth. Cell viability did not decrease after 24 h. However, the cell survival on the nanocomposite was affected at 72 h. The results indicate that CCN/chitosan nanocomposite could be a promising biocompatible biomaterial for biomedical applications.

**Keywords:** biomaterials; biopolymer; in vitro cell culture; polymeric nanomaterials; nanotopography

## APÊNDICE B

### Premiações

**2016** MENÇÃO HONROSA na área da Nanotoxicologia, Avaliação in vitro da biocompatibilidade de nanofibras de celulose em cultura de células-tronco da polpa dentária humana. In: I SIMPÓSIO NACIONAL DE NANOBIOTECNOLOGIA, II Workshop de Nanobiotecnologia da UFMG - Avanços e Aplicações.

**2018** MENÇÃO HONROSA na área de Biotecnologia, GeneTime Conference - Programa de Pós-Graduação em Genética da UFJF.

**2018** MELHOR PÔSTER na área de Genética e Biotecnologia, XLI Semana de Biologia e XXIV Mostra de Produção Científica da UFJF

**2019** MENÇÃO HONROSA como segundo lugar, III Encontro de Morfofisiologia - Universidade Federal de São João Del-Rei

## APÊNDICE C

### Resumos publicados em anais de congressos

**ZANETTE, R. S. S.**; VIDIGAL, L. M.; FAYER, L. B. A.; MATOS, E. M.; OLIVEIRA, E. R.; BRANDAO, H. M.; MUNK, M. CITOCOMPABILIDADE DE CÉLULAS-TRONCO DE POLPA DENTÁRIA HUMANA EXPOSTAS ÀS NANOFIBRAS DE CELULOSE. In: II Encontro de Morfofisiologia: Novas Abordagens Diagnósticas e Terapêuticas em Ciências Morfofuncionais, 2019, São João Del Rei. Anais do III Encontro de Morfofisiologia, 2019. v. I. p. 27-28.

**ZANETTE, R. S. S.**; FAYER, L. B. A.; AMARAL, DANIELLE LUCIANA AURORA SOARES DO; OLIVEIRA, E. R.; DE ALMEIDA, CAMILA GUIMARAES; OLIVEIRA, C. R.; BRANDAO, H. M.; MUNK, M. The effect of cotton cellulose nanofiber in human mesenchymal stem cells growth and gene expression. In: GeneTime Conference 2018, 2018, Belo Horizonte. Livro de resumos, 2018.

**ZANETTE, R. S. S.**; ALMEIDA, L. B. F.; DE ALMEIDA, CAMILA GUIMARAES; OLIVEIRA, C. R.; BRANDAO, H. M.; MUNK, MICHELE. ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE IN VITRO DAS NANOFIBRAS DE CELULOSE DE ALGODÃO. In: IX Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio, 2017, São Carlos. ANAIS DO IX WORKSHOP DE NANOTECNOLOGIA APLICADA AO AGRONEGÓCIO, 2017.

**ZANETTE, R. S. S.**; ALMEIDA, L. B. F.; DE SOUZA, NELSON LUÍS GONÇALVES DIA; DE ALMEIDA, CAMILA GUIMARAES; DE OLIVEIRA, LUIZ FERNANDO CAPPAS; OLIVEIRA, C. R.; DE MELLO BRANDÃO, HUMBERTO; MUNK, MICHELE. PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E CITOCOMPATIBILIDADE DE FILMES NANOCOMPÓSITOS DE QUITOSNA E NANOFIBRAS DE CELULOSE. In: IX Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio, 2017, São Carlos. ANAIS DO IX WORKSHOP DE NANOTECNOLOGIA APLICADA AO AGRONEGÓCIO, 2017.

**ZANETTE, R. S. S.**; ALMEIDA, L. B. F.; BRANDAO, H. M.; MARANDUBA, C. M. C.; MUNK, M. Avaliação in vitro da biocompatibilidade de nanofibras de celulose em cultura de células-tronco da polpa dentária humana. In: I I SIMPÓSIO NACIONAL DE NANOBIOTECNOLOGIA, II Workshop de Nanobiotecnologia da UFMG - Avanços e Aplicações, 2016, Belo Horizonte. Livro de resumos. 2016.