

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

LEONARA BEATRIZ FAYER DE ALMEIDA

Caracterização físico-química e avaliação da citocompatibilidade do nanobiocompósito de quitosana e nanofibra de celulose em fibroblastos e queratinócitos humanos cultivados *in vitro*

Tese

Juiz de Fora – MG
2023

LEONARA BEATRIZ FAYER DE ALMEIDA

Caracterização físico-química e avaliação da citocompatibilidade do nanobiocompósito de quitosana e nanofibra de celulose em fibroblastos e queratinócitos humanos cultivados *in vitro*

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Michele Munk Pereira
Coorientador: Dr. Humberto de Mello Brandão

Juiz de Fora
2023

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

Fayer de Almeida, Leonara Beatriz.

Caracterização físico-química e avaliação da citocompatibilidade do nanobiocompósito de quitosana e nanofibra de celulose em fibroblastos e queratinócitos humanos cultivados in vitro / Leonara Beatriz Fayer de Almeida. -- 2023.

108 f.

Orientadora: Michele Munk Pereira

Coorientador: Humberto de Mello Brandão

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2023.

1. célula epidérmica . 2. célula dérmica. 3. nanomaterial. 4. biopolímero. 5. engenharia tecidual. I. Munk Pereira, Michele , orient. II. de Mello Brandão, Humberto, coorient. III. Título.

Leonara Beatriz Fayer de Almeida

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA CITOCOMPATIBILIDADE DO
NANOBIOCOMPÓSITO DE QUITOSANA E NANOFIBRA DE CELULOSE EM FIBROBLASTOS
E QUERATINÓCITOS HUMANOS CULTIVADOS *IN VITRO***

Tese apresentada ao
Programa de Pós-
graduação em
Ciências Biológicas
da Universidade
Federal de Juiz de
Fora como requisito
parcial à obtenção do
título de Mestre em
Ciências Biológicas.
Área de
concentração:
Genética &
Biotecnologia.

Aprovada em 31 de agosto de 2023

BANCA EXAMINADORA

Profª. Drª. Michele Munk Pereira - Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profª. Drª. Priscila de Faria Pinto
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profª. Drª. Erika Lorena Fonseca Costa de Alvarenga
Universidade Federal de São João del-Rey

Profª. Drª. Rebecca Vasconcellos Botelho de Medeiros

Universidade Federal de Ouro Preto

Juiz de Fora, 14/08/2023.



Documento assinado eletronicamente por **Michele Munk Pereira, Professor(a)**, em 01/09/2023, às 07:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Magno da Costa Maranduba, Professor(a)**, em 01/09/2023, às 10:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rebecca Vasconcellos Botelho de Medeiros, Usuário Externo**, em 02/09/2023, às 10:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Priscila de Faria Pinto, Professor(a)**, em 05/09/2023, às 13:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Erika Lorena Fonseca Costa de Alvarenga, Usuário Externo**, em 06/09/2023, às 14:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1404849** e o código CRC **EAEFACFE**.

Aos meus pais,
Maria de Lourdes e Adailton.

AGRADECIMENTOS

Agradeço pela oportunidade e aperfeiçoamento, ao programa de pós-graduação em Ciência Biológicas da UFJF e Pró-reitoria de pesquisa da UFJF.

As agências de fomento que possibilitaram a realização desse estudo: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - 433461/2018-7 e 303148/2021-7), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, (FAPEMIG - APQ-02342-17) e Rede Agronano.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de pesquisa ao longo desse período e recente reajuste.

Aos Laboratórios de Nanotecnologia e Nanotoxicologia, Laboratório de Genética, Laboratório GENETEC, Laboratório Integrado de Pesquisa da PPGCBio Laboratório de Nanotecnologia da EMBRAPA e Laboratório de Química, os quais foram essenciais para a obtenção dos resultados desse estudo e capacitação profissional.

À minha orientadora Michele Munk, professora que admiro como pesquisadora e orientadora, agradeço por todo conhecimento compartilhado comigo nesses 7 anos de trabalho. Com as oportunidades ofertadas pude experienciar projetos que contribuíram imensamente para a minha formação e capacitação.

Ao meu coorientador Humberto Brandão, sou grata pelas oportunidades, disposição e ajuda em diferentes momentos dessa minha trajetória na pós-graduação.

Aos técnicos de laboratório Silvioney, Bárbara e Rogério pela disponibilidade e gentileza ao longo desse período.

Às minhas amigas de laboratório Duda e Rafa que fizeram a rotina de cultivo e experimentos serem divertidas e em momentos de impasses traçando juntas novas estratégias.

Aos meus colegas dos laboratórios Elyabe, Juliana, Rebecca, Camila e Laís pela cooperação, esclarecimento e troca de ideias.

Aos alunos de iniciação científica que tive o prazer de compartilhar meu conhecimento, bem como pela ajuda e boa vontade em contribuir com esse estudo.

Agradeço em especial àqueles que estiveram nos bastidores do desenvolvimento desse estudo. Primeiramente aos meus pais, Maria de Lourdes e Adailton, por não medirem esforços e apoio durante essa caminhada, são meus exemplos de perseverança e dedicação. Aos meus queridos, Nathália, Beto e Pedro pelo sentimento de irmandade que nos uni, conselhos, apoio incondicional e carinho. Ao meu amor, Paulinho, que me encoraja a seguir meus sonhos, apoio nos momentos difíceis e cumplicidade nas minhas escolhas. A Deus, por todas as bênçãos recebidas.

*The more we know, the more we
realize there is to know.*

Jennifer Doudna, 2020

Resumo

A pele possui um mecanismo natural de autorreparo em caso de lesões, contudo, em alguns casos, o processo de cicatrização pode ser comprometido, requerendo cuidados para auxiliar a reparação do órgão. Terapias reparativas têm sido objeto de estudos para o tratamento de lesões e os biopolímeros quitosana e nanofibra de celulose (NFC) se destacam por apresentarem propriedades biodegradáveis, antimicrobianas e características mecânicas semelhantes à da matriz extracelular natural. No entanto, até o momento, não há relatos sobre o uso combinado da quitosana e NFC extraídas do algodão na produção de um nanobiocompósito para aplicação na medicina reparativa da pele. Assim, o objetivo desse estudo foi realizar a caracterização físico-químico e avaliar a citocompatibilidade do nanobiocompósito de quitosana e NFC de algodão em fibroblastos e queratinócitos humanos cultivados *in vitro*. Inicialmente, foram realizadas avaliações de homogeneidade, estabilidade, rugosidade, porosidade e propriedades mecânicas do nanobiocompósitos. Posteriormente, foram realizados os ensaios *in vitro* de microscopia de luz, citometria de fluxo, MTT, Alamar Blue, cicatrização e produção de colágeno. Os resultados demonstraram que a incorporação da NFC ao filme de quitosana, formando um nanobiocompósito, resultou em um filme com melhores características como taxa de degradação, intumescimento, hidrofiliabilidade e rugosidade, otimizando sua aplicação na realização de testes *in vitro*. A viabilidade celular, cicatrização e produção de colágeno por fibroblastos e queratinócitos humanos indicam a citocompatibilidade do nanobiocomposito em cultura *in vitro*. Baseado nos resultados, o nanobiocompósito de quitosana com NFC apresenta potencial para aplicação futura em terapias reparativas para o tratamento de lesão na pele, bem como um modelo de teste de dermocosméticos.

Palavra-chave: célula epidérmica, célula dérmica, biopolímeros, nanomaterial, filme, reparo da pele.

Abstract

The skin has a natural self-repair mechanism in the event of injuries, however, in some cases, the healing process may be compromised, requiring care to help repair the organ. Reparative therapies have been the subject of studies for the treatment of injuries and the biopolymers chitosan and cellulose nanofiber (NFC) stand out for presenting biodegradable, antimicrobial properties and mechanical characteristics similar to those of the natural extracellular matrix. However, to date, there are no reports on the combined use of chitosan and NFC extracted from cotton in the production of a nanobiocomposite for application in skin reparative medicine. Thus, the objective of this study was to perform the physicochemical characterization and evaluate the cytocompatibility of the chitosan and cotton NFC nanobiocomposite in human fibroblasts and keratinocytes *in vitro*. At first, evaluations of homogeneity, stability, roughness, porosity and mechanical properties of the nanobiocomposites were carried out. Subsequently, *in vitro* light microscopy, flow cytometry, MTT, Alamar Blue, healing and collagen production tests were carried out. The results demonstrated that the incorporation of NFC into the chitosan film, forming a nanobiocomposite, resulted in a film with better characteristics such as degradation rate, swelling, hydrophilicity and roughness, optimizing its application in *in vitro* tests. Cell viability, healing and collagen production by human fibroblasts and keratinocytes indicate the cytocompatibility of the nanobiocomposite in *in vitro* culture. Based on the results, the chitosan nanobiocomposite with NFC has potential for future application in reparative therapies for the treatment of skin injuries, as well as a test model for dermocosmetics.

Keywords: epidermal cell, dermal cell, biopolymers, nanomaterial, film, skin repair.

Lista de Figura

Figura 1 - Esquema da organização e constituição da pele humana. Imagem adaptada (MACNEIL, S., 2007).....	21
Figura 2 – A subdivisão das camadas da epiderme. No topo da camada basal está o estrato espinhoso, os queratinócitos começam a se diferenciar e inicia-se a formação de corpos lamelares, contendo os precursores dos lipídios de barreira. Na próxima camada viável, o estrato granuloso, a síntese desses lipídios precursores é intensificada e a concentração de corpos lamelares aumenta. Na camada córnea é ocorre a deposição de queratina. Imagem adaptada (BOUWSTRA <i>et al.</i> , 2023).....	23
Figura 3 - Fases do processo de cicatrização de feridas. Hemostasia: a ativação da fibrina, responsável pela formação do coágulo. Inflamação: células danificadas são fagocitadas e fatores são liberados para promover migração e proliferação celular. Proliferação: células como fibroblastos, miofibroblastos e células-tronco da pele atingem o local da ferida e formam uma matriz extracelular provisória. Remodelação: as fibras de colágeno são realinhadas e os resíduos são removidos. Imagem adaptada de (SIERRA-SÁNCHEZ <i>et al.</i> , 2021).....	30
Figura 4 - Componentes e conceito fundamental de engenharia de tecidos. Imagem adaptada de (SCARRITT; MURDOCK; BADYLAK, 2019; SULTANA, 2018).	32
Figura 5 - Exemplificação das diferentes morfologias estruturais que os <i>scaffolds</i> podem apresentar. Como exemplo de <i>scaffolds</i> 2D há as membranas, filmes, materiais fibrosos ou sólidos; e em <i>scaffolds</i> 3D encontra-se estruturas de macro à micro poros, bem como os hidrogéis que tem maior teor de água em sua constituição. Imagem ilustrativas provenientes do <i>Biorender</i>	33
Figura 6 - Ilustração do microambiente bioativo e suas possíveis interações com a célula. A rigidez, mecânica, porosidade, rugosidade, degradação são estímulos que influenciam a diferentes processos celulares (adesão, morfologia, proliferação, migração e diferenciação). Imagem adaptada (GAHARWAR; SINGH; KHADEMHOSEINI, 2020).....	36
Figura 7 - Imagem representativa da estrutura da quitosana, os grupos funcionais mencionados no texto acima estão circulado em azul.	43
Figura 8 - Modelo esquemático de arranjo de celulose, hemicelulose e lignina em fontes lignocelulósicas (STRNAD, 2023).	46
Figura 9 - Ligações de hidrogênio intermoleculares (----) e intramoleculares (---) na estrutura molecular da celulose (STRNAD, 2023).....	47
Figura 10 – Esquema da síntese e reticulação do filme de quitosana e nanobiocompósito de quitosana e NFC (10, 100, 1000 µg/mL). Ilustração produzida no <i>Biorender</i>	52
Figura 11 - Imagens do filme de quitosana e dos nanobiocompósitos de quitosana com diferentes concentrações de nanofibras de celulose NFC em placas de petri não tratadas.	61
Figura 12 - Imagem da microscopia Raman das amostras do filme de quitosana (a), nanobiocompósito de quitosana com 10 µg/mL de NFC (b), 100 µg/mL de NFC (c) e 1.000 µg/mL de NFC (d). As imagens na coluna do lado esquerdo são das imagens geradas por informação espacial e do espectro e as imagens do lado direito são do filme/nanobiocompósito e os pontos marcados (círculo verde) sobre a amostra de onde o laser focou para mapear toda área de interesse.	62
Figura 13 - Taxas de intumescência (A) e degradação (B) das amostras do filme de quitosana, nanobiocompósito de quitosana com 10, 100 e 1.000 µg/mL. As médias	

foram comparadas por ANOVA seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$ foram considerados significativos, $n = 9$ por grupo.	63
Figura 14 - Imagens similares a uma reconstrução 3D produzidas através do software Zen (Zeiss) da topografia do filme de quitosana (A) e nanobiocompósitos contendo 10 $\mu\text{g/mL}$ de NFC (B), 100 $\mu\text{g/mL}$ de NFC (C) e 1.000 $\mu\text{g/mL}$ de NFC(D). As dimensões da área observada são 1000 μm no eixo y e 1400 μm no eixo x.	65
Figura 15 - Imagens de Microscopia de Força Atômica obtidas da avaliação do nanobiocompósito de quitosana contendo 10 $\mu\text{g/mL}$ de nanofibras de celulose (NFC) (A) e com 1.000 $\mu\text{g/mL}$ de NFC (B).	65
Figura 16 - Imagem representativa da morfologia dos fibroblastos após exposição por 24 h (A, B, C, D) e 48 h (F, G, H, I) em filme e nanobiocompósitos com diferentes concentrações de NFC. A e F – controle; B e G – quitosana; C e H – quitosana com 100 $\mu\text{g/mL}$ NFC; D e I – quitosana com 1.000 $\mu\text{g/mL}$ NFC. Ampliação 200x e barra de escala = 50 μm . Resultado da área celular (μm^2) medida pelo software <i>ImageJ</i> , após 24 h (E) e 48 h (J) de exposição a diferentes concentrações de CNF. Cada valor representa a média \pm (SEM) de três experimentos independentes, as médias foram comparadas por ANOVA post hoc Dunnett e valores de $p < 0,05$ foram estatisticamente significativos, $n = 100$	67
Figura 17 - Imagem representativa da morfologia dos queratinócitos após exposição por 24 h (A, B, C, D) e 48 h (F, G, H, I) em filme de quitosana e nanobiocompósitos de quitosana com diferentes concentrações de NFC. A e F – controle; B e G – quitosana; C e H – quitosana com 100 $\mu\text{g/mL}$ NFC; D e I – quitosana com 1.000 $\mu\text{g/mL}$ NFC. Ampliação 200x e barra de escala = 50 μm . Resultado da área celular (μm^2) medida pelo software <i>ImageJ</i> , após 24 h (E) e 48 h (J) de exposição a diferentes concentrações de CNF. Cada valor representa a média \pm (SEM) de três experimentos independentes, as médias foram comparadas por ANOVA post hoc Dunnett e valores de $p < 0,05$ foram estatisticamente significativos.	68
Figura 18 - Com base no ensaio de citometria de fluxo, a relação entre dados de dispersão frontal (FSC) e dispersão lateral (SSC) foram analisadas em fibroblastos durante 24 h (A,C) e 48 h (B,D) de exposição ao filme de quitosana e aos nanobiocompósitos de quitosana e NFC (100 e 1.000 $\mu\text{g/mL}$). Cada valor representa a média \pm (SEM) de três experimentos independentes, em cada experimento foi analisado 10.000 eventos, as médias foram comparadas por ANOVA post hoc Dunnett e valores de $p < 0,05$ foram estatisticamente significativos.	70
Figura 19 - Com base no ensaio de citometria de fluxo, a relação entre dados de dispersão frontal (FSC) e dispersão lateral (SSC) foram analisadas de queratinócitos durante 24 h (A,C) e 48 h (B,D) de exposição ao filme de quitosana e aos nanobiocompósitos de quitosana e NFC (100 e 1.000 $\mu\text{g/mL}$). Cada valor representa a média \pm (SEM) de três experimentos independentes, em cada experimento foi analisado 10.000 eventos, as médias foram comparadas por ANOVA post hoc Dunnett e valores de $p < 0,05$ foram estatisticamente significativos.	70
Figura 20 - Resultados da marcação com iodeto de propídio para avaliar a integridade da membrana celular por citometria de fluxo de fibroblastos após 24 h (A) e 48 h (B) de exposição. Cada valor representa a média \pm (SEM) de três experimentos independentes, em cada experimento foi analisado 10.000 eventos, as médias foram comparadas por ANOVA post hoc Dunnett e valores de $p < 0,05$ foram estatisticamente significativos.	71
Figura 21 - Resultados da marcação com iodeto de propídio para avaliar a integridade da membrana celular por citometria de fluxo de queratinócitos após 24 h (A) e 48 h (B) de exposição. Cada valor representa a média \pm (SEM) de três experimentos	

independentes, em cada experimento foi analisado 10.000 eventos, as médias foram comparadas por ANOVA post hoc Dunnett e valores de $p < 0,05$ foram estatisticamente significativos.	71
Figura 22 - Resultados do ensaio de MTT de fibroblastos durante 24 h (A) e 48 h (B) de exposição aos filmes de quitosana e nanobiocompósito de quitosana e NFC (100 e 1.000 $\mu\text{g/mL}$). Cada valor representa a média \pm (SEM) de três experimentos independentes, as médias foram comparadas por ANOVA post hoc Dunnett e valores de $p < 0,05$ foram estatisticamente significativos.	72
Figura 23 - Resultados do ensaio de MTT de queratinócitos durante 24 h (A) e 48 h (B) de exposição aos filmes de quitosana e nanobiocompósito de quitosana e NFC (100 e 1.000 $\mu\text{g/mL}$). Cada valor representa a média \pm (SEM) de três experimentos independentes, as médias foram comparadas por ANOVA post hoc Dunnett e valores de $p < 0,05$ foram estatisticamente significativos.	72
Figura 24 - Resultados do ensaio de alamar blue de fibroblasto durante 24 h (A) e 48 h (B) de exposição aos filmes de quitosana e nanobiocompósito de quitosana e NFC (100 e 1.000 $\mu\text{g/mL}$). Cada valor representa a média \pm (SEM) de três experimentos independentes, as médias foram comparadas por ANOVA post hoc Dunnett e valores de $p < 0,05$ foram estatisticamente significativos.	73
Figura 25 - Resultados do ensaio de alamar blue de queratinócitos durante 24 h (A) e 48 h (B) de exposição aos filmes de quitosana e nanobiocompósito de quitosana e NFC (100 e 1.000 $\mu\text{g/mL}$). Cada valor representa a média \pm (SEM) de três experimentos independentes, as médias foram comparadas por ANOVA post hoc Dunnett e valores de $p < 0,05$ foram estatisticamente significativos.	73
Figura 26 - Imagens representativas do ensaio de cicatrização com fibroblastos até o tempo de 72 h quando se observa fechamento da cicatriz. (A) Controle, (B) filme de quitosana e (C) nanobiocompósito de 1.000 $\mu\text{g/mL}$ de NFC. As setas mostram o rastro da ponteira no nanobiocompósito de 1.000 $\mu\text{g/mL}$ de NFC. Ampliação 40x e barra de escala = 100 μm	74
Figura 27 - Imagens representativas do ensaio de cicatrização com queratinócito até o tempo de 48 h quando se observa fechamento da cicatriz. (A) Controle, (B) filme de quitosana e (C) nanobiocompósito de 1.000 $\mu\text{g/mL}$ de NFC. As setas mostram o rastro da ponteira no nanobiocompósito de 1.000 $\mu\text{g/mL}$ de NFC. Ampliação 100x e barra de escala = 100 μm	75
Figura 28 - Ensaio de quantificação de colágeno utilizando o corante Direct Red. (A) Curva padrão de colágeno produzida a partir de colágeno do tipo I proveniente da cauda de ratos Wistar dissolvida em ácido acético pelo corante Direct Red. Linha tracejada é referente ao intervalo de confiança (5%). (B) Quantificação de colágeno a partir dos valores de absorbância aplicados na fórmula de regressão linear ($y = 0,06063X - 0,01524$) de fibroblastos após 48 h de exposição. Cada valor representa a média \pm (SEM) de três experimentos independentes, as médias foram comparadas por ANOVA post hoc Dunnett e valores de $p < 0,05$ foram estatisticamente significativos.	76

Lista de Tabela

Tabela 1 - Classificação das lesões de acordo espessura, complexidade, idade e origem. Imagem adaptada (PATRULEA <i>et al.</i> , 2015).....	27
Tabela 2 - As vantagens e desvantagens dos polímeros naturais e sintéticos (SULTANA, 2018).	41
Tabela 3 - Os resultados dos ensaios de porosidade, ângulo de contato e pH dos nanobiocompósitos de quitosana com diferentes concentrações de NFC, seguem as médias seguidas pelo desvio padrão. As médias foram comparadas por ANOVA seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$ foram considerados significativos, $n=9$	64
Tabela 4 - Propriedades mecânicas do filme de quitosana e dos nanobiocompósitos de com diferentes concentrações de NFC. As médias foram comparadas por ANOVA seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$ foram considerados significativos.	66
Tabela 5 - Descrição da relação SSC x FSC de cada quadrante baseados na análise de citometria de fluxo.	69

Lista de Abreviação/Siglas

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
AMPK	Proteína Quinase ativada por Monofosfato de Adenosina
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
DATASUS	Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
GAGs	Glicosaminoglicanos
GHS	Sistema Global Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos
h	Horas
HaCaT	Queratinócito
MEC	Matriz Extracelular
MFA	Microscopia de Força Atômica
min	Minutos
mm	Milímetros
MMPs	Metaloproteinases de Matriz
NFC	Nanofibra de Celulose
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Solução salina tamponada com D-fosfato
PCL	Policaprolactona
PEG	Poli(etil)enoglicol
PGA	Poliglicólido
PLA	Polilactido
PU	Poliuretano
RENAMA	Rede Nacional de Métodos Alternativos
RhE (sigla inglês)	Epiderme humana reconstruída
SFB	Soro fetal bovino
UV	Ultravioleta

Sumário

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Biologia da Pele	21
2.1.1 Lesões na Pele	26
2.1.2 Cicatrização	29
2.2 Engenharia Tecidual	31
2.2.1 Terapias Reparativas da Pele	37
2.2.2 Biomateriais	39
2.2.3 Quitosana	42
2.2.4 Nanofibra de Celulose	46
3. HIPÓTESE	50
4. OBJETIVO	50
4.1 Objetivo Geral	50
4.2 Objetivo Específico	50
5. METODOLOGIA	51
5.1 Produção e caracterização do nanobiocompósito de quitosana com nanofibra de celulose	51
5.1.1 Síntese do nanobiocompósito de quitosana com nanofibra de celulose	51
5.1.2 Análise por mapeamento RAMAN	52
5.1.3 Análise do pH	52
5.1.4 Ensaio de intumescência	53
5.1.5 Ensaio de degradação	53
5.1.6 Avaliação do ângulo de contato	54
5.1.7 Análise da topografia por microscopia invertida 3D	54
5.1.8 Análise da nanotopografia por microscopia de força atômica (MFA)	54
5.1.9 Análise das propriedades mecânicas	55
5.1.10 Análise da Porosidade	55
5.2 Avaliação da citocompatibilidade de fibroblastos e queratinócito cultivados em nanobiocompósitos de quitosana e nanofibra de celulose.	56
5.2.1 Cultivo <i>in vitro</i> de fibroblastos e queratinócitos humanos no nanobiocompósitos de quitosana e nanofibra de celulose	56
5.2.2 Morfologia e área celular	56
5.2.3 Ensaio de citometria de fluxo por marcação com Iodeto de Propídio	57
5.2.4 Ensaio de MTT	57
5.2.5 Ensaio de <i>Alamar Blue</i>	58
5.2.6 Ensaio de cicatrização <i>in vitro</i> (<i>Wound Healing</i>)	58
5.2.7 Avaliação da produção de colágeno em fibroblastos	59
5.3 Análises Estatísticas	59
6. RESULTADOS	61
6.1 Caracterização físico-química do filme de quitosana e dos nanobiocompósitos de quitosana e nanofibra de celulose	61
6.2 Avaliação da citocompatibilidade do nanocompósito de quitosana e nanofibra de celulose em fibroblastos e queratinócitos humanos cultivados <i>in vitro</i>	66
7. DISCUSSÃO	77
8. CONCLUSÃO	85

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	86
Anexo	97
Resumos apresentados em congressos.....	97
Prêmios.....	98
Participação em eventos, congressos.....	98
Publicação de artigo.....	99

1. INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano (representa 15% do peso corporal), atuando como uma barreira protetora primária contra agentes externos, como calor, luz, agentes químicos e microrganismos (LIANG *et al.*, 2022). Portanto, devido ao seu alto grau de exposição ao ambiente e por ser caracterizado como um tecido elástico e macio, a pele pode ser facilmente afetada (XIA *et al.*, 2022). A lesão é definida com uma ruptura da estrutura e função desse tecido, podendo ser provocada por traumas, queimaduras, infecções e neoplasias (HORUE *et al.*, 2023). A pele apresenta mecanismo de autorreparo espontâneo visando restabelecer a estrutura e função. Contudo, cuidados são necessários com a lesão de modo a evitar infecções, ressecamento, dor e cicatriz. O atendimento em redes hospitalares para a cura de lesões agudas e crônicas apresentam alta demanda. Baseado no DATA SUS, em 2022 o número de internações por doenças da pele e do tecido subcutâneo, bem como lesões por consequências externas (exemplo envenenamento, efeitos tóxicos, queimaduras, corrosões, traumas, entre outros) atingiram 1.613.539 internações, somatizando um valor de 1,8 bilhões. Lesões crônicas que não seguem processo normal de cicatrização, que acomete principalmente pacientes diabéticos e com patologias cardiovasculares, apresentam altas taxas de hospitalizações, gerando implicações sociais e econômicas (ALMEIDA *et al.*, 2021).

A medicina regenerativa fornece terapias reparativas de lesões que visam acelerar e promover a cicatrização, além de reparar a pele à sua função primitiva, restabelecendo os tecidos danificados. A engenharia de tecido visa contribuir com novas possibilidades em terapias reparativas, como os *scaffolds*, hidrogel e filmes nanobiocompósitos contendo biomateriais com propriedades biodegradáveis, antimicrobianas, imunomoduladoras, podendo conter células epidérmicas ou dérmicas (autólogos ou alogênicos) facilitando o processo de cicatrização e reparo da pele (KAMOLZ *et al.*, 2022). Outra alternativa são os curativos ativos (método *in situ*) constituídos de biomateriais com propriedades que aceleram o processo de cicatrização, absorção do exsudato e proteção contra patógenos (ELANGWE *et al.*, 2022). Dessa forma, diferentes biomateriais e combinações desses, além de uma diversidade de tipo de estruturas, são investigadas para viabilizar possibilidades eficientes na cicatrização de lesões.

Os polissacarídeos são um grupo de biopolímeros que se destacam pela presença de ligações glicosídicas (ligação fundamental em diferentes moléculas biológicas), abundantes na biosfera, podendo ser extraídas de uma variedade de fontes, como plantas, algas, bactérias e fungos. (ALVEN; ADERIBIGBE, 2020). Polissacarídeos, como quitosana e celulose (os mais abundantes da natureza) podem ser aplicados na medicina regenerativa devido às suas propriedades físico-químicas, controláveis, solubilidade, não antigenicidade, propriedades antimicrobianas e características mecânicas semelhantes às da matriz extracelular (MEC) (MADNI *et al.*, 2021; SAHANA; REKHA, 2018a; WANG *et al.*, 2020). A quitosana exibe unidade de N-acetil-D-glucosamina similares aos glicosaminoglicanos (GAGs) presentes na MEC (ZARRINTAJ *et al.*, 2023). Porém, os filmes compostos de quitosana tem propriedades mecânicas fracas e são instáveis (QIN *et al.*, 2023; WANG *et al.*, 2020). A incorporação de nanofibras de celulose (NFC) de algodão pode aumentar a estabilidade e resistência mecânica desses filmes. Além disso, a NFC exibe uma rede semelhante às fibrilas de colágeno da MEC, com tamanhos de fibra que promovem a distribuição de poros homogêneos, alta cristalinidade e área de superficial (LUO *et al.*, 2019; PINA; OLIVEIRA; REIS, 2015). A NFC e a quitosana possuem potencial de interação molecular visto que a quitosana é um polímero policatiônico e seus grupos acetamidas e hidroxila são susceptíveis a substituição nucleofílica (PATRULEA *et al.*, 2015), além das interações eletrostáticas com a celulose, polissacarídeo aniônico (ALVEN; ADERIBIGBE, 2020; CROISIER; JÉRÔME, 2013). Desse modo, a associação de ambos os materiais pode produzir um nanobiocompósito com propriedades importantes para aplicações biomédicas.

Dentre as aplicações biomédicas há muitas evidências do potencial de ambos biopolímeros na medicina regenerativa para o tratamento de lesões (SAHANA; REKHA, 2018b). A quitosana demonstrou a capacidade de iniciar a cascata de cicatrização, exibir desempenho hemostático, promover infiltração de neutrófilos, migração de macrófagos, aumentar a migração de fibroblastos e conduzir a deposição de colágeno em estudo realizado com camundongos diabéticos (ZARRINTAJ *et al.*, 2023). Enquanto, evidências mostram que a celulose promove a cicatrização de feridas nos estágios iniciais e regular a perda de água trans epidérmica (ZARRINTAJ *et al.*, 2023). Consta também que a celulose tem capacidade de acelerar o processo de cicatrização de feridas através da liberação

de fatores de crescimento e assim, promovem a migração e proliferação de fibroblastos, e inibem a proliferação de bactérias na ferida (ALVEN; ADERIBIGBE, 2020). Modelos comerciais de curativos contendo celulose extraídas de bactérias mimetizam a MEC promovendo o aumento da epitelização (recobrimento da lesão na superfície epitelial durante a fase proliferativa) (HORUE *et al.*, 2023). No entanto, não há relatos na literatura da associação das NFC provenientes de algodão e quitosana aplicados ao cultivo de células da pele humana. Além disso, materiais em escala nanométrica podem apresentar risco citotóxico (NAQVI; KUMAR; GOPINATH, 2018; YANG, W. *et al.*, 2021).

Portanto, estudos de segurança são imprescindíveis para garantir o desenvolvimento seguro de novos biomateriais que incorporem nanotecnologia. Os fibroblastos são as células mais abundantes na derme e são responsáveis pela produção de colágeno, principal constituinte da MEC. Os queratinócitos são as principais células da epiderme formando um tecido com células justapostas e camadas estratificadas, desempenhando uma função de barreira com o ambiente externo (CASTAÑO *et al.*, 2018). Portanto, esses dois tipos celulares são modelos *in vitro* representativos da pele humana.

Atributos presente nos biomateriais como diversidade de procedências, acessibilidade, baixo custo de obtenção e síntese, adesão celular, proliferação, migração celular, desempenho de absorção de exsudato, notáveis propriedade físico-químicas e mecânicas são avaliados para se tornarem candidatos em potencial para aplicação na cicatrização de feridas (ZARRINTAJ *et al.*, 2023). Diante das características abordadas anteriormente, a quitosana e celulose proveniente do algodão, apresentam potencial para o processo de cicatrização de lesões, assim como aplicação na medicina regenerativa. Assim, o objetivo desse estudo é realizar a caracterização químico-física e avaliar a citocompatibilidade do nanobiocompósito de quitosana e NFC de algodão utilizando fibroblastos e queratinócitos humanos cultivados *in vitro*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biologia da Pele

A pele é essencial para a sobrevivência do organismo sendo um órgão de proteção para os outros órgãos e tecidos, evitando a desidratação, regulando a temperatura corpórea e impedindo a entrada de patógenos. A pele é dividida em três camadas denominadas de epiderme, derme e tecido subcutâneo (Figura 1). Há os apêndices da pele, o qual compreende nos sensores de temperatura, glândula sudorípara e sebácea, filículo piloso e unha (PHANTHONG *et al.*, 2018).

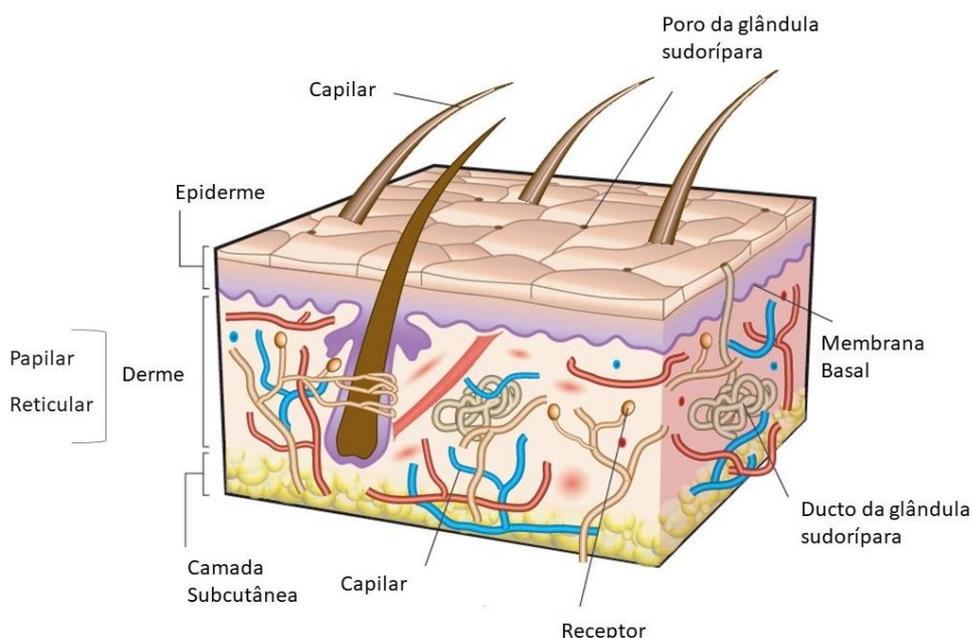


Figura 1 - Esquema da organização e constituição da pele humana. Imagem adaptada (MACNEIL, S., 2007)

A epiderme abrange a camada mais externa do tecido, em humanos tem espessura entre 50 – 150 μm (Pissarenko, 2019), é uma fina camada do tecido epitelial de revestimento estratificado pavimentoso e queratinizado (AARESTRUP, 2012). Por ser a mais externa age como uma barreira químico-física e a disposição das camadas justapostas e unidas evitam a perda de água. Nela encontramos diferentes populações de células, tais como: os queratinócitos, as células de

Langerhans, as células de Merkel e os melanócitos. Os queratinócitos apresentam 80% das células, logo são as mais abundantes e responsáveis pela estrutura estratificada, formando camadas na epiderme de acordo com sua diferenciação, apresentando monomorfismo dentro de cada camada. Assim, se dispõem em monocamadas de células cúbicas às cilíndricas. A constante renovação e crescimento ocorre em suas subcamadas, onde as células-tronco no estrato interno basal se diferenciam em queratinócitos, que migram para o exterior e eventualmente decaem como corneócitos, formando a camada córnea, uma camada queratinizada resistente (CASTAÑO *et al.*, 2018).

A epiderme é subdividida em: basal (ou germinativa), média, granular e córnea (Figura 2) (FENNER; CLARK, 2016). Os queratinócitos da camada basal são programados para alcançar a superfície da pele, nesse processo que dura aproximadamente 4 semanas há mudanças na morfologia, produção de diferentes queratinas, fator de crescimento e citocinas (BOUWSTRA *et al.*, 2023). A camada basal é mais profunda, sendo composta de células-fonte que levam pouco mais de um mês para cumprir sua meia-vida útil e descamar na superfície externa. As células dessa camada ao passar pelo processo de divisão celular, a mitose, seguem em direção a superfície originando a camada média (conhecidas por espinhosa ou malpighiana). Nessa camada as células apresentam citoplasma volumoso e a se diferenciar. A camada seguinte é área na qual se dá o amadurecimento dos grânulos de queratina. A quantidade de queratinócitos granulares e de grânulos em seu citoplasma é proporcional à espessura da queratina da região anatômica da pele observada (FENNER; CLARK, 2016). Durante o amadurecimento proteico surge no interior dos grânulos uma matriz interfibrilar, que une várias fibrilas de queratina inicialmente maleáveis e delgadas. Na porção superficial da camada granular, inicia-se o processo de apoptose celular através da atividade enzimática, matriz sofre dissolução, liberando as fibrilas que se dispersam na superfície corporal formando camadas de queratina livre, horizontais, seguindo a polarização epitelial. A camada córnea é onde a deposição de queratina, nela pode conter ou não restos celulares aprisionados (FENNER; CLARK, 2016). Os queratinócitos são conectados principalmente por desmossomos e junções ocludentes (BOUWSTRA *et al.*, 2023).

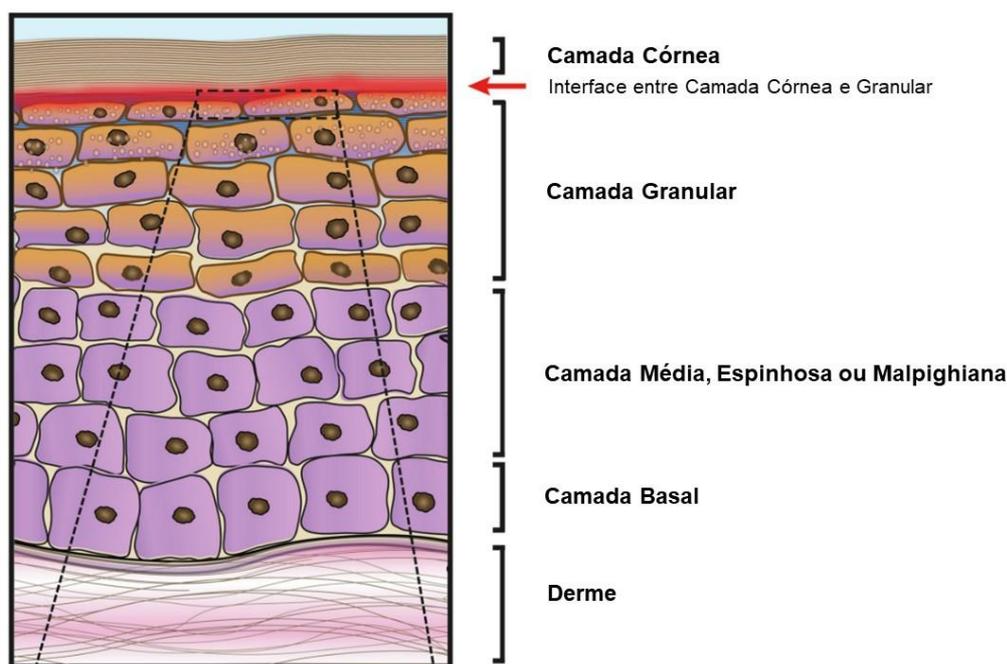


Figura 2 – A subdivisão das camadas da epiderme. No topo da camada basal está o estrato espinhoso, os queratinócitos começam a se diferenciar e inicia-se a formação de corpos lamelares, contendo os precursores dos lipídios de barreira. Na próxima camada viável, o estrato granuloso, a síntese desses lipídios precursores é intensificada e a concentração de corpos lamelares aumenta. Na camada córnea é ocorre a deposição de queratina. Imagem adaptada (BOUWSTRA *et al.*, 2023).

Além dos queratinócitos presente na epiderme, há os melanócitos que constituem cerca de 10% das células na região basal. São localizados na camada basal, no entanto, seus dendritos atingem queratinócitos na camada média e participam na produção de melanina, pigmento que protege os queratinócitos dos efeitos nocivos do raio ultravioleta (UV), absorvendo-os. Os melanócitos tem origem da diferenciação de células que entram em proliferação próxima à crista neural e migram, guiadas pela lâmina basal, em direção aos queratinócitos basais que estão em amadurecimento inicial. Tais células raramente têm atividade mitótica nas áreas de pele não expostas ao sol, logo a atividade proliferativa é ocasional, ou seja, se proliferando apenas quando recebem estímulo (FENNER; CLARK, 2016). Outras células encontradas e de grande importância para a epiderme são as células de Langerhans e as células de Merkel, no qual atuam, respectivamente, na endocitose de antígenos para apresentarem aos linfócitos da derme, e na percepção de estímulos táteis para o sistema nervoso (FENNER; CLARK, 2016). As células de Langerhans são macrófagos residentes em epitélios estratificados, mas só são considerando maduras após contato com antígeno. Os queratinócitos podem interagir com outras células do sistema imune (como macrófagos e neutrófilos) e

participa também da produção de citocinas pelas vias Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) e Fator Nuclear Potenciador da cadeia leve Kappa de células B ativadas em resposta a estresses como radiação UVB e processo inflamatórios, bem como a de fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) (FENNER; CLARK, 2016).

No tecido epitelial as células são justapostas, separadas por escassos materiais intracelulares, o qual é constituído por elementos da própria membrana celular, como o glicocálice – carboidrato que auxilia a união lateral, protege a superfície da célula apresenta propriedades catalíticas e receptor para hormônios, vírus, bactérias e fungos. Outra característica desse tecido é a ausência de vasos sanguíneos, o fornecimento de oxigênio e nutrientes são realizados e a remoção de resíduos ocorrem por difusão a partir de capilares sanguíneos presentes nos tecidos adjacentes ou subjacentes (AARESTRUP, 2012). A proteção desse tecido pode ser pela presença de camadas de proteínas impermeabilizantes e rígidas (queratina) na superfície externa, por células de defesa (células de Langerhans), as propriedades mecânicas por espessa camada e justaposição das células, bem como por propriedades químicas específicas conferidas por microrganismos comensais. A movimentação de moléculas é realizada pela membrana através dos meios transcelulares (membranas dos polos apical e basal) e paracelulares (entre duas membranas celulares laterais) (FENNER; CLARK, 2016).

A camada presente abaixo da epiderme é denominada de derme, é constituída de tecido conjuntivo propriamente dito, com espessura de 150 μ m a 4 mm em humanos, com características fibrosa e elástica, tem como finalidade de fornecer nutrientes e suporte estrutural através da derme papilar, onde os sulcos ondulados facilitam as trocas. O conjuntivo em contato com a lâmina basal é do tipo frouxo, formando a derme superficial ou derme papilar. A baixo desta há um aumento da densidade de colágeno até predomínio de conjuntivo denso não modelado, compondo a derme profunda ou reticular (AARESTRUP, 2012). A derme reticular compreende uma variedade de nervos, glândulas e vasos, no qual é responsável pela sensibilidade e nutrição, respectivamente. Nessa camada, encontram-se vasos linfáticos, glândulas sebáceas, folículos capilares e células do sistema imune como os leucócitos (CASTAÑO *et al.*, 2018). As fortes conexões entre a derme e epiderme forma uma camada denominada membrana basal (BOUWSTRA *et al.*, 2023).

O principal componente da derme é a matriz extracelular produzido pelos

fibroflasto. A tensão mecânica é dinâmica entre as camadas densas de fibras de colágeno, elastina dispostas em fibras transversais incorporadas e matriz proteoglicana, juntamente com o fibroblasto que se conecta a essa matriz pelas integrinas (sendo então uma interface entre matriz-citoesqueleto) utilizam desse acoplamento para puxar as redes de fibras de colágeno. Dessa forma, a adesão pelas integrinas promove a montagem e reorganização de microtúbulos e filamentos intermediários que “empurram” o meio externo e proporciona o estiramento celular normal. A derme é constituída de 70% de colágeno, que proporcionando elasticidade e dureza, 1% de fibras de elastina, mantendo característica de elasticidade e flexibilidade, e proteoglicanos, que oferecem hidratação e viscosidade. Além disso, os proteoglicanos atuam na remodelação de cálcio e zinco dependente de proteoglicano enzima, identificada como metaloproteinase da matriz (MMPs) produzido por múltiplas células, como o fibroblasto, queratinócito, neutrófilos (CASTAÑO *et al.*, 2018).

Os fibroblastos sintetizam e reorganizam a MEC através da produção de colágeno, proteoglicanos, fibronectina, lamininas, glicosaminoglicanos, metaloproteinases e prostaglantinas. A MEC está em constante comunicação com as células circundantes, visto que os fibroblastos podem secretar e responder a sinais autócrinos e parácrinos. Os fibroblastos apresentam uma variedade de função na derme, sendo os fibroblastos localizados em camadas superficiais está envolvido na formação do folículo piloso e reepitelização durante a cicatrização de feridas, enquanto os localizados em camadas profundas é responsável pela geração de MEC (DICK MK, MIAO JH, 2023).

A molécula de colágeno recém-sintetizada é convertida em pró-colágeno pela remoção do peptídeo sinal de seu N-terminal no retículo endoplasmático. A estrutura de tripla hélice típica dos colágenos é causada pela hidroxilação e glicosilação de resíduos de aminoácidos, denominada de pró-colágeno. Quando secretadas por vesículas no espaço extracelular o pró-colágeno é enzimaticamente convertido em tropocolágeno. Através da reticulação covalente é montado as fibrilas de colágeno final. As características mecânicas da rede de colágeno dependem do mecanismo de reticulação (SINGH; RAI; K AGRAWAL, 2023). A rede de colágeno produzida é mantida também pela tensão mecânica através dos fibroblastos. Há reticulações intra e intermoleculares altamente resistentes à degradação (DICK MK, MIAO JH, 2023). Após a reticulação encontramos ligações cruzadas do tipo dissulfeto de

cistina-cisteína, ligações cruzadas de transglutaminase, ligações cruzadas relacionadas a produtos de extremidade de glicação avançada e ligações cruzadas criadas através da via da lisil oxidase que são redutíveis e maduras (SINGH; RAI; K AGRAWAL, 2023).

O tecido subcutâneo (ou hipoderme), é a camada mais interna da pele, sua espessura varia de acordo com a região do corpo. Essa camada é a união da pele ao panículo adiposo ou fáscias musculares subjacentes (AARESTRUP, 2012). Composta principalmente de tecido adiposo de modo a fornecer isolamento térmico, armazenar energia, absorver choques e minimizar o atrito com o tecido muscular vizinho devido sua estrutura frouxa de tecido conjuntivo. O tecido adiposo apresenta adipócitos no qual formam aglomerados chamados lóbulos, cercados por uma rede fibro-colágena e separados por septos de tecido conectivo fibroso que contém nervos conectivos, vasos linfáticos e rica rede microvascular de onde provém a oxigenação e nutrientes. A espessura dessa camada varia entre as pessoas devido às condições de baixas temperaturas, reservatório de energia, proteção dos tecidos mais profundos de trauma e atua como um órgão endócrino na síntese de estrona e leptina (NYSTRÖM; BRUCKNER-TUDERMAN, 2019).

Desse modo, percebe-se que cada camada da pele cumpre uma determinada função: a superfície queratinizada da epiderme aumenta a resistência, a derme fornece propriedades de suporte de carga, e o tecido subcutâneo fornece absorção de choque (CASTAÑO *et al.*, 2018).

2.1.1 Lesões na Pele

A pele por funcionar como uma barreira de proteção está exposta a diferentes injúrias, como: agentes químicos, agentes físicos, queimaduras, raios UV e neoplasias. Quando ocorre uma lesão na pele (ruptura da anatomia normal do tecido) o processo de reparo pode ser classificado como aguda ou crônica. As lesões agudas são aquelas oriundas de arranhões superficiais ou lesões profundas com completa cicatrização de no mínimo 3 semanas ou nenhuma formação de cicatriz. As lesões classificadas como crônicas são caracterizadas pela não cicatrização de no mínimo 3 meses, exemplo dessas são as úlceras (PATRULEA *et al.*, 2015). Apesar de sua capacidade inata de reparo, em casos de patologias sistêmicas como

diabetes, alterações cardiovasculares e idade, podem ter como consequência feridas crônicas (lesão que demora mais de 12 semanas para cicatrizar) (BOUWSTRA *et al.*, 2023). Baseado na origem, espessura e complexidade da lesão, o processo de cicatrização pode apresentar diferentes consequências. As lesões podem ser classificadas em razão de diferentes fatores, como esquematizado na tabela a seguir.

Tabela 1 - Classificação das lesões de acordo espessura, complexidade, idade e origem. Imagem adaptada (PATRULEA *et al.*, 2015).

Classificação das Lesões		
Espessura da Lesão	Superficial	Perda apenas da epiderme
	Parcial	Perda da epiderme e derme
	Total	Perda da derme, hipoderme e em alguns casos osso
Complexidade da Lesão	Simple	Afeta apenas 1 órgão e tecido
	Combinada	Afeta múltiplos órgãos e tecido
Idade da Lesão	Nova	Menor que 8 h de tempo de injúria
	Velha	Maior que 8 h de tempo de injúria
Origem da Lesão	Superficial	Quebra na superfície da pele
	Inciso	Resultado de intervenção cirúrgica
	Esmagamento	Resultado de um golpe forte com uma ferramenta de corte
	Lacerado	Fragments de tecido arrancados com um objeto pontiagudo
	Facada	Feito com uma ferramenta pontiaguda ou arma
	Golpe Físico	Lesão tecidual sob a superfície da pele
Secundária	Úlceras diabéticas, úlceras por pressão, úlceras venosas, etc.	

Algumas substâncias químicas podem causar lesões temporárias ou permanentes na pele, dessa forma orientações são desenvolvidas para avalia-las. Essas lesões podem ser classificadas como a irritação ou corrosão. A irritação é menos preocupante visto que é definida como uma inflamação superficial, com danos reversíveis na pele (ROONEY *et al.*, 2021). O processo de irritação inicia-se

com a penetração da substância através do estrato córneo, inflamação dos queratinócitos e outras células da pele, e, conseqüentemente, pode se observar eritema e edema devido à dilatação e aumento permeabilidade das células endoteliais (RIEBELING; LUCH; TRALAU, 2018; TOVAR; LEIKIN, 2015). A irritação pode ter como conseqüências a dermatite (inflamação na pele) o qual é caracterizada por vermelhidão, calor, inchaço e dor, ou até mesmo bolhas, escamas ou escaras. As dermatites causadas por irritação após exposição ao agente químico não apresenta reações imunes, não sendo necessário um sensibilização (exposição prévia), e indivíduos expostos a mesma substância manifesta reação semelhante (NOVAK-BILIĆ et al., 2018).

A corrosão da pele é um dano irreversível apresentando uma lesão dérmica profunda, podendo levar a necrose da epiderme e na derme (Tovar & Leikin, 2015). As substâncias químicas corrosivas são capazes de penetrar no estrato córneo por difusão ou erosão e são citotóxicas para as células nas camadas subjacentes. A classe de substâncias corrosivas inclui: ácidos e bases, bem como compostos anidros. O contato com agentes ácidos resulta em dessecação de proteínas, produzindo necrose coagulativa, enquanto agente alcalinos há penetração mais profundamente, produzindo necrose liquefativa e causando saponificação do tecido (TOVAR; LEIKIN, 2015b). Alguns produtos químicos já passaram por estudos de validação e então foi criado um banco de dados para identificação de não corrosivos versus corrosivos, o qual totalizou 60 produtos químicos que abrangem uma ampla gama de classes químicas. Atualmente, há diferente ensaios propostos pela OECD (em inglês Organisation for Economic Co-operation and Development) que avaliam os danos de substâncias químicas expostas modelos de pele *in vitro* de referência, como: OECD TG 435, 442D, 442E, 432, 431 439 e 431 (RIEBELING; LUCH; TRALAU, 2018).

Lesões por queimadura é um dos danos mais comum no mundo e pode ser ocasionada em razão do calor, radiação, eletricidade ou produtos químicos. Em caso de queimadura ser superficial e parcial é assegurado pela migração de queratinócitos dos apêndices dérmicos da pele poucas horas após a lesão. No entanto, em queimaduras mais profundas, a cicatrização começa nas bordas para um fechamento rápido da ferida. Quando comparado a outros tipos de lesões, a queimadura pode apresentar efeitos sistêmicos devido a liberação de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucinas (IL-6, 8 e 1 β). As alterações podem ser

percebidas no funcionamento de pulmões, rins, coração, fígado, trato gastrointestinal, medula óssea e órgãos linfoides. Quando as concentrações destes fatores são elevadas há risco de infecções, síndrome de disfunção de múltiplos órgãos e morte. Ademais, um desequilíbrio imunológico por ter como consequências a sépsis (SHPICHKA *et al.*, 2019).

A cicatrização de feridas um processo vital para a sobrevivência (RAMOS *et al.*, 2017). Segundo a Organização Mundial da Saúde, as queimaduras, por exemplo, são um problema global já que é responsável por 180.000 mortes anualmente (WHO, 2018). Além disso, as não fatais são uma das principais causas de morbidade, incluindo hospitalização prolongada devido a infecção e desfiguração. O fechamento rápido do local da ferida por migração e proliferação de células epiteliais é fundamental para restaurar a função de barreira que é vital para a sobrevivência do organismo. Com o avanço da engenharia de tecidos estamos cada vez mais próximos estratégias terapêuticas ideais para regeneração da pele, o qual seja capaz de evitar a desidratação, resistir às forças de cisalhamento, resistir à infecção, falta antigenicidade, ser flexível, baixo custo, durável, adaptável e evitar a formação de cicatrizes (SAHANA; REKHA, 2018b).

2.1.2 Cicatrização

O processo de cicatrização envolve a coordenação de eventos celulares e moleculares de modo a reparar o tecido lesionado. A lesão pode ser ocasionada por danos físicos ou químicos, como calor, eletricidade, exposição química, traumas e queimaduras, além de infecções, neoplasias e cirurgias. Apesar da pele estar exposta a diferentes danos, esta possui um processo reparador sofisticados que lhe permite curar de forma eficiente o dano provocado. O processo inicia-se com contenção do extravasamento de fluídos através das plaquetas e as fibrinas, seguida pelo recrutamento de células inflamatórias com objetivo de eliminar células danificadas e os patógenos, e ao final iniciasse a fase para cobrir e preencher a ferida até o tecido ser reparado completamente. Basicamente podemos distinguir o processo de cicatrização em condições normais em quatro fases: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação (GUILLAMAT-PRATS, 2021) (Figura 3). A prolongação da fase de inflamação tem consequência negativas no processo de

cicatrização, resultando em uma ferida que não fecha, aumentando as chances de infecção, bem como queloides e fibroses em razão da excessiva secreção de MEC e citocinas pró-fibróticas. Dessa forma, estratégias para que uma cicatrização ocorra normalmente em tecido um lesionado são pensadas para que principalmente pacientes diabéticos e/ou com problemas cardiovasculares não apresente complicações durante a cicatrização das lesões. A pele pode responder a agentes infecciosos e não infecciosos por meio de mecanismos de imunidade inata e adaptativa (FERNANDES *et al.*, 2023).

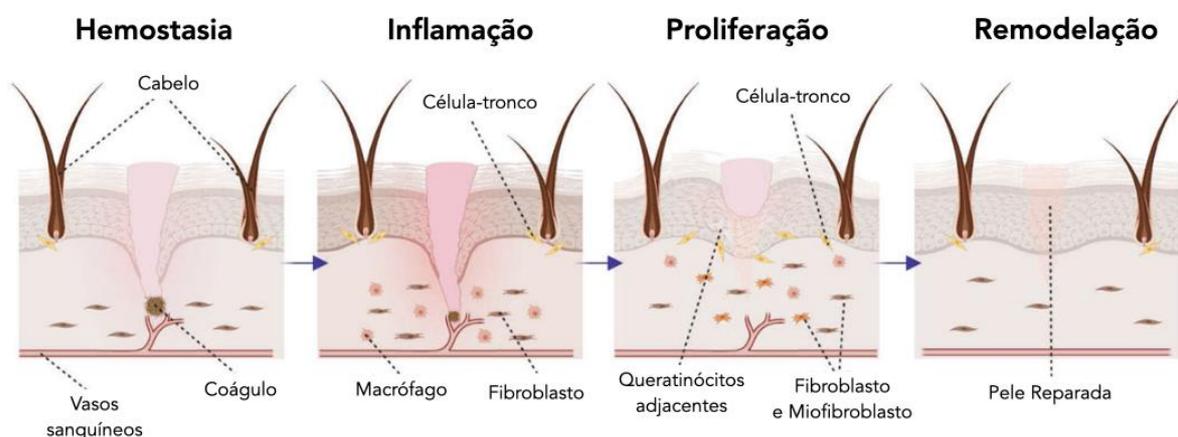


Figura 3 - Fases do processo de cicatrização de feridas. Hemostasia: a ativação da fibrina, responsável pela formação do coágulo. Inflamação: células danificadas são fagocitadas e fatores são liberados para promover migração e proliferação celular. Proliferação: células como fibroblastos, miofibroblastos e células-tronco da pele atingem o local da ferida e formam uma matriz extracelular provisória. Remodelação: as fibras de colágeno são realinhadas e os resíduos são removidos. Imagem adaptada de (SIERRA-SÁNCHEZ *et al.*, 2021).

A hemostasia inicia-se com a formação de coágulo, o qual evita novos sangramentos, através de plaquetas que se aderem a constituintes da MEC e libera conteúdos granulares. Assim, o coágulo proporciona que queratinócitos migrem para a região e ocorra também a infiltração de células imunes, dando início a segunda fase. Afim de prevenir infecções, na fase de inflamação encontramos neutrófilos, macrófagos, linfócitos, e mediadores pró-inflamatório ($\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-12, IL-1 β) na região da ferida. Os macrófagos são os principais responsáveis pela mudança para a fase reparação, visto que os macrófagos M1 auxilia na inflamação após lesão cutânea através de mediadores pró-inflamatório enquanto os macrófagos M2 induzidos por IL-4, IL-10 e IL-13 causam efeitos anti-inflamatórios. Acreditasse que essa transição é através da via p38/MKP-1 que ativa e regula a produção de citocinas inflamatórias e ao mesmo tempo induz a via microRNA-21 que ativa a

proteína quinase B (AKT), resultando na transição do fenótipo macrófago para M2 (FERNANDES *et al.*, 2023). Além das citocinas anti-inflamatórias, simultaneamente, os macrófagos M2 liberam fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) e fator de crescimento transformador (TGF)- β , e então avança para a terceira fase (LOO *et al.*, 2022).

A fase proliferativa compreende na expansão de fibroblasto (secreção da MEC, principalmente colágeno tipo III), queratinócitos (restauração da barreira) e células do endotélio (angiogênese). Os fibroblastos nessa fase começam a expressar actina α -SM e tornam-se miofibroblasto, o qual sintetizam e depositam componentes da MEC, além da contração e maturação do tecido. Por fim, há fase remodelação o qual compreende na restauração da arquitetura normal da pele e maturação do colágeno para tipo I, o mais dominante na pele (MATHEW-STEINER; ROY; SEN, 2021). Os macrófagos secretam MMPs para remodelar a MEC e evitar o excesso de colágeno (FERNANDES *et al.*, 2023). Ademais, outra célula importante durante este processo é a célula-tronco, apesar de estar em uma menor quantidade nos tecidos, se diferencia em queratinócito e fibroblasto antes da fase proliferativa (BELLU *et al.*, 2021).

2.2 Engenharia Tecidual

A engenharia de tecidos é um campo interdisciplinar aplicado aos princípios da engenharia e ciências da vida a fim de desenvolver alternativas às abordagens convencionais para restaurar e reparar a função do tecido (DELLAMBRA *et al.*, 2019). As estratégias de engenharia de tecidos, resumidamente, compreendem no isolamento de células saudáveis do corpo, ou uso de células tronco, seguido pela inserção de substâncias indutoras de tecidos como fatores de crescimento e a exposição das células ao *scaffold* para a expansão da mesma (Figura 4). *Scaffold* (em português, andaime ou arcabouço) na engenharia de tecidos é a estrutura que fornece o suporte físico para estruturas mecânicas básicas. Os scaffolds deverão fornecer condições adequadas (como oxigênio, nutrientes, transporte de resíduos e suporte mecânico) para promover a ligação, migração, proliferação, diferenciação celular durante o desenvolvimento do neotecido (MABROUK; BEHEREI; DAS, 2020). Dependendo da constituição alguns apresentam vantagens além do

fornecimento da estrutura física, pois podem servir como o veículo de entrega de células e o transportador de fatores de crescimento. Os *scaffolds* inteligentes são conhecidos pela incorporação de moléculas bioativas, nanomateriais e modificações das propriedades físicas e químicas de modo a se tornarem eficazes na medicina regenerativa (ZHANG *et al.*, 2018). A princípio o objetivo final do tecido construído pela engenharia de tecidos pode ser a implantação no tecido do corpo, contudo também pode ser aplicada: no desenvolvimento de sistemas especializados de suporte à vida extracorpórea contendo células (exemplo, fígado e rim bioartificiais), unidades de tecidos que podem ser usadas para triagem diagnóstica, testes de drogas para eficácia e toxicologia, e estudos básicos sobre desenvolvimento e morfogênese de tecidos (BERTHIAUME; MAGUIRE; YARMUSH, 2011).

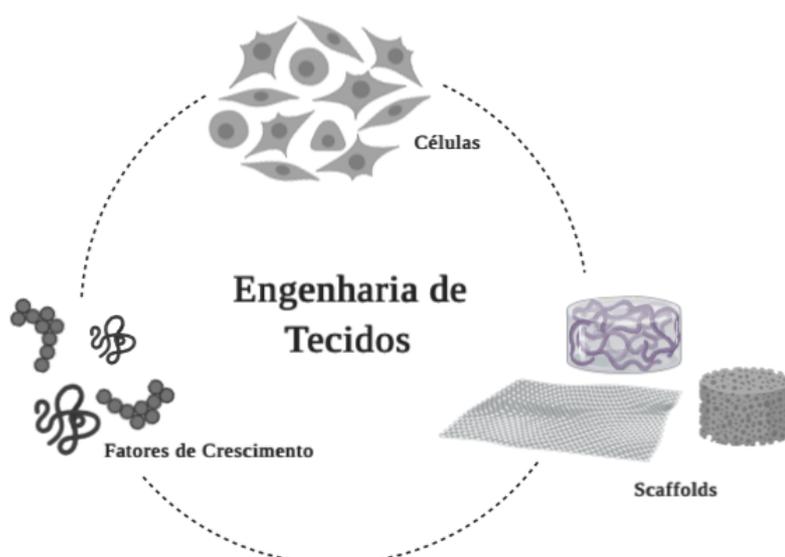


Figura 4 - Componentes e conceito fundamental de engenharia de tecidos. Imagem adaptada de (SCARRITT; MURDOCK; BADYLAK, 2019; SULTANA, 2018).

Os tecidos vivos são essencialmente materiais projetados pela própria natureza para ter uma estrutura específica que influencia as propriedades das células e conduz todos os eventos biológicos. Dessa forma, a engenharia de tecidos busca conhecimento nas propriedades, estruturas e funcionamentos dos tecidos projetados naturalmente na tentativa de replicar a estrutura de materiais para recapitular uma resposta celular predeterminada – biomimética. Os *scaffolds* podem ser constituídos de materiais naturais como fibrina, colágeno, ácido hialurônico, seda, gelatina, alginato e quitosana; quanto por materiais sintéticos, como metais,

vidros bioativos e polietilenoglicol; ou pela combinação de ambos (SAJI JOSEPH; TEBOGO MALINDISA; NTWASA, 2019). A vantagem pela escolha por materiais derivado de tecido animal, é que esses contêm componentes bioquímicos similares ao tecido nativo no qual as células serão cultivadas. Em contrapartida, a síntese de *scaffold* contendo matérias sintéticos é desafiador visto que é necessário o controle da bioatividade celular, propriedades bioquímicas, elasticidade e porosidade (DUVAL *et al.*, 2017).

Os *scaffolds* além de apresentarem diferentes constituições, podem apresentar diferentes morfologias estruturais (YU; ZHANG; GUO, 2022). Assim, este pode assumir formato de filme, membrana, esponja, hidrogel ou uma matriz descelularizada (Figura 5). As dimensões entre eles propícia para célula diferentes estímulos, no caso de hidrogel, esponja ou matrizes as células recebem estímulos na região basal, lateral e apical, enquanto que em filmes e membranas os estímulos estão presentes nas regiões basais e laterais. Os *scaffolds* classificados como 2D são geralmente conhecidos pela boa permeabilidade ao oxigênio, resistência à água, propriedades mecânicas resistentes, fácil observação celular e métodos de produção simples. Em *scaffolds* 3D são vantajoso em razão de absorver grande quantidade de líquido, manter o ambiente úmido e atuar como transportadores de substâncias bioativas e células (BAI *et al.*, 2019; CHAUDHARI *et al.*, 2016).

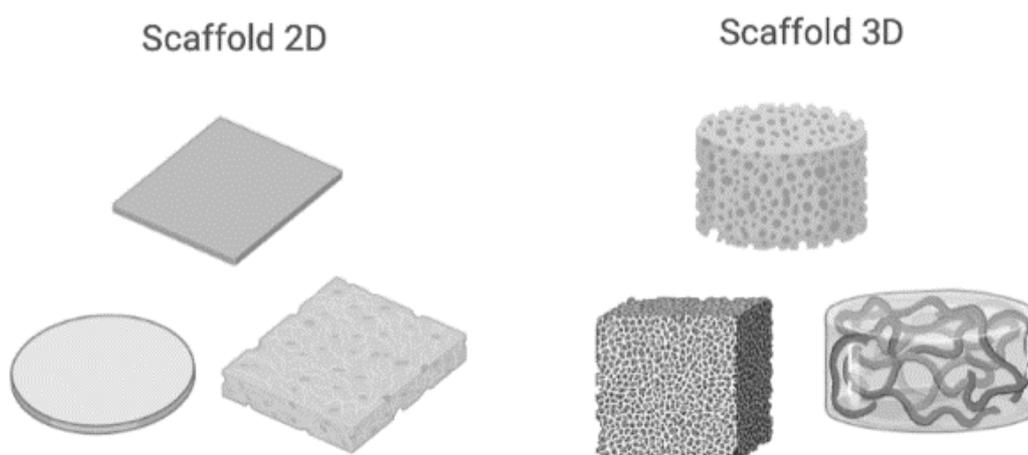


Figura 5 - Exemplificação das diferentes morfologias estruturais que os *scaffolds* podem apresentar. Como exemplo de *scaffolds* 2D há as membranas, filmes, materiais fibrosos ou sólidos; e em *scaffolds* 3D encontra-se estruturas de macro à micro poros, bem como os hidrogéis que tem maior teor de água em sua constituição. Imagem ilustrativas provenientes do *Biorender*.

A princípio acreditava-se que os *scaffolds* funcionavam apenas como suporte físico para as células, contudo este pode ser combinado com materiais específicos para direcionar o comportamento das células nessas estruturas com o propósito de auxiliar a adesão, proliferação ou diferenciação. Os materiais biomiméticos apresentam propriedades similares às propriedades da matriz extracelular e têm sido usados largamente dado que alcançam vantagens além do fornecimento da estrutura física (GUIMARÃES *et al.*, 2020). Tais materiais são interessantes pois podem induzir a recuperação do tecido e podem ser utilizados para o transporte de biomoléculas, como fatores de crescimento que facilitam o crescimento das células (ZHU, YANG; WAGNER, 2019). Dependem do tecido pretendido vários parâmetros, como biocompatibilidade, porosidade, pH, carga superficial, biodegradabilidade, características mecânicas e bioatividade influenciam a escolha de seus constituintes e o comportamento celular (Maheshwari *et al.* 2019).

A célula ao ser aplicada a uma superfície biocompatível necessita do auxílio das integrinas (proteína transmembrana) para fornecerem sinalização e mediar a adesão celular. As forças mecânicas transmitidas através das integrinas podem fazer com que uma proteína sensora associada ao citoplasma mude suas atividades de conformação e ter influência no núcleo e forma da célula (BAKER; CHEN, 2012). No processo de transmissão de força para o citoesqueleto, as integrinas desempenham um papel importante na mecanotransdução através de proteínas de adesão focal conectando os domínios de integrina aos filamentos de actina para formar o complexo de adesão. Assim, características como hidrofobicidade, rugosidade, porosidade e carga superficial influenciam na mecânica celular diante ao *scaffold*, visto que características externas podem ser percebidas e gerar uma resposta pelas células (MAHESHWARI *et al.*, 2019). Os microtúbulos e os filamentos de actina, mostram-se resistentes às forças compressivas, enquanto os filamentos intermediários são capazes de suportar cargas tridimensionais. Além disso, ambos têm uma estrutura molecular polarizada que permite atuarem como motores moleculares levando a um nível adicional de complexidade mecânica. Já os filamentos de actina, que determinam a forma celular e, conseqüentemente, direcionam eventos que variam da motilidade ao crescimento e diferenciação, são frequentemente complexados com miosina para formar uma estrutura contrátil denominada "actomiosina", também conhecida como fibras de estresse. A mecânica celular é ditada por uma malha de actomiosina conhecida como córtex, uma estrutura

mecanicamente rígida e altamente plástica imediatamente abaixo da membrana celular. A tensão gerada pela ativação no córtex celular é responsável pela forma e integridade da célula, no qual pode se propagar através das junções célula-célula e célula-matriz extracelular, sendo fundamental para a arquitetura e função dos tecidos vivos (MAHESHWARI *et al.*, 2019; SULTANA, 2018).

As células exibem comportamentos diversos em uma ampla variedade de topografias. A topografia da superfície influencia no alinhamento celular, polarização, alongamento, migração, proliferação e expressão gênica. *Scaffolds* que apresentam superfícies super-hidrofóbicas, por exemplo, são produzidas de modo a restringir a adsorção de proteínas e adesão celular (GHASEMI-MOBARAKEH, 2015). As estruturas porosas no *scaffold* facilitam a difusão de moléculas dentro da estrutura proporcionando uma maior conectividade, assim como a liberação de moléculas para o exterior da estrutura. Contudo, um alto grau de porosidade pode não ser vantajoso devido à observação da diminuição das taxas de degradação de alguns *scaffold* poliméricos, o que retardaria a entrega acelerada devido aos efeitos da degradação (YAO; BAKER; MORONI, 2020). As diferentes características que influenciam o ambiente que as células estão inseridas estão representadas a seguir na Figura 6.

Em um tecido nativo, encontramos estruturas na MEC com tamanho nanométrico entre 50 a 500 nm. Assim, a engenharia de tecidos tendo como objetivo mimetizar tecidos nativos vêm se integrando a nanotecnologia, área que trabalha com materiais com pelo menos uma de suas dimensões em escalas nanométricas (≤ 100 nm). As estruturas em nanoescalas encontradas nos *scaffolds* são fatores importantes que podem influenciar no crescimento celular, já que as células podem perceber variações de alguns nanômetros na topografia da superfície e responder ativamente a essa nanotopografia (ZHU, YANG; WAGNER, 2019). Essa resposta deve-se ao aumento da área de contato do substrato, o qual com a disponibilidade de contatos há uma maior densidade de receptores de superfície ancorados em relação ao volume celular (YANG, YONG *et al.*, 2017). A migração pode ser afetada, já que nessa condição se reduz a área aparente da superfície que as células podem se prender, logo há uma restrição das aderências focais, enfraquecendo a adesão celular e facilitando o deslocamento das células (FREY *et al.*, 2006). Logo, a incorporação dos materiais em nanoescala são relevantes para os *scaffolds* (YANG, YONG *et al.*, 2017).

Materiais Bioativos para Indução da Regeneração

Propriedades Mecânicas

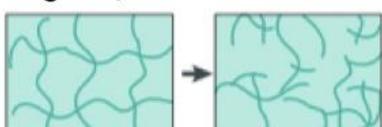


Rigidez

Porosidade



Degradação



Propriedades Mecânicas e Composição Química

Mole

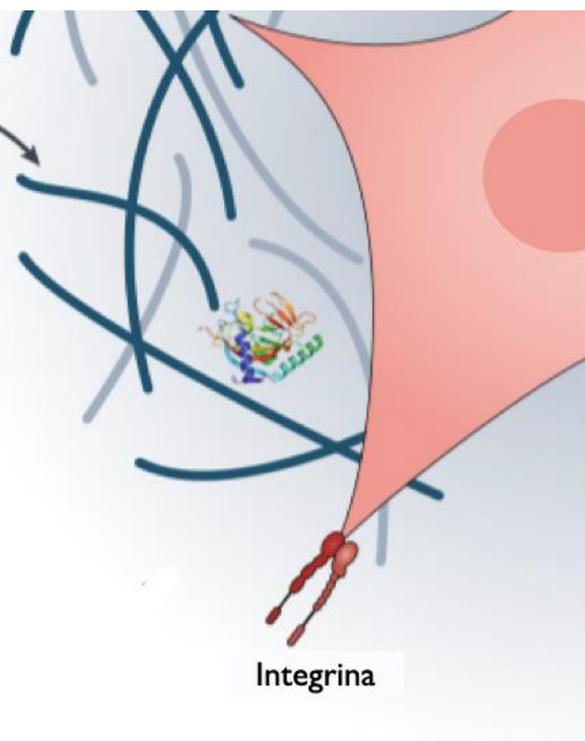
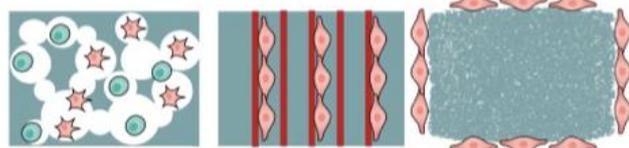
Rígido



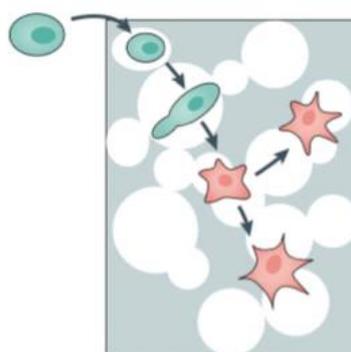
Característica da Superfície (hidrofilicidade, rugosidade, funcionalização)



Estrutura



Estrutura Porosa



Proliferação e
Migração Celular

Figura 6 - Ilustração do microambiente bioativo e suas possíveis interações com a célula. A rigidez, mecânica, porosidade, rugosidade, degradação são estímulos que influenciam a diferentes processos celulares (adesão, morfologia, proliferação, migração e diferenciação). Imagem adaptada (GAHARWAR; SINGH; KHADEMHOSEINI, 2020)

Estratégias que adotam o emprego de nanoestruturas na engenharia de tecidos vêm se destacando. Na regeneração óssea, por exemplo, um estudo demonstra que a presença de 10% de nanopartículas de quitosana em um hidrogel melhorou as propriedades mecânicas do biomaterial composto e promoveu nova formação óssea em animais (CAO *et al.*, 2014; ZHU, LISHA; LUO; LIU, 2020). A síntese de uma nano-rede de bio-carbono apresentou ser proliferativa para fibroblastos de camundongo (NIH-3T3). *Scaffold* contendo glicosaminoglicano mineralizado nanoparticulado osteogênico (MC-GAG) e um fator de crescimento duplamente condrogênico e osteogênico (BMP-9) foram usados na diferenciação de células-tronco mesenquimais humanas primárias e mostrou-se ser capaz na diferenciação condrocítica e osteogênica (Ren *et al.* 2016). A combinação de membranas nanofibrosas de poli (ácido láctico) modificadas por superfície com prata e nanofibrilas de celulose em um *scaffold* a fim de induzir a proliferação de células epiteliais oculares de coelho e com aplicação antimicrobiana demonstrou ser uma possível bandagem para a ferida e pode se tornar um tecido ocular artificial ideal para cicatrização de feridas (REN *et al.*, 2016).

Estratégias de reparo da pele pela engenharia tecidual tem sido a síntese de *scaffolds* com biomateriais para fabricarem tecidos biomiméticos a pele que promovam a viabilidade de células da pele e/ou que apresentem características que auxiliam o processo de cicatrização. Os filmes por exemplo apresentam espessura fina e são maleáveis. Além da facilidade no manuseio, são comumente permeáveis ao oxigênio e ao vapor de umidade e impermeáveis a bactérias (LIANG *et al.*, 2022), desse modo têm potencial para serem aplicados como curativo bioativos.

2.2.1 Terapias Reparativas da Pele

A medicina regenerativa através de biotecnologias como a engenharia de tecidos, terapias celulares, dispositivos médicos (oxigenoterapia hiperbárica, terapia de pressão negativa, eletroterapia e ultrassom) e órgãos artificiais, busca substituir e tratar tecidos e órgãos danificados por doenças, traumas, processo alérgicos ou malformações congênitas, bem como aprimorar o processo de cicatrização afim de restaurar a estrutura e função do tecido rapidamente (KAMOLZ *et al.*, 2022). Esses avanços contribuem para a sobrevivência e qualidade de vida daqueles que foram

acometidos por queimaduras, traumas, neoplasias, entre outros. A pele é um tecido elástico e macio, susceptível à lesões e apresenta mecanismo de reparo de estrutura e funcionamento, mas há necessidade de cuidados com as lesões para evitar infecção, dessecação, dor, proteção e rapidez na cicatrização (YU; ZHANG; GUO, 2022). Lesões difíceis de cicatrizar necessitam auxílio de novas tecnologias para o tratamento. As lesões podem ser provocadas de diferentes formas e apresentar diferentes características e essas questões influenciam na maneira de tratar.

Os curativos tradicionais (gazes, bandagens e algodão) não exercem efeito ativo na cicatrização de feridas e algumas vezes dificultam o processo, em razão de aderirem ao tecido, tendo como consequências desidratação e uma segunda lesão. Atualmente, curativos contendo biomateriais com propriedades bioativas atuam na lesão auxiliando o processo de cicatrização, como: gerenciamento de exsudato e proteção contra patógenos, capacidade antibacteriana, propriedade antioxidante, capacidade de auto cicatrização, adesividade e propriedades mecânicas (YU; ZHANG; GUO, 2022).

No tratamento de lesões extensas na pele, alguma das técnicas utilizadas são os enxertos (podendo ser autólogo, alogênico ou xenogenético), contudo apresenta limitações quando são casos de queimaduras extensas pelo corpo e assim as áreas doadoras são reduzidas (KAMOLZ *et al.*, 2022). Outras alternativas comercializadas são matrizes dérmicas que podem ser combinadas com enxertos (autólogo ou alogênico) de pele e assim auxiliar na reconstrução da pele, no entanto apresenta maior eficiência em casos de ferida profunda. Alguns desses exemplos de matrizes já comercializadas são: Matriderm® (MedSkin Solutions Dr. Suwelack AG, Alemanha) e Integra® (Integra Life Sciences, Alemanha), PolyNovo® (Polynovo Limited, Austrália) (KAMOLZ *et al.*, 2022).

A medicina regenerativa pode explorar outras técnicas da engenharia de tecidos: ex-vivo ou in situ. Na ex-vivo, *scaffolds* são associados a células e biomoléculas fora do corpo de modo a obter um tecido biomimético para posteriormente ser implantado. No entanto, demonstrar limitações como morbidade do tecido doador e grandes quantidades de células. O cultivo dessas células serem cultivadas in vitro sem as condições nativas do tecido de origem acarretaria na perda do fenótipo celular. Logo, o método in situ é uma alternativa interessante ao método anterior, visto que aposta no potencial regenerativo inato do corpo utilizando *scaffolds* sem células reduzindo o obstáculo regulatório. Outra vantagem é a vida

útil, os *scaffolds* carregados com células apresentam uma vida útil inferior ao *scaffold* da abordagem *in situ*. O uso de *scaffolds* constituído de biomaterias com propriedades físico-químicas notáveis estimularam a adesão, proliferação e migração celular (GAHARWAR; SINGH; KHADEMHOSEINI, 2020).

Os *scaffolds* são promissores visto que fornecem a estrutura físico-química e mecânica para a formação de MEC *in vitro*, sendo lentamente degradadas, reabsorvidas ou metabolizadas após a implantação. Além de conter características bioativas (rugosidade, hidrofílica, porosidade, carga superficial e propriedades mecânicas que promova sinalização para as células) que facilita a interconectividades das estruturas, infiltração celular, proliferação e migração (GAHARWAR; SINGH; KHADEMHOSEINI, 2020). Os substitutos de pele artificial atuais propostos pela engenharia de tecidos são compostos principalmente de queratinócitos e/ou fibroblastos, no entanto carecem de componentes funcionais, como nervos, estruturas anexiais e células pigmentares (KAMOLZ *et al.*, 2022). Dessa forma, a engenharia de tecidos tem investido no desenvolvimento de *scaffolds* com excelentes funções biológicas e curativos a base de biomaterias que apresentam propriedades ativas no processo de cicatrização para aplicação na medicina regenerativa.

2.2.2. Biomateriais

Os biomateriais, conforme Bergmann e Stumpf (2013), podem ser uma substância ou uma combinação desta, com origem sintética ou natural utilizada para aumentar ou substituir parcial ou totalmente qualquer tecido, órgão ou função do corpo por um período para melhorar a qualidade de vida do indivíduo. Dessa forma, a escolha pelo material a ser usado na engenharia tecidual deve atender as necessidades do tecido pretendido concomitantemente com as propriedades físicas e químicas do material, tais como: topografia da superfície, arquitetura, carga, energia livre e grupos funcionais (RAHMATI *et al.*, 2018). Os biomaterias poliméricos são geralmente os mais usados em aplicações biomédicas e de engenharia de tecido porque imitam a MEC oferecendo um microambiente biomimético; podem ser altamente biocompatíveis e citofílicos na promoção de resposta celular positiva como

na adesão e proliferação celular; e mantém o genótipo e fenótipo da célula alvo (RAMOS *et al.*, 2017).

Os biomateriais são classificados em 3 categorias considerando a interação do tecido/órgão, são eles: biotolerantes, bioativos e o bioinertes. Quando um material é implantado em um tecido, caso este seja separado do tecido por uma camada de tecido fibroso, este é considerado biotolerante, e em outra situação quando não há uma reação química com o tecido, e a liberação de componentes para a formação de um invólucro fibroso é mínima, o material é denominado de bioinerte. Entretanto, quando o material realiza reações químicas com o tecido se integrando a ele, o material é considerado bioativo (DOS SANTOS; BRANDALISE; SAVARIS, 2017; RAHMATI *et al.*, 2018). Geralmente os materiais bioativos são vidros à base de fosfato de cálcio, hidroxiapatita, compostos de fosfato de cálcio polímeros naturais e vitrocerâmicas. Os biotolerantes comumente são materiais poliméricos sintéticos e a maioria dos metais. Os bioinertes são alumina, zircônia, titânio e ligas de carbono (DOS SANTOS; BRANDALISE; SAVARIS, 2017).

Entre os biomateriais existentes há os metais, cerâmica, polímeros e biocompósitos (uma combinação de diferentes materiais, como cerâmica e polímeros). De acordo com a literatura, os metais e cerâmicas são conhecidos por apresentarem alta rigidez e resistência, enquanto, os poliméricos são conhecidos pela baixa rigidez e densidade (RAMOS *et al.*, 2017). No entanto, a maioria dos tecidos humanos possui valores de rigidez abaixo (em gigapascal) fazendo com que os polímeros sejam requisitados para compor *scaffold* substitutos de tecidos moles (ZHU, YANG; WAGNER, 2019). Os polímeros apresentam vantagens aos demais em razão de oferecerem flexibilidade para adaptação de suas propriedades químicas e físicas de superfície, é possível controlar com precisão as propriedades em massa dos polímeros, como porosidade, biodegradação e propriedades mecânicas (RAHMATI *et al.*, 2018).

Polímeros naturais (biopolímeros) são interessantes por possuírem características como biocompatibilidade, atividade biológica hidrofílica (RAMOS *et al.*, 2017), se assemelham a componentes encontrados na MEC nativa, de modo que eles possam ajudar as células a se ligarem aos receptores da superfície celular e fornece um ambiente físico para controlar a função celular em comparação com materiais sintéticos. Alguns dos polímeros naturais bastante usados em *scaffolds* são colágenos, quitosana, fibrinogênio, ácido hialurônico, glicosaminoglicanos

(GAGs), celulose e fibroína da seda. Apesar de apresentarem baixa resistência mecânica e rápida taxa de degradação, a combinação com outras substâncias podem superar essas limitações (TRAN; HAMID; CHEONG, 2018). Os polímeros sintéticos são uma das opções para superar as limitações presentes nos polímeros naturais. Alguns dos polímeros sintéticos geralmente usados são: poliglicólido (PGA), polilactido (PLA), poli (N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm), polietilenoglicol (PEG), policaprolactona (PCL), poliuretano (PU). Na Tabela 2, nota-se as vantagens e desvantagens de ambos os polímeros.

As limitações presentes em biomateriais contendo apenas polímeros naturais pode ser superada com a adição de outras substâncias de modo a modificar as características físico-químicas da superfície. As modificações físico-químicas são realizadas através de reações químicas (como oxidação, redução, acetilação) e/ou polimento mecânico. (DOS SANTOS; BRANDALISE; SAVARIS, 2017). A adição de nanomateriais é uma opção para se aprimorar as características dos *scaffolds*, já que estes apresentam propriedades físico-química diferentes dos materiais em escala macro e micro, funcionalidades biológicas distintas e na MEC dos tecidos humanos são encontradas estruturas em escala nano, que são fundamentais para funcionalidade do tecido

Tabela 2 - As vantagens e desvantagens dos polímeros naturais e sintéticos (SULTANA, 2018).

	Polímeros Naturais	Polímeros Sintéticos
Vantagens	Não são citotóxicos, apresentam locais de ligação de proteínas e sinais bioquímicos específicos, que desencadeiam interações moleculares e celulares.	Apresentam baixo custo na síntese, têm grande homogeneidade e possuem características físico-químicas, mecânicas e de degradação reproduzíveis.
Desvantagens	Imunogenicidade, risco de contaminação que podem ter como consequência uma rejeição imunológica, e a instabilidade pode prejudicar a biodegradação e as propriedades biomecânicas.	Carece de elementos moleculares específicos para interação com células e proteínas, o que pode eventualmente levar a respostas inflamatórias e toxicidade.

Os materiais em nanoescala compreendem em matérias contendo abaixo de 100 nm em uma ou mais dimensões onde o aparecimento de fenômenos

dependentes do tamanho geralmente permite novas aplicações. Esses apresentam propriedades diferentes de átomos, moléculas e matérias a granel individuais, o qual favorecem a criação de materiais, dispositivos e sistemas que exploram essas propriedades diferenciais (ISSO/Ts 80004-1:2015). A combinação de um biocompósito com um nanomaterial é denominado de nanobiocompósito. Dessa forma, a incorporação de nanomateriais melhora a capacidade do *scaffold* em mimetizar estruturas semelhantes a dos tecidos (PIAIA; SALMORIA; HOTZA, 2018).

2.2.3 Quitosana

A quitina é um polissacarídeo encontrado amplamente nos exoesqueletos de artrópodes, conchas de crustáceos e cutículas de insetos, logo, é o segundo biopolímero mais abundante na Terra, superado apenas pela celulose (YAN *et al.*, 2020). A quitina apresenta semelhanças à celulose, são polissacarídeos de cadeia longa, contudo a quitina apresenta alto grau de agregação e é insolúvel na maioria dos solventes orgânicos, devido à ligação hidrogênio inter e intra-molecular causada pela presença de ligação acetilamino e hidroxila. Contudo, a quitosana, originada da desacetilação da quitina, é facilmente dissolvida em uma solução de ácido diluído na forma de um sal de amônio e possui funcionalidade de grupos amino, grupos hidroxila primário e secundário para outras modificações químicas (KIM *et al.*, 2018).

A quitosana constitui em um polissacarídeo linear composto por D-glucosamina ligada por ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4) a N-acetil-D-glucosamina. As ligações glicosídicas são um dos principais elementos estruturais dos exoesqueletos de animais (ZARRINTAJ *et al.*, 2023). A aplicação da quitosana na engenharia de tecidos também se deve a semelhança com os GAGs (polissacarídeos lineares), que são um dos constituintes dos tecidos conjuntivos e apresenta unidades de N-acetil-D-glucosamina em sua estrutura (Patrulea *et al.*, 2015). Além disso, consta que a quitosana apresenta outras características essenciais para a aplicação na engenharia de tecidos como biodegradabilidade, atividade antimicrobiana, baixa toxicidade, hidrofílica, e é um dos poucos polímeros naturais que possui grupo amino (-NH₂) em sua cadeia principal o qual aumenta a capacidade de absorção de água, ligação com biomoléculas com o DNA e proteína (ABDUL KHALIL *et al.*, 2016) e

ajuda na formação da MEC atraindo moléculas com carga negativa, como os proteoglicanos (MADNI *et al.*, 2021). O grupo hidroxila (-OH) atrai as moléculas com carga positiva aumentando o número de interações da molécula de quitosana. A natureza policatiônica da quitosana em condições ácidas, propicia interações eletrostáticas envolvendo poliânions de tamanho pequeno, mas também polieletrólitos. Dessa forma interage com moléculas carregadas negativamente, como fosfatos, sulfatos e íons citratos durante os processos de reticulação.

A variação da concentração e tamanho das espécies aniônicas, bem como o número de unidades de D-glucosamina verso as unidades de N-acetil-D-glucosamina permite um ajuste fino no intumescimento dos *scaffolds* (CROISIER; JÉRÔME, 2013). Os grupos funcionais presentes na estrutura da quitosana permite que este seja modificado de modo a melhorar as propriedades mecânicas e biológicas (MADNI *et al.*, 2021).

A solubilidade da quitosana se modifica dependendo do pH e dos grupos de amino e N-acetil livres. Em pH neutro ou básico devido ao grupo amino livre a quitosana não é solúvel em água, em contrapartida, em pH ácido a quitosana é solúvel em água em razão da protonação dos grupos amino (ROY *et al.*, 2017). Logo, a quitosana é solúvel em ácido acético, láctico, málico, fórmico e succínico aquoso diluído. Em pH inferior a 6 a quitosana é policatiônica e, conseqüentemente, interage com moléculas carregadas negativamente, como as proteínas, polissacarídeos aniônicos (por exemplo, alginato e carragenina), ácidos graxos, ácidos biliares e fosfolípidios (AHMED; IKRAM, 2016). A estrutura da quitosana está representado na Figura 7.

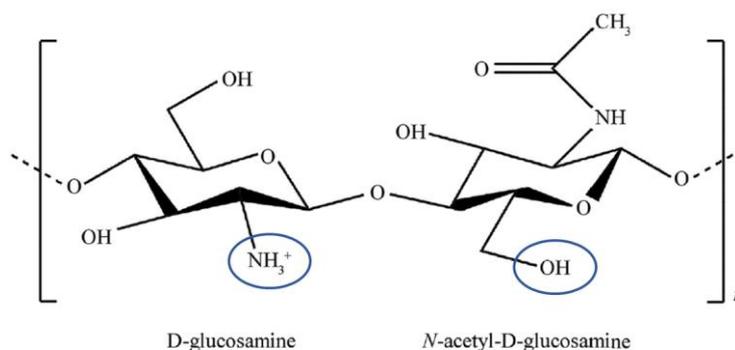


Figura 7 - Imagem representativa da estrutura da quitosana, os grupos funcionais mencionados no texto acima estão circulado em azul.

A biodegradabilidade é um fator fundamental para a produção de um *scaffold* visto que a degradação do material do andaime é um processo muito importante na remodelação do tecido. A lisozima, enzima encontrada em diferentes fluidos corporais, desempenha um papel de liderança na degradação *in vivo*, logo pode estar presente na degradação da quitosana (AHMED; IKRAM, 2016). A taxa de degradação é inversamente proporcional ao grau de cristalinidade, que é grandemente influenciado no grau de desacetilação, desse modo, dependendo do grau de desacetilação na quitosana produzida esta pode se degradar facilmente (AHMED; IKRAM, 2016; KIM *et al.*, 2018).

A atividade antimicrobiana abrange as bactérias gram-positivos e gram-negativos, além dos fungos. O mecanismo da ação antimicrobiana mais aceitável inclui a presença de grupos carregados positivamente na cadeia e suas interações com a parede bacteriana carregada negativamente. Essa interação iônica leva a alterações na permeabilidade citoplasmática de bactérias, resultando em morte celular. No entanto, a quitosana mostra sua atividade antibacteriana apenas em circunstâncias ácidas, devido à sua baixa solubilidade acima de pH 6,5 (KIM *et al.*, 2018).

Na literatura encontramos diferentes aplicações promissoras da quitosana como na área biomédica, sendo considerado um material inovador em sistemas de administração de medicamentos, pode atuar na cicatrização de feridas, agente antibacteriano, ligante de gordura, agente hemostático, e ter efeito hipocolesterolêmico (CABUK; ALAN; UNAL, 2017; KIM *et al.*, 2018; RABEA *et al.*, 2003). O emprego de quitosana em *scaffolds* para o tratamento de feridas na pele têm se mostrado promissor. No mercado encontramos na constituição de curativos como o HemCon[®], Chitoseal[®] (AHMED; IKRAM, 2015), HidroKi[®], Axiostat[®], Chitopack[®], Tegasorb[®] e KytoCel[®] (KIM *et al.*, 2018). De acordo com estudos, a quitosana desempenha um papel essencial na coagulação do sangue, inflamação, crescimento de tecidos e remodelação. A atividade hemostática está relacionada com os cátions presentes na quitosana que podem se ligar ao plasma, células e tecidos de hospedeiros que estejam carregados negativamente. A quitosana ligada a glucosamina atrai os glóbulos vermelhos que, conseqüentemente, irão formar aglutinações (SIMÕES *et al.*, 2018). Para a proliferação, a quitosana promove um suporte de matriz não proteica para o reparo do tecido, além disto, com a

despolimerização gradual ocorrer liberação de N-acetil- β -D-glicosamina que estimula a proliferação de fibroblastos, síntese de ácido hialurônico, angiogênese e deposição ordenada de colágeno no local da ferida (POGORIELOV *et al.*, 2015).

O efeito da atividade anti-inflamatória geralmente ocorre em casos de alta massa molecular e a atividade pró-inflamatória em casos com baixa massa molecular (AHMED; IKRAM, 2016; MIGUEL; MOREIRA; CORREIA, 2019; PATRULEA *et al.*, 2015). Efeitos anti-inflamatórios estão relacionados com a inibição da expressão da proteína prostaglandina E2 e ciclooxigenase-2, que por consequência atenua as citocinas pró-inflamatórias (exemplo: fator de necrose tumoral- α e interleucina-1 β), entretanto, aumenta a expressão da citocina anti-inflamatória interleucina-10 (CHANG *et al.*, 2019). Dessa forma, como a quitosana exibe considerável atividade imunoestimuladora o seu emprego em dispositivos biomédicos pode fornecer um desempenho significativo (SPINDOLA *et al.*, 2009).

Em *scaffolds* utilizando apenas quitosana percebe-se uma estrutura mecanicamente fraca e instável (HU; WANG; WANG, 2016; WANG *et al.*, 2020). Assim, é necessário a incorporação de outros materiais de modo a superar tais características. A adição de nanomateriais à matriz polimérica, formando um nanobiocompósito, é uma alternativa promissora, dado que esses materiais apresentem características notáveis e podem melhorar as propriedades específicas. Devido as características notáveis da quitosana, é aplicada na engenharia de tecidos em diferentes formas, como: hidrogel, esponjas, microesferas, nanopartículas e filmes como transportadores de entrega de moléculas de interesse e regeneração de tecidos. Há evidências da quitosana envolvida no processo de cicatrização nas diferentes fases. Permitem a infiltração e migração de neutrófilos e macrófagos, proporcionando uma lesão limpa de agentes infecciosos, a formação de um tecido fibroso e reepitelização. Em casos de cicatrizes hipertróficas, causadas pela produção excessiva de colágeno na fase de remodelação, a quitosana é capaz de diminuir a fibrose (PATRULEA *et al.*, 2015).

2.2.4 Nanofibra de Celulose

O polímero natural mais abundante é a celulose, visto que está presente nas paredes celulares das plantas (FONG; HOEMANN, 2018). Nas paredes celulares das plantas, na estrutura da biomassa lignocelulósica, encontramos três subdivisões de polímero: hemicelulose, lignina e celulose (Figura 8). A porcentagem de lignina, hemicelulose e celulose depende das condições de crescimento, fonte e processo de cultivo da planta (SHARMA *et al.*, 2019). A hemicelulose que é composta principalmente por xilanos e glucomananos, monômeros de pentose e hexose ligados por cadeias curtas ou ramificadas. Essas estruturas fornecem as propriedades antibacterianas, resistência e impermeabilidade à água ou solvente à parede celular da planta. Esta estão aderidas às fibras de celulose através de ligações de hidrogênio e interações de Van der Waal. A lignina serve como ligante que fica entre e ao redor da celulose e hemicelulose. Por consistir em um polímero amorfo reticulado, essa estrutura atua no fornecimento de rigidez, impermeabilidade e resistência à compressão e deterioração (MOKHENA; JOHN, 2019).

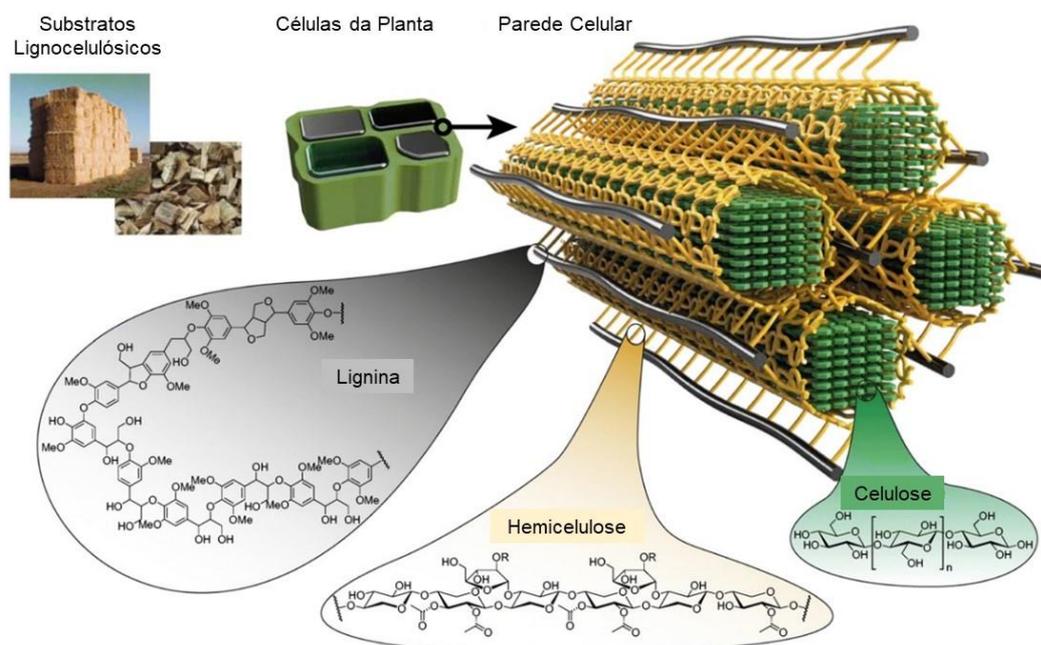


Figura 8 - Modelo esquemático de arranjo de celulose, hemicelulose e lignina em fontes lignocelulósicas (STRNAD, 2023).

A celulose é a principal constituinte da biomassa lignocelulósica, consiste em um polissacarídeo linear com unidades repetidas de celobiose (dissacarídeo D glicose) ligadas pela ligação β -1,4 e existem fortes ligações de hidrogênio intramolecular ou intermolecular entre unidades adjuvantes de glicose na mesma cadeia ou cadeia diferente através dos grupos hidroxila abertos presentes nas unidades de monômero de glicose. Essas ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares (Figura 9) são em razão do monômero da celobiose, denominada unidade de anidroglicose que consiste em três grupos hidroxila (PHANTHONG *et al.*, 2018).

A fibra de celulose é conhecida pelas excelentes propriedades físicas e mecânicas devido à presença de grupos hidroxila e forte ligação de hidrogênio redes, contudo, há agregação nas regiões altamente ordenadas (estrutura cristalina) e regiões desordenadas (estrutura amorfa). Nas regiões cristalinas, as moléculas da cadeia são empacotadas, o que promove alta rigidez e resistência à celulose, em contrapartida, as regiões amorfas contribuem para a flexibilidade do material a granel (PHANTHONG *et al.* 2018).

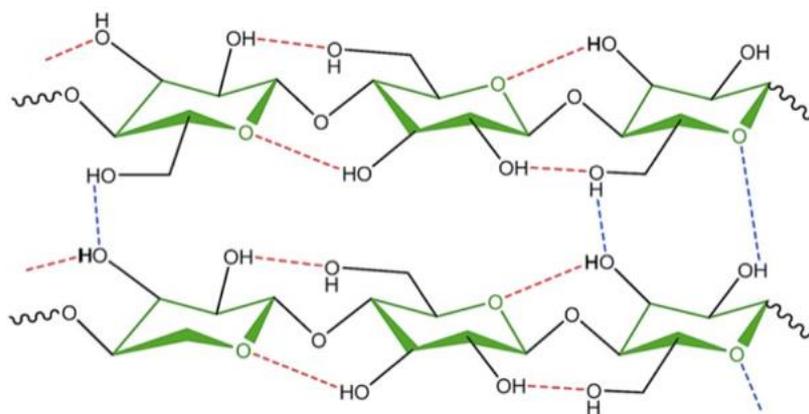


Figura 9 - Ligações de hidrogênio intermoleculares (----) e intramoleculares (----) na estrutura molecular da celulose (STRNAD, 2023).

Algumas das características que torna a celulose um biopolímero notável são a baixa densidade, não abrasividade, combustibilidade, não toxicidade, biodegradabilidade, menor custo de produção do que outros polímeros sintéticos e excelente propriedade de resistência e cheia da superfície reativa dos grupos hidroxila, que pode ser funcionalizada com várias propriedades da superfície. Dessa forma, esse biopolímero tem se destacado nas pesquisas como reforço para a síntese de biocompósitos. Assim como a celulose, no entanto, com algumas das

dimensões na escala nanométrica (menos que 100 nm), vem se destacando a nanocelulose. Devido ao aumento da área de superfície em relação ao volume e a maior resistência e rigidez, este nanomaterial vem se ressaltando no campo da nanotecnologia (PHANTHONG *et al.*, 2018). Ademais, a celulose é relevante em aplicações biomédicas em razão da sua baixa toxicidade (SHARMA *et al.*, 2019).

A nanocelulose pode ser categorizada em três tipos principais; celulose nanocristalina, nanocelulose bacteriana e celulose nanofibrilada. Apesar de terem a mesma composição química, as diferenças entre os tipos se encontram na morfologia, tamanho de partícula, cristalinidade e algumas propriedades devido à diferença de fontes e métodos de extração (PHANTHONG *et al.*, 2018).

A celulose nanocristalina apresenta a forma de bastão curto ou bigode com 2–20 nm de diâmetro e 100–500 nm de comprimento, geralmente é extraída das fibrilas de celulose por hidrólise ácida. Além disso, contém 100% da composição química da celulose, principalmente nas regiões cristalinas (alta cristalinidade em torno de 54 a 88%) (PHANTHONG *et al.*, 2018).

A nanocelulose bacteriana é produzida a partir da acumulação de baixa massa molecular de açúcares por bactérias, principalmente pelo *Gluconacetobacter xylinus* por alguns dias até duas semanas (bottom-up). Uma vantagem da nanocelulose bacteriana está sempre na forma pura sem outros componentes da biomassa lignocelulósica, como lignina, hemicelulose, pectina e assim por diante. A nanocelulose bacteriana possui as mesmas composições químicas que outros dois tipos de nanoceluloses e apresenta morfologia de fitas torcidas com diâmetros médios de 20–100 nm e comprimentos de micrômetros com grande área de superfície por unidade (PHANTHONG *et al.*, 2018).

A celulose nanofibrilada apresenta morfologia longa, com 1–100 nm de diâmetro e 500–2000 nm de comprimento, flexível e emaranhada que pode ser extraída das fibrilas de celulose por métodos mecânicos (como ultra-sonicação e homogeneização a alta pressão). Este tipo contém 100% da composição química da celulose com as regiões cristalina e amorfa. Quando comparamos está com a celulose nanocristalina, notamos que a nanofibrilada tem o comprimento mais longo, com alta relação do comprimento para diâmetro, alta área de superfície e grande quantidade de grupos hidroxila, facilmente acessíveis para modificação da superfície (PHANTHONG *et al.*, 2018).

Na área de engenharia tecidual a celulose em nano escala já vem sendo incorporada em *scaffolds* com diferentes aplicações. Destaca-se para o tratamento de feridas devido suas propriedades de retenção de umidade e feridas úmidas são conhecidas por cicatrizar mais rapidamente devido ao fornecimento adequado de fatores de crescimento e outras moléculas para os tecidos em cicatrização e a estrutura de celulose porosa imita a MEC da pele, auxiliando na regeneração tecidual (SAHANA; REKHA, 2018b). A celulose proveniente do algodão mostrou-se ser biocompatível com células foliculares dentárias humanas primárias (HE *et al.*, 2015), fibroblastos embrionários de camundongo (HIVECHI; HAJIR BAHRAMI; SIEGEL, 2019), células embrionária de rim humano (ZANETTE *et al.*, 2019) e entre outras.

3. HIPÓTESE

O nanobiocompósito de quitosana e NFC de algodão apresenta propriedades físico-químicas e é citocompatível para fibroblastos e queratinócitos humanos cultivados *in vitro*.

4. OBJETIVO

4.1 Objetivo Geral

Caracterizar as propriedades físico-químicas e avaliar a citocompatibilidade do nanobiocompósito de quitosana e NFC de algodão em fibroblastos e queratinócitos humanos cultivados *in vitro*.

4.2 Objetivo Específico

- Analisar a composição química e homogeneidade do nanobiocompósito de quitosana com NFC;
- Avaliar a estabilidade, hidrofiliabilidade, rugosidade, propriedades mecânicas e porosidade do nanobiocompósito de quitosana com NFC;
- Examinar a morfologia e área celular de fibroblasto e queratinócitos cultivados sobre o nanobiocompósito de quitosana com NFC;
- Analisar a integridade da membrana de fibroblasto e queratinócitos cultivados sobre o nanobiocompósito de quitosana com NFC;
- Avaliar a atividade mitocondrial de fibroblasto e queratinócitos cultivados sobre o nanobiocompósito de quitosana com NFC;
- Investigar o nível de oxidação-redução (REDOX) de fibroblasto e queratinócitos cultivados sobre o nanobiocompósito de quitosana com NFC;
- Examinar a migração celular de fibroblasto e queratinócitos cultivados sobre o nanobiocompósito de quitosana com NFC;
- Quantificar a produção de colágeno em fibroblastos cultivados sobre o nanobiocompósito de quitosana com NFC.

5. METODOLOGIA

5.1 Produção e caracterização do nanobiocompósito de quitosana com nanofibra de celulose

5.1.1 Síntese do nanobiocompósito de quitosana com nanofibra de celulose

O filme de quitosana foi produzida a partir do método de Casting (evaporação de solvente; Figura 10), dissolvendo 1% (p/v) de quitosana de baixa massa molecular, com grau de desacetilação de 75-85% (Sigma) em solução de 1% (v/v) de ácido acético glacial sob constante agitação magnética moderada. Após 24h de agitação, foi adicionado as NFC para a produção do nanobiocompósito de quitosana e NFC, e em seguida foi sonicado em banhos de ultrassom por 20 min para a dispersão do nanomaterial. A solução foi transferida para as placas de polipropileno e mantidas em estufa por 24h a 37 °C para evaporação do solvente. Em uma das placas havia o filme contendo apenas quitosana diluída. Em seguida, o filme e os nanobiocompósitos foram imersas em solução de NaOH 1M por 1h e lavados em água destilada. Os nanobiocompósitos foram reticuladas pela técnica de gelificação iônica em solução de 1,3% (p/v) de tripolifosfato de sódio (TPP, Sigma) por 2h. O pH da solução de reticulação foi ajustado para 5,4 com solução de HCl 1M. Posteriormente, os filmes foram lavados em água destilada e neutralizados em 1M NaOH por 30 min e, então, lavados novamente em água destilada e secos em estufa.

A NFC foi produzida no Laboratório de Nanotecnologia para o Agronegócio (Embrapa Instrumentação, São Carlos, SP) através do método de hidrólise ácida. Os nanobiocompósitos foram testadas em 4 grupos, sendo eles: 10, 100 e 1.000 µg/mL de NFC, além do filme com quitosana para os ensaios de caracterização físico-química.

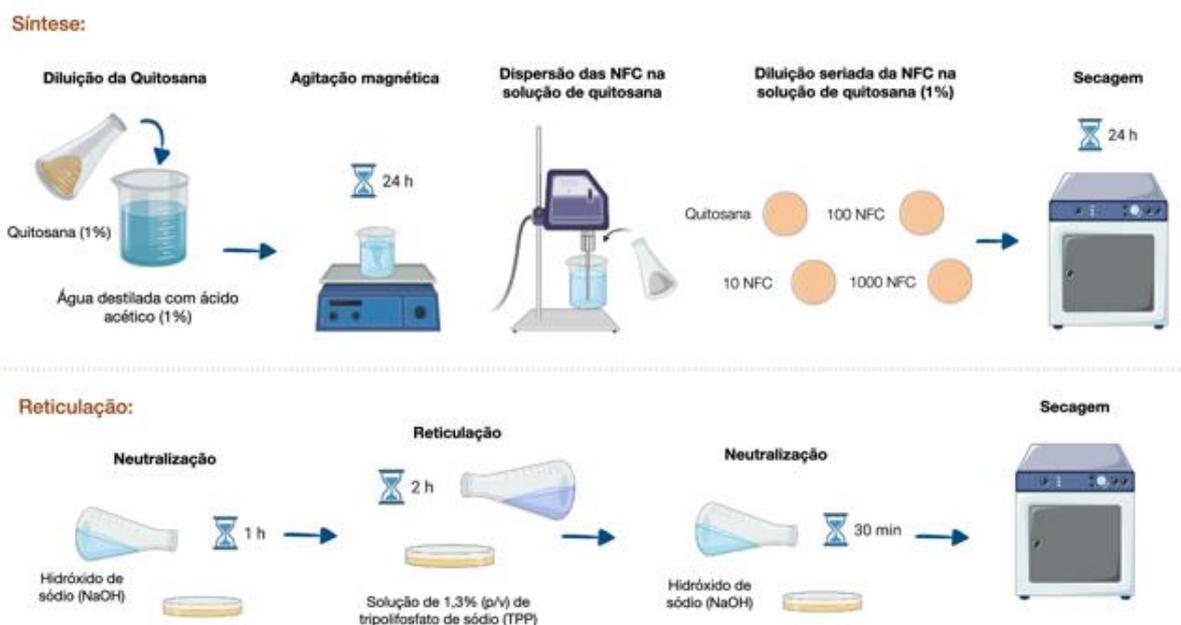


Figura 10 – Esquema da síntese e reticulação do filme de quitosana e nanobiocompósito de quitosana e NFC (10, 100, 1000 µg/mL). Ilustração produzida no Biorender.

5.1.2 Análise por mapeamento RAMAN

Mapeamento RAMAN utiliza um sistema de microscópio RAMAN o qual analisa numerosos espectros simultaneamente que mapeia pontos da superfície da amostra, fornecendo uma correlação da distribuição dos picos espectrais com a existência de compostos químicos específicos na amostra. As imagens Raman do filme de quitosana e nanobiocompósitos de quitosana contendo 10, 100 e 1.000 µg/mL de NFC foram obtidas utilizando um equipamento Brucker SENTERRA (Alemanha) acoplado ao microscópio. A imagem Raman foi adquirida através do mapeamento de 25 pontos da amostra usando uma lente óptica de 50x, excitação a laser a 785 nm, uma média de 10 co-adições e 50 segundos de exposição, com potência do laser de 100mW e espectral resolução de 4 cm⁻¹.

5.1.3 Análise do pH

De maneira a avaliar a mudança do pH do nanobiocompósito em meio de cultivo, foi realizado o seguinte ensaio: 1 mL meio de cultura DMEM foi adicionado em placas de petri contendo o filme de quitosana e os nanobiocompósitos de quitosana contendo 10, 100 e 1.000 µg/mL de NFC, e mantida em incubadora

umidificada com 5% de CO₂, a 37°C, por 7 dias. Uma placa sem os biomateriais contendo apenas o meio de cultivo foi testada como sendo o grupo controle. Após esse tempo, os meios foram coletados e a medição do pH utilizando um medidor de pH foi realizada na sequência. O ensaio foi realizado em triplicata.

5.1.4 Ensaio de intumescência

De modo a avaliar a absorção de água em meio aquoso, foi realizado o ensaio de intumescência do filme de quitosana e dos nanobiocompósitos de quitosana contendo 10, 100 e 1.000 µg/mL de NFC. Os biomateriais foram pesados secos previamente (peso inicial), e em seguida colocados em solução salina tamponada com fosfato (PBS 1X, pH 7) e mantidas em temperatura ambiente. Após 2h, 4h, 6h, 1D, 3D e 7D o meio não absorvido foi retirado e a amostra molhada foi pesada novamente (peso final) em balança analítica (AB204-S, Mettler Toledo, EUA). Os ensaios foram feitos em triplicata, repetidos três vezes e os valores foram inseridos na seguinte fórmula de acordo com o estudo de PUROHIT *et al.*, 2019:

$$\text{Taxa de Intumescimento (\%)} = \frac{\text{peso final} - \text{peso inicial}}{\text{peso inicial}} \times 100$$

5.1.5 Ensaio de degradação

A fim de avaliar a perda de peso quando em meio aquoso foi realizado o ensaio de degradação do filme de quitosana e nanobiocompósitos de quitosana contendo 10, 100 e 1.000 µg/mL de NFC. Os biomateriais foram pesados secos (peso inicial) e em seguida foram expostos a PBS 1X (pH7). Após 2h, 4h, 6h, 1D, 3D e 7D, o filme e os nanobiocompósitos foram retiradas do PBS, seco em estufa e então pesada novamente (peso final) na balança analítica (AB204-S, Mettler Toledo, EUA). Os ensaios foram feitos em triplicata, repetidos três vezes e os valores foram inseridos na seguinte fórmula de acordo com o estudo de PUROHIT *et al.*, 2019:

$$\text{Taxa de degradação (\%)} = \frac{\text{peso inicial} - \text{peso final}}{\text{peso inicial}} \times 100$$

5.1.6 Avaliação do ângulo de contato

A molhabilidade do filme de quitosana e dos nanobiocompósitos de quitosana contendo 10, 100 e 1.000 $\mu\text{g/mL}$ de NFC foi determinada pela medida do ângulo de contato por meio da captura de imagem por uma câmera fotográfica (Canon EOS, Japão). Os biomateriais foram produzidos em placas de poliestireno tratadas, e em razão do tratamento da placa ficaram fixos e esticadas, facilitando a deposição de uma gota de água destilada (50 μL). A borda da placa de petri foi retirada de modo que a câmera registre as gotas de frente, a câmera ficou posicionada a 25 cm de distância. As imagens foram capturadas após 10 seg e a medida do ângulo de contato foi feita utilizando o *software* ImageJ, NIH (www.imagej.nih.gov/ij) a ferramenta ângulo para as medições. Ao final foram analisadas 10 gotas por grupo.

5.1.7 Análise da topografia por microscopia invertida 3D

De maneira a obter conhecimento da rugosidade da superfície do filme de quitosana e dos nanobiocompósitos de quitosana contendo 10, 100 e 1.000 $\mu\text{g/mL}$ de NFC, as amostras foram sintetizadas em placas polietileno tratadas e em seguida foram analisadas no microscópio invertido Primovert (Zeiss, Alemanha) com câmera (Axiocam ERc 5s) acoplado a um computador para as imagens serem captadas no software da Zen 2.3 lite utilizando a ferramenta que gera imagens similares a uma reconstrução 3D.

5.1.8 Análise da nanotopografia por microscopia de força atômica (MFA)

Através do microscópio de força atômica (MFA) (Nanosurf easyScan 2 STM, Suíça) pode-se avaliar a nanotopografia do filme de quitosana e dos nanobiocompósitos de quitosana contendo 10, 100 e 1.000 $\mu\text{g/mL}$ de NFC. 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 μm . A rugosidade da superfície foi caracterizada pelo MFA 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).

5.1.9 Análise das propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas do filme de quitosana e dos nanobiocompósitos de quitosana contendo 10, 100 e 1.000 µg/mL de NFC foram investigadas conforme a norma ASTM D 882-98 usando um texturômetro TA.XT Plus (Stable Micro System, Reino Unido). As dimensões dos espécimes foram de 40 x 5 mm, os espécimes foram colocados entre grampos de cabelo pneumáticos com a distância entre os grampos ajustada para 20 mm e a velocidade de tração foi ajustada para 0,8 mm/seg. Os testes foram realizados a 25°C. No mínimo cinco medições foram realizadas para cada amostra. A partir dessa análise, o módulo elástico (GPa) e a deformação de ruptura do filme de quitosana e os nanobiocompósitos de quitosana e NFC foram conhecidos.

5.1.10 Análise da Porosidade

A porosidade do filme de quitosana e dos nanobiocompositos de quitosana contendo 10, 100 e 1.000 µg/mL de NFC foi baseada na quantidade de solvente absorvida por fragmento dos filmes em imersão. Os filmes foram cortados na dimensão 2cm x 2cm e pesados (P_s) em balança analítica (AB204-S, Mettler Toledo, EUA) e em seguida foram imersos em etanos 95% por 1 h. Após esse tempo, as amostras foram pesadas úmidas (P_u) e sua espessura mensurado por um paquímetro. Os dados coletados foram inseridos na seguinte fórmula, onde *Detanol* é a densidade do etanol (0,79 g/mL) e *E* é a espessura do nanobiocompósito. Para o cálculo da porosidade a fórmula utilizada foi de acordo com o estudo de ANDRADE; *et al.*, 2023:

$$P(\%) = \frac{P_u - P_s \times 100}{Detanol \times E}$$

5.2 Avaliação da citocompatibilidade de fibroblastos e queratinócito cultivados em nanobiocompósitos de quitosana e nanofibra de celulose.

5.2.1 Cultivo *in vitro* de fibroblastos e queratinócitos humanos no nanobiocompósitos de quitosana e nanofibra de celulose

As amostras de filme de quitosana e de nanobiocompósitos foram esterilizadas em luz UV por 30 min e posteriormente imersas em meio de cultivo contendo 2% de antibiótico penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL) e, então mantidas em estufa incubadora (Thermo Fisher, EUA) em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ a 37°C por 24h. Após o processo de esterilização, as células cultivadas em Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) com 4,5 g/L de glicose, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos contendo penicilina e estreptomicina foram colocadas em contato com os biomateriais, separadamente. Em seguida, foi mantida em estufa incubadora em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ a 37°C para os testes biológicos. As células utilizadas foram linhagens imortalizadas de queratinócito (HaCaT) e fibroblasto humano (CCD-1072Sk) oriundas do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ). Para os ensaios biológicos foram selecionados o grupo controle (placa de polietileno), o filme de quitosana e os nanobiocompósitos de quitosana contendo 100 e 1.000 µg/mL de NFC.

5.2.2 Morfologia e área celular

A morfologia celular foi observada utilizando-se um microscópio de luz invertido (ICM 405, Zeiss, Alemanha) acoplado com câmera AxionCam ERc5 para visualizar e registrar as células cultivadas por 24 h e 48 h. Os queratinócitos (5×10^4 células/poço) e fibroblastos (4×10^4 células/poço) foram semeadas em em placas de 24 poços contendo o grupo controle (placa de polietileno), o filme de quitosana e os nanobiocompósitos de quitosana contendo 100 e 1.000 µg/mL de NFC. A partir das imagens registradas foi possível medir a área celular através do software morfométrico ImageJ (Wayne Rasband). Esse ensaio foi realizado em triplicata com três repetições independentes, então o total de 100 células foi avaliado por grupo entre as repetições.

5.2.3 Ensaio de citometria de fluxo por marcação com Iodeto de Propídio

Para avaliar a integridade da membrana foi utilizado o iodeto de propídio que tem um alto peso molecular e não são susceptíveis em penetrar em células viáveis e intercalar no DNA. Os queratinócitos (5×10^4 células/poço) e fibroblastos (4×10^4 células/poço) foram semeadas em uma placa de 24 poços já contendo os diferentes tratamentos: controle, filme de quitosana e nanobiocompósitos de quitosana contendo 100 e 1.000 $\mu\text{g/mL}$ de NFC. Após 24 h e 48 h de exposição para que a aderência das células, os sobrenadantes referente a cada tratamento foi coletado e as células tripsinizadas. As células foram coletadas por centrifugação a 1500 rpm por 3 min. Então, as células colocadas em PBS 1x e coradas com PI (50 $\mu\text{g/ml}$) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). As suspensões de células foram lidas em um citômetro BD FACSCanto™ (Becton Dickinson, EUA). Foram realizadas em triplicata com três repetições independentes, contando 10.000 células por repetição. Os dados foram analisados usando o *software* FlowJo™ (BD Biosciences, USA).

5.2.4 Ensaio de MTT

A atividade mitocondrial foi avaliada pelo ensaio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio-brometo; Sigma-Aldrich, EUA) que é convertido em Formazam através da enzima succinato desidrogenase, encontrada em a membrana mitocondrial (RAMBERSAD, 2012). O ensaio MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide) (Sigma-Aldrich, USA) foi realizado semeando os queratinócito (8×10^3 células/poço) e fibroblasto (4×10^3 células/poço), separadamente, em placas de 96 poços contendo o grupo controle, o filme de quitosana e os nanobiocompósitos de quitosana contendo 100 e 1.000 $\mu\text{g/mL}$ de NFC, por 24 e 48 h baseado na Norma ISO 9001. Após esse tempo, o meio foi descartado e em seguida as células foram incubadas com meio de cultivo contendo MTT (Sigma Aldrich, EUA) à 10% (v/v), durante 4 h. Após esse tempo, o meio foi retirado para adição de Isopropanol-ácido (0,04 M HCl) a fim de diluir o formazam sintetizado para a leitura no espectrofotômetro (Varioskan Flash Multimode Reader,

Thermo Fisher Scientific, EUA) à 570 nm. O ensaio foi realizado em quadruplicata e três repetições independentes.

5.2.5 Ensaio de Alamar Blue

O ensaio Alamar Blue é baseado no indicador de oxidação-redução (REDOX) resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona10-óxido), que é um aceptor intermediário de elétrons na cadeia de transporte de elétrons sem a interferência normal de elétrons, formando resofurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona) (RAMBERSAD, 2012). Antes de semear as celular, foi realizado a privação de soro por 24 horas. De acordo com a literatura, foi utilizado em queratinócito 0% de SFB e fibroblasto 0,5% de SFB (GOISSIS *et al.*, 2007; GOLPOUR *et al.*, 2014; MANICONE *et al.*, 2011). Após esse tempo, os queratinócitos (5×10^4 células/poço) e fibroblastos (4×10^4 células/poço) foram semeados em placas de 24 poços onde havia os biomateriais e cultivados *in vitro* em meio de cultura celular DMEM suplementado com 10% de SFB em estufas com 5% de CO₂ a 37°C. As células foram expostas aos grupos controle (placa poliestireno, 24 poços) filme de quitosana e nanobiocompósito de quitosana contendo 100 e 1.000 µg/mL de NFC durante 24 h e 48 h. Ao final do período de exposição, o meio de cultivo era retirado para que fosse adicionado meio de cultivo suplementado com o corante Alamar Blue. As células ficaram em contato com esse corante por 4 h e armazenadas na estufa de cultivo. Em seguida, o meio foi coletado e transferido para uma placa de 96 poços afim de realizamos a leitura da fluorescência (580 – 610 nm) no espectrofotometro (Varioskan Flash Multimode Reader, Thermo Fisher Scientific, EUA). O ensaio foi realizado em quadruplicata e três repetições independentes.

5.2.6 Ensaio de cicatrização *in vitro* (Wound Healing)

Para conhecer a migração celular das células sobre o filme e nanobiocompósito, processo essencial durante a fase de reepitelização da cicatrização de ferida, foi avaliado o cultivo *in vitro* das células (fibroblastos e queratinócito) nos nanobiocompósito. As células foram semeadas (8×10^4 células/poço) em placas de 6 poços e cultivadas sobre o filme de quitosana, nanobiocompósito de quitosana contendo 1.000 µg/mL de NFC, além do grupo

controle (apenas placa de poliestireno, sem filme e nanobiocompósito). Após atingirem 80% de confluência, um arranhão foi feito com auxílio de um ponteira P1.000. Posteriormente, os poços de cultura contendo as amostras foram lavados com PBS, para evitar que as células voltem a aderir na placa. A área com a sua cicatriz e sua evolução foram observadas em diferentes tempos (0, 24, 48 e 72 horas) até a completa reconstituição da área, onde todo o processo foi fotografado em microscópio de fase invertida (PrimoVert, Zeiss, EUA) equipado com uma câmera acoplada (AxionCam ERc5). O ensaio foi realizado em duplicata.

5.2.7 Avaliação da produção de colágeno em fibroblastos

A produção de colágeno foi avaliada em fibroblastos utilizando o corante *Direct Red* (Sigma-Aldrich, USA). Os fibroblastos foram semeados (8×10^4 células/poço) em placas de 24 poços, nesta continha poços com o filme de quitosana, nanobiocompósito de quitosana com NFC ($1.000 \mu\text{g/mL}$) e o grupo controle (sem filme e nanobiocompósito). No dia seguinte o meio de cultivo foi trocado para retirar células que não aderiram e *debris*. Os meios de cultivo após 48h de cultivo com fibroblasto foram reservados para a análise do colágeno. O meio de cultivo reservado foi adicionado à solução de 1% do *Direct Red* em solução aquosa de ácido pícrico a 1,2%, e então permaneceram sob leve agitação em agitador tipo *shaker* (Thermo Max Q 400, Thermo Fischer Scientific, USA) por 1 h. Em seguida, foram centrifugadas por 10 min a 10.000 rpm, o pellet foi ressuspenso em $300 \mu\text{L}$ de solução de ácido acético ($0,1 \text{ mol/L}$) e centrifugadas novamente. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* foi solubilizado em $150 \mu\text{L}$ de hidróxido de sódio ($0,1 \text{ mol/L}$). Os volumes das amostras foram repassados para placa de 96 poços para leitura à 550 nm em espectrofotômetro (Varioskan Flash Multimode Reader, Thermo Fisher Scientific, EUA). O ensaio foi realizado em triplicata e três repetições independentes.

5.3 Análises Estatísticas

Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey para os ensaios de pH, ângulo de contato, intumescimento, taxa da degradação porosidade e propriedades mecânicas. Os

ensaios de citocompatibilidade e produção de colágeno tiveram suas médias comparadas pelo teste de Dunnett. Os resultados foram apresentados como médias \pm erro padrão da média. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos e a análise foi realizada no *software GraphPad Prism* versão 9 (GraphPad, USA).

6. RESULTADOS

6.1 Caracterização físico-química do filme de quitosana e dos nanobiocompósitos de quitosana e nanofibra de celulose

Através do método de *Casting* foi possível a síntese de um nanobiocompósito de quitosana com diferentes concentrações de NFC. Na imagem da Figura 11, podemos observar que o filme de quitosana e os nanobiocompósitos de quitosana e NFC são similares a um filme e translúcido.

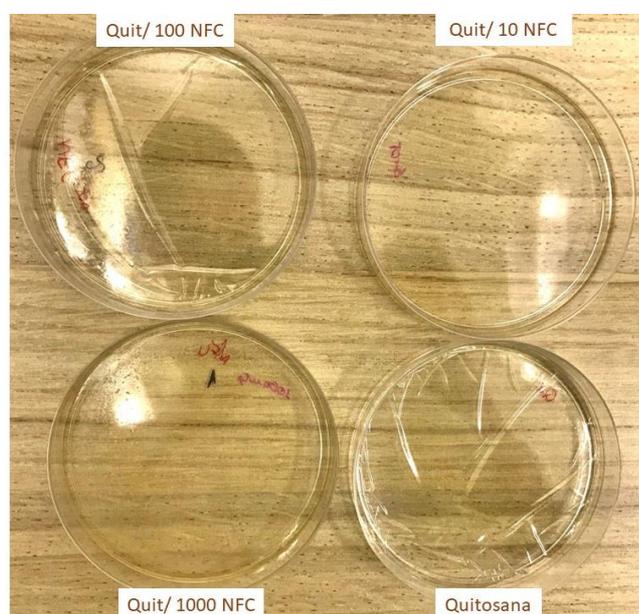


Figura 11 - Imagens do filme de quitosana e dos nanobiocompósitos de quitosana com diferentes concentrações de nanofibras de celulose NFC em placas de petri não tratadas.

Os nanobiocompósitos foram analisados por microscopia Raman para analisar a homogeneidade da amostra. As imagens provenientes dessa análise da quitosana reticulada pura e com adição de NFC (Figura 12) mostra a distribuição espacial das espécies moleculares de mistura de polímeros dessa análise. Para a obtenção das imagens foi utilizado a integração da banda 1180 e 1300 cm^{-1} que são relacionadas a deformação (CNH) e as características da molécula de quitosana. Dessa forma, percebemos que a síntese realizada resulta em uma mistura polimérica homogênea sem agregados de NFC. As amostras mostram pequenas variações de intensidade, que pode ser relacionado a não planaridade de suas superfícies, o que interfere no foco durante a análise e como consequência na intensidade das bandas.

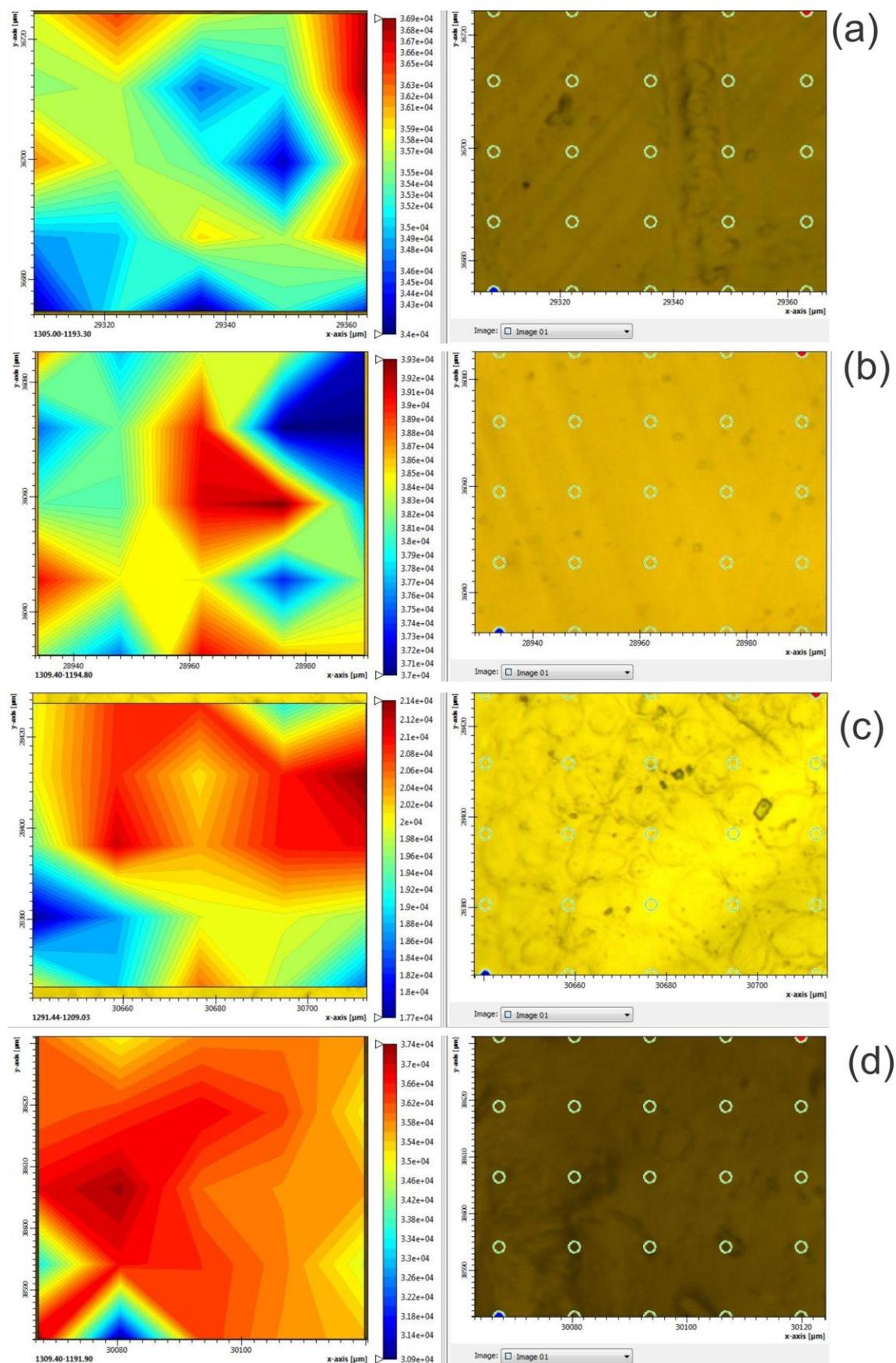


Figura 12 - Imagem da microscopia Raman das amostras do filme de quitosana (a), nanobiocompósito de quitosana com 10 µg/mL de NFC (b), 100 µg/mL de NFC (c) e 1.000 µg/mL de NFC (d). As imagens na coluna do lado esquerdo são das imagens geradas por informação espacial e do espectro e as

imagens do lado direito são do filme/nanobiocompósito e os pontos marcados (círculo verde) sobre a amostra de onde o laser focou para mapear toda área de interesse.

Os resultados de taxa de intumescimento e degradação são encontrados na Figura 13. As análises estatísticas foram realizadas comparando as médias de cada grupo dentro de cada tempo de exposição, visto que os diferentes tempos de exposição testados foram realizados em ensaios independentes. No ensaio de intumescimento (Figura 13, A) mostra que a NFC aparentemente influenciou no maior intumescimento em 2 h para o nanobiocompósito de quitosana com 1.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NFC, mas essa diferença não foi significativa. Observa-se que o filme de quitosana apresentou seu intumescimento máximo após 6 h de exposição ao meio aquoso, sendo estatisticamente diferente de nanobiocompósito de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0,05$). No teste de degradação, não foi observado diferença significativa ($p > 0,05$). Nos resultados desse ensaio encontramos valores negativos em razão do peso final em alguns grupos foi superior ao peso inicial. Dessa forma, esses valores de taxa de degradação negativos indicam que nesses grupos não foram observados perda de massa. A perda de massa até de 4 horas de exposição foi notada principalmente no filme de quitosana e nanobiocompósito com menor concentração de NFC. Portanto, observou-se que a incorporação de NFC melhorou a estabilidade dos andaimes. Após 1 dia de exposição observamos menores perda de massa entre os grupos.

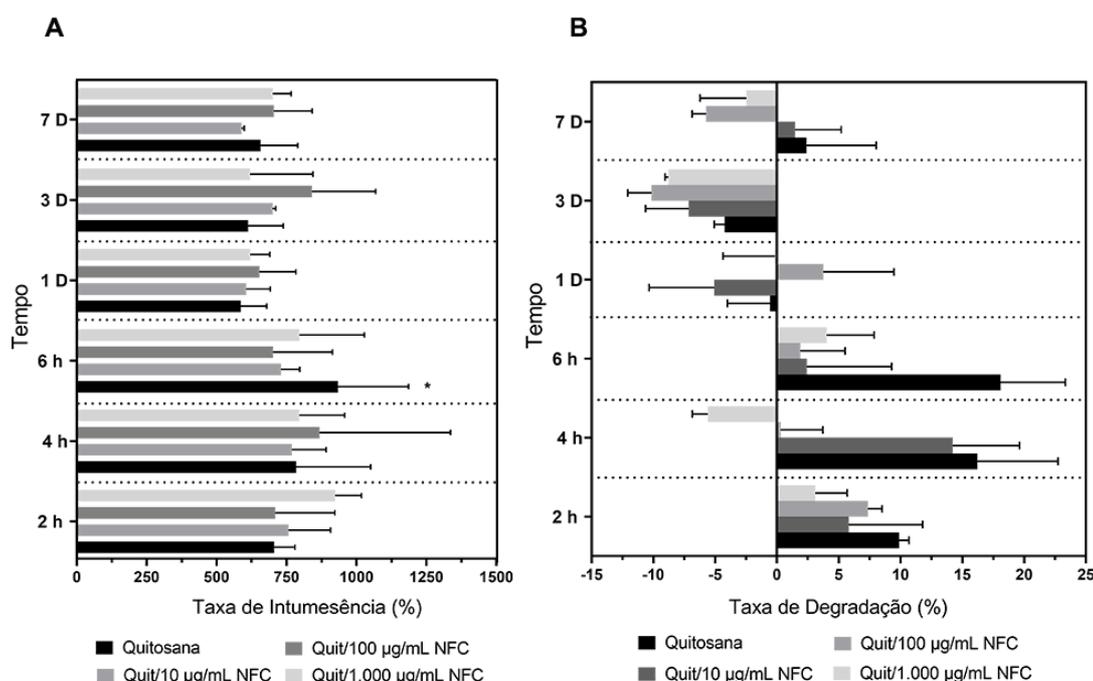


Figura 13 - Taxas de intumescência (A) e degradação (B) das amostras do filme de quitosana, nanobiocompósito de quitosana com 10, 100 e 1.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As médias foram comparadas por ANOVA seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$ foram considerados significativos, $n=9$ por grupo.

O ensaio de medida de pH mostrou que não ocorreram alterações quando na presença do nanobiocompósito e filme de quitosana (Tabela 3). A avaliação do ângulo de contato (Tabela 3) mostrou que as superfícies dos nanobiocompósitos são hidrofílicas, dado que em todos os ângulos foram menores que 90° (RUPP *et al.*, 2014). O nanobiocompósito de quitosana com 1.000 µg/mL de NFC obteve ângulo menor que o grupo com quitosana apenas. Os grupos de nanobiocompósitos contendo 10 µg/mL de NFC foram estatisticamente diferentes do grupo com 1.000 µg/mL de NFC ($p < 0,05$), logo, a concentração de NFC contribuiu para uma maior hidrofiliabilidade do nanobiocompósito. Acerca da porosidade, baseado em Andrade et al., 2023 as taxas entre 60 e 90% são as mais indicadas e o nanobiocompósito de quitosana e NFC apresentou valores próximo ao menor valor recomendado. Dentre as taxas de porosidade dos nanobiocompósitos não observou diferença estatística ($p > 0,05$).

Tabela 3 - Os resultados dos ensaios de porosidade, ângulo de contato e pH dos nanobiocompósitos de quitosana com diferentes concentrações de NFC, seguem as médias seguidas pelo desvio padrão. As médias foram comparadas por ANOVA seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$ foram considerados significativos, $n=9$.

Amostras	Porosidade (%)	Ângulo de Contato (θ)	pH
1.000 NFC/Quitosana	52 ± 13,8	60 ± 6,0	7,67 ± 0,10
100 NFC/Quitosana	54 ± 22,8	68 ± 7,5	7,68 ± 0,07
10 NFC/Quitosana	42 ± 6,0	73 ± 5,1*	7,71 ± 0,05
Quitosana	52 ± 11,5	66 ± 8,1	7,70 ± 0,05

A análise da topografia pela microscopia de luz invertida demonstra que a adição de NFC no filme de quitosana influenciou na rugosidade. Como é possível observar na Figura 14 nos grupos contendo NFC observa picos topográficos que não são visualizados no grupo contendo apenas quitosana. Desse modo, a NFC aumentou a rugosidade da superfície do filme e quitosana.

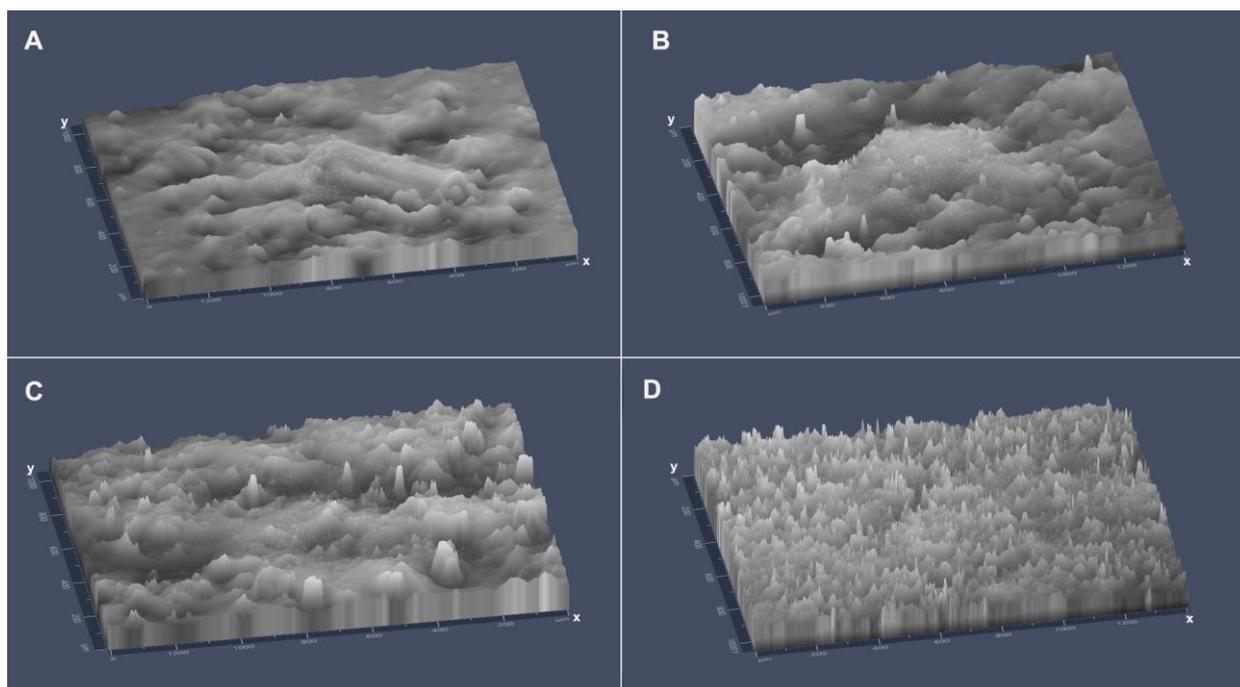


Figura 14 - Imagens similares a uma reconstrução 3D produzidas através do software Zen (Zeiss) da topografia do filme de quitosana (A) e nanobiocompósitos contendo 10 $\mu\text{g/mL}$ de NFC (B), 100 $\mu\text{g/mL}$ de NFC (C) e 1.000 $\mu\text{g/mL}$ de NFC (D). As dimensões da área observada são 1000 μm no eixo y e 1400 μm no eixo x em todas as imagens.

Com base na análise de microscopia de força atômica, percebe-se estruturas na superfície dos biomateriais na escala nanométrica, dado que na altura estão escala com 120 nm e 390 nm. Logo, as cavidades e elevações visualizadas nas imagens estão na escala nanométrica. Nos nanobiocompósitos com maior concentração de NFC (1.000 $\mu\text{g/mL}$) percebe-se maior rugosidade quando comparado ao nanobiocompósito com menor concentração (Figura 15).

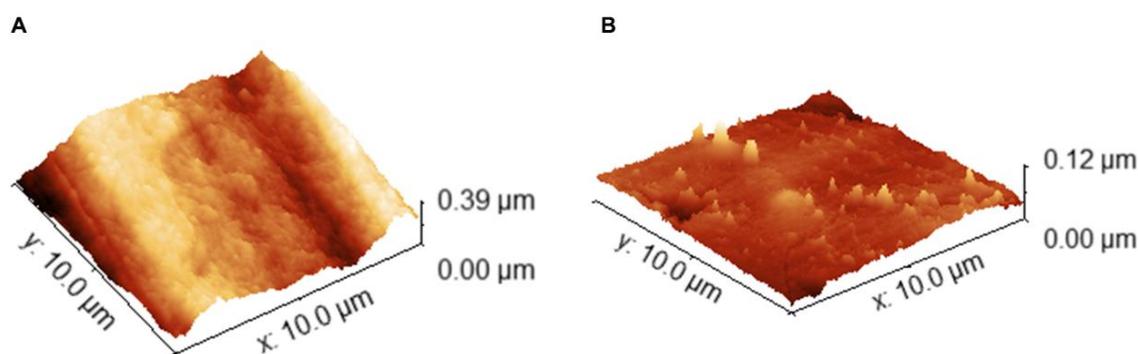


Figura 15 - Imagens de Microscopia de Força Atômica obtidas da avaliação do nanobiocompósito de quitosana contendo 10 $\mu\text{g/mL}$ de nanofibras de celulose (NFC) (A) e com 1.000 $\mu\text{g/mL}$ de NFC (B).

A partir da análise das propriedades mecânica (tabela 4) a rigidez do material diante dos valores do módulo elástico revelou uma diminuição ($p < 0,05$) do módulo elástico em nanocompósito de quitosana contendo 1.000 $\mu\text{g/mL}$ NFC ($0,002 \pm 0,0015$) e 100 $\mu\text{g/mL}$ NFC ($0,005 \pm 0,0007$) quando comparado a 10 $\mu\text{g/mL}$ de NFC ($0,008 \pm 0,0007$) e filme de quitosana ($0,007 \pm 0,0006$) que não diferiram entre si ($p > 0,05$). A deformação de ruptura (ou deslocamento) revela a relação entre a variação dimensional e as dimensões iniciais do corpo. Nessa análise houve uma menor deformação de ruptura (deslocamento) em nanobiocompósito de quitosana contendo 1.000 $\mu\text{g/mL}$ de NFC ($4,233 \pm 0,576$; $p < 0,05$) quando comparado aos outros grupos de 10 $\mu\text{g/mL}$ de NFC ($5,885 \pm 1,037$), 100 $\mu\text{g/mL}$ de NFC ($6,017 \pm 1,574$) de NFC e filme de quitosana ($5,759 \pm 0,826$).

Tabela 4 - Propriedades mecânicas do filme de quitosana e dos nanobiocompósitos de com diferentes concentrações de NFC. As médias foram comparadas por ANOVA seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Amostras	Módulo elástico (GPa)	Deformação de ruptura (%)
1.000 NFC / Quitosana	$0,002 \pm 0,0015$	$4,233 \pm 0,576$
100 NFC / Quitosana	$0,005 \pm 0,0007$	$6,017 \pm 1,574$
10 NFC / Quitosana	$0,008 \pm 0,0007$	$5,885 \pm 1,037$
Quitosana	$0,007 \pm 0,0006$	$5,759 \pm 0,826$

6.2 Avaliação da citocompatibilidade do nanocompósito de quitosana e nanofibra de celulose em fibroblastos e queratinócitos humanos cultivados *in vitro*

As imagens representativas obtidas por microscopia de luz invertida de queratinócito e fibroblasto no filme de quitosana e nanobiocompósito de quitosana e NFC podem ser visualizadas na Figura 16 e 17. Baseado nos registros feitos pela microscopia de luz invertida pode-se mensurar a área celular das células expostas ao filme de quitosana e aos nanobiocompósito no *software ImageJ*. Dessa forma observou que em contato com a superfície rugosa do filme e nanobiocompósitos as células tiveram uma alteração na área quando comparado ao controle (Figura 16 e 17).

Após os fibroblastos serem cultivados, observou que após 24 h de exposição houve diferença significativa dos valores da área celular (Figura 16, E) nos grupos formados pelo filme de quitosana, nanobiocompósito de quitosana contendo 100

$\mu\text{g/mL}$ e $1.000 \mu\text{g/mL}$ de NFC quando comparado ao controle ($p < 0,05$). Após 48 h (Figura 16, J) de exposição apenas o nanobiocompósito de quitosana e NFC apresentou diferença com o controle ($p < 0,05$).

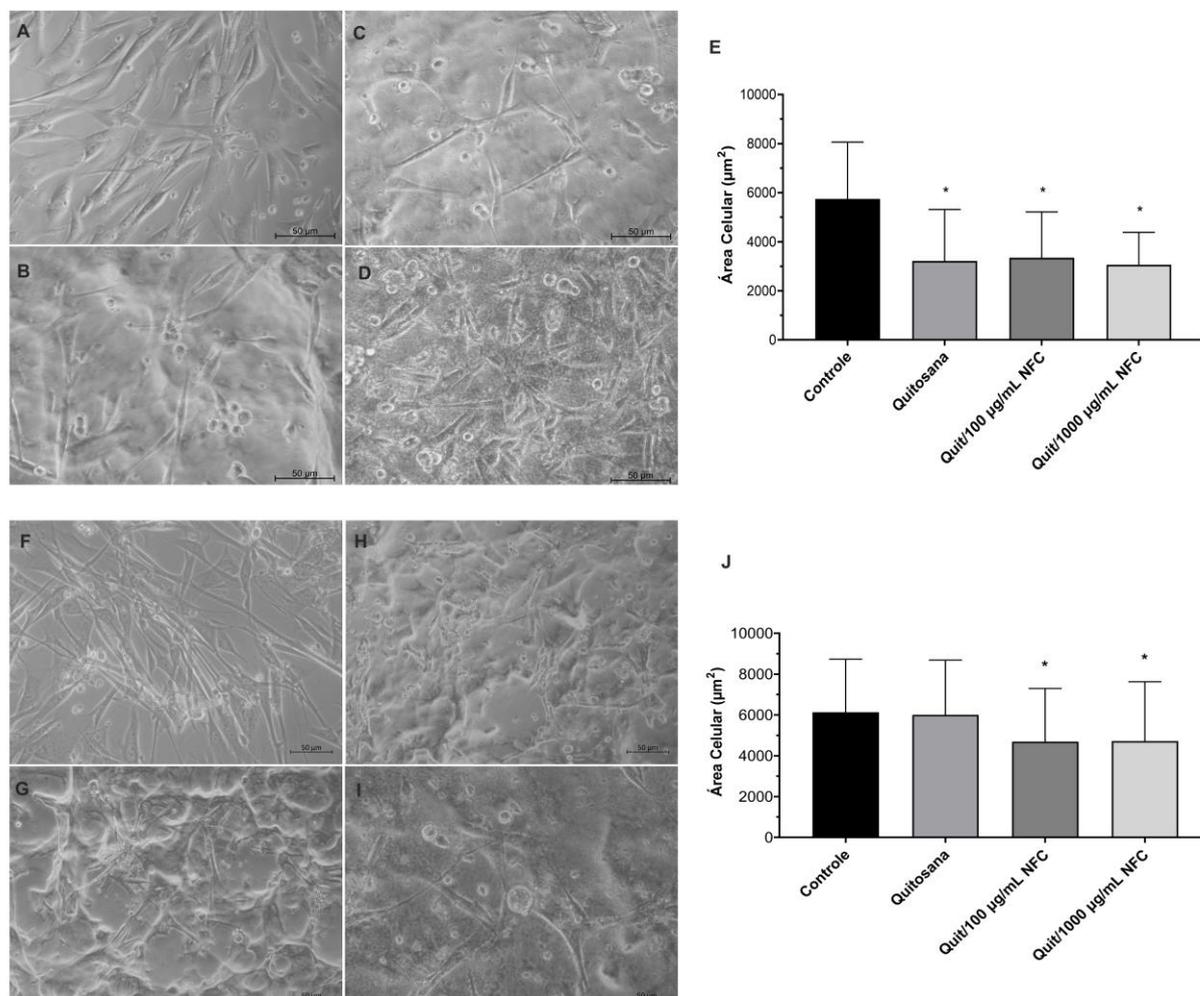


Figura 16 - Imagem representativa da morfologia dos fibroblastos após exposição por 24 h (A, B, C, D) e 48 h (F, G, H, I) em filme e nanobiocompósitos com diferentes concentrações de NFC. A e F – controle; B e G – quitosana; C e H – quitosana com $100 \mu\text{g/mL}$ NFC; D e I – quitosana com $1.000 \mu\text{g/mL}$ NFC. Ampliação $200\times$ e barra de escala = $50 \mu\text{m}$. Resultado da área celular (μm^2) medida pelo software *ImageJ*, após 24 h (E) e 48 h (J) de exposição a diferentes concentrações de CNF. Cada valor representa a média \pm (SEM) de três experimentos independentes, as médias foram comparadas por ANOVA post hoc Dunnett e valores de $p < 0,05$ foram estatisticamente significativos, $n = 100$.

Nos queratinócitos, apresentou diferença na área celular ($p < 0,05$) após 24 h (Figura 17, E) e 48 h (Figura 17, J) de exposição entre o filme de quitosana, nanobiocompósito de quitosana contendo $100 \mu\text{g/mL}$ e $1.000 \mu\text{g/mL}$ de NFC quando comparado ao controle (Figura 17). Nas imagens representativas do microscópio invertido observou também a mudança no formato celular quando são comparados com o grupo controle (Figura 16, A e D).

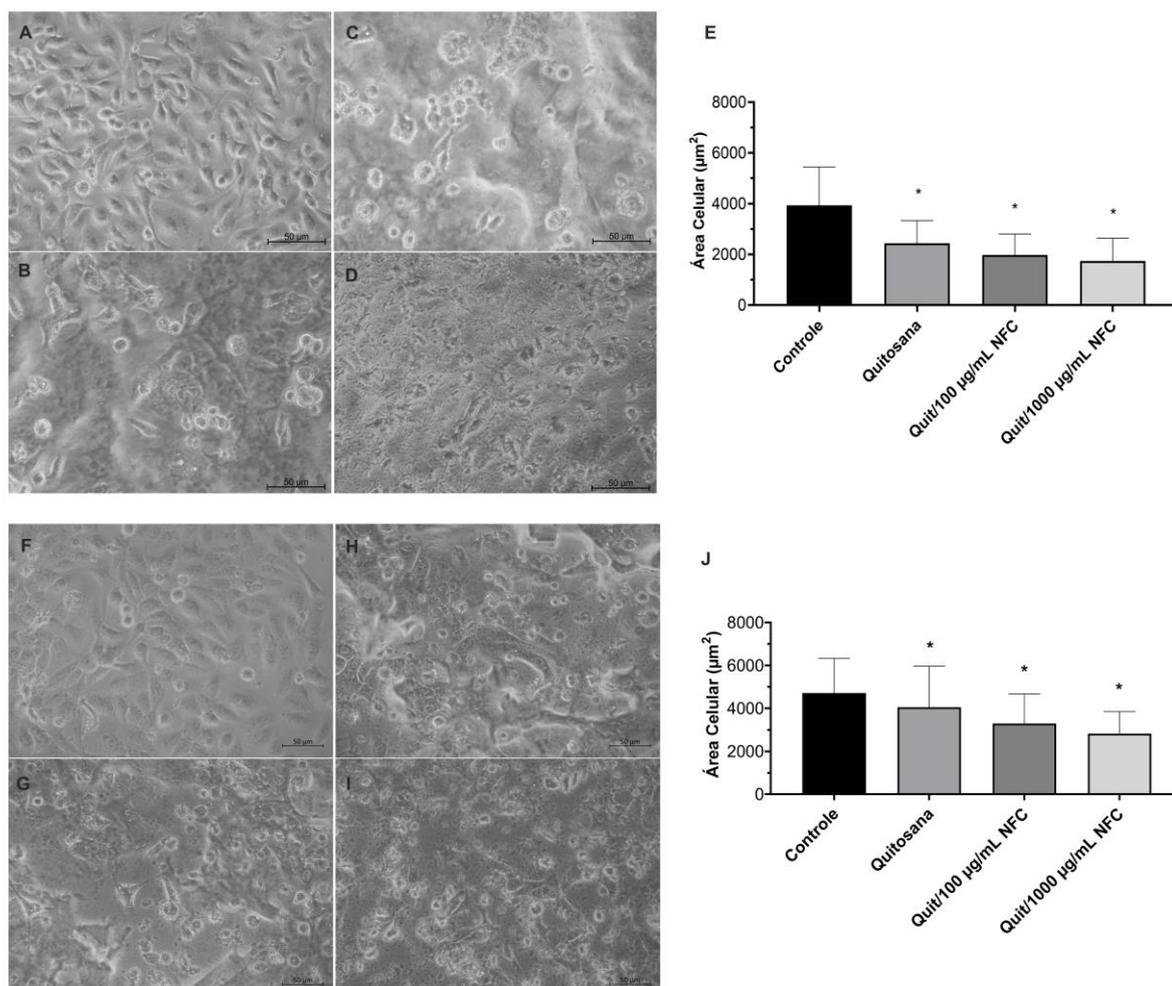


Figura 17 - Imagem representativa da morfologia dos queratinócitos após exposição por 24 h (A, B, C, D) e 48 h (F, G, H, I) em filme de quitosana e nanobiocompósitos de quitosana com diferentes concentrações de NFC. A e F – controle; B e G – quitosana; C e H – quitosana com 100 µg/mL NFC; D e I – quitosana com 1.000 µg/mL NFC. Ampliação 200x e barra de escala = 50 µm. Resultado da área celular (µm²) medida pelo software ImageJ, após 24 h (E) e 48 h (J) de exposição a diferentes concentrações de CNF. Cada valor representa a média ± (SEM) de três experimentos independentes, as médias foram comparadas por ANOVA post hoc Dunnett e valores de p<0,05 foram estatisticamente significativos.

Baseado no ensaio de citometria de fluxo, foi analisada a relação entre os dados da dispersão frontal (FSC) que detecta a dispersão ao longo do caminho do laser indicando o tamanho da amostra e a dispersão lateral (SSC) que mede a dispersão em um ângulo de 90° em relação ao laser, o qual diz respeito a complexidade/granulosidade da amostra. Nessa análise os gráficos foram divididos em quatro quadrantes (Q1, Q2, Q3 e Q4; Tabela 5), as porcentagens em cada grupo foi coletada conforme o *software* FlowJo™ e, em seguida, a estatística foi realizada desses valores de modo a avaliar a diferença entre eles.

Tabela 5 - Descrição da relação SSC x FSC de cada quadrante baseados na análise de citometria de fluxo.

Quadrantes	Descrição
Q1	menor tamanho (<50K) e maior granulosidade (>50K)
Q2	maior tamanho (>50K) e maior granulosidade (>50K)
Q3	maior tamanho (>50K) e menor granulosidade (<50)
Q4	menor tamanho (<50K) e menor granulosidade (<50K)

Os fibroblastos após 24 h de exposição apresentaram diferença apenas no quadrante Q3 ($p < 0,05$), onde houve uma redução da porcentagem amostral nesse quadrante do filme e dos nanobiocompósitos de quitosana e NFC quando comparado com o controle (Figura 18). Os fibroblastos após 48 h de exposição apresentaram diferenças nos quatro quadrantes ($p < 0,05$). No Q1 a diferença foi entre o filme de quitosana onde se nota um aumento da porcentagem amostral quando comparado ao controle ($p < 0,05$). Em Q2 foi observado um aumento da porcentagem amostral do filme e dos nanobiocompósitos de quitosana e NFC quando comparado ao controle ($p < 0,05$). No Q3 e Q4 a diferença foi na redução da porcentagem amostral do filme de quitosana comparado ao controle ($p < 0,05$). Entretanto, nas análises do queratinócito após 24 h e 48 h de exposição não foi encontrado diferença significativa entre os quadrantes nos diferentes grupos ($p > 0,05$, Figura 19).

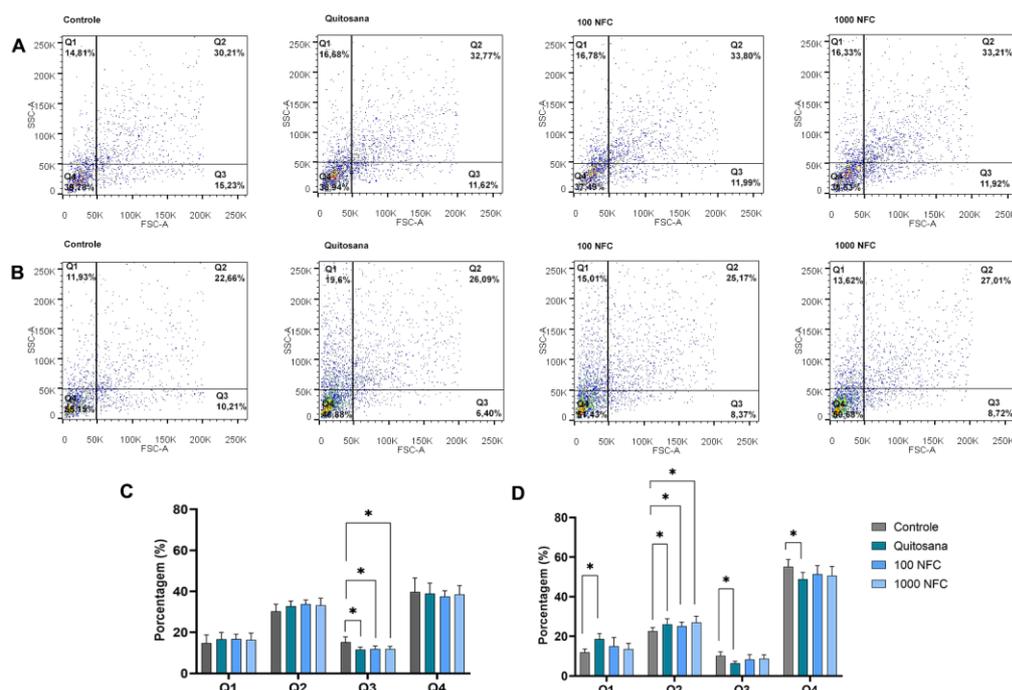
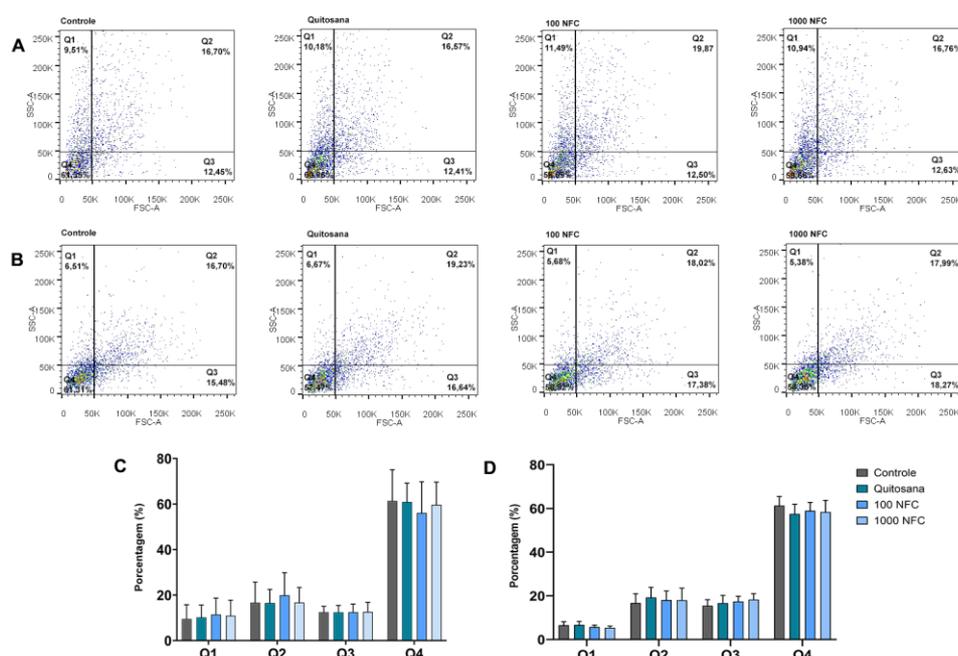


Figura 18 - Com base no ensaio de citometria de fluxo, a relação entre dados de dispersão frontal (FSC) e dispersão lateral (SSC) foram analisadas em fibroblastos durante 24 h (A,C) e 48 h (B,D) de exposição ao filme de quitosana e aos nanobiocompósitos de quitosana e NFC (100 e 1.000 µg/mL). Cada valor representa a média ± (SEM) de três experimentos independentes, em cada experimento foi analisado 10.000 eventos, as médias foram comparadas por ANOVA post hoc Dunnett e valores de $p < 0,05$ foram estatisticamente significativos.



Os dados da avaliação por marcação com iodeto de propídio no ensaio de citometria de fluxo mostram que as células estavam viáveis com sua membrana íntegra após 24 h de exposição. Observou-se um aumento dos fibroblastos cultivados nos nanobiocompósitos quando comparado com o controle (Figura 20; $p < 0,05$). Contudo, após 48 h de exposição apenas ao nanobiocompósito de quitosana com 1.000 µg/mL de NFC mostrou diferença significativa quando comparado com o controle ($p < 0,05$).

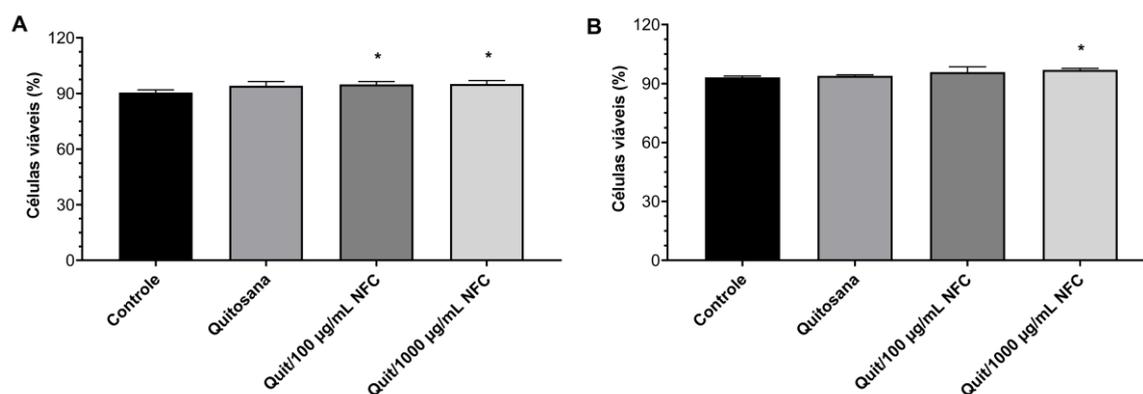


Figura 20- Resultados da marcação com iodeto de propídio para avaliar a integridade da membrana celular por citometria de fluxo de fibroblastos após 24 h (A) e 48 h (B) de exposição. Cada valor representa a média \pm (SEM) de três experimentos independentes, em cada experimento foi analisado 10.000 eventos, as médias foram comparadas por ANOVA post hoc Dunnett e valores de $p < 0,05$ foram estatisticamente significativos.

No entanto, para os queratinócitos, não foi observada diferença significativa da viabilidade celular quando comparado ao controle ($p > 0,05$) após 24 h e 48 h de exposição (Figura 21). Assim, os queratinócitos tiveram suas células viáveis com membrana íntegra mesmo após a exposição.

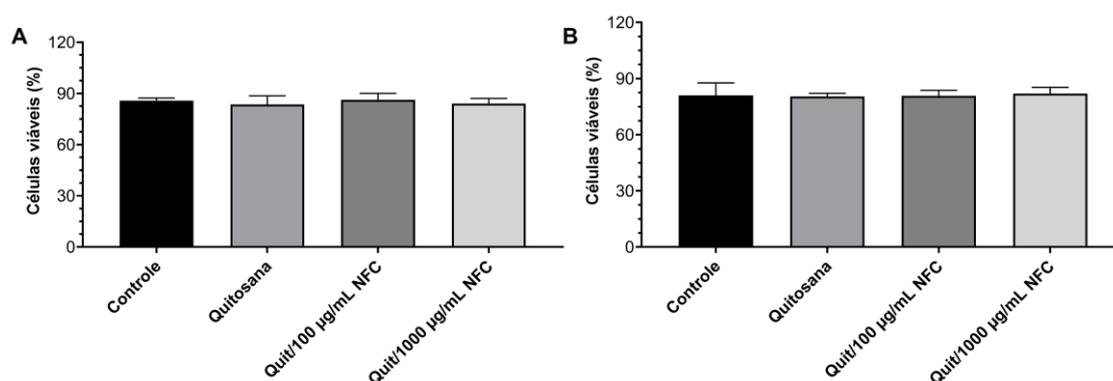


Figura 21 - Resultados da marcação com iodeto de propídio para avaliar a integridade da membrana celular por citometria de fluxo de queratinócitos após 24 h (A) e 48 h (B) de exposição. Cada valor representa a média \pm (SEM) de três experimentos independentes, em cada experimento foi analisado 10.000 eventos, as médias foram comparadas por ANOVA post hoc Dunnett e valores de $p < 0,05$ foram estatisticamente significativos.

Os valores de absorvância obtidos na leitura no espectrofotômetro foram elaborados para porcentagem, utilizando o grupo controle como parâmetro. A avaliação da atividade mitocondrial pelo método do MTT demonstrou uma redução nas porcentagens na cultura de fibroblasto ($p < 0,05$) durante o cultivo por 24 h e 48

h nos filmes de quitosana e nos nanobiocompósitos (100 e 1.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NFC) quando comparado ao controle (Figura 22).

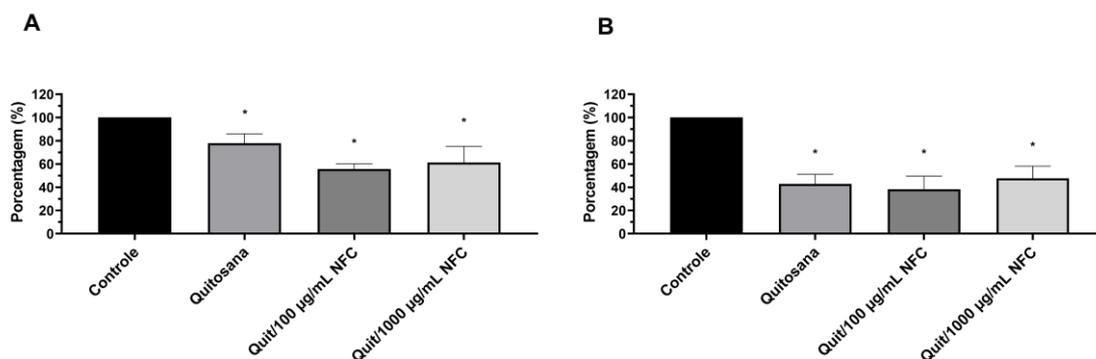


Figura 22 - Resultados do ensaio de MTT de fibroblastos durante 24 h (A) e 48 h (B) de exposição aos filmes de quitosana e nanobiocompósito de quitosana e NFC (100 e 1.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Cada valor representa a média \pm (SEM) de três experimentos independentes, as médias foram comparadas por ANOVA post hoc Dunnett e valores de $p < 0,05$ foram estatisticamente significativos.

Quando testado nas mesmas condições, o queratinócito com 24 h de exposição mostrou diferença significativa quando comparada com o controle ($p < 0,05$). Enquanto, com 48 h de exposição aos nanobiocompósitos, o queratinócito não apresentou diferença significativa com o controle ($p > 0,05$; Figura 23).

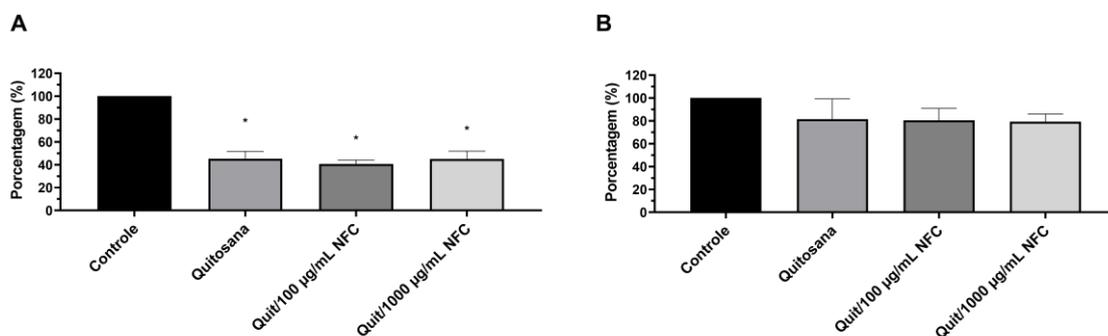


Figura 23 - Resultados do ensaio de MTT de queratinócitos durante 24 h (A) e 48 h (B) de exposição aos filmes de quitosana e nanobiocompósito de quitosana e NFC (100 e 1.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Cada valor representa a média \pm (SEM) de três experimentos independentes, as médias foram comparadas por ANOVA post hoc Dunnett e valores de $p < 0,05$ foram estatisticamente significativos.

Conforme os ensaios de Alamar Blue, foi encontrado diferença significativa após 24 h de exposição ($p < 0,05$) entre os fibroblastos expostos ao filme de quitosana e aos nanobiocompósito quando comparado ao controle (Figura 24). Contudo, após 48 h de exposição não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$).

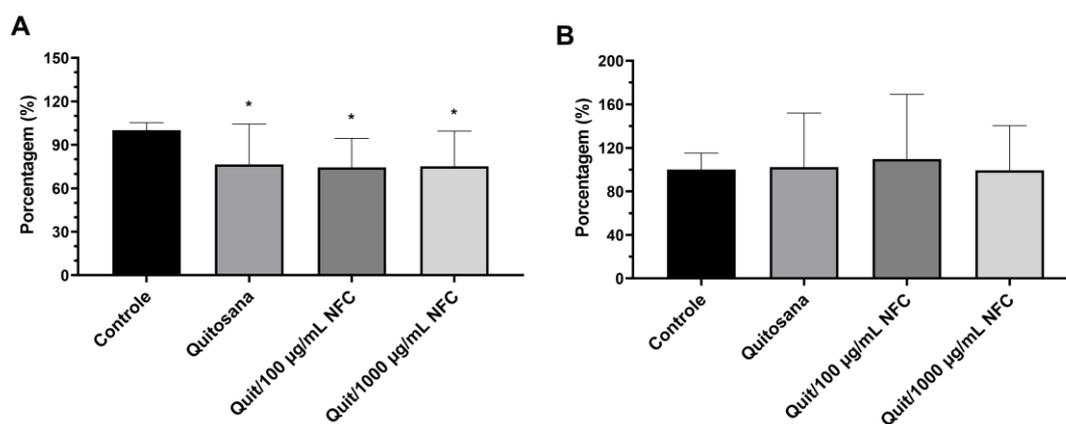


Figura 24 - Resultados do ensaio de alamar blue de fibroblasto durante 24 h (A) e 48 h (B) de exposição aos filmes de quitosana e nanobiocompósito de quitosana e NFC (100 e 1.000 µg/mL). Cada valor representa a média ± (SEM) de três experimentos independentes, as médias foram comparadas por ANOVA post hoc Dunnett e valores de $p < 0,05$ foram estatisticamente significativos.

Em queratinócitos, após 24 h de exposição também foi observado diferença significativa no ensaio de Alamar Blue ($p > 0,05$, Figura 25). No entanto, após 48 h de exposição nenhuma diferença foi observada entre o controle e os demais grupos.

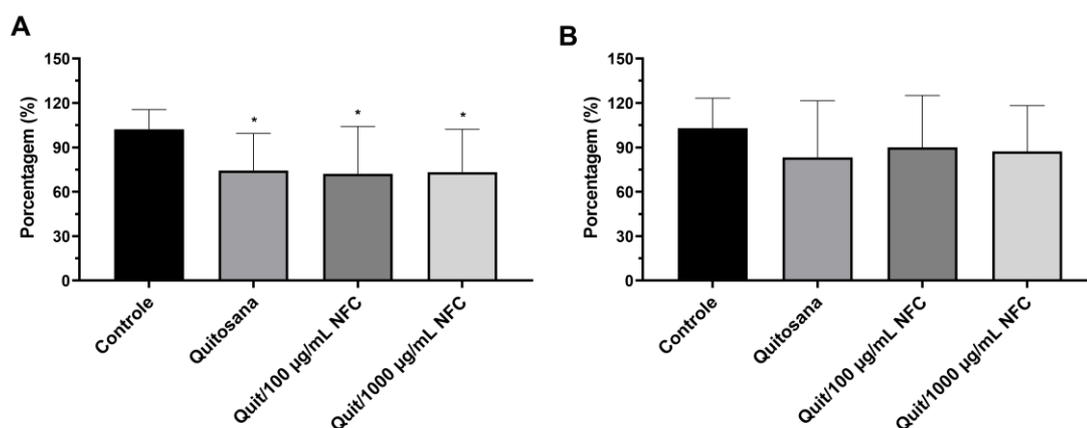


Figura 25 - Resultados do ensaio de alamar blue de queratinócitos durante 24 h (A) e 48 h (B) de exposição aos filmes de quitosana e nanobiocompósito de quitosana e NFC (100 e 1.000 µg/mL). Cada valor representa a média ± (SEM) de três experimentos independentes, as médias foram comparadas por ANOVA post hoc Dunnett e valores de $p < 0,05$ foram estatisticamente significativos.

Com o ensaio de cicatrização observou a migração e proliferação dos fibroblastos sobre o nanobiocompósito de quitosana e NFC. Após 72h de exposição, observa-se a presença de fibroblastos no local da realização da lesão *in vitro* (Figura 26). Nota-se no tempo de 72 h de exposição uma maior quantidade de célula em direção ao centro da lesão na placa de poliestireno (controle) e no nanobiocompósito

de quitosana com 1.000 $\mu\text{g/mL}$ de NFC. As imagens dos fibroblastos foram realizadas na amplificação de 40x, visto que no aumento de 100x não era possível registrar em uma imagem as duas margens da cicatriz com células. Os fibroblastos apresentam comprimento maior que os queratinócitos, o que exigia um aumento menor para captar mais detalhes na imagem.

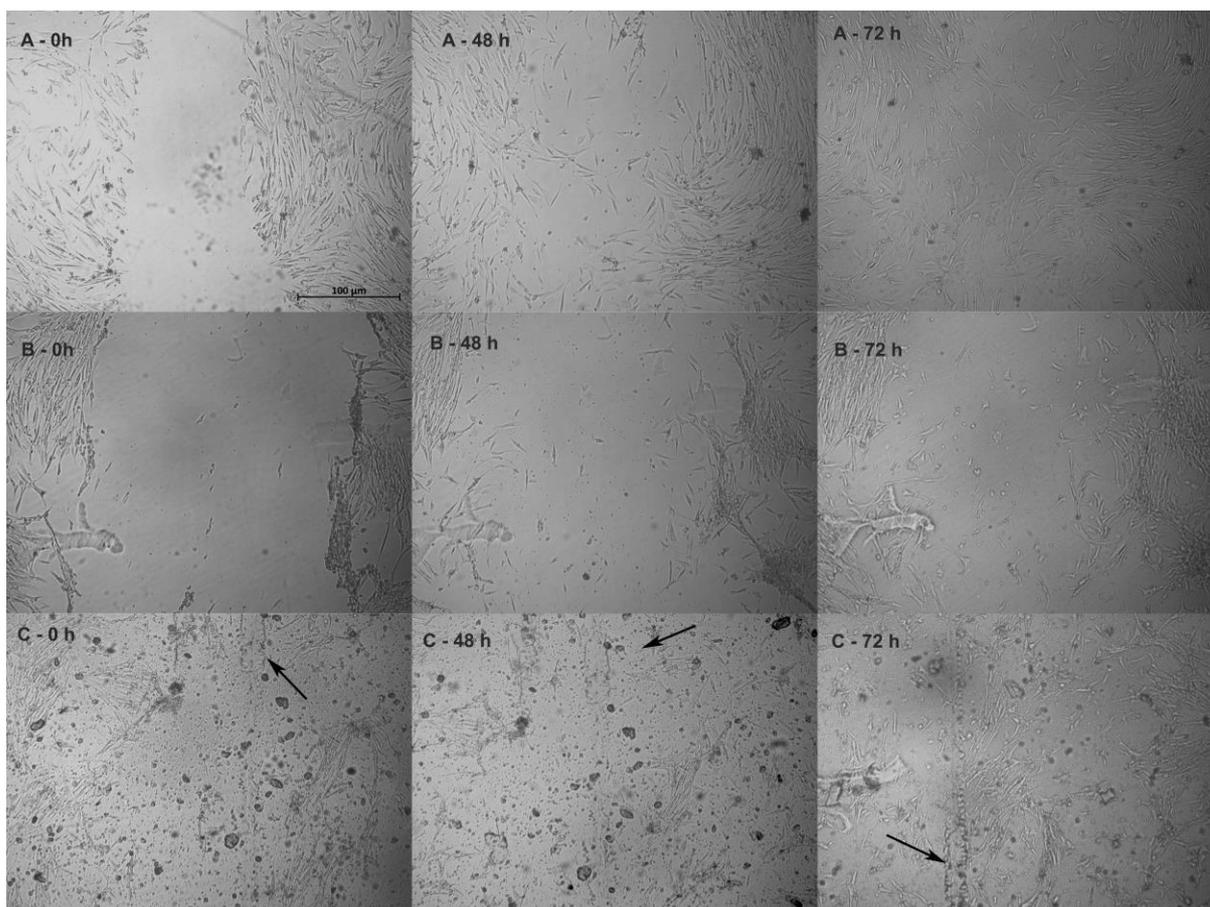


Figura 26 - Imagens representativas do ensaio de cicatrização com fibroblastos até o tempo de 72 h quando se observa fechamento da cicatriz. (A) Controle, (B) filme de quitosana e (C) nanobiocompósito de 1.000 $\mu\text{g/mL}$ de NFC. As setas mostram o rastro da ponteira no nanobiocompósito de 1.000 $\mu\text{g/mL}$ de NFC. Ampliação 40x e barra de escala = 100 μm .

Assim como visualizado em fibroblasto, observou-se a migração do queratinócito quando exposto ao nanobiocompósito de quitosana e NFC (1.000 $\mu\text{g/mL}$). Os registros obtidos após a realização da lesão mostraram que com 48 h a cicatriz estava próxima de fechar completamente (Figura 27). Assim, esses resultados mostram que os queratinócitos migraram e se proliferaram sobre os nanobiocompósitos, principalmente contendo 1.000 $\mu\text{g/mL}$ de NFC, como pode ser observado na figura 27 C.

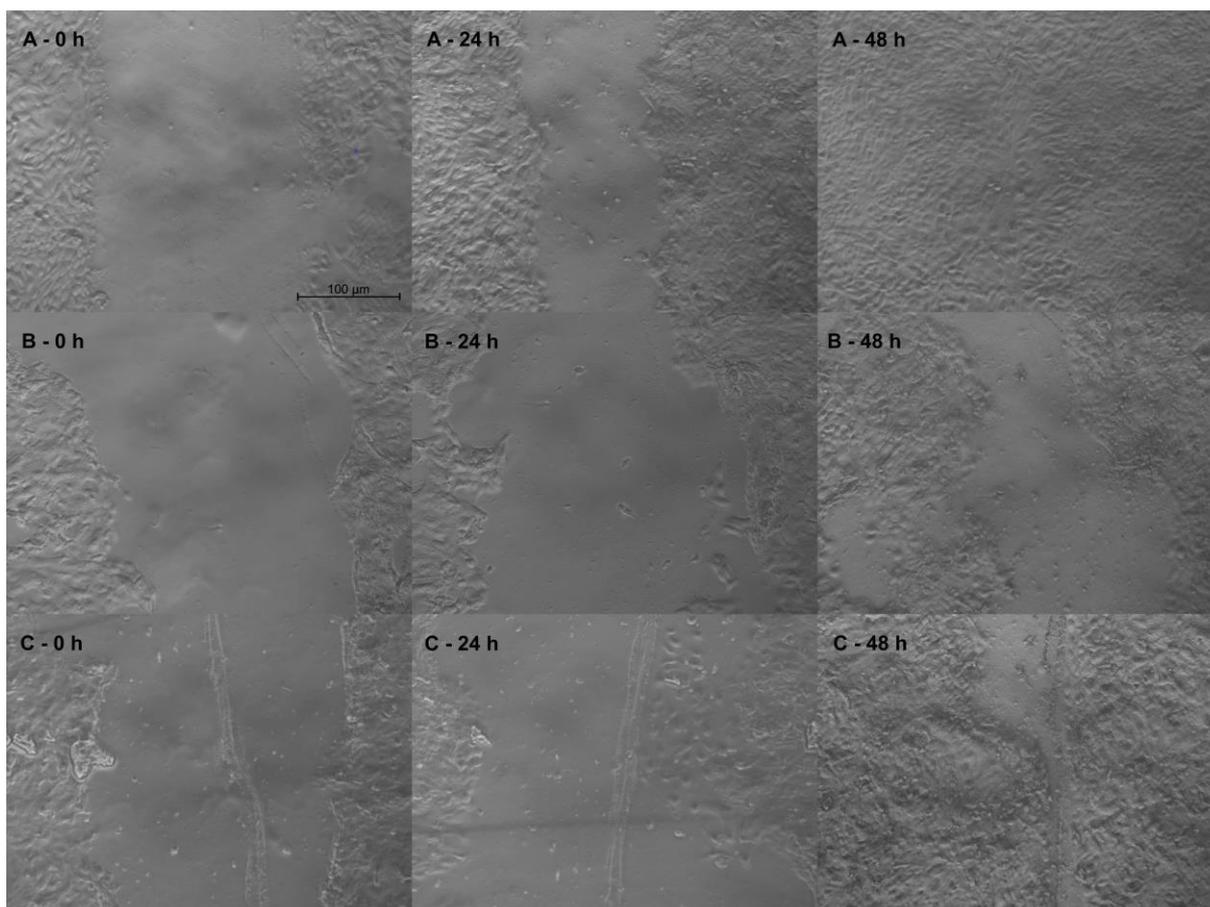


Figura 27 - Imagens representativas do ensaio de cicatrização com queratinócito até o tempo de 48 h quando se observa fechamento da cicatriz. (A) Controle, (B) filme de quitosana e (C) nanobiocompósito de 1.000 µg/mL de NFC. As setas mostram o rastro da ponteira no nanobiocompósito de 1.000 µg/mL de NFC. Ampliação 100x e barra de escala = 100 µm.

A produção de colágeno após o cultivo de fibroblastos sobre o nanobiocompósito foi avaliada utilizando o corante Direct Red. Os valores das absorvâncias foram aplicados na fórmula da regressão linear da curva de colágeno (figura 28, A) para que a quantidade de colágeno produzida nas diferentes condições experimentais fosse encontrada. Os resultados revelam que há produção de colágeno pelos fibroblastos, quando exposto ao nanobiocompósito de quitosana e NFC durante 48 h de exposição. Não houve diferença significativa quando comparado o grupo controle com filme de quitosana e nanobiocompósito de quitosana e NFC ($p > 0,05$).

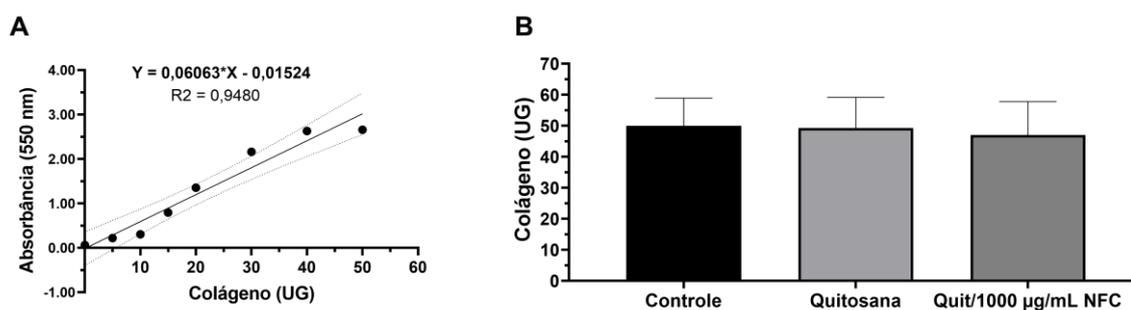


Figura 28 - Ensaio de quantificação de colágeno utilizando o corante Direct Red. (A) Curva padrão de colágeno produzida a partir de colágeno do tipo I proveniente da cauda de ratos Wistar dissolvida em ácido acético pelo corante Direct Red. Linha tracejada é referente ao intervalo de confiança (5%). (B) Quantificação de colágeno a partir dos valores de absorvância aplicados na fórmula de regressão linear ($y = 0,06063X - 0,01524$) de fibroblastos após 48 h de exposição. Cada valor representa a média \pm (SEM) de três experimentos independentes, as médias foram comparadas por ANOVA post hoc Dunnett e valores de $p < 0,05$ foram estatisticamente significativos.

7. DISCUSSÃO

A aplicação biomédica de filmes de quitosana é bem explorada, no entanto, são escassas as investigações sobre a associação desse polímero com NFC do algodão. As análises de caracterização físico-química do filme de quitosana e os nanobiocompósitos com 10, 100 e 1.000 µg/mL de NFC demonstraram que a incorporação de NFC influenciou no aumento da taxa de intumescimento, rugosidade e hidrofobicidade. Além disso, o nanobiocompósito de quitosana com NFC tiveram sua taxa de degradação, rigidez e deformação reduzida. Dessa forma, a NFC proveniente do algodão aprimorou algumas das características físico-químicas do filme de quitosana consideradas para utilização em cultivo *in vitro* e para emprego em processos de cicatrização de lesões. Os ensaios biológicos avaliando o nanobiocompósito de quitosana e NFC em fibroblastos e queratinócitos cultivados *in vitro*, revelou que esse biomaterial apresenta uma superfície adequada para adesão celular, manutenção da viabilidade, indução de migração celular e produção de colágeno. Os resultados de caracterização físico-química e citocompatibilidade apontam que o nanobiocompósito de quitosana e NFC do algodão apresentam atributos essenciais que potencializa sua aplicação na cicatrização de lesão de pele. Esses resultados encontrados são relevantes em razão de haver poucos estudos que avaliam os parâmetros investigados nesse estudo em nanobiocompósito de quitosana com NFC proveniente do algodão.

As características relacionadas homogeneidade do nanobiocompósito foram avaliadas após a síntese pela microscopia Raman. Os dados demonstraram que o método de produção adotado resultou em um nanobiocompósito sem agregados de NFC. O método de *Casting*, utilizado para produção do filme de quitosana e nanobiocompósito de quitosana e NFC, é indicado por favorecer a conservação da dispersão das NFC (BHAT *et al.*, 2017; BLILID *et al.*, 2020), é um dos métodos mais empregados na produção de filmes (ABDUL KHALIL *et al.*, 2016). Visando as futuras aplicações do nanobiocompósito, a praticidade do método de *Casting* por usar equipamentos comumente encontrados em laboratório influenciará no custo do produto final. Além disso, o nanobiocompósito de quitosana e NFC revela ser de fácil manuseio, o qual poderia ser aplicado facilmente em diferentes regiões do corpo,

bem como sua característica translúcida possibilita uma fácil observação da lesão e da cicatrização.

A estabilidade do nanobiocompósito em meio aquoso é importante ser avaliada visto que para os ensaios biológicos é colocado em meio aquoso em condições de cultivo *in vitro*. O nanobiocompósito de quitosana e NFC foi avaliada enquanto a estabilidade pelos ensaios de degradação e intumescimento, os quais mostraram uma maior estabilidade quando comparado ao o filme de quitosana puro. A avaliação do pH também foi testada e nenhuma mudança de pH foi notada quando o filme de quitosana pura e nanobiocompósitos de quitosana e NFC (10, 100 e 1.000 µg/mL) permaneceram me meio de cultivo. De modo a analisar a hidrofiliçidade do nanobiocompósito de quitosana e NFC, o ensaio de ângulo de contato mostrou que a concentração de NFC é proporcional a hidrofiliçidade.

O aumento do intumescimento e hidrofiliçidade, observado com incorporação de NFC, deve-se a capacidade da celulose em formar estruturas de rede interconectadas por ligação de hidrogênio (PHANTHONG *et al.*, 2018), bem como a presença de muitos grupos funcionais como hidroxilas, carboxilas e carbonila (Purohit *et al.*, 2019), o qual interagem com as moléculas de água. Tais características são relevantes para retenção de fluidos, absorção do exsudato e fornecimento de nutrientes às células, atributos importantes para o processo de cicatrização (PUROHIT *et al.*, 2019).

Os resultados de taxa de degradação revelaram que filmes de quitosana são mecanicamente fracos e instáveis, e que a adição de NFC ao filme de quitosana aprimorou este parâmetro. Os grupos amina da quitosana, quando dissolvido, torna-se carregado positivamente e fica disponível para interações dielétricas com moléculas negativos (KIM *et al.*, 2018). A celulose é um polissacarídeo aniônico e assim pode interagir por interações eletrostáticas com a quitosana (polissacarídeo catiônico), aproximando as cadeias poliméricas e, conseqüentemente, melhorar a estabilidade. De acordo com outros estudos, a incorporação da celulose ao filme de quitosana também aumentou sua estabilidade (DUFRESNE, 2017; QIN *et al.*, 2023). A estabilidade provocada pela incorporação de NFC é benéfica para a integridade do nanobiocompósito que poderá ser aplicado em locais lesionados sem se degradar facilmente.

Adicionalmente, as NFC influenciaram na rugosidade da superfície, como demonstrado pelas imagens obtidas pelo microscópio de força atômica e imagens

similares a reconstrução 3D pelo *software* Zeiss. A incorporação de NFC resultou em um aumento da rugosidade, aumentando as variações nanotopográficas do nanobiocompósito. A topografia da superfície também influencia na adesão, proliferação, migração e diferenciação, sendo que a quantidade de sinais químicos e físicos presentes na superfície é proporcional aos estímulos que a célula receberá. A incorporação de nanomateriais em filmes poliméricos aproxima esses biomateriais das características do tecido vivo. Nos tecidos, as células crescem em meio a um ambiente contendo estruturas em nanoescala com diferentes formatos (ZHU, LISHA; LUO; LIU, 2020). Durante a adesão celular as moléculas de adesão necessitam de pontos de interação facilmente encontrados em superfícies rugosas e nanotopográficas porque há aumento na área de superficial e estímulos químicos e físicos (ZHU, LISHA; LUO; LIU, 2020). Os grupos amino (-NH₂) na quitosana oferecem fácil ligação a biomoléculas como proteínas (Madni et al., 2021), e os grupos hidroxila (-OH) ao longo das cadeias de quitosana e celulose fornecem ligações covalentes estáveis com outras moléculas também (MOKHENA; JOHN, 2019).

Enquanto a porosidade, nenhuma diferença foi encontrada entre o filme de quitosana e os nanobiocompósitos com NFC (10, 100 e 1.000 µg/mL). A porosidade é outro requisito importante, visto que fornece espaço para o alojamento celular, difusão de fluidos, gases e nutrientes (DAVE; GOMES, 2019). O nanobiocompósito de quitosana com NFC 100 µg/mL apresentou porcentagens de rugosidade próximas ao mínimo recomendado de 60% (ANDRADE; *et al.*, 2023). Como um curativo, a porosidade auxiliaria que o produto permita a respiração natural da pele e reduza a perda de água transepidérmicas.

Além disso, as propriedades mecânicas foram avaliadas pela medição do módulo elástico e deformação de ruptura. Essa análise revelou que o aumento da concentração de NFC reduziu o módulo elástico e deformação de ruptura. Contudo, para a pele humana o módulo elástico varia entre 0,0046 GPa a 0,02 GPa em teste de tração (WEI *et al.*, 2017). Logo, os valores indicados pelos nanobiocompósitos estão dentro dessa faixa, exceto pelo nanobiocompósito de quitosana com 1.000 µg/mL, o qual apresentou valor menor que 0,0046 GPa. A diminuição da rigidez foi inversamente proporcional a concentração de NFC no nanobiocompósito. Os nanobiocompósitos com maiores concentrações de NFC diminuíram o alongamento dos nanocompósito, provavelmente devido as forças de interações entre as cadeias

dos materiais (diminuindo a elasticidade). Portanto, as NFC nas concentrações de 100 e 1.000 µg/mL tornaram os filmes resistentes.

A citocompatibilidade entre as linhagens celulares utilizadas como modelos *in vitro* representativos da pele humana e o nanobiocompósito foi analisada considerando os parâmetros de morfologia, área celular, integridade de membrana, atividade mitocondrial, nível de oxidação-redução e migração. Os resultados do presente estudo mostraram que fibroblastos e queratinócitos aderiram à superfície do nanobiocompósito, contudo sua medida de área celular reduziu quando em contato com o nanobiocomposito. Parâmetros da relação entre tamanho e granulosidade (SSC x FFC), oriundos da citometria de fluxo, mostraram que os fibroblastos expostos ao filme de quitosana e nanobiocompósito de quitosana e NFC (100 e 1.000 µg/mL) apresentaram mudanças no quadrante com maior tamanho e menor granulosidade após 24 h quando comparado ao controle. Além disso, após 48 h, fibroblastos expostos ao nanobiocompósito de quitosana e 1.000 µg/mL NFC apresentaram diferença com o controle apenas no quadrante com maior tamanho e granulosidade.

Os resultados encontrados no presente estudo da diferença na área celular e relação tamanho e granulosidade quando exposto ao nanobiocompósito, confirmam evidências anteriores de que as células se comportam de maneira diferente em superfícies com diferentes graus de rugosidade devido a diferenças na distribuição espacial das adesões (BAKER; CHEN, 2012). Em superfícies com alta rugosidade, as células são cercadas e com possibilidade de se aderir em diferentes pontos, portanto, a mudança na área e morfologia celular é em resposta ao ambiente (DUVAL *et al.*, 2017).

O ensaio de MTT realizado com fibroblastos, foi notada a redução após 24 e 48 h de exposição ao filme de quitosana pura e aos nanobiocompósitos de quitosana e NFC (100 e 1.000 µg/mL), enquanto em queratinócito a redução foi observada apenas após 24 h de exposição. No ensaio de Alamar Blue, fibroblastos e queratinócitos expostos ao filme de quitosana e nanobiocompósito de quitosana e NFC (100 e 1.000 µg/mL) apresentaram diferença com o grupo controle apenas após 24 h de exposição. Ensaio de MTT e Alamar Blue são baseados no metabolismo energético das células (LONGHIN *et al.*, 2022; RAMPERSAD, 2012). Logo, sugere-se que os fibroblastos e queratinócitos tiveram mudança no seu metabolismo energético quando em contato com filme de quitosana pura e aos nanobiocompósitos

de quitosana e NFC (100 e 1.000 µg/mL) no mínimo após 24 h de exposição. Além da atividade do metabolismo energético, o MTT e Alamar Blue podem ser indicativos de viabilidade celular e proliferação, respectivamente (LONGHIN *et al.*, 2022). Contudo, foi realizado os ensaios de citometria de fluxo onde as células foram coradas com iodeto de propídeo (intercalante de DNA, mas é internalizado quando as membranas celulares não estão íntegras), o qual é indicativo da viabilidade celular avaliando a integridade da membrana. A integridade da membrana não foi afetada em ambas as células após 24 h e 48 h de exposição, indicando que as células estavam viáveis durante esse tempo de exposição. Nesse ensaio, destacam-se as células de fibroblasto que apresentaram maior viabilidade quando em contato com nanobiocompósito de quitosana e 1.000 µg/mL de NFC comparada ao grupo controle.

Os dados encontrados de atividade mitocondrial em nosso estudo corroboram com os estudos de (KĘDZIERSKA *et al.*, 2021), onde foi avaliado a viabilidade celular em fibroblasto e queratinócito em nanobiocompósitos de quitosana com nanocristais e microcristais de celulose do algodão pelo ensaio de MTT. Neste foi observado também a redução da atividade mitocondrial quando comparado com o controle no nanobiocompósito contendo nanocristais de celulose.

Em um estudo do nosso grupo de pesquisa utilizando células renais embrionárias humanas expostas ao mesmo nanobiocompósito de quitosana com NFC do algodão, revelou que o número de células viáveis (por marcação com iodeto de propídeo) não foi afetado também após 24 horas de cultivo *in vitro* (Zanette *et al.*, 2019). Nossos resultados são consistentes com outros trabalhos que também avaliaram a citocompatibilidade de um hidrogel de quitosana e celulose proveniente de bactérias (ALVEN; ADERIBIGBE, 2020; MAHARJAN *et al.*, 2021).

Embora a relação entre o metabolismo energético e a adesão celular é pouco relatada, um estudo observou que a E-caderina (molécula de adesão) estimula a ativação da proteína quinase ativada pela adenosina monofosfato (AMPK) após a aplicação de tensão de cisalhamento ou força em uma cultura em monocamada (BAYS *et al.*, 2017). A AMPK está envolvida na regulação da homeostase energética, modulando positivamente a dinâmica da actina e a migração celular e acoplando as demandas energéticas das mitocôndrias durante a migração e invasão celular (CUNNIFF *et al.*, 2016; SALVI; DEMALI, 2018). A regulação da E-caderina em resposta a sinais extracelulares desempenha um papel importante na morfogênese

tecidual e no rearranjo celular (GUMBINER, 2005). Dada a distribuição espacial das adesões, as células que migram mediante a superfícies rugosas requerem coordenação entre múltiplas redes de sinalização com demandas metabólicas dinâmicas (CUNNIFF *et al.*, 2016). Desta forma, devido à interface entre moléculas de adesão (como integrinas e caderinas) com vias metabólicas pela AMPK, sugere-se que a superfície com alta rugosidade possa influenciar na área celular e no metabolismo energético através desta via. Ensaios adicionais são necessárias para determinar como o nanobiocompósito influenciou exatamente no metabolismo energético das células.

De maneira a avaliar o processo de migração das células sobre a superfície do nanobiocompósito de quitosana e NFC (1.000 µg/mL) foi realizado o ensaio de cicatrização, o qual revelou que o nanobiocompósito propícia à migração dessas células, fato relevante no processo de cicatrização. A superfície bioativa promove mobilidade celular (DUVAL *et al.*, 2017). A migração celular é estimulada por quimiotaxia ou orientação de via promovida por moléculas adesivas na matriz extracelular, ou superfícies celulares para guiar as células migratórias. As propriedades muco adesivas causadas por grupos amino ao longo das cadeias de quitosana (CROISIER; JÉRÔME, 2013), simultaneamente, a grupos hidroxila e grupos sulfato presentes em razão da hidrólise ácida (ZANETTE *et al.*, 2019) provavelmente permite a interação com moléculas de adesão, e então migração celular. Logo, acredita que os grupos funcionais presentes nas moléculas de quitosana e NFC, além da hidrofiliçidade, rugosidade, superfícies nanotopográficas apresentados pelos nanobiocompósito permitiram a migração celular. A migração durante o processo de cicatrização de lesão da pele é necessária devido ser fundamental para restauração da função de barreira (SAHANA; REKHA, 2018) pelos queratinócitos e para a fase de reepitelização no recrutamento de fibroblasto e consequentemente produção de colágeno (SIERRA-SÁNCHEZ *et al.*, 2021).

O processo de cicatrização pode ser acelerado pela reepitelização de fibroblastos, o qual contribuem para o depósito de colágeno (ALVEN; ADERIBIGBE, 2020; MATHEW-STEINER; ROY; SEN, 2021). Os componentes da MEC, como o colágeno tipo I o mais abundante, também impulsiona o processo de cicatrização (MATHEW-STEINER; ROY; SEN, 2021). O colágeno induz a ativação e agregação plaquetária tendo como consequência a formação de coágulo no local da lesão. Além disso, influência na síntese de fatores de crescimento que levam à angiogênese e

reepitelização (MATHEW-STEINER; ROY; SEN, 2021). A deposição de colágeno deve ser controlada, já que a deposição inadequada tem como consequência cicatrizes atróficas, hipertróficas ou queloides (CASTRO *et al.*, 2023). Dessa maneira, a produção de colágeno por fibroblasto cultivado no nanobiocompósito de quitosana e NFC (1.000 µg/mL), revela mais um atributo essencial presente para a cicatrização de lesão, sugerindo seu potencial para aplicação futura como curativos bioativos ou em reparo da pele.

O nanobiocompósito de quitosana e NFC de algodão apresenta características relevantes para aplicação como estratégias para auxiliar a cicatrização de lesão da pele na medicina regenerativa. Dentre esses destaca-se: hidrofiliabilidade e taxa de intumescimento favorável para absorção de exsudatos, baixa taxa de degradação em meio aquoso, maior rugosidade e nanotopografia o qual são estímulos para adesão celular, viabilidade celular e migração de fibroblasto e queratinócito, assim como produção de colágeno pelos fibroblastos. Com o intuito de continuar sua validação visando uma futura aplicação como estratégia de cicatrização de lesões, investigações sobre propriedades antimicrobianas, bem como realizar o ensaio de estresse oxidativo, hemólise, tempo de coagulação e genotoxicidade *in vitro* e reparo de lesões em modelos *in vivo* são recomendados.

O nanobiocompósito de quitosana e NFC contendo células da pele, como fibroblastos e queratinócitos, pode ser um promissor modelo alternativo de pele *in vitro* para avaliação de segurança de cosméticos. Outra possibilidade de aplicação desse scaffold é em estudo de modo de migração celular que células de câncer adotam em uma superfície irregular e com módulo elástico similar da pele. Bem como, na área de produtos de tratamento dermatológico como máscara facial, tendo possibilidade de incorporação e liberação de moléculas ativas de interesse.

Em suma, nosso estudo teve como foco a avaliação das propriedades físico-químicas e mecânicas de um nanobiocompósito contendo quitosana e NFC, bem como sua citocompatibilidade utilizando linhagens celulares representativas da pele humana *in vitro*. Esta avaliação utilizando NFC proveniente do algodão são relevantes para a literatura, visto que é oriunda de fonte acessível e renovável, de baixo custo, com diferentes aplicações, portanto, investigações combinando NFC provenientes de algodão e a quitosana aplicados ao cultivo de células da pele humana são escassos. Os resultados desse estudo apontam que a

nanobiocompósito contendo quitosana e NFC (1.000 $\mu\text{g/mL}$) apresenta potencial para futura aplicação na medicina regenerativa.

8. CONCLUSÃO

Os dados do presente estudo demonstraram que a incorporação de NFC do algodão ao filme de quitosana aprimorou características como taxa de degradação, intumescimento, hidrofobicidade e rugosidade. Adicionalmente, os resultados de viabilidade celular, cicatrização e produção de colágeno, sugerem a potencialidade de aplicação do nanobiocompósitos de quitosana e NFC (1.000 µg/mL) na medicina regenerativa, em especial em processo de reparo da pele humana.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- AARESTRUP, B.J. **Histologia essencial**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 457 p. .978-85-277-2058-8.
- ABDUL KHALIL, H. P.S. *et al.* A review on chitosan-cellulose blends and nanocellulose reinforced chitosan biocomposites: Properties and their applications. **Carbohydrate Polymers** v. 150, p. 216–226 , 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.028>>.
- AHMED, Shakeel; IKRAM, Saiqa. Chitosan & its derivatives: A review in recent innovations Development of Environmentally Benign Hybrid Bio-nanocomposite Film with Enhanced Antimicrobial and Gas Barrier Properties View project biodegradable packaging films View project Saiqa Ikram Jamia M. **Article in International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research** v. 6, n. 1, p. 14–30 , 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6>>.
- AHMED, Shakeel; IKRAM, Saiqa. Chitosan Based Scaffolds and Their Applications in Wound Healing. **Achievements in the Life Sciences** v. 10, n. 1, p. 27–37 , jun. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2078152015300298>>.
- ALMEIDA, I *et al.* Smart dressings for wound healing: A review. **Advances in Skin and Wound Care** v. 34, n. 2, p. 1–8 , 2021.0000725188.
- ALVEN, Sibusiso; ADERIBIGBE, Blessing Atim. Chitosan and cellulose-based hydrogels for wound management. **International Journal of Molecular Sciences** v. 21, n. 24, p. 1–30 , 2020.
- ANDRADE;, Carla Luiza Schnell De *et al.* Technological Development of Chitosan Membranes Containing. p. 4–25 , 2023.
- BAI, Renu Geetha *et al.* Graphene-based 3D scaffolds in tissue engineering: Fabrication, applications, and future scope in liver tissue engineering. **International Journal of Nanomedicine** v. 14, n. July, p. 5753–5783 , 2019.
- BAKER, Brendon M.; CHEN, Christopher S. Deconstructing the third dimension-how 3D culture microenvironments alter cellular cues. **Journal of Cell Science** v. 125, n. 13, p. 3015–3024 , 2012.
- BAYS, Jennifer L. *et al.* Linking E-cadherin mechanotransduction to cell metabolism through force-mediated activation of AMPK. **Nature Cell Biology** v. 19, n. 6, p. 724–731 , 2017.

- jun. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/ncb3537>>.3902264330.
- BELLU, Emanuela *et al.* Nanomaterials in skin regeneration and rejuvenation. **International Journal of Molecular Sciences** v. 22, n. 13 , 2021.
- BERTHIAUME, François; MAGUIRE, Timothy J.; YARMUSH, Martin L. Tissue engineering and regenerative medicine: History, progress, and challenges. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering** v. 2, p. 403–430 , 2011.
- BHAT, Aamir H. *et al.* Application of nanocrystalline cellulose: Processing and biomedical applications. **Cellulose-Reinforced Nanofibre Composites: Production, Properties and Applications** n. November, p. 215–240 , 2017.9780081009659.
- BLILID, Sara *et al.* Phosphorylated Micro- A nd Nanocellulose-Filled Chitosan Nanocomposites as Fully Sustainable, Biologically Active Bioplastics. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering** v. 8, n. 50, p. 18354–18365 , 2020.
- BOUWSTRA, Joke A. *et al.* The skin barrier: An extraordinary interface with an exceptional lipid organization. **Progress in Lipid Research** p. 101252 , set. 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2023.101252>>.
- CABUK, Mehmet; ALAN, Yusuf; UNAL, H. Ibrahim. Enhanced electrokinetic properties and antimicrobial activities of biodegradable chitosan/organo-bentonite composites. **Carbohydrate Polymers** v. 161, p. 71–81 , abr. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861716314527>>.
- CAO, Lingyan *et al.* Bone regeneration using photocrosslinked hydrogel incorporating rhBMP-2 loaded 2-N, 6-O-sulfated chitosan nanoparticles. **Biomaterials** v. 35, n. 9, p. 2730–2742 , mar. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961213015123>>.
- CASTAÑO, Oscar *et al.* *Instructive microenvironments in skin wound healing: Biomaterials as signal releasing platforms*. **Advanced Drug Delivery Reviews**. [S.l: s.n.]. , 2018
- CASTRO, Jiulia Tereza Marques De *et al.* Efficacy of collagen-only scaffolds compared to polymer-associated collagen and nanomaterials in skin wound repair – a review. **Bioscience Journal** v. 39, n. Figure 1, p. e39085 , 2023.
- CHANG, Shun-Hsien *et al.* Effect of chitosan molecular weight on anti-inflammatory activity in the RAW 264.7 macrophage model. **International Journal of Biological Macromolecules** v. 131, p. 167–175 , jun. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014181301834563X>>.
- CHAUDHARI, Atul A. *et al.* Future prospects for scaffolding methods and biomaterials in skin tissue engineering: A review. **International Journal of Molecular Sciences** v. 17, n.

12 , 2016.

- CHOWDHURY, A. K.M.Rezaul Haque *et al.* Biofunctionalized 3-D carbon nano-network platform for enhanced fibroblast cell adhesion. **Scientific Reports** v. 7, p. 1–14 , 2017.
- CROISIER, Florence; JÉRÔME, Christine. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. **European Polymer Journal** v. 49, n. 4, p. 780–792 , 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009>>.
- CUNNIFF, Brian *et al.* AMPK activity regulates trafficking of Mitochondria to the leading edge during cell migration and matrix invasion. **Molecular Biology of the Cell** v. 27, n. 17, p. 2662–2674 , 2016.
- DAVE, Khyati; GOMES, Vincent G. Interactions at scaffold interfaces: Effect of surface chemistry, structural attributes and bioaffinity. **Materials Science and Engineering C** v. 105, n. August , 2019.
- DELLAMBRA, Elena *et al.* Non-animal models in dermatological research. **Altex** v. 36, n. 2, p. 177–202 , 2019.
- DICK MK, MIAO JH, Limaiem F. Histology, Fibroblast. **National Library of Medicine** p. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541065/> , 2023. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541065/>>.
- DOS SANTOS, Venina; BRANDALISE, Rosmary Nichele; SAVARIS, Michele. Biomaterials: Characteristics and Properties. **Engineering of biomaterials**. [S.l: s.n.], 2017. p. 5–15. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-58607-6>>. 978-3-319-58606-9.
- DUFRESNE, Alain. Cellulose nanomaterial reinforced polymer nanocomposites. **Current Opinion in Colloid and Interface Science** v. 29, p. 1–8 , 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cocis.2017.01.004>>.
- DUVAL, Kayla *et al.* Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. **Physiology** v. 32, n. 4, p. 266–277 , 2017.
- ELANGWE, Collins N. *et al.* A Review on Chitosan and Cellulose Hydrogels for Wound Dressings. **Polymers** v. 14, n. 23 , 2022.
- FENNER, Justine; CLARK, Richard A.F. Anatomy, Physiology, Histology, and Immunohistochemistry of Human Skin. **Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine**. [S.l.]: Elsevier, 2016. p. 1–17. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128016541000012>>. 012801654X, 978-0-12-801654-1, 9780128017975, 012801797X.
- FERNANDES, A. *et al.* A systematic review of natural products for skin applications: Targeting

- inflammation, wound healing, and photo-aging. **Phytomedicine** v. 115 , 2023.
- FONG, David; HOEMANN, Caroline D. Chitosan immunomodulatory properties: perspectives on the impact of structural properties and dosage. **Future Science OA** v. 4, n. 1, p. FSO225 , jan. 2018. Disponível em: <<http://www.future-science.com/doi/10.4155/fsoa-2017-0064>>.
- FREY, Margo T. *et al.* Cellular responses to substrate topography: Role of myosin II and focal adhesion kinase. **Biophysical Journal** v. 90, n. 10, p. 3774–3782 , 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.105.074526>>.
- GAHARWAR, Akhilesh K.; SINGH, Irtisha; KHADEMHOSEINI, Ali. Engineered biomaterials for in situ tissue regeneration. **Nature Reviews Materials** v. 5, n. 9, p. 686–705 , 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41578-020-0209-x>>.
- GHASEMI-MOBARAKEH, Laleh. *Structural properties of scaffolds: Crucial parameters towards stem cells differentiation* .**World Journal of Stem Cells**. [S.l: s.n.] , 2015
- GOISSIS, Marcelo *et al.* Effects of Serum Deprivation and Cycloheximide on Cell Cycle of Low and High Passage Porcine Fetal Fibroblasts Effects of Serum Deprivation and Cycloheximide on Cell Cycle of Low and High Passage Porcine Fetal Fibroblasts. n. December , 2007.
- GOLPOUR, Monireh *et al.* Human fibroblast switches to anaerobic metabolic pathway in response to serum starvation: a mimic of warburg effect. **International journal of molecular and cellular medicine** v. 3, n. 2, p. 74–80 , 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25035856>>.
- GUILLAMAT-PRATS, Raquel. The role of MSC in wound healing, scarring and regeneration. **Cells** v. 10, n. 7 , 2021.
- GUIMARÃES, Carlos F. *et al.* The stiffness of living tissues and its implications for tissue engineering. **Nature Reviews Materials** , 2020.
- GUMBINER, Barry M. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** v. 6, n. 8, p. 622–634 , 2005.
- HE, Xu *et al.* Tissue engineering scaffolds electrospun from cotton cellulose. **Carbohydrate Polymers** v. 115, p. 485–493 , 2015.
- HIVECHI, Ahmad; HAJIR BAHRAMI, S.; SIEGEL, Ronald A. Investigation of morphological, mechanical and biological properties of cellulose nanocrystal reinforced electrospun gelatin nanofibers. **International Journal of Biological Macromolecules** v. 124, p. 411–417 , 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.214>>.
- HORUE, Manuel *et al.* Bacterial Cellulose-Based Materials as Dressings for Wound Healing.

- Pharmaceutics** v. 15, n. 2, p. 1–26 , 2023.
- HU, Dongying; WANG, Haixia; WANG, Lijuan. Physical properties and antibacterial activity of quaternized chitosan/carboxymethyl cellulose blend films. **LWT - Food Science and Technology** v. 65, p. 398–405 , jan. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643815301274>>.
- KAMOLZ, Lars Peter *et al.* Skin regeneration, repair, and reconstruction: present and future. **European Surgery - Acta Chirurgica Austriaca** v. 54, n. 3, p. 163–169 , 2022.
- KĘDZIERSKA, Marta *et al.* Insight into factors influencing wound healing using phosphorylated cellulose-filled-chitosan nanocomposite films. **International Journal of Molecular Sciences** v. 22, n. 21, p. 1–18 , 2021.
- KIM, Chun Ho *et al.* Chitosan for Tissue Engineering. **Advances in Experimental Medicine and Biology** v. 1077, p. 475–485 , 2018.9789811309472.
- LIANG, Yuqing *et al.* Antibacterial biomaterials for skin wound dressing. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 17, n. 3, p. 353–384 , maio 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ajps.2022.01.001>>.
- LONGHIN, Eleonora Marta *et al.* The alamar blue assay in the context of safety testing of nanomaterials. **Frontiers in Toxicology** v. 4, n. September, p. 1–10 , 2022.
- LOO, Hooi Leong *et al.* Application of chitosan-based nanoparticles in skin wound healing. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 17, n. 3, p. 299–332 , 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ajps.2022.04.001>>.
- LUO, Huize *et al.* Advances in tissue engineering of nanocellulose-based scaffolds: A review. **Carbohydrate Polymers** v. 224, n. May, p. 115144 , 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115144>>.
- MABROUK, Mostafa; BEHEREI, Hanan H.; DAS, Diganta B. Recent progress in the fabrication techniques of 3D scaffolds for tissue engineering. **Materials Science and Engineering C** v. 110, p. 110716 , 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110716>>.
- MADNI, Ahmed *et al.* Recent advancements in applications of chitosan-based biomaterials for skin tissue engineering. v. 6, n. November 2020, p. 11–25 , 2021.
- MAHARJAN, Bikendra *et al.* Regenerated cellulose nanofiber reinforced chitosan hydrogel scaffolds for bone tissue engineering. **Carbohydrate Polymers** v. 251, n. June 2020 , 2021.
- MAHESHWARI, Neha *et al.* **Nanotechnology in Tissue Engineering**. [S.l.: s.n.], 2019. 225–261 p. With growing age, the self-repair mechanism of our body decreases and

recovery from or injury or prevailing disease takes even longer time, and this process is limited to small localized tissue. In context, the development and progress of tissue engineering will help to reconstitute artificial cells or tissues in place of damaged organs using cells of the recipient. Moreover, employment of nanotechnology in tissue engineering may help in the successful transplantation of harvested cells/tissues at the damaged site in the body. We mainly focus on various natural and synthetic materials for tissue scaffold engineering such as chitosan, albumin, alginate, dendrimers, polylactic acid, polyethylene glycol, and poly l-glycolic acid. After discussing materials for tissue scaffold engineering, we also cover various nanotechnology-based applications of tissue engineering with special focus on the bone, hepatic, stem, vascular, and skin tissue engineering. 9780128144282.

MANICONE, Anne M. *et al.* Epilysin (matrix metalloproteinase-28) contributes to airway epithelial cell survival. **Respiratory Research** v. 12, p. 1–9 , 2011.

MATHEW-STEINER, Shomita S; ROY, Sashwati; SEN, Chandan K. Collagen in wound healing. **Injury** v. 1, n. 1, p. 76 , 2021.

MIGUEL, Sónia P; MOREIRA, André F; CORREIA, Ilídio J. International Journal of Biological Macromolecules Chitosan based-asymmetric membranes for wound healing: A review. **International Journal of Biological Macromolecules** v. 127, p. 460–475 , 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.072>>.

MOKHENA, T. C.; JOHN, M. J. **Cellulose nanomaterials: new generation materials for solving global issues**. [S.l.]: Springer Netherlands, 2019. 0123456789 v. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10570-019-02889-w>>. Abstract: This review describes the recent advances in the production and application of cellulose nanomaterials. Cellulose nanomaterials (CNMs), especially cellulose nanocrystals and cellulose nanofibers, can be produced using different preparation processes resulting in materials with unique structures and physicochemical properties that are exploited in different fields such as, biomedical, sensors, in wastewater treatment, paper and board/packaging industry. These materials possess attractive properties such as large surface area, high tensile strength and stiffness, surface tailor-ability via hydroxyl groups and are renewable. This has been a driving force to produce these materials in industrial scale with several companies producing CNMs at tons-per-day scale. The recent developments in their production rate and their applications in various fields such as medical sector, environmental protection, energy harvesting/storage are comprehensively discussed in this review. We emphasize on the current trends and

future remarks based on the production and applications of cellulose nanomaterials.
Graphic abstract: [Figure not available: see fulltext.].1057001902.

- NAQVI, Saba; KUMAR, Vinay; GOPINATH, P. Nanomaterial Toxicity: A Challenge to End Users. **Applications of Nanomaterials**. [S.l.]: Elsevier, 2018. p. 315–343. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081019719000120>>.
- NOVAK-BILIĆ, Gaby *et al.* Irritant and allergic contact dermatitis – skin lesion characteristics. **Acta Clinica Croatica** v. 57, n. 4, p. 713–720 , 2018.
- NYSTRÖM, Alexander; BRUCKNER-TUDERMAN, Leena. Matrix molecules and skin biology. **Seminars in Cell and Developmental Biology** v. 89, n. July, p. 136–146 , 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.07.025>>.
- PATRULEA, V. *et al.* Chitosan as a starting material for wound healing applications **.European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. [S.l.]: Elsevier. , 1 nov. 2015
- PHANTHONG, Patchiya *et al.* Nanocellulose: Extraction and application. **Carbon Resources Conversion** v. 1, n. 1, p. 32–43 , 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.crcon.2018.05.004>>.
- PIAIA, L.; SALMORIA, G. V.; HOTZA, Dachamir. **Additive manufacturing of nanostructured bone scaffolds**. [S.l.]: Elsevier Inc., 2018. 181 p. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814621-7.00010-X>>. .9780128146224.
- PINA, Sandra; OLIVEIRA, Joaquim M; REIS, Rui L. Natural-Based Nanocomposites for Bone Tissue Engineering and Regenerative Medicine : A Review. p. 1–27 , 2015.
- POGORIELOV, M. *et al.* Haemostatic chitosan coated gauze: in vitro interaction with human blood and in-vivo effectiveness. **Biomaterials Research** v. 19, n. 1, p. 22 , 2 dez. 2015. Disponível em: <<http://www.biomaterialsres.com/content/19/1/22>>.
- PUROHIT, Shiv Dutt *et al.* Development of a nanocomposite scaffold of gelatin–alginate–graphene oxide for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules** v. 133, p. 592–602 , jul. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813019316071>>.
- QIN, Liguó *et al.* Cellulose nanofibril reinforced functional chitosan biocomposite films. **Polymer Testing** v. 120, n. February, p. 107964 , 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2023.107964>>.
- RABEA, Entsar I. *et al.* Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. **Biomacromolecules** v. 4, n. 6, p. 1457–1465 , nov. 2003. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bm034130m>>.

- RAHMATI, Maryam *et al.* Biomaterials for regenerative medicine: Historical perspectives and current trends. **Advances in Experimental Medicine and Biology** v. 1119, p. 1–19 , 2018.
- RAMOS, Ana P. *et al.* Biomedical applications of nanotechnology. **Biophysical Reviews** v. 9, n. 2, p. 79–89 , 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12551-016-0246-2>>.
- RAMPERSAD, Sephra N. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. **Sensors (Switzerland)** v. 12, n. 9, p. 12347–12360 , 2012.
- REN, Xiaoyan *et al.* Nanoparticulate Mineralized Collagen Scaffolds and BMP-9 Induce a Long-Term Bone Cartilage Construct in Human Mesenchymal Stem Cells. **Advanced Healthcare Materials** v. 5, n. 14, p. 1821–1830 , jul. 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/adhm.201600187>>.
- RIEBELING, Christian; LUCH, Andreas; TRALAU, Tewes. Skin toxicology and 3Rs—Current challenges for public health protection. **Experimental Dermatology** v. 27, n. 5, p. 526–536 , 2018.
- ROONEY, John P. *et al.* Analysis of variability in the rabbit skin irritation assay. **Regulatory Toxicology and Pharmacology** v. 122, p. 104920 , 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2021.104920>>.
- ROY, Jagadish C. *et al.* Solubility of Chitin: Solvents, Solution Behaviors and Their Related Mechanisms. **Solubility of Polysaccharides**. [S.l.]: InTech, 2017. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/solubility-of-polysaccharides/solubility-of-chitin-solvents-solution-behaviors-and-their-related-mechanisms>>.
- RUPP, Frank *et al.* A review on the wettability of dental implant surfaces I: Theoretical and experimental aspects. **Acta Biomaterialia** v. 10, n. 7, p. 2894–2906 , 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2014.02.040>>.
- SAHANA, T. G.; REKHA, P. D. Biopolymers: Applications in wound healing and skin tissue engineering. **Molecular Biology Reports** v. 45, n. 6, p. 2857–2867 , 2018a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11033-018-4296-3>>.0123456789.
- SAHANA, T. G.; REKHA, P. D. Biopolymers: Applications in wound healing and skin tissue engineering. **Molecular Biology Reports** v. 45, n. 6, p. 2857–2867 , 2018b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11033-018-4296-3>>.0123456789.
- SAJI JOSEPH, Jitcy; TEBOGO MALINDISA, Sibusiso; NTWASA, Monde. Two-Dimensional (2D) and Three-Dimensional (3D) Cell Culturing in Drug Discovery. **Cell Culture**. [S.l.]:

- IntechOpen, 2019. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/cell-culture/two-dimensional-2d-and-three-dimensional-3d-cell-culturing-in-drug-discovery>>.
- SALVI, Alicia M; DEMALI, Kris A. Mechanisms linking mechanotransduction and cell metabolism. **Current Opinion in Cell Biology** v. 54, n. 3, p. 114–120 , out. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955067418300279>>.
- SCARRITT, Michelle; MURDOCK, Mark; BADYLAK, Stephen F. **Biologic Scaffolds Composed of Extracellular Matrix for Regenerative Medicine**. [S.l.]: Elsevier Inc., 2019. 613–626 p. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-809880-6.00035-7>>.
- SHARMA, Amita *et al.* Commercial application of cellulose nano-composites – A review. **Biotechnology Reports** v. 21, n. 2018, p. e00316 , 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00316>>.
- SHPICHKA, Anastasia *et al.* Skin tissue regeneration for burn injury. **Stem Cell Research & Therapy** v. 10, n. 1, p. 94 , 15 dez. 2019. Disponível em: <<https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-019-1203-3>>.1328701912033.
- SIERRA-SÁNCHEZ, Álvaro *et al.* Cellular human tissue-engineered skin substitutes investigated for deep and difficult to heal injuries. **npj Regenerative Medicine** v. 6, n. 1 , 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41536-021-00144-0>>.
- SIMÕES, Déborah *et al.* Recent advances on antimicrobial wound dressing: A review. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** v. 127, p. 130–141 , jun. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641117315023>>.
- SINGH, Drishtant; RAI, Vikrant; K AGRAWAL, Devendra. Regulation of Collagen I and Collagen III in Tissue Injury and Regeneration. **Cardiology and Cardiovascular Medicine** v. 07, n. 01, p. 5–16 , 2023.
- SPINDOLA, H. *et al.* Anti-inflammatory effect of chitosan oligomers. **New Biotechnology** v. 25, p. S9 , set. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871678409001253>>.
- STRNAD, Simona. Cellulose – Chitosan Functional Biocomposites. **Polymers** , 2023.
- SULTANA, Naznin. *Mechanical and biological properties of scaffold materials* .**Functional 3D Tissue Engineering Scaffolds: Materials, Technologies, and Applications**. [S.l: s.n.]. , 2018

- TOVAR, Richard; LEIKIN, Jerrold B. Irritants and corrosives. **Emergency Medicine Clinics of North America** v. 33, n. 1, p. 117–131 , 2015a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.emc.2014.09.009>>.
- TOVAR, Richard; LEIKIN, Jerrold B. Irritants and corrosives. **Emergency Medicine Clinics of North America** v. 33, n. 1, p. 117–131 , 2015b.
- TRAN, T. T.; HAMID, Z. A.; CHEONG, K. Y. A Review of Mechanical Properties of Scaffold in Tissue Engineering: Aloe Vera Composites. **Journal of Physics: Conference Series** v. 1082, n. 1 , 2018.
- WANG, Wenqian *et al.* Chitosan derivatives and their application in biomedicine. **International Journal of Molecular Sciences** v. 21, n. 2 , 2020.8645186608.
- WEI, Jonathan C.J. *et al.* Allometric scaling of skin thickness, elasticity, viscoelasticity to mass for micro-medical device translation: From mice, rats, rabbits, pigs to humans. **Scientific Reports** v. 7, n. 1, p. 1–17 , 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-15830-7>>.
- WHO. " Burn fact sheet " No. 365. [S.l: s.n.], 2018.
- XIA, Yidan *et al.* Applications of Chitosan and its Derivatives in Skin and Soft Tissue Diseases. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology** v. 10, n. May, p. 1–13 , 2022.
- YAN, Dan *et al.* Surface modified electrospun poly(lactic acid) fibrous scaffold with cellulose nanofibrils and Ag nanoparticles for ocular cell proliferation and antimicrobial application. **Materials Science and Engineering: C** v. 111, p. 110767 , jun. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493119343577>>.
- YANG, W. *et al.* Nanoparticle Toxicology. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology** v. 61, p. 269–289 , 2021.
- YANG, Yong *et al.* *Biophysical Regulation of Cell Behavior—Cross Talk between Substrate Stiffness and Nanotopography* .**Engineering**. [S.l: s.n.]. , 2017
- YAO, Tianyu; BAKER, Matthew B.; MORONI, Lorenzo. Strategies to Improve Nanofibrous Scaffolds for Vascular Tissue Engineering. **Nanomaterials** v. 10, n. 5, p. 887 , 5 maio 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2079-4991/10/5/887>>.
- YU, Rui; ZHANG, Hualei; GUO, Baolin. **Conductive Biomaterials as Bioactive Wound Dressing for Wound Healing and Skin Tissue Engineering**. [S.l.]: Springer Singapore, 2022. 1–46 p. 14 v. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40820-021-00751-y>>.
- YUAN, Yuehua; LEE, T. Randall. Contact Angle and Wetting Properties. **Springer Series in Surface Sciences**. [S.l: s.n.], 2013. 51 v. p. 3–34. Disponível em:

<http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-34243-1_1>. 9783642342431.

ZANETTE, Rafaella S.S. *et al.* Cotton cellulose nanofiber/chitosan nanocomposite: characterization and evaluation of cytocompatibility. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition** v. 30, n. 16, p. 1489–1504 , 2019a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/09205063.2019.1646627>>.

ZANETTE, Rafaella S.S. *et al.* Cotton cellulose nanofiber/chitosan nanocomposite: characterization and evaluation of cytocompatibility. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition** v. 30, n. 16, p. 1489–1504 , 2019b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/09205063.2019.1646627>>.

ZARRINTAJ, Payam *et al.* Biopolymer-based composites for tissue engineering applications: A basis for future opportunities. **Composites Part B: Engineering** v. 258, p. 110701 , 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2023.110701>>.

ZHANG, Ke *et al.* Advanced smart biomaterials and constructs for hard tissue engineering and regeneration. **Bone Research** v. 6, n. 1, p. 31 , 22 dez. 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41413-018-0032-9>>.4141301800329.

ZHU, Lisha; LUO, Dan; LIU, Yan. Effect of the nano/microscale structure of biomaterial scaffolds on bone regeneration. **International Journal of Oral Science** v. 12, n. 1, p. 1–15 , 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41368-020-0073-y>>.

ZHU, Yang; WAGNER, William R. **Design Principles in Biomaterials and Scaffolds**. [S.l.]: Elsevier Inc., 2019. 505–522 p.

Anexo

Resumos apresentados em congressos

- **FAYER, LEONARA**; OLIVEIRA, E. R.; ZANETTE, R. S. S.; VASCONCELLOS, R.; GLANZMANN, D.; FERREIRA, C. S. A.; MONTEIRO, A. W. F.; ALMEIDA, CAMILA G; Brandão, H.M.; MUNK, M. Nanobiocompósito de quitosana com nanofibra de celulose apresenta potencial como modelo in vitro de pele. 2023.
- GLANZMANN, D.; **FAYER, L.**; ZANETTE, R. S. S.; OLIVEIRA, E. R.; BRANDAO, H. M.; MUNK, M. Estudo da estabilidade da matriz de quitosana e nanofibra de celulose e cultivo in vitro de fibroblastos. In: III Congresso Digital de Nanobiotecnologia e Bioengenharia, 2022. III Congresso Digital de Nanobiotecnologia e Bioengenharia, 2022.
- **FAYER, L.**; ZANETTE, R. S. S.; SOUZA, N. L.; OLIVEIRA, E. R.; SOUZA, N. S.; OLIVEIRA, L. F. C.; Brandão, H. M.; MUNK, M. Scaffold de matriz polimérica de quitosana com nanofibra de celulose para aplicação na bioengenharia tecidual. In: III Congresso Digital de Biotecnologia e Bioengenharia, 2021. Resumos do II Congresso Digital de Nanobiotecnologia e Bioengenharia (II CDNB), 2021. v. I. p. 36-36.
- OLIVEIRA, E. R.; **FAYER, L. B. A.**; ZANETTE, R. S. S.; MATOS, E. M.; LADEIRA, L. O.; MARANDUBA, C. M. C.; BRANDÃO, H. M.; MUNK, M. P. Avaliação Citotóxica de Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas Funcionalizadas em Células Tronco Mesenquimais. In: III Simpósio Internacional de Ciências Biológicas, 2020, Ouro Preto, MG. III Simpósio Internacional de Ciências Biológicas, 2020. v. III
- **FAYER, L. B. A.**; SIQUEIRA, J. T. C.; VIDIGAL, L. M.; OLIVEIRA, E. R.; ZANETTE, R. S. S.; BRANDÃO, H. M.; Munk, M.P. Efeito da Exposição de Células CHO as Nanopartícula de Dióxido de Titânio na Frequência de Micronúcleos e Estresse Oxidativo. In: III Encontro de Morfofisiologia: Novas Abordagens Diagnósticas e Terapêuticas em Ciências Morfofuncionais, 2019, São João Del Rei. III Encontro de Morfofisiologia, 2019.
- VIDIGAL, L. M.; ZANETTE, R. S. S.; **FAYER, L. B. A.**; MATOS, E. M.; OLIVEIRA, E. R.; BRANDÃO, H. M.; MUNK, M. P. Filmes Nanocompósitos de Quitosana e Nanofibras de Celulose para o Cultivo in vitro. In: III Encontro de Morfofisiologia: Novas

Abordagens Diagnósticas e Terapêuticas em Ciências Morfofuncionais, 2019, São João Del Rei. III Encontro de Morfofisiologia, 2019.

- ZANETTE, R. S. S.; VIDIGAL, L. M.; **FAYER, L. B. A.**; MATOS, E. M.; OLIVEIRA, E. R.; BRANDÃO, H. M.; MUNK, M. P. Citocompatibilidade de Células-Tronco de Polpa Dentária Humana Expostas às Nanofibras de Celulose. In: III Encontro de Morfofisiologia: Novas Abordagens Diagnósticas e Terapêuticas em Ciências Morfofuncionais, 2019, São João Del Rei. III Encontro de Morfofisiologia, 2019.
- OLIVEIRA, E. R.; **FAYER, L. B. A.**; ZANETTE, R. S. S.; LADEIRA, L. O.; BRANDÃO, H. M.; MUNK, M. P. Análise da Viabilidade de Células-Tronco de Polpa Dentária Humana Cultivadas *in vitro* com Nanotubos de Carbono. In: III Encontro de Morfofisiologia: Novas Abordagens Diagnósticas e Terapêuticas em Ciências Morfofuncionais, 2019, São João Del Rei. III Encontro de Morfofisiologia, 2019.

Prêmios

- 2020 – Premiada em primeira colocação no edital *Adas tech* Empreendedorismo Tecnológico Feminino com o projeto NANOBIOKIN, do Centros Regional de Inovação e Transferência de Tecnologia (CRITT) da Universidade Federal de Juiz de Fora.
- 2021 – Menção Honrosa, 3º lugar Biomateriais – Estudo da estabilidade da matriz polimérica de quitosana e nanofibra de celulose e cultivo *in vitro* de fibroblastos.

Participação em eventos, congressos

- 2019 – Participação do III Encontro de Morfofisiologia, organizado na Universidade Federal de São João del Rei.
- 2019 – Ministrou o minicurso intitulado “Cultura de células animais *in vitro*” na XLII Semana de Biologia da Universidade Federal de Juiz de Fora.
- 2020 – Participação do Congresso Digital de Nanobiotecnologia e Bioengenharia, organizado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia / NanoDiversity.
- 2020 – Participação do I workshop de Imunologia: atualizações imunológicas

em tempos de COVID 19, promovido pelo Laboratório de Imunologia da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC).

- 2020 – Participação da Conferência Técnica “Cultura celular: boas práticas contra contaminação”, organizado pela Eppendorf.
- 2020 – Simpósio de Genética e Biotecnologia organizado pela pós graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora.
- 2020 – Participação da Conferência internacional *on line* “Alternatives to animal experiments in biology, medicine and toxicology”, organizado pelo Centro republicanos de bioética, Academia Médica Bielo-russa de Educação de Pós-Graduação e Instituição de educação ecológica e cultural: Centro de Atitude Ética em Relação à Natureza.
- 2020 – I Congresso virtual Brasileiro de Engenharia de Tecidos
- 2020 – I Internacional Conference of Nanoscience and Nanobiotechnology
- 2020 – I Congresso Digital de Nanotecnologia e Bioengenharia
- 2021 – II Congresso Digital de Nanotecnologia e Bioengenharia
- 2022 – III Congresso Digital de Nanotecnologia e Bioengenharia
- 2022 – II Workshop Microscopia Confocal pela Universidade Federal de Juiz de Fora, organizado pelo programa de pós-graduação em Ciências Biológicas.
- 2023 – IV Congresso Digital de Nanotecnologia e Bioengenharia

Publicação de artigo

- ZANETTE, RAFAELLA S.S.; **ALMEIDA, LEONARA B. F.**; SOUZA, NELSON L.G.D.; ALMEIDA, CAMILA G.; OLIVEIRA, LUIZ F. C.; DE MATOS, ELYABE M.; GERN, JULIANA C.; BRANDÃO, HUMBERTO M.; MUNK, MICHELE. Nanocompósito de nanofibra de celulose de algodão/quitosana: caracterização e avaliação da citocompatibilidade. JOURNAL OF BIOMATERIALS SCIENCE-POLYMER EDITION, v. 30, p. 1 a 15 de 2019.
- **FAYER, LEONARA**; ZANETTE, RAFAELLA S S; SIQUEIRA, JULIANA T C; OLIVEIRA, EDUARDA R; ALMEIDA, CAMILA G; GERN, JULIANA C; SOUSA, SAULO M; DE OLIVEIRA, LUIZ F C; BRANDÃO, HUMBERTO M; MUNK, MICHELE. The distinct effect of titanium dioxide nanoparticles in primary and immortalized cell lines. Toxicology Research, v. 11, p. 1-12, 2021.

- ZANETTE, RAFAELLA DE S. S.; **FAYER, LEONARA**; DE OLIVEIRA, EDUARDA R.; ALMEIDA, CAMILA G.; OLIVEIRA, CAUÊ R.; DE OLIVEIRA, LUIZ F.C; MARANDUBA, CARLOS M. C.; ALVARENGA, ÉRIKA C.; BRANDÃO, HUMBERTO M.; MUNK, MICHELE. Cytocompatibility and osteogenic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth with cotton cellulose nanofibers for tissue engineering and regenerative medicine. JOURNAL OF BIOMATERIALS SCIENCE-POLYMER EDITION, v., p. 1-20, 2021.
- DE OLIVEIRA, EDUARDA ROCHA; **FAYER, LEONARA**; ZANETTE, RAFAELLA DE SOUZA SALOMÃO; LADEIRA, LUIZ ORLANDO; OLIVEIRA, LUIZ FERNANDO; MARANDUBA, CARLOS M.C.; BRANDAO, HUMBERTO M.; MUNK, MICHELE. Cytocompatibility of carboxylated multi-wall carbon nanotubes in stem cells from human exfoliated deciduous teeth. NANOTECHNOLOGY, v., p., 2021.
- DOS SANTOS, ELISANDRA M.; TAVARES, ETÍCIA S.; **FAYER, LEONARA**; BRANDÃO, HUMBERTO M.; MUNK, MICHELE; SANTOS, MARCELO DE O. Nanoencapsulated Lippia rotundifolia antimicrobial peptide: synthesis, characterization, antimicrobial activity, and cytotoxicity evaluations. ARCHIVES OF MICROBIOLOGY, v. 204, p.-., 2022.
- CARMO, IAGO AGUIAR DIAS; DE SOUZA, ALINE KARLA NOLBERTO; **FAYER, LEONARA**; MUNK, MICHELE; BRANDÃO, HUMBERTO M.; DE OLIVEIRA, LUIZ FERNANDO CAPPÀ; BANDEIRA, STEPHANE; CAVALLINI, GRASIELE SOARES; DE SOUZA, NELSON LUIS GONÇALVES DIAS. Cytotoxicity and bactericidal activity of alginate/polyethylene glycol films with zinc oxide or silicon oxide nanoparticles for food packaging. International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, v., p. 1-12, 2022.
- ZANETTE, RAFAELLA DE SOUZA SALOMÃO; **FAYER, LEONARA**; VASCONCELLOS, REBECCA; DE OLIVEIRA, LUIZ FERNANDO CAPPÀ; MARANDUBA, CARLOS MAGNO DA COSTA; DE ALVARENGA, ÉRIKA LORENA FONSECA COSTA; MARTINS, MARIA ALICE; BRANDÃO, HUMBERTO DE MELLO; MUNK, MICHELE. Cytocompatible and osteoinductive cotton cellulose nanofiber/chitosan nanobiocomposite scaffold

for bone tissue engineering. **Biomedical Materials**, v. 18, p. 055016, 2023.



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

Rafaella S.S. Zanette, Leonara B.F. Almeida, Nelson L.G.D. Souza, Camila G. Almeida, Luiz F.C. Oliveira, Elyabe M. de Matos, Juliana C. Gern, Humberto M. Brandão & Michele Munk

To cite this article: Rafaella S.S. Zanette, Leonara B.F. Almeida, Nelson L.G.D. Souza, Camila G. Almeida, Luiz F.C. Oliveira, Elyabe M. de Matos, Juliana C. Gern, Humberto M. Brandão & Michele Munk (2019): Cotton cellulose nanofiber/chitosan nanocomposite: characterization and evaluation of cytocompatibility, Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, DOI: [10.1080/09205063.2019.1646627](https://doi.org/10.1080/09205063.2019.1646627)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/09205063.2019.1646627>



Accepted author version posted online: 19 Jul 2019.



Submit your article to this journal [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



PAPER

The distinct effect of titanium dioxide nanoparticles in primary and immortalized cell lines

Leonara Fayer,¹ Rafaella S.S. Zanette,¹ Juliana T.C. Siqueira,¹
Eduarda R. Oliveira,¹ Camila G. Almeida,² Juliana C. Gern,² Saulo M. Sousa,¹
Luiz F.C. de Oliveira,³ Humberto M. Brandão² and Michele Munk¹,

¹Department of Biology, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora a 36036-900, Brazil, ²Laboratory of Nanotechnology, Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA), Juiz de Fora a 36038-330, Brazil and ³Department of Chemistry, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora a 36036-330, Brazil

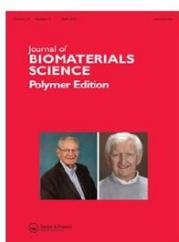
Correspondence address: Department of Biology, Federal University of Juiz de Fora—University Campus, street José Lourenço Kelmer, São Pedro, Juiz de Fora 36036-900, Brazil. Tel: +553221026300; Fax: 553221023201; E-mail: michele.munk@icb.ufjf.br

Abstract

The titanium dioxide nanoparticles (NPs) have been applied to biomedical, pharmaceutical, and food additive fields. However, the effect on health and the environment are conflicting; thus, it has been reviewing several times. In this context, establishing standard robust protocols for detecting cytotoxicity and genotoxicity of nanomaterials became essential for nanotechnology development. The cell type and the intrinsic characteristics of titanium dioxide NPs can influence nanotoxicity. In this work, the cyto- and genotoxicity effects of standard reference material titanium dioxide NPs in primary bovine fibroblasts and immortalized Chinese hamster ovary epithelial (CHO) cells were determined and compared for the first time. Titanium dioxide NPs exposure revealed no cytotoxicity for primary bovine fibroblasts, while only higher concentrations tested (10 µg/ml) induce genotoxic effects in this cell model. In contrast, the lower concentrations of the titanium dioxide NPs cause the cyto- and genotoxic effects in CHO cells. Therefore, our finding indicates that the CHO line was more sensitive toward the effects of titanium dioxide NPs than the primary bovine fibroblast, which should be valuable for their environmental risk assessment.

Received: 14 January 2021; Revised: 2 March 2021; Accepted: 30 March 2021

© The Author(s) 2021. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com



Cytocompatibility and osteogenic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth with cotton cellulose nanofibers for tissue engineering and regenerative medicine

Rafaella de S. S. Zanette, Leonara Fayer, Eduarda R. de Oliveira, Camila G. Almeida, Cauê R. Oliveira, Luiz F. C. de Oliveira, Carlos M. C. Maranduba, Érika C. Alvarenga, Humberto M. Brandão & Michele Munk

To cite this article: Rafaella de S. S. Zanette, Leonara Fayer, Eduarda R. de Oliveira, Camila G. Almeida, Cauê R. Oliveira, Luiz F. C. de Oliveira, Carlos M. C. Maranduba, Érika C. Alvarenga, Humberto M. Brandão & Michele Munk (2022) Cytocompatibility and osteogenic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth with cotton cellulose nanofibers for tissue engineering and regenerative medicine, Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 33:5, 627-650, DOI: [10.1080/09205063.2021.2008787](https://doi.org/10.1080/09205063.2021.2008787)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/09205063.2021.2008787>



Published online: 24 Nov 2021.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 102



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Cytocompatibility of carboxylated multi-wall carbon nanotubes in stem cells from human exfoliated deciduous teeth

Eduarda R Oliveira¹ , Leonara Fayer¹, Rafaella S S Zanette¹,
Luiz O Ladeira², Luiz F C de Oliveira³, Carlos M C Maranduba⁴,
Humberto M Brandão⁵ and Michele Munk¹ 

¹Laboratory of Nanobiotechnology and Nanotoxicology, Department of Biology, Federal University of Juiz de Fora, Brazil

²Nanomaterials Laboratory, Department of Physics, Federal University of Minas Gerais, Brazil

³Nucleus of Spectroscopy and Molecular Structure, Department of Chemistry, Federal University of Juiz de Fora, Brazil

⁴Laboratory of Human Genetics and Cell Therapy, Department of Biology, Federal University of Juiz de Fora, Brazil

⁵Laboratory of Nanotechnology, Brazilian Agricultural Research Corporation- Embrapa Dairy Cattle, Brazil

E-mail: michele.munk@icb.ufjf.br

Received 9 September 2021, revised 14 October 2021

Accepted for publication 26 October 2021

Published 15 November 2021



CrossMark

Abstract

Carboxylated multi-wall carbon nanotube (MWCNT-COOH) presents unique properties due to nanoscale dimensions and permits a broad range of applications in different fields, such as bone tissue engineering and regenerative medicine. However, the cytocompatibility of MWCNT-COOH with human stem cells is poorly understood. Thus, studies elucidating how MWCNT-COOH affects human stem cell viability are essential to a safer application of nanotechnologies. Using stem cells from the human exfoliated deciduous teeth model, we have evaluated the effects of MWCNT-COOH on cell viability, oxidative cell stress, and DNA integrity. Results demonstrated that despite the decreased metabolism of mitochondria, MWCNT-COOH had no toxicity against stem cells. Cells maintained viability after MWCNT-COOH exposure. MWCNT-COOH did not alter the superoxide dismutase activity and did not cause genotoxic effects. The present findings are relevant to the potential application of MWCNT-COOH in the tissue engineering and regenerative medicine fields.

Supplementary material for this article is available [online](#)

Keywords: carbon materials, *in vitro* study, nanotechnology, tissue engineering

(Some figures may appear in colour only in the online journal)



Nanoencapsulated *Lippia rotundifolia* antimicrobial peptide: synthesis, characterization, antimicrobial activity, and cytotoxicity evaluations

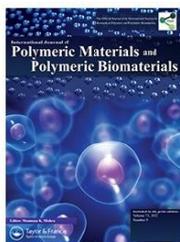
Elisandra M. dos Santos¹ · Letícia S. Tavares¹ · Leonara Fayer¹ · Humberto M. Brandão² · Michele Munk¹ · Marcelo de O. Santos^{1,3}

Received: 16 August 2021 / Revised: 26 January 2022 / Accepted: 31 January 2022
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2022

Abstract

Antimicrobial peptides (AMP) are promising novel antibiotics but exhibit low stability and can be toxic. The AMP encapsulation can be used to protect the drug and control its release rates. The Lr-AMP1f encapsulated into chitosan nanoparticle (NP) by ionic gelation method reached 90% efficiency. The results indicated that the hydrodynamic particle size of NPs increased from 196.1 ± 3.14 nm (free NP) to 228.1 ± 12.22 nm (nanoencapsulated Lr-AMP1f), while the atomic force microscope showed the spherical shape. The Zeta potential of the nanoencapsulated Lr-AMP1f was high (+35 mV). These AMP-loaded NPs exhibited stability for up to 21 days of storage. The minimum inhibitory concentration (MIC) of free Lr-AMP1f was 8 $\mu\text{g/mL}$ for *E. coli* and *S. epidermidis*. However, the nanoencapsulated Lr-AMP1f produced a bacteriostatic effect against both bacteria at 8 $\mu\text{g/mL}$. The MIC of nanoencapsulated Lr-AMP1f was 16 $\mu\text{g/mL}$ for *E. coli* and 32 for *S. epidermidis*. Nanoencapsulated Lr-AMP1f was nontoxic to HEK293 cells. Promisingly, chitosan NP can be used as a vehicle for the antibacterial application of new AMP (Lr-AMP1f).

Keywords Antimicrobial peptides · Nanotechnology · Nanocapsulates



International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials



ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/gpom20>

Cytotoxicity and bactericidal activity of alginate/polyethylene glycol films with zinc oxide or silicon oxide nanoparticles for food packaging

Iago Aguiar Dias Carmo, Aline Karla Nolberto de Souza, Leonara Fayer, Michele Munk, Humberto de Mello Brandão, Luiz Fernando Cappa de Oliveira, Stephane Bandeira, Grasielle Soares Cavallini & Nelson Luis Gonçalves Dias de Souza

To cite this article: Iago Aguiar Dias Carmo, Aline Karla Nolberto de Souza, Leonara Fayer, Michele Munk, Humberto de Mello Brandão, Luiz Fernando Cappa de Oliveira, Stephane Bandeira, Grasielle Soares Cavallini & Nelson Luis Gonçalves Dias de Souza (2022): Cytotoxicity and bactericidal activity of alginate/polyethylene glycol films with zinc oxide or silicon oxide nanoparticles for food packaging, International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, DOI: [10.1080/00914037.2022.2032706](https://doi.org/10.1080/00914037.2022.2032706)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/00914037.2022.2032706>



Published online: 03 Feb 2022.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=gpom20>

Biomedical Materials



PAPER

Cytocompatible and osteoinductive cotton cellulose nanofiber/chitosan nanobiocomposite scaffold for bone tissue engineering

RECEIVED
24 April 2023REVISED
12 July 2023ACCEPTED FOR PUBLICATION
26 July 2023PUBLISHED
4 August 2023

Rafaella de Souza Salomão Zanette¹, Leonara Fayer¹, Rebecca Vasconcellos¹,
Luiz Fernando Cappa de Oliveira², Carlos Magno da Costa Maranduba³,
Érika Lorena Fonseca Costa de Alvarenga⁴, Maria Alice Martins⁵, Humberto de Mello Brandão⁶
and Michele Munk^{1*} 

¹ Laboratory of Nanobiotechnology and Nanotoxicology, Department of Biology, Federal University of Juiz de Fora, 36036-900 Juiz de Fora, Brazil

² Nucleus of Spectroscopy and Molecular Structure, Department of Chemistry, Federal University of Juiz de Fora, 36036-900 Juiz de Fora, Brazil

³ Laboratory of Human Genetics and Cell Therapy, Department of Biology, Federal University of Juiz de Fora, 36036-900 Juiz de Fora, Brazil

⁴ Department of Natural Sciences, Federal University of São João Del Rei, 36031-160 São João del Rei, Brazil

⁵ National Laboratory of Nanotechnology for Agriculture, Embrapa Instrumentation, 13560-970 São Carlos, Brazil

⁶ Laboratory of Applied Nanotechnology for Animal Production and Health, Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA), 36038-330 Juiz de Fora, Brazil

* Author to whom any correspondence should be addressed.

E-mail: michele.munk@icb.ufjf.br

Keywords: cell differentiation, human mesenchymal stem cells, biomedical nanomaterials

Abstract

Natural polymeric nanobiocomposites hold promise in repairing damaged bone tissue in tissue engineering. These materials create an extracellular matrix (ECM)-like microenvironment that induces stem cell differentiation. In this study, we investigated a new cytocompatible nanobiocomposite made from cotton cellulose nanofibers (CNFs) combined with chitosan polymer to induce osteogenic stem cell differentiation. First, we characterized the chemical composition, nanotopography, swelling properties, and mechanical properties of the cotton CNF/chitosan nanobiocomposite scaffold. Then, we examined the biological characteristics of the nanocomposites to evaluate their cytocompatibility and osteogenic differentiation potential using human mesenchymal stem cells derived from exfoliated deciduous teeth. The results showed that the nanobiocomposite exhibited favorable cytocompatibility and promoted osteogenic differentiation of cells without the need for chemical inducers, as demonstrated by the increase in alkaline phosphatase activity and ECM mineralization. Therefore, the cotton CNF/chitosan nanobiocomposite scaffold holds great promise for bone tissue engineering applications.