

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

EDUARDA ROCHA DE OLIVEIRA

**EFEITOS DE NANOTUBOS DE CARBONO MULTICAMADAS
FUNCIONALIZADOS EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE
POLPA DENTÁRIA HUMANA CULTIVADAS *IN VITRO***

DISSERTAÇÃO

JUIZ DE FORA
2020

EDUARDA ROCHA DE OLIVEIRA

**EFEITOS DE NANOTUBOS DE CARBONO MULTICAMADAS
FUNCIONALIZADOS EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE
POLPA DENTÁRIA HUMANA CULTIVADAS *IN VITRO***

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área Genética e Biotecnologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas, área Genética e Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Michele Munk Pereira

JUIZ DE FORA
2020

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

Oliveira, Eduarda Rocha de.

Efeitos de nanotubos de carbono multicamadas funcionalizados em células-tronco mesenquimais de polpa dentária humana cultivadas in vitro / Eduarda Rocha de Oliveira. -- 2020.

87 f. : il.

Orientadora: Michele Munk Pereira

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

1. Nanotoxicologia. 2. Testes in vitro. 3. Citocompatibilidade. 4. Nanomateriais. I. Pereira, Michele Munk, orient. II. Título.

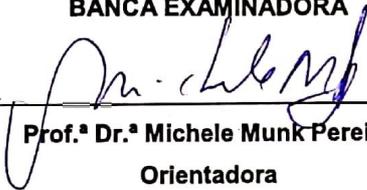
EDUARDA ROCHA DE OLIVEIRA

**EFEITOS DE NANOTUBOS DE CARBONO MULTICAMADAS FUNCIONALIZADOS EM
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE POLPA DENTÁRIA HUMANA CULTIVADAS *IN*
VITRO**

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

Aprovada em: 18/02/2020.

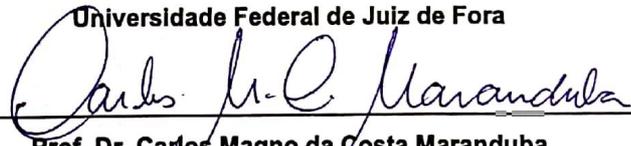
BANCA EXAMINADORA



Prof.ª Dr.ª Michele Munk Pereira

Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba

Universidade Federal de Juiz de Fora



Dr. Humberto de Mello Brandão

Embrapa Gado de Leite

AGRADECIMENTOS

Sou grata, primeiramente, a Deus por sempre estar ao meu lado e me conceder grandes oportunidades nos momentos certos.

Aos meus pais, Marília e José Renato, e irmãos, Renata e Ramon, pelo amor incondicional e sempre acreditarem nas minhas escolhas.

À Prof^a. Dr^a. Michele Munk, pela orientação e incrível oportunidade de aprendizado.

Ao Dr. Humberto de Mello Brandão, pelos ensinamentos e incentivo aos questionamentos científicos, e à Embrapa Gado de Leite.

Ao Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba e ao GENETEC pelo suporte à minha pesquisa e formação profissional.

À Universidade Federal de Juiz de Fora e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas pela acolhida, ensino e oportunidade de aperfeiçoamento profissional.

Às amigas do Laboratório de Nanotecnologia e Nanotoxicologia, Leonara e Rafaella pelos compartilhamentos diários e parceria e à toda a equipe do Laboratório de Nanobiotecnologia e Nanotoxicologia.

Aos Laboratórios de Genética e de Bioquímica, seus professores responsáveis, técnicos e colegas de trabalho do programa de pós-graduação pelas inúmeras colaborações.

Aos meus amigos, de perto ou longe, pelo carinho, amizade, apoio e presença constantes.

Aos meus queridos familiares, que sempre me incentivam a trilhar o caminho da educação.

Às agências de fomento CAPES, FAPEMIG, CNPq, Rede AGRONANO e Rede Mineira de Pesquisa e Inovação para Bioengenharia de Nanossistemas.

A todos que de alguma forma contribuíram para que este momento chegasse, meus sinceros agradecimentos.

“(...) Estou em processo
Há coisas a aprender
Há coisas a reprogramar
Há coisas que sou e não quero ser
Há coisas que ainda não sou e quero ser
Há coisas que sou e ainda não sei
Mas estou buscando saber
Estou em construção
Mas já estive em demolição”

Eliane Stahl

RESUMO

A nanotecnologia é um campo de estudo que investiga o potencial uso da matéria em escala nanométrica e os nanomateriais (NMs) são aqueles que apresentam pelo menos uma de suas três dimensões variando entre 1 e 100nm, e por isso, podem ter propriedades diferentes das que teriam em tamanho comum. Os nanotubos de carbono multicamadas (MWCNTCs) possuem características relevantes como alta condução térmica, elétrica, peso ultraleve, resistência mecânica acentuada, capilaridade e grande superfície de contato, permitindo aplicações potenciais na área biomédica e engenharia tecidual. Contudo, a alta reatividade proveniente do tamanho do NM, traz também riscos toxicológicos. Logo, estudos que investiguem os efeitos dos NMs em células humanas são essenciais para aplicações seguras da nanotecnologia. O objetivo deste trabalho foi avaliar os potenciais efeitos tóxicos dos MWCNTs funcionalizados com grupos carboxila (MWCNT-COOH) em células-tronco mesenquimais da polpa dentária humana. Os MWCNT-COOHs foram caracterizados por espectroscopia de Infravermelho e RAMAN para confirmação da composição química e espalhamento de luz dinâmico (DLS) para conhecimento do potencial Zeta (PZ), índice de polidispersão e tamanho hidrodinâmico (TH). Posteriormente foram realizados testes de citotoxicidade e genotoxicidade, tais como avaliação da morfologia por microscopia de luz, análise de atividade mitocondrial por ensaio de Metil Tiazol Tetrazólio (MTT), atividade antioxidativa por ensaio da enzima superóxido dismutase, ensaio de viabilidade celular por citometria de fluxo e teste de micronúcleo. As células foram expostas à diferentes concentrações de MWCNT-COOH (concentrações de 0,1, 1, 10, 50 e 100 µg/mL) por 24, 48 e 72h. A espectroscopia RAMAN confirmou a composição química do MWCNT. O PZ negativo de -0,6 a -27,8 corroborou a funcionalização, evidenciada primeiramente pela obtenção de bandas relativas à presença de grupos carboxila em espectroscopia de Infravermelho. As médias do TH de MWCNT-COOHs foram menores em meio contendo soro fetal bovino e em baixas concentrações (0,1, 1 e 10 µg/mL). A análise de morfologia das células mostrou que houve redução da área celular ($P < 0,05$) principalmente nas concentrações de 50 e 100 µg/mL nos três tempos analisados. Os dados de MTT revelaram que os MWCNT-COOHs reduziram a atividade mitocondrial ($P < 0,05$). Porém, os MWCNT-COOH não alteraram a atividade antioxidante, a viabilidade celular e a frequência de micronúcleos ($P > 0,05$). Em conclusão, nas condições experimentais deste estudo, os

MWCNT-COOHs alteraram alguns parâmetros celulares, como área celular e metabolismo energético. No entanto, não afetaram a viabilidade celular, o metabolismo oxidativo ou induziram efeitos genotóxicos.

Palavras-chaves: nanotoxicologia, testes *in vitro*, citocompatibilidade, nanomateriais.

ABSTRACT

Nanotechnology is a field of study that investigates the potential use of nanoscale matter and nanomaterials (NMs) are those that present one of the three dimensions, ranging from 1 to 100nm and, therefore, may have different properties when compared with their equivalents in bulk size. The multi-wall carbon nanotubes (MWCNTs) have relevant characteristics such as high thermal and electrical conductivity, ultralight weight, elevated mechanical resistance, capillarity and large contact surface, enabling possible applications in biomedicine and tissue engineering. On the other hand, the high reactivity we observe in NMs may cause toxicological risks. Then, studies that investigate the effects of NMs on human cells are essential for safe applications of nanotechnology. The objective of this work was to evaluate the potential toxic effects of MWCNTs functionalized with carboxyl groups (MWCNT-COOH) in mesenchymal stem cells of the human dental pulp. The MWCNT-COOHs were characterized by infrared spectroscopy and RAMAN to confirm the chemical composition and dynamic light scattering (DLS) for knowledge of the zeta potential (ZP), polydispersity index and hydrodynamic size. Subsequently, cytotoxicity and genotoxicity tests were performed, such as morphology evaluation by optical microscopy, analysis of mitochondrial activity by the Methyl Thiazole Tetrazolium (MTT) assay, antioxidant activity by the superoxide dismutase enzyme assay, cell viability assay by cytometry and micronucleus test. The cells were exposed to different concentrations of MWCNT-COOHs (concentrations of 0.1, 1, 10, 50 and 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$) for 24, 48 and 72h. RAMAN spectroscopy confirmed the chemical composition of MWCNT. The negative ZP of -0.6 to -27.8 corroborated the functionalization, evidenced by the obtained bands related to the presence of carboxyl groups in the infrared spectroscopy. The average hydrodynamic size of the MWCNT-COOHs was lower, on average, containing fetal bovine serum and in low concentrations (0.1, 1 and 10 $\mu\text{g} / \text{mL}$). The morphological analysis of the cells showed that there was a reduction in the cell area ($P < 0.05$) mainly in the concentrations of 50 and 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ in the three analyzed times. MTT data revealed that MWCNT-COOHs reduced mitochondrial activity ($P < 0.05$). However, MWCNT-COOHs did not alter antioxidant activity, cell viability and micronucleus frequency ($P > 0.05$). In conclusion, in the experimental conditions of this study, the MWCNT-COOHs altered some cellular

parameters, such as cell area and energy metabolism. However, they did not impair cell viability, oxidative metabolism or induce genotoxic effects.

Keywords: nanotoxicology, in vitro tests, cytocompatibility, nanomaterials.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ilustração de estruturas alótropas do Carbono: a) folha de grafeno e Nanotubos de Carbono dos tipos b) Single-wall carbon nanotube, c) Multi-wall carbon nanotube e d) Multi-wall carbon nanotube carboxilado, criado no BioRender (2019), renderizador online de ilustrações científicas.....29
- Figura 2.** Espectro na região do Infravermelho obtido para o nanotubo de carbono parede múltipla funcionalizado com carboxila (MWCNT-COOH).....46
- Figura 3.** Espectroscopia Raman obtida para nanotubos de carbono funcionalizados com grupos carboxílicos (MWCNT-COOHs). Os picos em 1323 cm^{-1} , 1587 cm^{-1} e 2642 cm^{-1} correspondem as bandas D, G e D' referentes ao MWCNT.....47
- Figura 4.** Microscopia de Força atômica de nanotubos de carbono multicamadas funcionalizados com grupos carboxila (MWCNT-COOH), confirmando a forma de tubo deste NM com diâmetro de 10 a 20 nm.....48
- Figura 5.** Microscopia Eletrônica de Transmissão de nanotubos de carbono multicamadas funcionalizados com grupos carboxila (MWCNT-COOHs), confirmando a forma de tubo deste NM. Círculos pretos tracejados apontam regiões irregulares da superfície.....49
- Figura 6.** Análise de morfologia por microscopia de luz invertida. As imagens feitas em objetiva de 10X mostram CTMs em crescimento em monocamada aderente nas concentrações de (a) $0\text{ }\mu\text{g/mL}$, (b) $0,1\text{ }\mu\text{g/mL}$, (c) $1\text{ }\mu\text{g/mL}$, (d) $10\text{ }\mu\text{g/mL}$, (e) $50\text{ }\mu\text{g/mL}$, (f) $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ de MWCNT-COOHs após 24h de exposição. Agregados de MWCNT-COOHs estão apontados por setas.....51
- Figura 7.** Análise de morfologia por microscopia de luz invertida. As imagens feitas em objetiva de 10X mostram CTMs em crescimento em monocamada aderente nas concentrações de (a) $0\text{ }\mu\text{g/mL}$, (b) $0,1\text{ }\mu\text{g/mL}$, (c) $1\text{ }\mu\text{g/mL}$, (d) $10\text{ }\mu\text{g/mL}$, (e) $50\text{ }\mu\text{g/mL}$, (f) $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ de MWCNT-COOHs após 48h de exposição. Agregados de MWCNT-COOHs estão apontados por setas.....52

Figura 8. Análise de morfologia por microscopia de luz invertida. As imagens feitas em objetiva de 10X mostram CTMs em crescimento em monocamada aderente nas concentrações de (a) 0 µg/mL, (b) 0,1 µg/mL, (c) 1 µg/mL, (d) 10 µg/mL, (e) 50 µg/mL, (f) 100 µg/mL de MWCNT-COOHs após 72h de exposição. Agregados de MWCNT-COOHs estão apontados por setas.....	52
Figura 9. Análise de morfologia por microscopia de luz invertida. As imagens feitas em objetiva de (a) 4x e (b) 40x mostram CTMs em crescimento em monocamada aderente e interagindo com agregados (apontados por setas) de MWCNT-COOHs.....	53
Figura 10. Análise de atividade mitocondrial realizada por ensaio de MTT para os tempos de (a) 24h, (b) 48h e (c) 72h de incubação das células expostas às concentrações de 0 µg/mL, 0,1 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL de MWCNT-COOHs. Médias que não diferem entre si estão representadas pelas mesmas letras.....	53
Figura 11. Análise da atividade da enzima SOD para os tempos de (a) 24h, (b) 48h e (c) 72h de incubação das células expostas às concentrações de 0 µg/mL, 0,1 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL de MWCNT-COOHs. Médias que não diferem entre si estão representadas pelas mesmas letras.....	55
Figura 12. Análise estatística da viabilidade celular por citometria de fluxo com marcação por iodeto de propídio para os tempos de (a) 24h, (b) 48h e (c) 72h de incubação das células expostas às concentrações de 0 µg/mL 0,1 µg/mL, n1 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL de MWCNT-COOHs. Médias que não diferem entre si estão representadas pelas mesmas.....	55
Figura 13. Gráficos PE-A x FSC-A de citometria de fluxo com marcação por iodeto de propídio para o tempo de 24 h de exposição das CTMs aos tratamentos a) 0 µg/mL, b) 0,1 µg/mL, c) 1 µg/mL, d) 10 µg/mL, e) 50 µg/mL, f) 100 µg/mL de MWCNT-COOHs.....	56
Figura 14. Gráficos PE-A x FSC-A de citometria de fluxo com marcação por iodeto de propídio para o tempo de 48 h de exposição das CTMs aos tratamentos a) 0 µg/mL, b) 0,1 µg/mL, c) 1 µg/mL, d) 10 µg/mL, e) 50 µg/mL, f) 100 µg/mL de MWCNT-COOHs.....	56
Figura 15. Gráficos PE-A x FSC-A de citometria de fluxo com marcação por iodeto de propídio para o tempo de 72 h de exposição das CTMs aos tratamentos a) 0 µg/mL, b) 0,1 µg/mL, c) 1 µg/mL, d) 10 µg/mL, e) 50 µg/mL, f) 100 µg/mL de MWCNT-COOHs.....	57

Figura 16. Imagem, em objetiva de 20x, representativa do ensaio de micronúcleo em CTMs para o (a) controle e para o (b) tratamento de 50 µg/ml e período de 24h de exposição. Setas pretas indicando células binucleadas com presença de micronúcleo e seta laranja indicando agregado de MWCNT-COOHs.....58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diâmetro hidrodinâmico (nm), Índice de Polidispersão (IPD) e Potencial Zeta (mV) obtidos por Espalhamento de Luz Dinâmico.....50

Tabela 2. Médias das áreas celulares em μm^2 em função da dose e tempo de análise Análise de morfologia por microscopia de luz, em relação ao tamanho da área celular. A área celular foi medida manualmente através do programa ImageJ (Wayne Rasband). Médias que não diferem entre si estão representadas pelas mesmas letras.....53

Tabela 3. Ensaio de Micronúcleo para teste de Genotoxicidade mostrando a média e erro padrão da média da frequência de micronúcleos em CTMs tratadas com 0 $\mu\text{g/mL}$, 0,1 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ de MWCNT-COOH para o período de 24h de exposição.....57

Tabela 4. Valores de CBPI para as CTMs expostas por 24h aos MWCNT-COOHs.....58

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

AFM- Microscopia de Força Atômica

CBPI- Índice de Proliferação do Bloqueador de Citocinese

CT- Célula-tronco

CTM- Célula-tronco mesenquimal

DLS- Espalhamento de Luz Dinâmico

DMEM/F12- Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12

MTT- Metil Tiazol Tetrazólio

MWCNT- Nanotubos de Carbono Multiparede

MWCNT-COOH- Nanotubos de Carbono Multiparede carboxilados

NM- Nanomaterial

NTC- Nanotubo de Carbono

PBS- Tampão Fosfato Salino

PZ- Potencial Zeta

SFB- Soro Fetal Bovino

SOD- Superóxido Desmutase

SWCNT- Nanotubos de Carbono de Parede Simples

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 NANOTECNOLOGIA.....	21
2.1 CARACTERIZAÇÃO DE NANOMATERIAIS.....	22
2.1.1 ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHO.....	22
2.1.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN.....	23
2.1.3 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO.....	24
2.1.4 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.....	25
2.1.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	25
2.2 NANOTOXICIDADE.....	26
2.3 NANOTUBO DE CARBONO.....	29
2.4 MODELO EXPERIMENTAL: CÉLULAS-TRONCO.....	31
2.5 ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE NANOMATERIAIS.....	34
2.5.1 ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE.....	34
2.5.1.1 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA CELULAR POR MICROSCOPIA DE LUZ.....	34
2.5.1.2 ENSAIO DE REDUÇÃO DO CORANTE METIL TIAZOL TETRAZÓLIO.....	34
2.5.1.3 ENSAIO DA SUPERÓXIDO DISMUTASE.....	35
2.5.1.4 ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	36
2.6 ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DE GENOTOXICIDADE.....	36
2.6.1 ENSAIO DE MICRONÚCLEO.....	36
3 OBJETIVOS.....	38

3.1 OBJETIVO GERAL.....	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1 REAGENTES.....	39
4.2 MWCNT-COOH.....	39
4.3 DISPERSÃO DOS MWCNT-COOHs	39
4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS MWCNT-COOHs.....	40
4.4.1 ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHO.....	40
4.4.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN.....	40
4.4.3 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO.....	40
4.4.4 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.....	41
4.4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	41
4.5 CULTIVO DE CÉLULAS	41
4.6 EXPOSIÇÃO CELULAR AOS NTCs PARA ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE.....	42
4.7 ANÁLISE DE CRESCIMENTO E MORFOLOGIA CELULAR.....	42
4.8 ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR.....	43
4.9 ANÁLISE DE ATIVIDADE MITOCONDRIAL.....	43
4.10 ANÁLISE DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	44
4.11 ANÁLISE DE GENOTOXICIDADE.....	44

4.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	45
5 RESULTADOS	46
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS MWCNT-COOHs.....	46
5.1.1 ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHO.....	46
5.1.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN.....	47
5.1.3 MICROSCPIA DE FORÇA ATÔMICA.....	47
5.1.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	48
5.1.5 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO.....	49
5.2 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE.....	51
5.2.1 ANÁLISE DE CRESCIMENTO E MORFOLOGIA CELULAR.....	51
5.2.2 ANÁLISE DE ATIVIDADE MITOCONDRIAL.....	54
5.2.3 ENSAIO DA ATIVIDADE DA ENZIMA SOD.....	54
5.2.4 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR.....	55
5.3 ENSAIO DE GENOTOXICIDADE POR MICRONÚCLEO.....	57
6 DISCUSSÃO.....	59
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
ANEXO.....	80

1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é um campo de estudo que consiste no desenvolvimento e uso da matéria em escala nanométrica, com o objetivo de gerar dispositivos funcionais (DYCK et al., 2019) e vem crescendo rapidamente no século 21. Os nanomateriais (NMs) são aqueles que apresentam mais de 50% de suas partículas com pelo menos uma de suas três dimensões variando entre 1 e 100nm (MIERNICKI et al., 2019; COMISSÃO EUROPEIA, 2011) e, devido às dimensões tão reduzidas podem apresentar propriedades físicas e químicas que diferem dos seus equivalentes em massa. Por isso, há um vasto potencial para aplicação comercial de NMs em diferentes áreas como a eletrônica, ambiental, agropecuária, alimentícia, cosmética e biomédica (MCCLEMENT & XIAO, 2017; TRINH et al., 2017; YANG et al., 2017; CORSI et al., 2018; HE et al., 2018; SOARES et al., 2018;).

Atualmente há uma diversidade de NMs sendo produzidos, e dentre eles destacam-se os Nanotubos de Carbono (NTCs), alótropos do carbono como uma estrutura cilíndrica. Esses cilindros podem estar organizados na forma de uma camada (*Single-wall carbon nanotubes* – SWCNTs) ou multicamadas (*Multi-wall carbon nanotubes* – MWCNTs). Os NTCs apresentam características relevantes como alta condução térmica e elétrica, peso ultraleve, resistência mecânica acentuada, capilaridade e grande superfície de contato (GHASEMPOUR & NAREI, 2018). Essas propriedades podem ter potencial aplicação na área biomédica.

Dentre as relevâncias biomédicas dos NTCs podemos mencionar a capacidade de absorverem radiação na região do espectro infravermelho e, conseqüentemente, aumentarem sua temperatura (SANTOS et al., 2019). Isso os tornam úteis na terapia fototermal antimicrobiana como, por exemplo, no tratamento de infecções fúngicas causadas por *Candida albicans* (SANTOS et al., 2019). Os MWCNTs também vem sendo utilizados como sistemas não virais eficientes para entrega de DNA e neste sentido, Munk et al. (2016; 2017) mostraram a transfeccção gênica de embriões e fibroblastos bovinos. Recentemente, Sun e colaboradores (2019) sintetizaram NTCs formados por ligações entre benzenos, que proporcionaram cavidades ocasionais neste NM. Estas cavidades permitiram o alojamento de partículas de fulereno, indicando que

estes nanotubos podem ser aplicados como carreadores de outras moléculas de interesse.

As características dos NTCs os tornam materiais relevantes na fabricação de *scaffolds* para uso na engenharia tecidual e medicina regenerativa (EIVAZZADEH-KEIHAN et al., 2019; QUIAN et al., 2019). Estudos prévios demonstraram que a utilização de SWCNTs amino-funcionalizados, juntamente com *scaffolds*, resultou em um gel com propriedades eletrofisiológicas que induziram diferenciação osteogênica (QIAN et al., 2019), adicionando possibilidades ao tratamento local de lesões ósseas.

Contudo, apesar dos avanços promissores provenientes da nanotecnologia e do crescimento no interesse de seus benefícios, cresce também a preocupação de riscos emergentes dos produtos desta tecnologia. A alta produção e disseminação de NMs gera a possibilidade de exposição de organismos a esses novos materiais. No entanto, ainda não se tem informações suficientes sobre os possíveis impactos dos NMs na saúde humana e ambiental (MAYNARD & AITKEN, 2016; FADEEL et al., 2018; GIESE et al., 2018). Desta forma, para que a nanotecnologia se desenvolva de forma segura e sustentável, torna-se essencial preencher estas lacunas avaliando os possíveis efeitos adversos simultaneamente aos benefícios que essas novas tecnologias podem trazer para a sociedade.

Estudos anteriores revelaram toxicidade *in vitro* de MWCNT-COOH em embriões bovinos cultivados *in vitro* (MUNK et al., 2016), queratinócitos humanos (PALMER et al., 2019) e macrófagos de roedores (ZHANG et al. 2019), bem como genotoxicidade em células pulmonares de roedores (JACKSON et al. 2014) e células de medula óssea de camundongos (PATLOLLA et al., 2010). Assim, uma alternativa para tornar os NMs mais biocompatíveis consiste na funcionalização de sua superfície com moléculas ou complexos moleculares. Estudos anteriores demonstraram que a alteração das propriedades físico-químicas dos MWCNTs mediante carboxilação aumentaram a biocompatibilidade desse NM (ZHOU et al., 2017, HAMILTON et al., 2018). No entanto, ainda há uma lacuna de informações no que tange a interação de MWCNT-COOHs com células-tronco mesenquimais (CTMs) humanas.

Assim, a hipótese desse trabalho é a de que os MWCNT-COOH podem ser citocompatíveis quando em contato com as células-tronco mesenquimais humanas. Logo, o objetivo deste trabalho foi avaliar os potenciais efeitos citotóxicos e genotóxicos de MWCNT-COOHs em CTMs isoladas de polpa dentária humana.

2 NANOTECNOLOGIA

A Nanotecnologia, termo que se popularizou há mais de três décadas (DREXLER, 1986) e vem ganhando cada vez mais atenção na ciência, já sendo considerada a revolução científica do século 21 (WENNERSTEN et al., 2018), consiste nas tecnologias que envolvem o entendimento, manipulação e controle da matéria na dimensão nanométrica. O nanômetro é um bilhão de vezes menor que o metro ($1\text{ m}=1\times 10^{-9}\text{ nm}$). Sendo assim, os NMs são definidos como estruturas nas quais uma, duas ou três de suas dimensões estão entre 1 e 100 nm e, devido as dimensões tão reduzidas, podem apresentar propriedades físico-químicas que diferem dos seus equivalentes em massa. Como exceção, por questões de segurança, fulereno, grafeno e NTCs também são considerados NMs mesmo quando uma de suas dimensões externas é inferior a 1 nm (ou seja, abaixo da variação padronizada de 1 a 100 nm) (MIERNICKI et al., 2019; THIMIRI et. al., 2016; COMISSÃO EUROPEIA, 2011).

A matéria em nanoescala pode existir naturalmente nos ecossistemas ou como resultado de atividades antropológicas em processos industriais. No primeiro caso, os NMs podem ser resultado de queimadas e emissões vulcânicas, por exemplo. Já em casos resultantes de ações antropogênicas, NMs podem surgir de processos de combustão provenientes de automóveis, refinação e produção de alimentos (ROBLES-GARCÍA et. al., 2016).

NMs engenheirados são resultantes da nanoestruturação intencional de átomos e moléculas pensando-se no desenvolvimento de um produto. Portanto, esses NMs vão apresentar características físico-químicas de acordo com a aplicação desejada (ROBLES-GARCÍA et. al., 2016). Isto é possível pois as dimensões nanométricas possibilitam que os NMs apresentem propriedades específicas que surgem devido a estruturação em dimensões que integram a física clássica e a mecânica quântica, que são diferentes de suas propriedades em tamanho macro (CLARK & PAZDERNIK, 2015).

As características elétricas, mecânicas, magnéticas, óticas e catalíticas acabam despertando interesse de diversas áreas, como a alimentícia, ambiental, biomédica, agropecuária e cosmética para designar novos usos para esses NMs e oferecendo possíveis soluções para problemas da atualidade e melhoria de produtos já

existentes (DRASLER et al., 2017). Assim, há um aumento de pesquisas na área nanotecnológica, necessárias para a identificação de características dos NMs e compreensão de como eles agem ou interferem em processos biológicos (JAIN, 2017).

2.1 CARACTERIZAÇÃO DE NANOMATERIAIS

Como mencionado anteriormente, as características físico-químicas dos NMs são de ampla aplicação comercial. Por isso, ter conhecimento sobre a composição química e propriedades físicas dos NMs é relevante. Tratando-se de ensaios nanotoxicológicos, a caracterização permite prever os mecanismos de interação dos NMs com os sistemas biológicos e, assim, sua toxicidade, visto que apresentam reatividade química e comportamento diferentes nos meios biológicos. Existe um conjunto de propriedades dos NMs que são geralmente avaliadas em estudos de caracterização para fins de avaliação de nanotoxicidade, as quais inclui: composição química, tamanho, forma, carga da superfície, cristalinidade e estado de aglomeração e agregação (GUNSOLUS & HAYNES, 2015). Nesse contexto, a caracterização da composição química pode ser avaliada pelas espectroscopias de Infravermelho e Raman; o tamanho e forma pela Microscopia de Força Atômica (AFM) e Microscopia Eletrônica de Transmissão; a formação de agregados, diâmetro hidrodinâmico, Potencial Zeta (PZ) e homogeneidade da dispersão pela técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS).

2.1.1 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica de caracterização da composição química de materiais. Esta envolve a interação da radiação na região do infravermelho do espectro eletromagnético com a matéria e baseia-se em efeitos de absorção dos fótons incididos no material levando a uma energia vibracional específica (DENDISOVÁ et al., 2018). Assim, a energia de absorção que corresponde a frequência vibracional desencadeia uma vibração molecular devido a uma alteração no momento dipolo elétrico. Essa vibração proporciona informações sobre a estrutura molecular e,

logo, as bandas características da espectroscopia de infravermelho são como “impressões digitais” das moléculas (DENDISOVÁ et al., 2018).

A radiação infravermelha atua induzindo oscilações recorrentes das posições dos átomos ao redor de suas ligações, enquanto a molécula inteira está em processo contínuo de movimento de translação e rotação. A partir disso, os dois principais modos de vibração são o estiramento ou alongamento, no qual a distância entre dois átomos e, conseqüentemente, entre as ligações são alteradas; e a flexão, referente a mudança na inclinação das ligações (EL-AZAZY, 2018). Assim, a partir do espectro gerado após a vibração no interior de uma molécula de um composto químico, conhecemos suas propriedades físico-químicas pelo seu padrão de espectro, sendo possível identificá-lo (ATKINS & DE PAULA, 2011)

2.1.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN

A espectroscopia Raman se baseia no fenômeno de espalhamento da luz, o qual é normalmente descrito nos termos de radiação eletromagnética produzida por oscilação de dipolos induzidos na molécula pelo campo eletromagnético da radiação incidente. O momento dipolo induzido ocorre como resultado da polarizabilidade, ou seja, da deformabilidade da nuvem de elétrons ao redor da molécula por um campo elétrico externo. Logo, baseando-se no espalhamento inelástico de luz pela matéria, obtemos os modos vibracionais da molécula, a ligação química presente, os tipos de átomos que compõem a molécula e os grupamentos moleculares (ATKINS & DE PAULA, 2011).

Em uma análise Raman típica, um laser é usado para irradiar a amostra com uma radiação monocromática para excitação nas regiões espectrais de luz UV, visível e infravermelho próximo. Os fótons dispersos do Raman perdem um pouco de energia em relação à energia excitante para as coordenadas vibracionais específicas da amostra. E para as bandas Raman serem observadas a vibração molecular precisa causar uma alteração na polarizabilidade. Portanto, quando a amostra é exposta à radiação laser na faixa UV, visível ou infravermelho próximo, o fóton incidente deixa um pouco de sua energia nos modos vibracionais da molécula que atinge ou acumula energia adicional de uma vibração que já foi excitada. Assim, a radiação espalhada apresentará uma

frequência diferente da radiação incidida. A regra para as transições Raman vibracionais é que a polarizabilidade molecular deve mudar à medida que a molécula vibra (ATKINS & DE PAULA, 2011).

2.1.3 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO

O Espalhamento de Luz Dinâmico (*Dynamic Light Scattering- DLS*), também conhecido como Espectroscopia de Correlação de Fóton, é uma importante ferramenta para se estudar o comportamento das moléculas em suspensão coloidal. Esta técnica consiste na incidência de um feixe monocromático de luz sobre as moléculas de uma suspensão e assim, a luz se espalha em todas as direções como uma função do tamanho e forma das mesmas (STETEFELD et al., 2016). O movimento Browniano de um NM gera a flutuação da luz espalhada, permitindo obter o coeficiente de difusão e este é relacionado ao diâmetro hidrodinâmico da molécula. Logo, tal movimento é dependente do tamanho das moléculas, temperatura e viscosidade do meio de dispersão. Assim, em um instrumento DLS, quando a luz do laser encontra a molécula a luz incidente espalha-se com uma intensidade que é registrada por um detector. Esta luz monocromática incidente passa por um fenômeno denominado *Doppler broadening* devido ao movimento contínuo das moléculas em suspensão (STETEFELD et al., 2016).

Normalmente, o instrumento usado para DLS pode, além disso, analisar a motilidade eletroforética e mensurar a carga superficial dos NMs por meio do potencial elétrico na superfície de cisalhamento, no qual é chamado de Potencial Zeta (PZ). Este é determinado pela medição da velocidade das espécies carregadas em direção ao eletrodo na presença de um campo elétrico externo através da amostra em suspensão (SAPSFORD et al., 2011). Logo, com estas informações, torna-se possível prever qual a carga líquida superficial do NM e suas possíveis formas de interação com as células e moléculas do meio.

2.1.4 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

O microscópio de força atômica é um tipo de sonda de varredura e utiliza uma sonda fina para percorrer uma superfície (ao contrário dos tipos que utilizam elétrons ou feixe de luz), fornecendo um mapa tridimensional. O mecanismo de atuação da Microscopia de Força Atômica (AFM) baseia-se na detecção de forças que atuam entre a sonda fina e a superfície amostral. Esta sonda, que funciona como um sensor, está associada a um cantilever muito flexível. Este conjunto sonda-cantilever pode ser produzido a partir de sílica ou nitreto de silício, e deve manter contato ou quase encostar na superfície de interesse (ATKINS & DE PAULA, 2011). A sonda pode ser modificada para investigar as propriedades e interagir com a superfície de três formas principais: modo de contato, contato intermitente ou toque e sem contato. Quando em modo de contato, a ponta é arrastada diretamente sobre a superfície, se desviando em decorrência da interação Coulomb (interação eletrostática entre partículas eletricamente carregadas); sem contato, ela é mantida a uma curta distância (geralmente < 100 nm) da amostra e oscila a uma frequência que depende das forças de Van der Waals atuantes entre a sonda e a amostra; quando ocorre o toque, a ponta é mantida oscilando acima da amostra, e a frequência de oscilação muda à medida que a ponta se aproxima da superfície em intervalos regulares (VAHABI et al., 2013).

2.1.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

A Microscopia Eletrônica de Transmissão é um método de análise físico-química que consiste na transmissão de feixes de elétrons através de uma amostra, a qual, para permitir a transmissão dos elétrons, precisa ser ultrafina (>100 nm) ou estar suspensa em uma grade de cobre, por exemplo. Basicamente, as imagens se formam a partir da interação dos elétrons com a amostra de acordo em que a transmissão do feixe vai ocorrendo através do espécime. A interação da sonda com a amostra gera uma variedade de sinais eletrônicos e eletromagnéticos. A partir disso, uma imagem é gerada e ampliada em um dispositivo eletrônico. Este tipo de microscopia possibilita a obtenção de imagens em um nível de resolução maior quando comparado a microscopia de luz convencional. Isso ocorre, pois, esta técnica está associada aos pequenos comprimentos

de onda dos elétrons, o que permite a captação de detalhes tão finos quanto uma coluna de átomos (LIU, 2005).

2.2 NANOTOXICIDADE

Alguns tipos de NMs são naturalmente encontrados nos ecossistemas, ficam em contato com organismos vivos e de alguma forma não causam danos. Dentre os NMs naturais estão as nanopartículas de ouro e prata, formadas em águas naturais que contém íons desses metais e matéria orgânica natural; nanopartículas contendo pirita, zinco, cobre e ferro formadas em fontes hidrotermais (SHARMA et al., 2015). Contudo, com o avanço da nanotecnologia, cresce também o número de NMs, os quais não se tem, ou tem pouco, conhecimento sobre seus perfis toxicológicos. O fato é que, seres humanos estão cada vez mais expostos a uma variedade de NMs e, portanto, a demanda de pesquisas com relação a citocompatibilidade e citotoxicidade destes NMs cresce a cada dia e tornam-se necessárias para um desenvolvimento nanotecnológico seguro. Neste contexto, surge uma nova área de estudos, a nanotoxicologia, que consiste no desenvolvimento de testes e protocolos para avaliar possíveis riscos da produção e aplicação de nanotecnologias em sistemas biológicos (ARORA et al. 2012; DEKKERS et al., 2016).

A toxicidade dos NMs está intimamente relacionada ao seu tamanho muito pequeno. Os NMs apresentam uma grande área de superfície, o que aumenta a relação área/volume e o número de elétrons superficiais. Sendo assim, as moléculas tornam-se potencialmente mais reativas e espera-se que sua atividade química e biológica aumente (SAHU & HAYES, 2017). Outra característica que influencia criticamente a toxicidade é a própria composição química do NM, uma vez que os próprios elementos apresentam reatividade química, e por consequência, toxicidade diferentes em meios biológicos (KIM et al., 2014).

A nanoescala facilita a translocação de espécies químicas ativas pelas barreiras do organismo como a pele, tecidos e órgãos, o que permite a penetração dos NMs através de barreiras dos epitélios e endotélios, atingindo as correntes sanguínea e

linfática e chegando a diferentes tecidos e órgãos. Podem ainda entrar em vias fagocitárias ou difundirem pela membrana plasmática, sendo capazes de alcançar diferentes compartimentos celulares (SUKHANOVA et al., 2018). Então, pode ocorrer estresse oxidativo irreversível, problemas respiratórios, mutações, danos às organelas, desnaturação de proteínas, decaimento da atividade mitocondrial, alteração da morfologia celular, dentre outros (JEEVANANDAM et al., 2018). Sahu e colaboradores (2017), ao realizarem um estudo sobre a relação do tamanho de NMs com a toxicidade apresentada por estes, mostraram que nanopartículas de ZnO foram mais citotóxicas que as partículas deste mesmo material em tamanho micro em monócitos do sangue periferal. Por outro lado, todos os tamanhos de ZnO avaliados nesse trabalho tiveram um perfil de toxicidade similar em fibroblastos de embrião humano. Assim, este estudo também evidenciou que um mesmo NM pode ter diferentes efeitos nos diversos tipos celulares. Resultados semelhantes foram observados em macrófagos e fibroblastos expostos às nanopartículas de prata (PARK, 2011).

Outra característica que influencia a toxicidade é a composição química do NM, uma vez que os próprios elementos apresentam reatividade química, e por consequência, toxicidade diferentes em meios biológicos (KIM et al., 2014). Neste sentido, o tipo de funcionalização, ou seja, o tipo de grupo ativo na superfície dos NMs, também possui relevância no potencial toxicológico destes materiais.

Estudos prévios demonstraram que a toxicidade é altamente determinada pela internalização do NM (SAHU & HAYES, 2017), que, por sua vez, é influenciada pela sua morfologia. Isso ocorre, pois a morfologia irá definir tanto a forma de interação destes com outras moléculas quanto os mecanismos de internalização e eficiência de captação de NMs pela célula (CABALLERO-DÍAZ & CASES, 2016). Neste contexto, nanopartículas de ouro com 1,4 nm, que apresentam uma estrutura cuboctaedral, causam alta citotoxicidade por interagirem fortemente com as regiões do sulco maior da dupla hélice do DNA, enquanto nanopartículas de ouro de maior ou menor tamanho tem citotoxicidade reduzida (SCHMID, 2008).

Adicionalmente, os NMs tendem a se estabilizar cineticamente e permanecer por mais tempo no organismo, aumentando o tempo de exposição (BLANCO et al., 2015).

Portanto, grande parte dos estudos em nanotoxicologia incluem análises dos efeitos de tempo, dose, morfologia, composição, agregação dos NMs nos sistemas biológicos a fim de determinar os limites de segurança para o uso de um determinado material na nanoescala (GOYAL & BASNIWAL, 2017; SAHU & HAYES, 2017; JEEVANANDAM et al., 2018) .

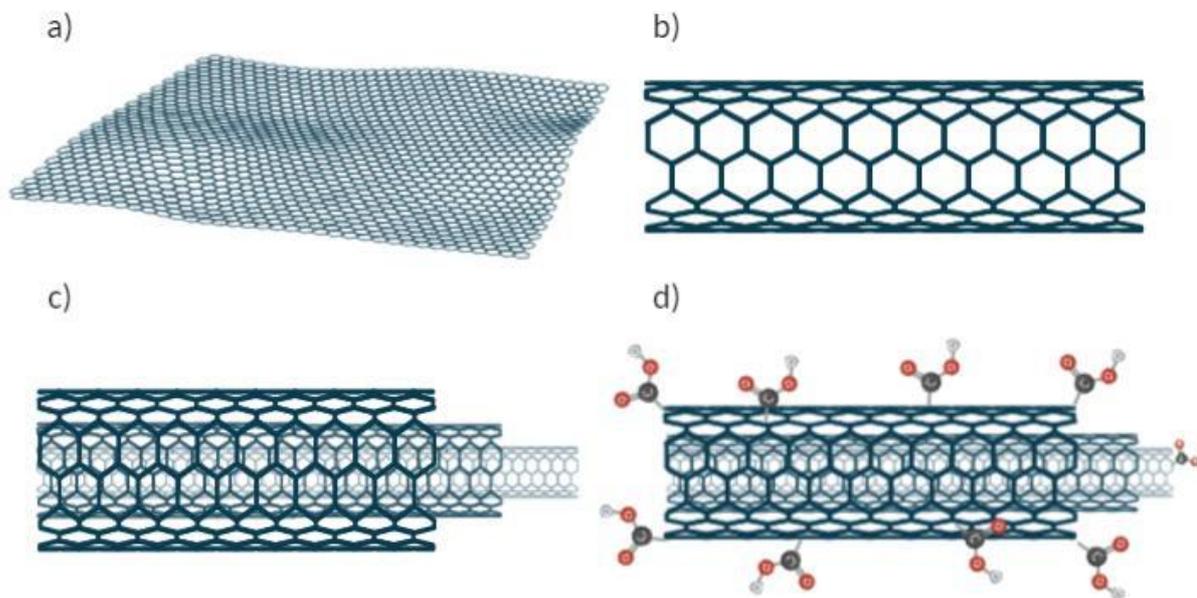
Segundo estudos que investigam a nanotoxicidade de NTCs, altas doses desses NMs funcionalizados (50 e 100 µg/ml) induziram uma citotoxicidade significativa em células-tronco humana de origem adiposa (ESFANDIARY et al., 2014). Também já foi observado por Bottini et al. (2006) que MWCNT-COOH induziram a morte de 50% de linfócitos T, de origem humana, após 24 h de exposição. Outro grupo de pesquisadores relatou que a citotoxicidade observada em queratinócitos está associada aos altos níveis de carboxilação de MWCNT, além de causar irritação epidérmica e inflamação cutânea, mesmo em baixas concentrações (PALMER et al, 2019). Células de carcinoma mamário de rato também apresentaram toxicidade em resposta a MWCNT, sendo esta resposta ainda maior em SWCNT (KAVOSI et al., 2018). Por outro lado, Albini et al. (2010) relataram baixa toxicidade de SWCNTs puros ou funcionalizados em células endoteliais humanas. Ainda, alguns trabalhos não observaram citotoxicidade de SWCNTs em cardiomiócitos de ratos (GARIBALDI et al., 2005) e células de linhagem HeLa, de tumor cervical humano (YEHIA et al., 2007). Quando há divergências na resposta toxicológica induzida por NMs, entende-se que está relacionada às diferenças entre os sistemas biológicos, composição, tamanho, morfologia e impurezas provenientes da síntese. Adicionalmente, a funcionalização pode tornar SWCNTs suscetíveis à degradação por enzimas oxidativas e levando à redução de respostas inflamatórias de neutrófilos (KAGAN et al., 2010), o que abre novas possibilidades de desenvolvimento deste tipo de NM de forma mais biocompatível.

Assim, observa-se que a toxicidade de NMs está associada a múltiplos fatores, sendo altamente variável e dependente também das condições de exposição e características físico-química deles. Logo, os estudos de toxicologia relacionados à nanotecnologia e, envolvendo a interação de NMs com modelos de sistemas biológicos, são essenciais para evitar conflitos de informação, extrapolação de dados e conclusões equivocadas em pesquisas.

2.3 NANOTUBOS DE CARBONO

NTCs são uma forma alotrópica do carbono, ou seja, uma substância diferente devido ao arranjo dos átomos de carbono. Outro exemplo de alótropo do carbono é o grafeno (Figura 1A). Este é formado por átomos de carbono que se ligam a outros três formando uma folha de espessura atômica. Esta folha, se estruturada como um cilindro, forma um NTC do tipo parede simples (single-walled carbon nanotube-SWCNT) (Figura 1B). Existem ainda os nanotubos formados por mais de uma folha concêntrica de grafeno, denominados de NTCs de paredes múltiplas (multi-walled carbon nanotube-MWCNT) (Figura 1C). O diâmetro do NTC pode variar de 4 nm a 30 nm, em média, enquanto seu comprimento pode chegar a escala dos micrômetros (IJIMA, 1991; MARTIN & KOHLI, 2003; PRASEK et al., 2011).

Figura 1. Ilustração de estruturas alotrópicas do Carbono: a) folha de grafeno e Nanotubos de Carbono dos tipos b) Single-wall carbon nanotube, c) Multi-wall carbon nanotube e d) Multi-wall carbon nanotube carboxilado, criado no BioRender (2019), renderizador online de ilustrações científicas.



Fonte: ELABORADO PELO AUTOR, 2020.

A princípio, os NTCs foram descritos em 1952 por Radush-Kevich e Lukianovich (Radush-Kevich e Lukianovich, 1952), em 1976, por Oberlin et al. (OBERLIN et al., 1976) e, posteriormente, estes NMs foram reportados por Iijima em 1991. Na época, a síntese foi realizada pelo método de descarga por arco elétrico (IIJIMA, 1991). Contudo, o método de síntese mais utilizado é o de deposição de vapor químico catalítico, que consiste na decomposição térmica de hidrocarbonetos como o metano e o etileno, na presença de um catalisador metálico como o ferro, cobalto ou níquel. Após a decomposição em alta temperatura (900°C), os átomos livres de carbono vão se depositando, em alta pressão, em forma de tubo junto aos catalisadores (PRASEK et al., 2011). Além disso, outros métodos de síntese como eletrólise e ablação a laser foram reportados (PRASEK et al., 2011).

Desde o início da década de 90, os NTCs vem sendo amplamente utilizados em diversas aplicabilidades devido às suas propriedades consideradas únicas: alta condutividade elétrica e térmica, elevada resistência mecânica, grande superfície de contato, peso ultraleve, e entre outras (GHASEMPOUR & NAREI, 2018). Essas propriedades são pensadas de acordo com a sua finalidade e são determinadas pela estrutura do NTC. Portanto, o número de paredes, diâmetro, comprimento, ângulo quiral para enrolar a folha de grafeno são levados em consideração (PRASEK et al., 2011).

As possibilidades de aplicação deste NM na área biomédica incluem o seu uso como vetor para transfeção de células de mamíferos (MUNK et al., 2016; MUNK et al., 2017), e humanas (GOLSHADI et al., 2016); como antibiótico de aplicação local em bioconjugados com prata devido as suas propriedades antimicrobianas (CHAUDHARI et al., 2016); como indutor de resposta imune específica contra doenças infecciosas (GOTTARDI & DOURADINHA, 2013; VERSIANI et al., 2017), cânceres (GOTTARDI & DOURADINHA, 2013) e terapia fototérmica para tumores (CHEN et al., 2019).

NTCs são também promissores para se aplicar na regeneração tecidual e engenharia de tecidos por apresentar condutividade elétrica, boas propriedades mecânicas e grande área de superfície. Jayaram e colaboradores (JAYARAM et al., 2019) sintetizaram *scaffolds* híbridos de nanocompósitos constituídos de um polímero condutor e MWCNTs, resultando em um suporte resistente, condutor de elétrons e de alta

porosidade para construção de tecidos. Também já foi relatado a produção de um gel eletrofisiológico contendo SWCNTs amino-funcionalizados que apresentou efeitos benéficos na diferenciação osteogênica, se mostrando promissor para o tratamento local de regeneração óssea (QUIAN et al., 2019), além de já ter sido descrito que NMs a base de carbono não foram citotóxicos pra osteoblastos (EIVAZZADEH-KEIHAN et al., 2019). A atividade antibacteriana deste NM também o coloca como ótimo candidato para fins de regeneração óssea (EIVAZZADEH-KEIHAN et al., 2019).

Contudo, há limitações para a aplicabilidade de NTCs na biomedicina devido à sua alta hidrofobicidade, fazendo com que ocorra formação de agregados, dificultando a dispersão e controle do tamanho e, impurezas provenientes da síntese, que podem prejudicar a biocompatibilidade deste NM. Na tentativa de contornar estas questões, a funcionalização dos NMs vem sendo explorada. Nesse sentido, a carboxilação para modificar a superfície dos NTCs (Figura 1D) tem sido amplamente utilizada (BAI et al., 2016; PÉREZ-LUNA et al., 2018).

2.4 MODELO EXPERIMENTAL: CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco (CTs) são aquelas indiferenciadas e apresentam capacidade de diferenciação em vários tipos celulares funcionais. Além disso, tem divisão celular assimétrica e capacidade de autorrenovação, ou seja, reabastecer o *pool* de CTs, passando por vários ciclos celulares, se dividindo e originando uma parcela de células indiferenciadas e, outra parte, de células especializadas (WEISSMAN, 2000; NOMBELA-ARRIETA et al., 2011; MIRZAEI et al., 2017). Por isso apresentam grande aplicabilidade como modelo experimental *in vitro* (DRUBIN & HYMAN, 2017). A capacidade de diferenciação pode ser totipotente, pluripotente e multipotente. Após a fecundação do espermatozoide e óvulo, a célula formada, o zigoto, apresenta potencial de originar todas as células de um organismo, incluindo estruturas extraembrionárias, sendo denominada totipotente. A medida que o zigoto sofre divisões celulares, esse potencial diminui. No estágio de blástula as células apresentam potencial pluripotente, com capacidade de originar muitas células e tecidos do nosso organismo. Já no indivíduo adulto, as células apresentam um potencial de diferenciação mais restrito, originando poucos tipos

celulares, sendo denominadas multipotentes (JOPLING et al., 2011). Ambas as capacidades, diferenciação e autorrenovação celular, vão se perdendo ao longo do tempo entre a totipotência até atingir a maturidade celular (SINGH et al., 2016). Estes são os critérios para classificá-las e os pilares para que este tipo celular consiga manter e desenvolver tecidos (NOMBELA-ARRIETA et al., 2011).

CTs podem ser de origem embrionária, somáticas e induzidas. As CTs embrionárias são aquelas presente no embrião (embrioblasto) e apresentam pluripotência (capacidade de originar qualquer tipo de célula embrionária) (JOPLING et al., 2011; SINGH et al., 2016). As CTs somáticas estão presentes em adultos, residem, geralmente, regiões teciduais específicas, são encarregadas, principalmente, da renovação e regeneração destes tecidos, e são principalmente multipotentes (JOPLING et al., 2011). CTs somáticas podem ter origem no endoderma (CTs do epitélio pulmonar, do trato gastrointestinal, hepática, mamária e da glândula prostática, ovariana e testicular), no mesoderma (CTs hematopoiética, mesenquimal, multipotente progenitora adulta, cardíaca, células satélite do músculo, somática fetal) e no ectoderma (CTs neural, epitelial e ocular) (HUI et al., 2011). Por outro lado, CTs induzidas são provenientes de células somáticas reprogramadas geneticamente para que voltem a expressar o fenótipo de células estaminais, como a pluripotência e, por isso, são denominadas células-tronco pluripotentes induzidas. CTs hematopoiéticas e CT mesenquimais (CTMs) são as mais estudadas e bem caracterizadas (MIRZAEI et al., 2017). Estas primeiras são residentes da medula óssea e formam todas as células sanguíneas (monócitos, neutrófilos, linfócitos, células dendríticas, células *natural killer*, macrófagos). Enquanto CTMs formarão tecido ósseo (osteoblastos), cartilaginoso (condrócitos), adiposo (adipócitos) e conjuntivo estromal (células reticulares) e podem ser encontradas também na medula óssea, cordão umbilical, fluido amniótico e polpa dentária (NOMBELA-ARRIETA et al., 2011). Portanto, CTMs podem ser definidas como células primárias, estromais não-hematopoiéticas, capazes de se diferenciar e contribuir na regeneração de tecidos mesenquimais (CHAMBERLAIN et al., 2007). Além disso, segundo a Sociedade Internacional para Pesquisas com Células-tronco, alguns itens precisam ser considerados para se afirmar se a célula é tronco: uma única célula é capaz de formar colônia; as células são aderentes ao plástico, tendo morfologia típica semelhante ao fibroblasto, as células tem a capacidade de se diferenciar em tipos principais como

osteoblasto, condrócito e adipócito, apresentam perfil imunofenotípico positivo para os marcadores de superfície OCT4, Nanog, Nestin, CD105, CD31, CD34; e são positivas para expressão de genes marcadores OCT4, Nanog, Nestin, CD105 (HORWITZ et al., 2005; LIU et al., 2009).

Ademais, CTMs, assim como outras CTs multipotentes, são fenotipicamente estáveis (LIAO & TSE, 2013; MIRZAEI et al, 2017), capazes de secretar fatores de crescimento e proteínas anti-inflamatórias, desempenhando papéis imunomodulatórios e anti-inflamatórios (AGGARWAL & PITTENGER, 2005). Estas propriedades permitem potenciais aplicações em terapia celular, transplantação e engenharia tecidual (LIAO & TSE, 2013; MIRZAEI et al, 2017). Por exemplo, Amaral et al. (2019) relataram o potencial de um *scaffold* 3D composto de nanopartículas de titanato de bário e gel de alginato para induzir diferenciação osteogênica em CTMs humanas. Nesse mesmo sentido, Quian et al. (2019) relataram melhora na organização e diferenciação osteogênica de CTMs de origem adiposa através de um gel eletrofisiológico contendo nanofibras e NTCs. Há ainda trabalhos explorando aplicações de CTMs na engenharia de tecido cartilaginoso (FUENTES-MERA et al.,2017) e outros tipos teciduais (GAZIT et al., 2019).

No contexto de modelos de estudos de toxicidade, as CTM cultivadas *in vitro* são modelos interessantes, uma vez que se tornam uma alternativa aos testes *in vivo* possibilitando uma redução do uso de animais de experimentação. Abud et al. (2019) demonstraram que CTM humanas provenientes de tecido adiposo podem ser utilizadas em ensaios de predição de toxicidade baseada na inibição da adipogênese. Adicionalmente, as CTMs são uma alternativa com maior relevância para a saúde humana por fornecer diferentes backgrounds genéticos para testes de novos NMs e nanoprodutos (HANDRAL et al., 2015).

2.5 ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE NANOMATERIAIS

2.5.1 ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Os agentes citotóxicos têm diferentes mecanismos de citotoxicidade levando a danos celulares como destruição da membrana citoplasmática, alteração da atividade mitocondrial e de enzimas ativas, além de levar a morte celular. Assim, os ensaios de citotoxicidade precisam ser baseados em diferentes funções celulares e, nesse contexto, destacam-se a avaliação da morfologia celular por microscopia de luz, o teste de MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]}, o ensaio da enzima Superóxido Dismutase (SOD) e avaliação da viabilidade celular por citometria de fluxo.

2.5.1.1 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA CELULAR POR MICROSCOPIA DE LUZ

A microscopia de luz é uma técnica simples e direta utilizada para visualizar a cultura de células *in vitro* e avaliar a morfologia celular. As condições de cultura estão diretamente relacionadas com a plasticidade da forma da célula pois podem desencadear respostas diferentes (FRESHNEY, 2015). Portanto, observações das culturas com o objetivo de comparar as células no mesmo estágio de crescimento e densidade celular devem ser considerados (FRESHNEY, 2015). Avaliações comparativas entre controle e tratamentos podem contribuir para as análises de toxicidade como um indicador de citotoxicidade, uma vez que alterações na constituição do meio e agentes citotóxicos podem afetar a morfologia celular (DUAN et al.,2013; CABALLERO-DÍAZ & CASES, 2016).

2.5.1.2 ENSAIO DE REDUÇÃO DO CORANTE METIL TIAZOL TETRAZÓLIO

O ensaio de Metil Tiazol Tetrazólio (MTT) é amplamente utilizado para conhecer os efeitos de NMs na viabilidade e atividade mitocondrial de diferentes tipos celulares (*Organisation for Economic Co-operation and Development*, TGs 439 e 492) e é considerado como padrão para ensaios de citotoxicidade por ser um teste sensível

(TONDER et al., 2015). Sais de tetrazólio são lipofílicos e apresentam carga líquida positiva, o que facilita que sejam absorvidos pelas células vivas (BERRIDGE et al., 2005). Em células metabolicamente viáveis, as desidrogenases mitocondriais clivam o anel de tetrazólio, reduzindo o composto de coloração amarela em um composto de coloração roxo/azul escuro, chamado de formazan {E,Z-1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan}, que são cristais insolúveis em soluções aquosas. Assim sendo, a produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória (RISS, 2004; SAHU et al., 2016).

2.5.1.3 ENSAIO DA SUPERÓXIDO DISMUTASE

O estresse oxidativo nos tecidos resultantes da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) é um dos mecanismos de nanotoxicidade dos NMs (FU et al., 2014). As EROs são subprodutos naturais do metabolismo celular e consistem em átomos ou moléculas que possuem elétrons não pareados na última camada de valência, tornando-as mais reativas por permitir aceitar ou transferir elétrons facilmente (AFONSO et al., 2017).

Nas mitocôndrias celulares, moléculas de adenosina trifosfato (ATP) são sintetizadas pela redução do oxigênio molecular em água em uma sequência de reações. No entanto, uma porção desse oxigênio não é reduzida completamente, resultando na formação de EROs como os radicais livres ânion superóxido (FU et. al., 2014). A enzima superóxido dismutase (SOD) neutraliza os ânions superóxido transformando-os em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e oxigênio molecular de modo a prevenir a formação de componentes mais agressivos (FU et. al., 2014; CHE et. al., 2015). O H₂O₂ é posteriormente convertido em água e oxigênio em uma reação catalisada pela catalase e peroxirredoxina (CHE et. al., 2015). Assim, a homeostase celular das EROs é mantida pelo equilíbrio entre a produção de EROs e a atividade do sistema antioxidante. Logo, o excesso de EROs pode oxidar macromoléculas como DNA, proteínas e lipídeos, desencadeando mutações elevadas, danos às organelas celulares e morte celular em circunstâncias mais extremas (CHE et. al., 2015).

2.5.1.4 ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

Teste de viabilidade celular tem alta importância em pesquisas envolvendo cultivo *in vitro* de células e tecidos, principalmente para avaliação de resposta citotóxica a tratamentos ou outros fatores ambientais (KUMMROW et al., 2012).

A citometria de fluxo é um método rápido, sensível e confiável para quantificar células viáveis em uma suspensão celular (KUMMROW et al., 2012). Esta análise pode fornecer parâmetros relevantes, tais como o tamanho celular, relativo ao espalhamento frontal (FSC) da luz do laser incidido; e a complexidade celular, devido à quantidade e densidade dos grânulos das células, relativo ao espalhamento lateral (SSC) da luz incidida (WEAVER, 1998).

A estimativa da viabilidade de uma população de células por citometria de fluxo é baseado no extravasamento de corantes, como o iodeto de propídeo. Neste caso, o iodeto de propídeo, que é permeável à membrana citoplasmática, é expulso do citoplasma de células viáveis. Logo, células mortas permanecem coradas. Este corante tem como característica ser intercalante dos pares de base de DNA e excitável a 488 nm (WEAVER, 1998).

2.6 ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DE GENOTOXICIDADE

2.6.1 ENSAIO DE MICRONÚCLEO

O Teste de micronúcleo detecta pequenos corpos de cromatina no citoplasma de células interfásicas (OECD TG 487, 2016). Estes fragmentos de cromatina extranucleares são circundados por um invólucro nuclear e se originam a partir de frações cromossômicas acêntricas (clastogênicos) ou cromossomos inteiros (aneugênicos) que, durante a anáfase da divisão celular, não conseguiram migrar para os polos. Além disso, após coloração convencional, nota-se que estes fragmentos são morfológicamente semelhantes aos núcleos. Logo, o teste de micronúcleo fornece uma base para investigação *in vitro* de potenciais danos cromossômicos ocasionados por agentes aneugênicos e clastogênicos (KIRSCH-VOLDERS, 1997; HINTZSCHE et. al., 2017).

Este método permite o uso da citocalasina β , um inibidor de polimerização dos filamentos de actina. Assim, ocorre inibição do processo de citocinese durante a divisão celular, resultando em células binucleadas. Além disso, o uso de citocalasina β possibilita a avaliação das frequências relativas de células mononucleadas, binucleadas e multinucleadas na cultura, o que pode ser um método de analisar a proliferação celular e a atividade citotóxica ou citostática de um tratamento (OECD TG 487, 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar os efeitos da exposição *in vitro* de MWCNT funcionalizados com grupos carboxila (MWCNT-COOH) em CTMs de origem da polpa dentária humana.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a estabilidade coloidal (diâmetro hidrodinâmico e potencial Zeta) dos MWCNT-COOH dispersos em meio de cultura celular;
- Avaliar a morfologia e estrutura química dos MWCNT-COOH;
- Avaliar a morfologia de CTMs derivadas da polpa dentária humana expostas *in vitro* aos MWCNT-COOH;
- Analisar a atividade mitocondrial de CTMs derivadas da polpa dentária humana cultivadas *in vitro* e expostas aos MWCNT-COOH
- Analisar o metabolismo oxidativo de CTMs derivadas da polpa dentária humana cultivadas *in vitro* e expostas aos MWCNT-COOH;
- Quantificar a influência dos MWCNT-COOH na viabilidade celular de CTMs derivadas da polpa dentária humana cultivadas *in vitro*;
- Avaliar o potencial genotóxico dos MWCNT-COOH em CTMs derivadas da polpa dentária humana cultivadas *in vitro*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

Os meios de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture-F12* (DMEM/F12), antibiótico penicilina-estreptomicina, tripsina 0,25% (p/v) e 0,5 mM de ácido etilenodiaminotetracético (tripsina-EDTA), metil tiazol tetrazólio (MTT), SOD kit 19160 do ensaio para superóxido dismutase (SOD), citocalasina B (cyto B) e iodeto de propídeo (IP) foram adquiridos da Sigma-Aldrich, EUA. Os suplementos do meio de cultura, soro fetal Bovino (SFB) e antibiótico (100 UI/mL de penicilina e 100 µg de estreptomicina mL⁻¹) são provenientes da LGC Biotecnologia, Brasil. O tampão fosfato salino (*phosphate-buffered saline*, PBS) 10X foi adquirido da Gibco Laboratories, Reino Unido.

4.2 MWCNT-COOH

Os MWCNT-COOHs (referência ROT 26271308) foram obtidos em colaboração com o Laboratório de Nanomateriais, localizado no Departamento de Física da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A síntese foi realizada pela técnica de deposição química da fase de vapor, utilizando Al₂O₃-Co-Fe como catalizador do processo. Os MWCNT-COOHs contém pureza >93%, presença de outras estruturas <2% e contaminantes provenientes do processo de síntese <5%.

4.3 DISPERSÃO DOS MWCNT-COOH

Os MWCNT-COOHs foram adicionados a uma concentração final de 1000 µg/ml em meio de cultura DMEM/F12 suplementado com 10% (v/v) de SFB e 1% (v/v) de antibiótico penicilina-estreptomicina. A seguir, a dispersão foi realizada com um sonicador UP200S (Hielscher, Teltow, Alemanha) em amplitude 75 e ciclo de 0,5 por aproximadamente 1 minuto, com o recipiente inserido no gelo.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS MWCNT-COOHs

4.4.1 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO

Os espectros de absorção na região do espectro infravermelho foram obtidos por espectroscopia de Infravermelho Transformada de Fourier (FTIR) em um espectrofotômetro Bomem FT IR MB-102 (Bomem, Canadá), no Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora. Estes foram realizados na região de 3000cm^{-1} a 500cm^{-1} utilizando pastilhas de KBr previamente dessecado a 500°C .

4.4.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN

Espectros Raman foram obtidos no Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora em um instrumento Bruker Senterra (Bruker, EUA), utilizando laser $632,8\text{ nm}$ com potência de 10 mV sobre a amostra de MWCNT-COOH seca sobre uma lâmina, durante 15 segundos de exposição. Foram feitas 20 aquisições, com resolução espectral de $3\text{-}5\text{ cm}^{-1}$, em objetiva de $50\times$.

4.4.3 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO

As análises do espalhamento de luz dinâmico e motilidade eletroforética para caracterização do diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão (IPD) e potencial Zeta (PZ) das suspensões coloidais contendo MWCNT-COOHs, foram obtidas em um aparelho Malvern 3000 ZetaSizer NanoZS (Malvern Instruments, Reino Unido), no Laboratório de Nanotecnologia para Saúde e Produção Animal da Embrapa Gado de Leite. A fim de comparação, os dados foram obtidos em suspensões compostas de água deionizada (pH $7,1$) e MWCNT-COOHs, meio de cultura DMEM/F12 e MWCNT-COOHs, meio de cultura DMEM/F12 suplementado com 10% (v/v) de SFB e MWCNT-COOHs, com uma réplica de cada tratamento (0 ; $0,1$; 1 ; 10 ; 50 ; $100\text{ }\mu\text{g/mL}$) para cada tipo de

suspensão. As concentrações escolhidas para os tratamentos utilizados neste trabalho foram definidas de acordo com observações da literatura de exposições realísticas.

4.4.4 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

As imagens de AFM foram obtidas por aparelho Nanosurf EasyScan 2 (Nanosurf Instruments, Suíça), via modo intermitente, em colaboração com o Laboratório de Nanotecnologia aplicada a Saúde e Produção Animal da Embrapa Gado de Leite. O diâmetro aproximado dos MWCNT-COOH foi medido manualmente pelo software ImageJ (Wayne Rasband) a partir da imagem gerada pela microscopia.

4.4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Imagens de MET foram obtidas em colaboração com o Centro de Microscopia da UFMG utilizando um microscópio Tecnai G2–20 da FEI Company (EUA), à 220 kV de voltagem e *spot size de 3*. As grades de cobre utilizadas para a deposição das amostras foram Holey Carbon. Para o preparo da amostra, uma gota de uma suspensão mãe foi diluída em 5 mL de água deionizada. A nova suspensão foi submetida a ultrassom em um banho por 5 minutos e posteriormente uma gota da nova suspensão foi pingada sobre a grade de cobre. Em seguida, a grade contendo a amostra foi levada para estufa e seca à 70 °C por 12 h. O diâmetro aproximado dos MWCNT-COOH foi medido manualmente pelo software ImageJ (Wayne Rasband) a partir da imagem gerada pela microscopia.

4.5 CULTIVO DE CÉLULAS

Células-tronco (primárias) mesenquimais (CTM) isoladas de polpa dentária humana foram obtidas do Biobanco de Genética Humana e Terapia Celular (GENETEC) da UFJF, com aprovação do Comitê Nacional de ética em Pesquisa (022/2015). A caracterização prévia foi realizada por citometria de fluxo, e estas células foram positivas para os marcadores embrionários OCT4 e Nanog e marcadores de células-tronco mesenquimais Nestin e CD105, enquanto foram negativas para marcadores de células-

tronco hematopoiéticas CD31 e CD34 (FERREIRA et al., 2019; ZANETTE, 2016). As CTMs foram cultivadas em meio de cultura DMEM/F12 suplementado com 10% (v/v) de SFB e 1% (v/v) de antibiótico penicilina-estreptomicina. A seguir, as células foram transferidas para uma incubadora Thermo Scientific Forma Series 3 Water Jacketed CO₂ Incubator (Thermo Scientific, EUA) com atmosfera umidificada, contendo 5% de CO₂ a 37°C. Para plaquear devidamente a densidade celular necessária para cada tipo de ensaio, o meio de cultura foi retirado e reservado, as células foram lavadas com 500µl de PBS 1x (pH 7,2), e tratadas com 300µl de tripsina + EDTA. O meio reservado foi repostado para inativar a ação da tripsina.

4.6 EXPOSIÇÃO CELULAR AOS MWCNT-COOHs PARA ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

As CTM foram expostas a diferentes concentrações: 0 µg/mL (controle); 0,1 µg/mL; 1 µg/mL; 10 µg/mL; 50 µg/mL e 100 µg/mL de MWCNT-COOHs dispersos em DMEM/F12 suplementado com 10% (v/v) de SFB e 1% (v/v) de antibiótico penicilina-estreptomicina.

4.7 ANÁLISE DE CRESCIMENTO E MORFOLOGIA CELULAR

Após as CTM serem plaqueadas em placas de 6 poços (aproximadamente 3×10^3 células por poço), estas foram expostas, no dia seguinte, aos tratamentos de 0 µg/mL; 0,1 µg/mL; 1 µg/mL; 10 µg/mL; 50 µg/mL e 100 µg/mL de MWCNT-COOHs em DMEM/F12 suplementado pelos tempos de 24, 48 e 72h. Em seguida, as células foram analisadas e fotografadas por microscopia de luz invertida no microscópio Zeiss PrimoVert (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). O perímetro celular foi medido manualmente pelo software ImageJ (Wayne Rasband), gerando automaticamente a área celular. Cada tratamento obteve um N amostral variando entre 80 e 100 células, medidas de, no mínimo, cinco campos diferentes.

4.8 ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR

A análise de viabilidade celular foi feita pela marcação com o Iodeto de Propídeo, uma sonda fluorescente intercalante de DNA, por citometria de fluxo. Para tanto, as CTMs foram plaqueadas em placas de 6 poços (aproximadamente 3×10^4 células/poço) Após, passaram por exposição aos MWCNT-COOHs nas concentrações de 0 $\mu\text{g/mL}$; 0,1 $\mu\text{g/mL}$; 1 $\mu\text{g/mL}$; 10 $\mu\text{g/mL}$; 50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ pelos períodos de 24, 48 e 72 h. O experimento foi realizado em duplicata, com o mínimo de duas repetições por tratamento. As células CTMs foram lavadas com PBS 1x e tripsinizadas (tripsina-EDTA) por aproximadamente 3 minutos para se destacarem do fundo da placa. Então, as células foram coletadas por centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos. Por fim, foi adicionado 475 μL de PBS 1x e, no momento das análises em um citômetro CytoFLEX S (Beckman Coulter, EUA), mais 25 μL de Iodeto de Propídeo (50 $\mu\text{g/mL}$).

4.9 ANÁLISE DE ATIVIDADE MITOCONDRIAL

O ensaio MTT, de redução do corante metil tiazol tetrazólio, foi realizado para análise da atividade mitocondrial, assim como proposto em *guidelines* para testes da OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development, TGs 439 e 492). Para este ensaio foi feito o plaqueamento de 3×10^3 células/poço, em placas de 96 poços. Após 24 h as células foram expostas aos MWCNT-COOHs nas concentrações de 0 $\mu\text{g/mL}$; 0,1 $\mu\text{g/mL}$; 1 $\mu\text{g/mL}$; 10 $\mu\text{g/mL}$; 50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ durante 24, 48 e 72 h. Para cada tratamento havia 6 repetições e o ensaio foi realizado em duplicata.

Após a exposição, o meio foi retirado e as células incubadas com meio de cultivo contendo MTT (solução estoque 5 mg/mL) à 10% (v/v), durante 4 h. A seguir, esse meio foi retirado para adição de Isopropanol-ácido (0,04 M HCl) a fim de diluir o formazan formado para a leitura de densidade óptica no espectrofotômetro (Varioskan Flash Multimode Reader, Thermo Fisher Scientific, EUA) à 570 nm. Os valores de absorbância também foram corrigidos por poço contendo apenas MWCNT-COOHs.

4.10 ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO

O ensaio de SOD (superóxido dismutase), para análise do estresse oxidativo nas células, foi realizado plaqueando-se uma densidade de 5×10^3 células por poço, em placas de 96 poços e após 24h foram expostas aos MWCNT-COOHs nas concentrações de 0 $\mu\text{g/mL}$; 0,1 $\mu\text{g/mL}$; 1 $\mu\text{g/mL}$; 10 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$, sendo 3 repetições por grupo e o ensaio em duplicata. Após o período de 24, 48 e 72h de exposição foi realizado o ensaio de SOD Kit 19160 (Sigma-Aldrich, EUA), conforme o protocolo para análise do SOD intracelular disponibilizado pela Sigma-Aldrich.

4.11 ANÁLISE DE GENOTOXIDADE

A fim de avaliar o potencial genotóxico dos MWCNT-COOHs foi realizado o ensaio de micronúcleo de acordo com o protocolo adaptado da OECD (TG 487) para testes químicos *in vitro*, padronizado para as NPs, em células de mamíferos.

As células-tronco foram cultivadas em meios de cultura DMEM-F12, com 10% (v/v) de SFB e 1% (v/v) de antibiótico em placas de 6 poços, em uma densidade de 3×10^4 células por poço, em estufa umidificada, 5% de CO_2 a 37°C . Após 24h de semente, as células foram expostas aos MWCNT-COOHs nas concentrações de 0 $\mu\text{g/mL}$; 0,1 $\mu\text{g/mL}$; 1 $\mu\text{g/mL}$; 10 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$, sendo 3 repetições por grupo, pelo período de 24h de exposição. Todos os tratamentos receberam Cyto B (Sigma-Aldrich, EUA) a 3 $\mu\text{g/mL}$ para garantir a formação de células binucleadas, ao impedir a conclusão da citocinese. Além disso, houve o preparo de três controles positivos com células cultivadas na presença de ciclofosfamida (agente clastogênico), Metil Metano Sulfonato (MMS- agente clastogênico) e Colchicina (agente aneugênico).

Após o período de 24 h de exposição (o que configura o tratamento longo, segundo o protocolo da OECD (TG 487)), as células foram fixadas e as lâminas preparadas para posterior observação ao microscópio de luz. Inicialmente, as células cultivadas *in vitro* foram tripsinizadas e centrifugadas a 120g por 5 min. A seguir, o sobrenadante foi descartado e adicionado 300 μL de KCl (0,075 M) e novamente

centrifugado a 1000 rpm durante 5 min e o sobrenadante descartado ao final. Posteriormente, as células foram ressuspensas em 100 µL do fixador Carnoy I (etanol: ácido acético, 3:1 (v/v)), e a seguir o esfregaço foi realizado. Após a secagem das lâminas, as mesmas foram colocadas por 10 seg na solução diafanizadora (45%(v/v) de ácido acético em água destilada), em seguida as lâminas foram coradas com Giemsa (Sigma-Aldrich, 0.4% p/v em Metanol) 5% (v/v) em água deionizada por 10 min.

Durante a análise das lâminas foi contabilizado o número de células binucleadas, mononucleadas e multinucleadas (o total de 500 células por grupo) a fim de obter o índice de Proliferação de Bloqueador de Citocinese (CBPI), o qual estima o número médio de núcleos por célula, indicando se estava ocorrendo a proliferação celular e o Índice de Replicação (RI). O RI indica o número relativo de ciclos celulares por células durante o período de exposição comparadas com o controle e pode ser utilizada para calcular a porcentagem de citostasia (inibição do crescimento celular) (TG 487-OECD, 2014). Enquanto para a determinação da frequência de micronúcleo, foram analisadas 2000 células binucleadas por grupo, distinguindo entre com ou sem micronúcleo. O experimento foi realizado com 3 repetições por tratamento e em duplicata.

4.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados gerados pelas análises de morfologia celular, viabilidade celular, atividade mitocondrial e estresse oxidativo foram submetidos a análises estatísticas utilizando o *software* GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, CA, EUA). Os testes de Análise de Variância *one-way* ANOVA com valores significativos, foram seguidos de *post hoc* Tukey para comparação de médias. Para a análise de micronúcleo foram realizados testes de qui-quadrado. Para todas as análises, valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os resultados foram apresentados como médias \pm erro padrão da média.

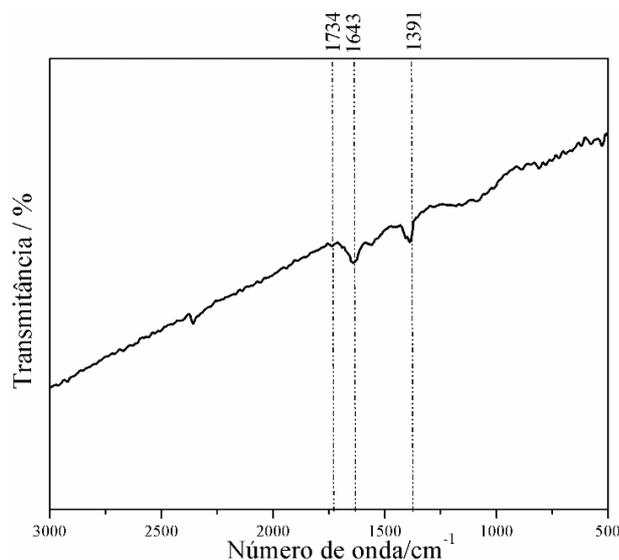
5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS MWCNT-COOHs

5.1.1 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO

A técnica de FTIR foi utilizada para caracterizar os MWCNTs funcionalizados com grupos carboxila (-COOH) e detectar as ligações químicas presentes na estrutura pela vibração dos átomos durante a exposição à radiação infravermelho. A Figura 2, com espectro na região entre 500 e 3000 números de onda/cm⁻¹, mostra o pico em 1734 cm⁻¹, que representa a vibração e elasticidade da ligação C=O referente à funcionalização desse NM (MONTANHEIRO et al., 2014, TAN et al., 2014, MALLAKPOUR et al., 2014).

Figura 2. Espectro na região do Infravermelho obtido para o nanotubo de carbono parede múltipla funcionalizado com carboxila (MWCNT-COOH).

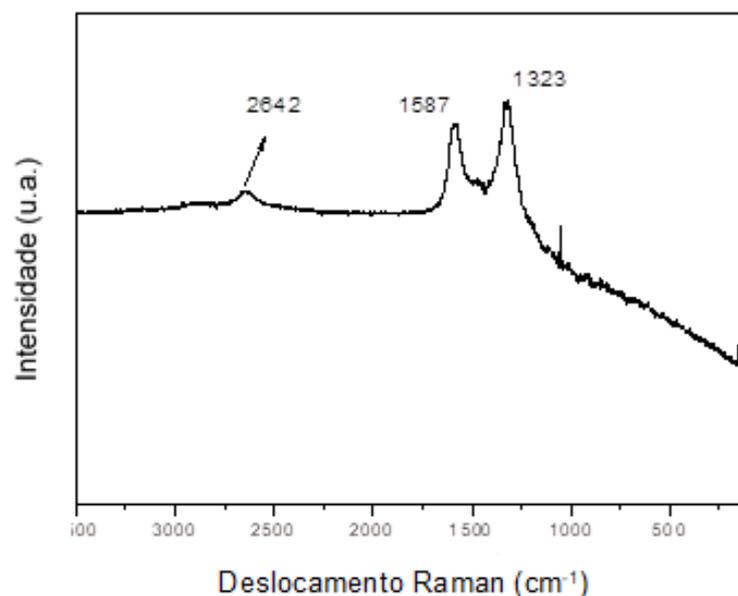


O Pico em 1391 cm⁻¹ corresponde a elasticidade de grupos hidroxila (-OH), também provenientes da carboxilação (MISHRA et al., 2015). O pico visto em 1643 cm⁻¹ é referente às ligações entre carbonos, confirmando a estrutura gráfica observada em NTCs (ZHAO et al, 2013; FATIN et al., 2014).

5.1.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN

A espectroscopia Raman realizada na amostra foi utilizada para caracterizar a composição química dos MWCNT-COOHs. A Figura 3 apresenta a faixa de deslocamento Raman, em cm^{-1} , entre 0 e 3500. Observa-se as bandas características de estruturas gráficas: a banda D, referente a distorções das ligações estruturais em 1323 cm^{-1} ; a banda G, referente as vibrações atômicas dos átomos de carbono uns contra os outros em 1587 cm^{-1} ; e a banda D', em 2642 cm^{-1} (JORIO et al., 2003).

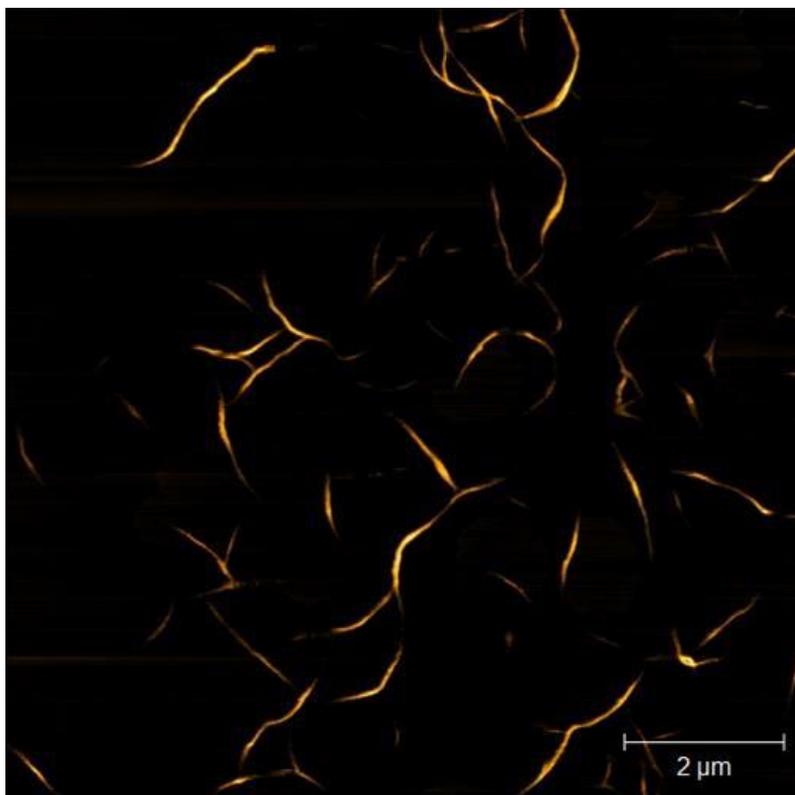
Figura 3. Espectroscopia Raman obtida para nanotubos de carbono funcionalizados com grupos carboxílicos (MWCNT-COOHs). Os picos em 1323 cm^{-1} , 1587 cm^{-1} e 2642 cm^{-1} correspondem as bandas D, G e D' referentes ao MWCNT.



5.1.3 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

A microscopia de força atômica, realizada para confirmação da morfologia dos MWCNT-COOHs (Figura 4), mostrou o formato alongado comum em NTCs e o diâmetro entre 10 e 20 nm.

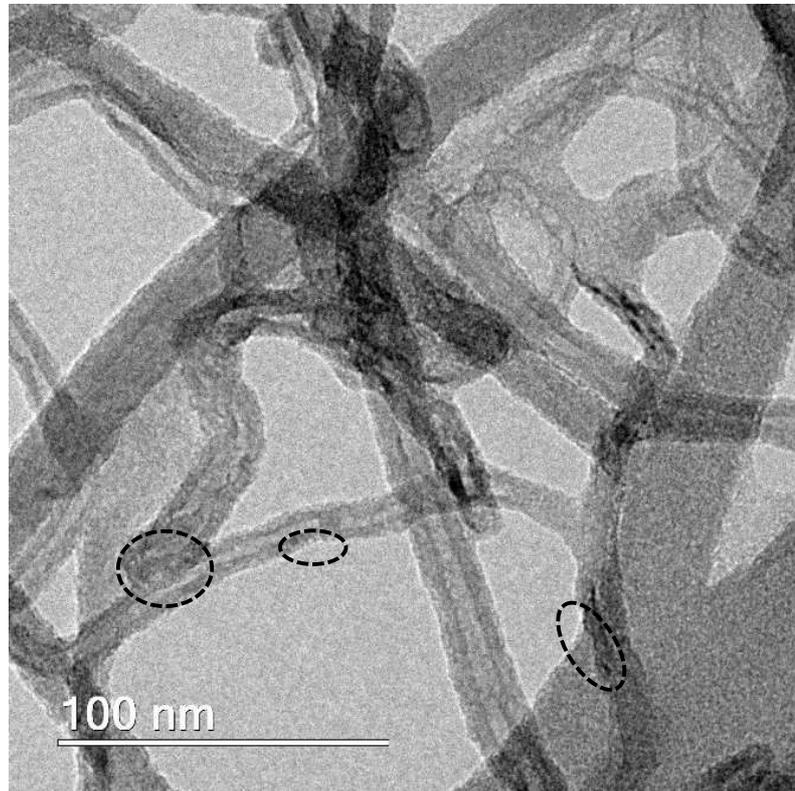
Figura 4. Microscopia de Força atômica de nanotubos de carbono multicamadas funcionalizados com grupos carboxila (MWCNT-COOHs), confirmando o formato alongado deste NM com diâmetro de 10 a 20 nm.



5.1.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

A microscopia eletrônica de transmissão foi realizada para caracterização física do NM e comprovou a estrutura de nanotubos dos MWCNT-COOHs (Figura 5). Além disso, é possível observar que estes apresentam diâmetro médio de 17,7 nm e algumas regiões de inconsistência e que sugerem uma superfície irregular (círculos pretos tracejados).

Figura 5. Microscopia Eletrônica de Transmissão de nanotubos de carbono multicamadas funcionalizados com grupos carboxila (MWCNT-COOHs), confirmando a forma de tubo deste NM. Círculos pretos tracejados apontam regiões irregulares da superfície.



5.1.5 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO

O espalhamento de luz dinâmico foi realizado para caracterização do MWCNT-COOHs a fim de obter o diâmetro hidrodinâmico e PZ, nas concentrações de 0,1 µg/mL; 1 µg/mL; 10 µg/mL; 50 µg/mL e 100 µg/mL. Os resultados obtidos sobre o diâmetro hidrodinâmico (Tabela 1) dos MWCNT-COOHs mostram valores elevados para todas as concentrações quando a dispersão é feita em água deionizada (valores entre 1.575,3 nm e 5.589,0 nm) e DMEM/F12 (valores entre 1.198,3 nm e 3.752,7 nm). Contudo, o diâmetro hidrodinâmico decai significativamente quando se acrescenta SFB à suspensão (valores entre 62,7 nm e 211,4 nm), principalmente nas concentrações menores (0,1 µg/mL = 86,7

, 1 µg/mL = 90,4 e 10 µg/mL = 62,7). Assim, observamos um diâmetro hidrodinâmico crescente em função da concentração.

Tabela 1. Diâmetro hidrodinâmico (nm), Índice de Polidispersão (IPD) e Potencial Zeta (mV) obtidos por Espalhamento de Luz Dinâmico.

Meio de Dispersão	Tratamentos	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	IPD	Potencial Zeta (mV)
Água Deionizada	0,1 µg/mL	1.575,3 ± 957,0	0,9 ± 0,1	0,2 ± 0,9
	1 µg/mL	2.989,3 ± 309,1	0,5 ± 0,1	-14,6 ± 2,0
	10 µg/mL	2.562,0 ± 477,7	0,9 ± 0,2	-12,6 ± 0,8
	50 µg/mL	5.589,0 ± 1.551,4	0,5 ± 0,4	-21,0 ± 1,0
	100 µg/mL	4.125,0 ± 859,3	0,5 ± 0,3	-18,1 ± 0,8
DMEM/F12	0,1 µg/mL	1.198,3 ± 257,8	0,6 ± 0,2	-6,0 ± 0,2
	1 µg/mL	1.209,7 ± 204,6	0,7 ± 0,1	-12,2 ± 0,4
	10 µg/mL	2.579,3 ± 342,3	0,4 ± 0,1	-9,6 ± 0,7
	50 µg/mL	3.752,7 ± 395,7	1,0 ± 0,0	-14,8 ± 0,5
	100 µg/mL	2.776,3 ± 310,5	0,2 ± 0,1	-27,8 ± 1,0
DMEM/F12 + SFB	0,1 µg/mL	86,7 ± 36,0	0,3 ± 0,2	-9,3 ± 0,2
	1 µg/mL	90,4 ± 34,5	0,4 ± 0,2	-9,8 ± 1,1
	10 µg/mL	62,7 ± 22,4	0,6 ± 0,2	-11,5 ± 0,9
	50 µg/mL	161,2 ± 54,7	0,8 ± 0,2	-13,1 ± 0,7
	100 µg/mL	211,4 ± 15,7	0,9 ± 0,0	-13,4 ± 0,6

Os valores de IPD (grau relativo de espalhamento em relação à média do diâmetro hidrodinâmico) (Tabela 1) variaram entre 0,2 e 1,0, com a maioria mantendo um nível intermediário de polidispersão ($0,3 \geq \text{IPD} \leq 0,6$). Os tratamentos de 0,1 µg/mL e 10 µg/mL em água deionizada, 1 µg/mL e 50 µg/mL em DMEM/F12, 50 µg/mL e 100 µg/mL em DMEM/F12+SFB demonstraram uma distribuição heterogênea ($\text{IPD} \geq 0,7$). O Tratamento de 100 µg/mL em DMEM/F12 e o de 0,1 µg/mL em DMEM/F12+SFB apresentaram uma população de diâmetro hidrodinâmico monodispersa ($\geq 0,3$) (DANAEL et al., 2018), com característica homogênea (IPD de 0,2 e 0,3, respectivamente).

Os resultados do PZ (Tabela 1) em pH 7,1 demonstram, na maioria, valores negativos. Dentre os grupos avaliados, o que se mostrou mais estável foi o de 100 µg/mL

suspensão em DMEM/F12 (PZ = -27.87 mV). Além disso, observamos uma queda no valor de PZ em função do aumento da concentração de MWCNT-COOH.

5.2 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

5.2.1 ANÁLISE DE CRESCIMENTO E MORFOLOGIA CELULAR

A análise de morfologia celular foi realizada por microscopia de luz. As Figuras 6, 7 e 8, em objetiva de 10X, mostram o crescimento e morfologia de CTMs após exposição aos MWCNT-COOHs. Verificou-se que as células cresceram em monocamada aderente e mantiveram a morfologia típica destes tipos celulares nos tempos de 24h (Figura 6), 48h (Figura 7) e 72h (Figura 8).

Figura 6. Análise de morfologia por microscopia de luz invertida. As imagens feitas em objetiva de 10X mostram CTMs em crescimento em monocamada aderente nas concentrações de (a) 0 $\mu\text{g/mL}$, (b) 0,1 $\mu\text{g/mL}$, (c) 1 $\mu\text{g/mL}$, (d) 10 $\mu\text{g/mL}$, (e) 50 $\mu\text{g/mL}$, (f) 100 $\mu\text{g/mL}$ de MWCNT-COOHs após 24h de exposição. Agregados de MWCNT-COOHs estão apontados por setas.

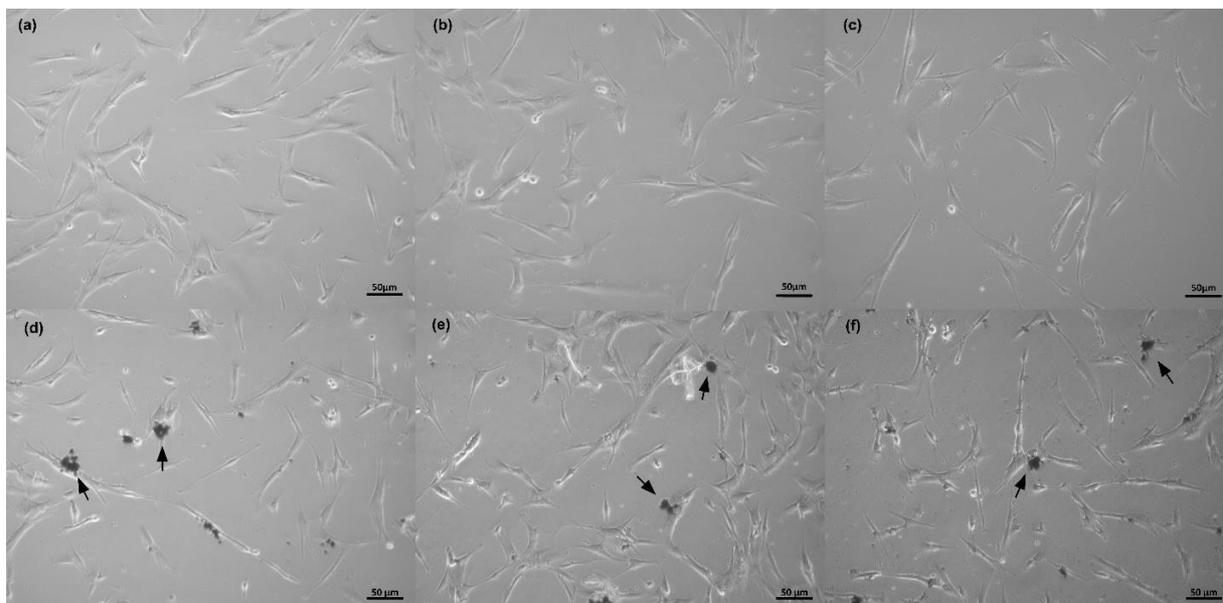


Figura 7. Análise de morfologia por microscopia de luz invertida. As imagens feitas em objetiva de 10X mostram CTMs em crescimento em monocamada aderente nas concentrações de (a) 0 $\mu\text{g/mL}$, (b) 0,1 $\mu\text{g/mL}$, (c) 1 $\mu\text{g/mL}$, (d) 10 $\mu\text{g/mL}$, (e) 50 $\mu\text{g/mL}$, (f) 100 $\mu\text{g/mL}$ de MWCNT-COOHs após 48h de exposição. Agregados de MWCNT-COOHs estão apontados por setas.

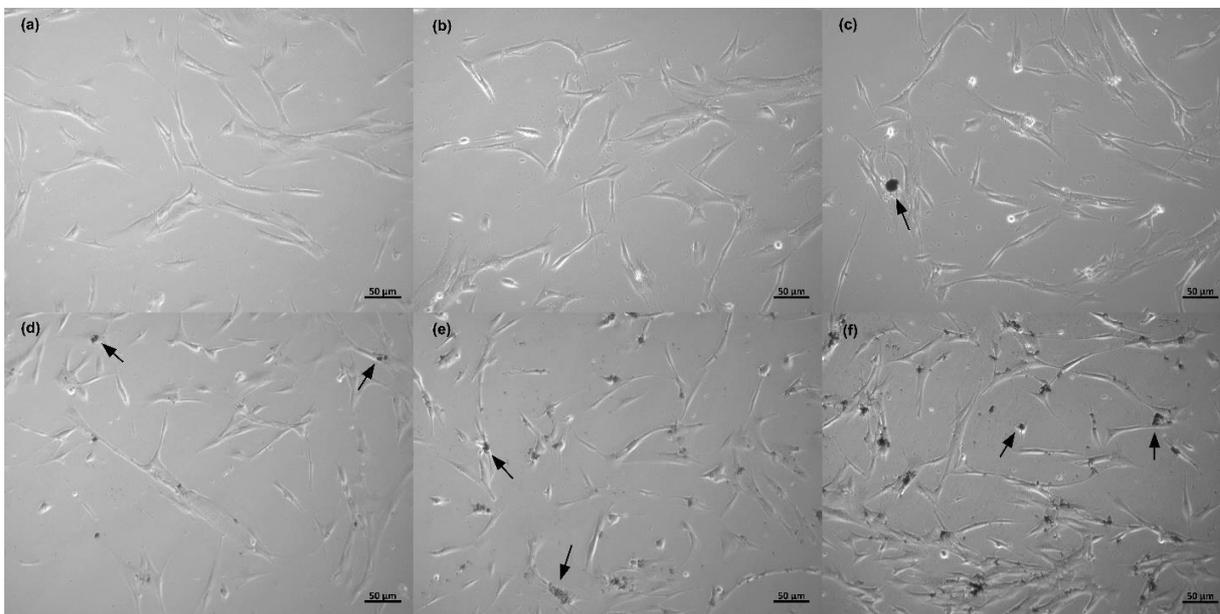
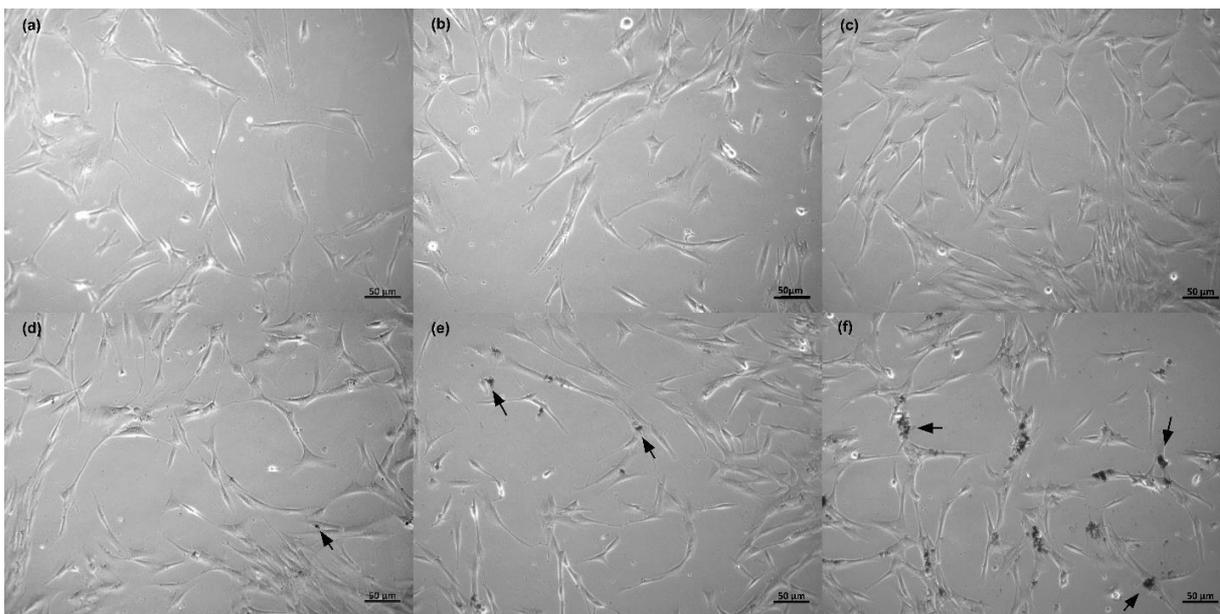
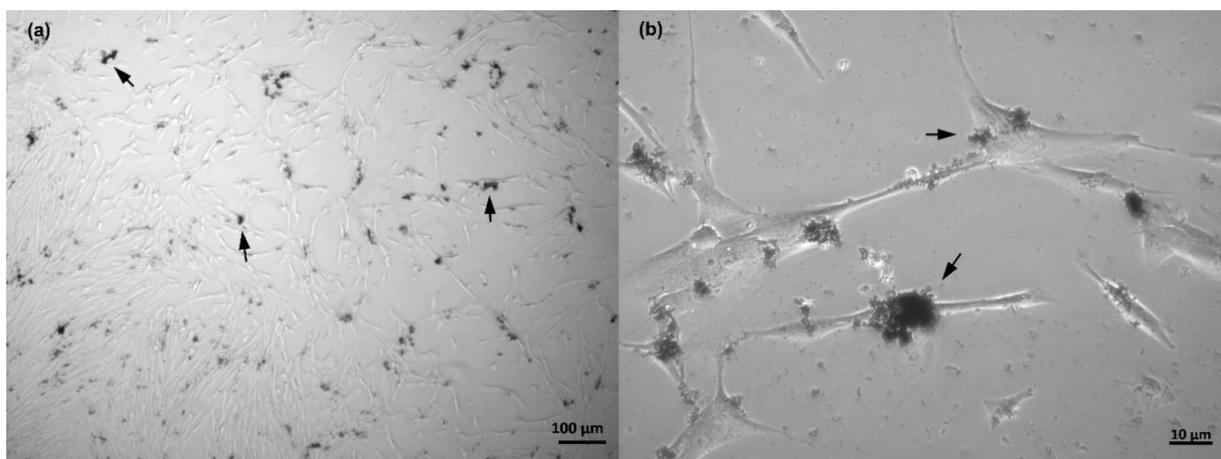


Figura 8. Análise de morfologia por microscopia de luz invertida. As imagens feitas em objetiva de 10X mostram CTMs em crescimento em monocamada aderente nas concentrações de (a) 0 $\mu\text{g/mL}$, (b) 0,1 $\mu\text{g/mL}$, (c) 1 $\mu\text{g/mL}$, (d) 10 $\mu\text{g/mL}$, (e) 50 $\mu\text{g/mL}$, (f) 100 $\mu\text{g/mL}$ de MWCNT-COOHs após 72h de exposição. Agregados de MWCNT-COOHs estão apontados por setas.



Na Figura 9 é possível observar agregados de MWCNT-COOHs. Os agregados mais visíveis e de maior tamanho tendem a estar em contato e a interagir com as CTMs, como apontado por setas na Figura 9B.

Figura 9. Análise de morfologia por microscopia de luz invertida. As imagens feitas em objetiva de (a) 4x e (b) 40x mostram CTMs em crescimento em monocamada aderente e interagindo com agregados (apontados por setas) de MWCNT-COOHs.



Apesar da morfologia típica ter se mantido, foi possível verificar que, nos três tempos, a área celular (μm^2) sofreu uma redução em alguns tratamentos em comparação ao controle (Tabela 2). Nos períodos de 24 e 72h apenas as concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tiveram uma redução da área celular em comparação ao controle ($p < 0,05$). No tempo de 48h os MWCNT-COOHs induziram alteração da área celular em todos os tratamentos, exceto o de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p > 0,05$).

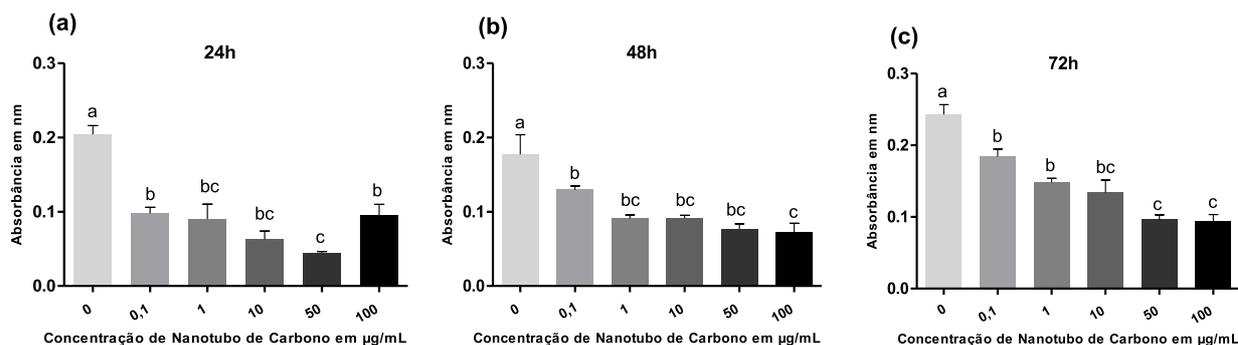
Tabela 2. Médias das áreas celulares em μm^2 em função da dose e tempo de análise de morfologia por microscopia de luz, em relação ao tamanho da área celular. A área celular foi medida manualmente através do programa ImageJ (Wayne Rasband). Médias que não diferem entre si estão representadas pelas mesmas letras.

	24h	48h	72h
0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	621 $\mu\text{m}^2 \pm 37,6$ ^a	638 $\mu\text{m}^2 \pm 30,9$ ^a	556 $\mu\text{m}^2 \pm 27,2$ ^a
0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	560 $\mu\text{m}^2 \pm 27,0$ ^{ab}	513 $\mu\text{m}^2 \pm 26,3$ ^b	537 $\mu\text{m}^2 \pm 30,3$ ^{ab}
1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	564 $\mu\text{m}^2 \pm 27,0$ ^{ab}	561 $\mu\text{m}^2 \pm 27,3$ ^{ab}	482 $\mu\text{m}^2 \pm 19,7$ ^{ab}
10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	512 $\mu\text{m}^2 \pm 27,7$ ^{ab}	517 $\mu\text{m}^2 \pm 23,5$ ^{bc}	480 $\mu\text{m}^2 \pm 20,6$ ^{ab}
50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	482 $\mu\text{m}^2 \pm 26,1$ ^b	432 $\mu\text{m}^2 \pm 22,3$ ^{bcd}	444 $\mu\text{m}^2 \pm 19,7$ ^b
100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	473 $\mu\text{m}^2 \pm 24,4$ ^b	399 $\mu\text{m}^2 \pm 19,9$ ^d	461 $\mu\text{m}^2 \pm 22,2$ ^b

5.2.2 ANÁLISE DE ATIVIDADE MITOCONDRIAL

Os resultados do ensaio de MTT para avaliar a atividade mitocondrial das CTMs incubadas com diferentes concentrações de MWCNT-COOHs (Figura 10) mostraram que os tratamentos (0,1 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL) reduziram a atividade mitocondrial ($p < 0,05$) nos três tempos de incubação (24h, 48h, 72h).

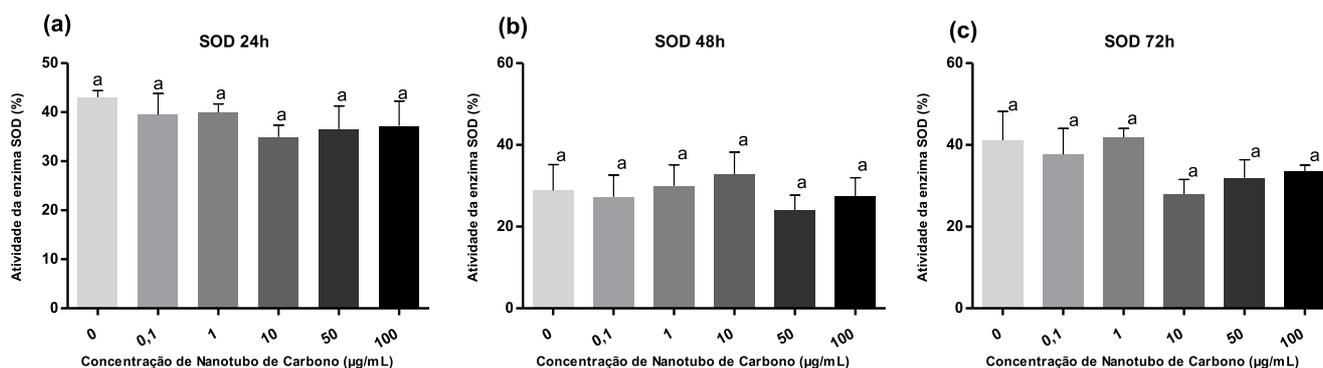
Figura 10. Análise de atividade mitocondrial realizada por ensaio de MTT para os tempos de (a) 24h, (b) 48h e (c) 72h de incubação das células expostas às concentrações de 0 µg/mL, 0,1 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL de MWCNT-COOHs. Médias que não diferem entre si estão representadas pelas mesmas letras.



5.2.3 ENSAIO DA ATIVIDADE DA ENZIMA SOD

A análise da atividade da enzima SOD foi realizada para obter informações quanto a possibilidade das células estarem sob estresse oxidativo causado pela interação com os MWCNT-COOHs. O resultado deste ensaio (Figura 11) mostra que não houve variação ($p > 0,05$) na atividade da enzima SOD nos diferentes tratamentos (0,1 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL de MWCNT-COOHs) em comparação ao grupo controle (0 µg/mL).

Figura 11. Análise da atividade da enzima SOD para os tempos de (a) 24h, (b) 48h e (c) 72h de incubação das células expostas às concentrações de 0 $\mu\text{g/mL}$, 0,1 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ de MWCNT-COOHs. Médias que não diferem entre si estão representadas pelas mesmas letras.



5.2.4 ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR

Os resultados do ensaio de citometria de fluxo (Figuras 12, 13, 14 e 15) por marcação com Iodeto de Propídeo mostram que nenhum dos tratamentos (0,1 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$) de MWCNT-COOHs diminuíram a viabilidade celular ($p > 0,05$) quando comparados ao grupo controle.

Figura 12. Análise estatística da viabilidade celular por citometria de fluxo com marcação por iodeto de propídeo para os tempos de (a) 24h, (b) 48h e (c) 72h de incubação das células expostas às concentrações de 0 $\mu\text{g/mL}$, 0,1 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ de MWCNT-COOHs. Médias que não diferem entre si estão representadas pelas mesmas

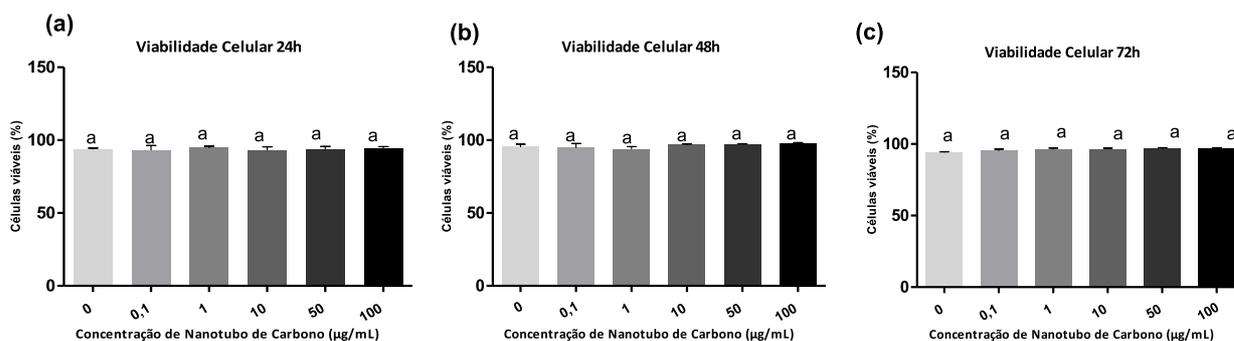


Figura 13. Gráficos PE-A x FSC-A de citometria de fluxo com marcação por iodeto de propídio para o tempo de 24 h de exposição das CTMs aos tratamentos a) 0 $\mu\text{g/mL}$, b) 0,1 $\mu\text{g/mL}$, c) 1 $\mu\text{g/mL}$, d) 10 $\mu\text{g/mL}$, e) 50 $\mu\text{g/mL}$, f) 100 $\mu\text{g/mL}$ de MWCNT-COOHs.

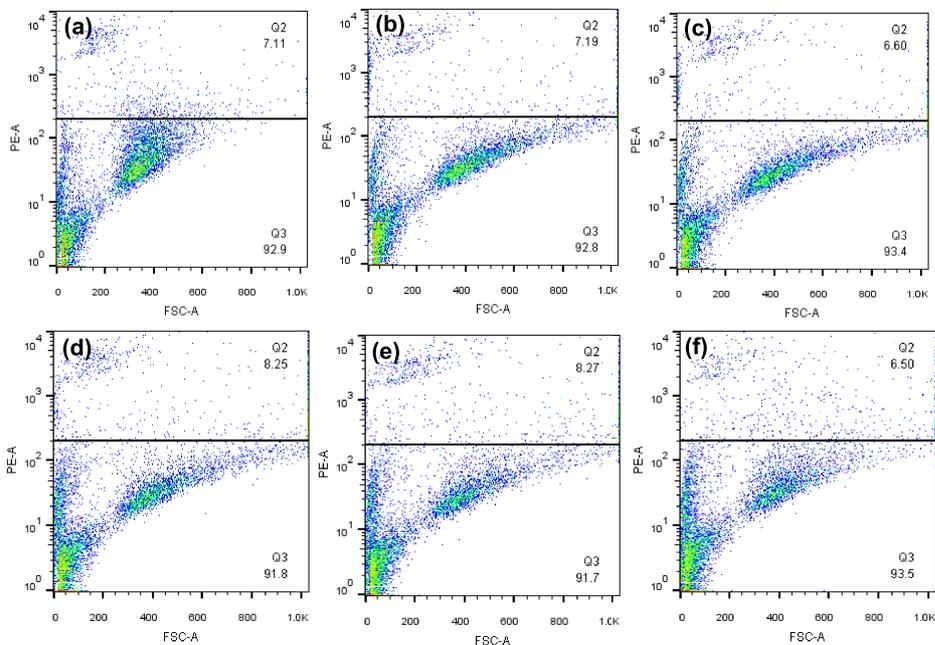


Figura 14. Gráficos PE-A x FSC-A de citometria de fluxo com marcação por iodeto de propídio para o tempo de 48 h de exposição das CTMs aos tratamentos a) 0 $\mu\text{g/mL}$, b) 0,1 $\mu\text{g/mL}$, c) 1 $\mu\text{g/mL}$, d) 10 $\mu\text{g/mL}$, e) 50 $\mu\text{g/mL}$, f) 100 $\mu\text{g/mL}$ de MWCNT-COOHs.

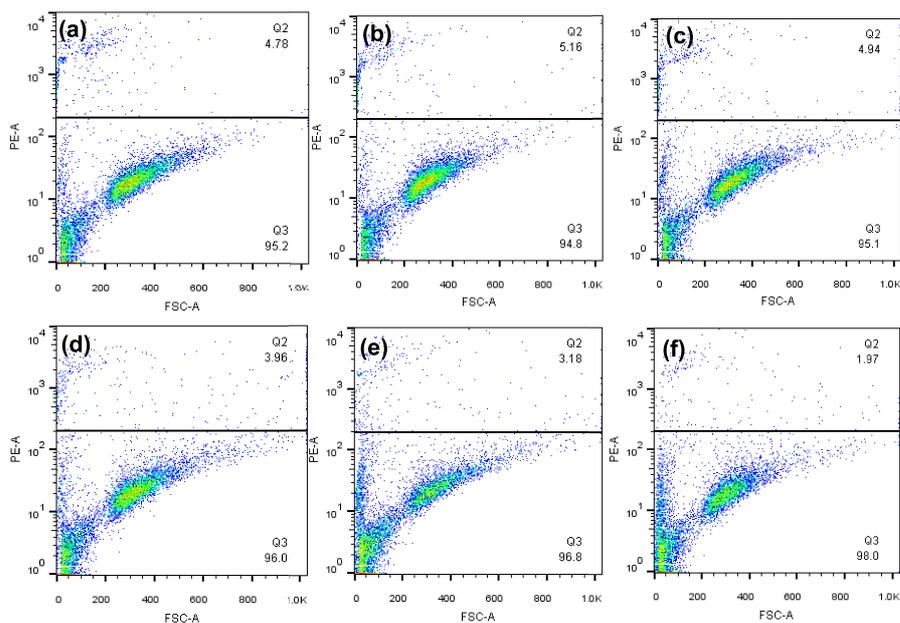
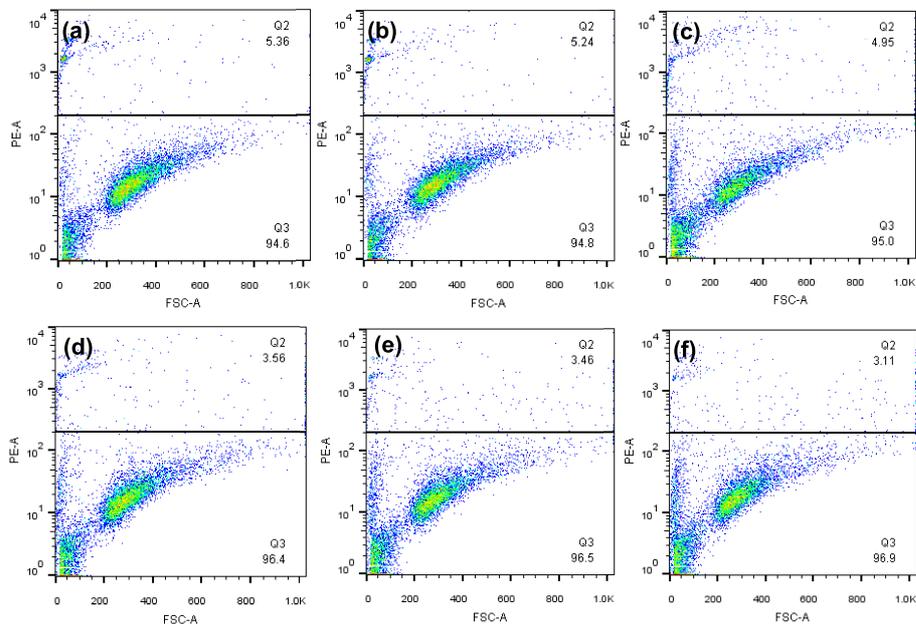


Figura 15. Gráficos PE-A x FSC-A de citometria de fluxo com marcação por iodeto de propídio para o tempo de 72 h de exposição das CTMs aos tratamentos a) 0 $\mu\text{g/mL}$, b) 0,1 $\mu\text{g/mL}$, c) 1 $\mu\text{g/mL}$, d) 10 $\mu\text{g/mL}$, e) 50 $\mu\text{g/mL}$, f) 100 $\mu\text{g/mL}$ de MWCNT-COOHs.



5.3 ENSAIO DE GENOTOXICIDADE POR MICRONÚCLEO

Os resultados do teste de genotoxicidade por análise de micronúcleo (Tabela 3) mostraram que as células expostas aos MWCNT-COOHs não tiveram alteração na frequência de micronúcleo quando comparada ao grupo controle ($p > 0,05$).

Tabela 3. Ensaio de Micronúcleo para teste de Genotoxicidade mostrando a média e erro padrão da média da frequência de micronúcleos em CTMs tratadas com 0 $\mu\text{g/mL}$, 0,1 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ de MWCNT-COOHs para o período de 24h de exposição.

Tratamentos	Micronúcleos
0 $\mu\text{g/mL}$	$2,7 \pm 1,4$
0,1 $\mu\text{g/mL}$	$7,3 \pm 1,8$
1 $\mu\text{g/mL}$	$4,7 \pm 0,3$
10 $\mu\text{g/mL}$	$5,3 \pm 2,8$
50 $\mu\text{g/mL}$	$6,3 \pm 1,8$
100 $\mu\text{g/mL}$	$2,6 \pm 0,8$

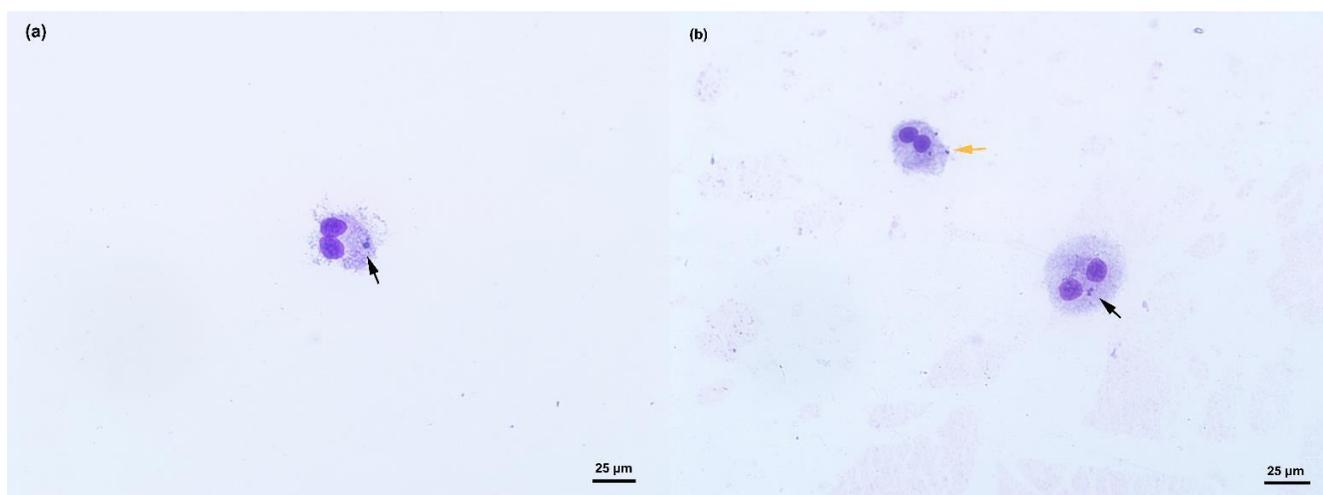
Dados relativos aos valores de índice de proliferação do bloqueio da citocinese (CBPI) podem ser observados na Tabela 4. Verificou-se que o CBPI das células expostas aos MWCNT-COOHs não diferiu ($P>0,05$) em relação ao grupo controle.

Tabela 4. Valores de CBPI para as CTMs expostas por 24h aos MWCNT-COOHs.

Tratamentos	Valor de CBPI
0 $\mu\text{g/mL}$	1,59
0,1 $\mu\text{g/mL}$	1,58
1 $\mu\text{g/mL}$	1,60
10 $\mu\text{g/mL}$	1,63
50 $\mu\text{g/mL}$	1,58
100 $\mu\text{g/mL}$	1,60

Podemos observar imagens representativas das lâminas analisadas na Figura 16. Foram observadas células binucleadas em todos os tratamentos, com a presença de micronúcleo em algumas delas.

Figura 16. Imagem, em objetiva de 20x, representativa do ensaio de micronúcleo em CTMs para o (a) controle e para o (b) tratamento de 50 $\mu\text{g/ml}$ e período de 24h de exposição. Setas pretas indicando células binucleadas com presença de micronúcleo e seta laranja indicando agregado de MWCNT-COOHs.



6 DISCUSSÃO

De forma geral, NTCs no estado diretamente pós-síntese, tem uma composição química que consiste em grafite e impurezas oriundas deste processo. Assim, sem modificações em sua superfície, apresentam insolubilidade acentuada em meio aquoso, o que os caracterizam como hidrofóbicos, dificultando sua dispersão já que tendem a formar agregados devido às interações de Van der Waals (TRINH et al., 2017). Nesse sentido, para solucionar esta questão e melhorar a solubilidade e biocompatibilidade deste NM, torna-se necessário modificar a superfície de NTCs com funcionalizações químicas. Tratamentos químicos para este fim são efetivos por promoverem maior interação entre os átomos dos NTCs e das moléculas do fluido (TRINH et al., 2017). A carboxilação dos MWCNTs têm sido um método comumente utilizado para modificação das cargas de superfície do NM e para sua dispersão (BAI et al., 2016). Assim, para confirmar a presença dos grupos carboxila na superfície do MWCNT utilizado neste trabalho, foi realizado uma caracterização por espectroscopia infravermelho. O resultado do FTIR mostra um pico baixo em 1734 cm^{-1} referente à vibração e elasticidade da ligação C=O e um pico em 1391 cm^{-1} relacionado à ligação C-O-H presentes na carboxilação. Picos observados em comprimentos de onda aproximados e relativos a essas ligações também foram reportados em outras amostras de MWCNT-COOHs (SILVA et al., 2012; ZHAO et al, 2013; FATIN et al., 2014; YJLDRJM & SEÇKIN, 2014). A observação destes dois picos para um mesmo grupo químico é devido à direção em que se encontram ligados às paredes. Adicionalmente, o pico em 1643 cm^{-1} é característico da rede hexagonal formada por carbonos na folha de grafeno que forma o NTC (SILVA et al., 2012; ZHAO et al, 2013; FATIN et al., 2014; YJLDRJM & SEÇKIN, 2014). Os dados de FTIR do ponto de vista da funcionalização são convergentes com os valores observados de PZ, que apresentaram valores negativos devido às cargas provenientes dos grupos carboxila na superfície dos MWCNTs.

A espectroscopia Raman é uma ferramenta amplamente utilizada na caracterização química dos NTCs. No presente estudo, as características mais importantes a serem observadas na Figura 3 são a banda D em 1323 cm^{-1} ; a banda G em 1587 cm^{-1} ; e uma segunda banda D de menor intensidade, a banda D', em 2642 cm^{-1} . Estes resultados são convergentes com os da literatura que mostram a banda D,

referente à carbonos amorfos e alteração na estrutura hexagonal, entre 1320-1370 cm^{-1} (JORIO et al., 2003; MURPHY et al., 2006; WEPASNICK et al., 2011; SILVA et al. 2012). Este modo D parece ser induzido em um processo duplo de ressonância e a intensidade relativa desta banda pode fornecer evidência direta de modificação covalente e concentração de modificações na estrutura de NTCs (MURPHY et al., 2006). Por outro lado, a banda G tangencial em um intervalo entre 1530 e 1610 cm^{-1} , consiste no modo ativo tangencial, no qual o espalhamento Raman (as vibrações) dos átomos de carbono é um contra o outro e induzido por um processo RAMAN ressonante único (JORIO et al., 2003; MURPHY et al., 2006).

Apesar da ampla caracterização química de NTCs por espectroscopia Raman, a maioria das características deste espectro que diferenciam a estrutura do grafite da estrutura dos MWCNTs não são evidentes. A banda G, como dito aqui anteriormente, é relativa às vibrações dos átomos de carbono da estrutura grafítica (e por isso a banda recebe o nome de G). Um pico único e intenso. Por outro lado, em SWCNTs, nota-se uma banda G com dois picos (G+ e G-), diferenciando estes nanotubos de um grafite. A aparência de pico único da banda G em MWCNTs ocorre devido aos maiores e vários tamanhos de diâmetros formados pelas camadas concêntricas de grafite que caracterizam este nanotubo (JORIO et al., 2003; MURPHY et al., 2006).

Além disso, nesta análise (Figura 3) foi possível observar uma alteração na intensidade Raman na região de comprimentos de onda de baixa frequência (100-200 cm^{-1}), referente ao Modo Radial de Respiração (*Radial Breathing Mode* - RBM) dos átomos de carbono. RBMs estão fortemente associados ao diâmetro mais largo proveniente das múltiplas camadas dos MWCNT (MURPHY et al., 2006; RABELO et al., 2016).

Os dados de espectroscopia Infravermelho e Raman convergentes ao confirmarem a composição química dos MWCNTs. E porque estas são técnicas complementares, a espectroscopia de infravermelho confirma a presença de grupos COOHs adsorvidos na superfície deste NM.

Os resultados das microscopias de força atômica (Figura 4) e eletrônica de transmissão (Figura 5) para caracterização morfológica do NM comprovaram a

morfologia de nanotubos dos MWCNT-COOHs. Ainda, é possível observar que estes apresentam comprimento aproximado de 2000 nm (2 μ m) e diâmetro médio de 17,7 nm. Estas dimensões estão de acordo com o reportado na literatura (NAGAI et al., 2011; OMRANI et al., 2019). As dimensões apresentadas por estes MWCNT-COOHs podem contribuir para uma boa viscosidade de *scaffolds*, já que esta característica está associada ao tamanho e a relação altura/comprimento que influenciam o movimento Browniano. Uma boa viscosidade é uma característica importante para aplicações em bioengenharia tecidual, uma vez que permite transporte de moléculas e gases por materiais fluídos (KUMAR et al., 2012; LI et al., 2012; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ et al., 2015). Assim como reportado por Omrani (2019), MWCNT-COOHs com uma menor proporção comprimento/diâmetro proporcionam maior viscosidade aos nanofluidos. Adicionalmente, é possível observar algumas regiões de irregularidades e que sugerem alterações nas superfícies dos MWCNT-COOHs. As alterações na superfície podem ser correlacionadas com a intensidade da banda D observada na espectroscopia Raman (Figura 3). Wepasnick e colaboradores (2011) relataram sobre a interrelação entre oxidantes fortes para adição de grupos COOHs, quantidade destes grupos ligados à parede do MWCNT e irregularidades na superfície e aparecimentos de carbonos amorfos com a intensidade da banda D. Trinh e colaboradores (2017) já relacionaram o aumento no tempo de processamento de funcionalização por tratamentos químicos por ligações covalentes (acidificação e oxidação), como é o caso da ligação de COOHs na superfície dos MWCNT, com o aumento destas alterações e a banda D da espectroscopia Raman. Ainda, de acordo com Wepasnick e colaboradores (2011), as irregularidades na superfície podem indicar os locais onde estão os grupos -COOH da funcionalização.

Para se ter conhecimento a respeito das características dispersivas e comportamento coloidal dos MWCNT-COOHs foram realizados os ensaios de DLS e de motilidade eletroforética e, para saber o impacto das moléculas do meio na dispersão, diferentes concentrações deste NM foram dispersos em três tipos de meio: água deionizada, DMEM/F12 e DMEM/F12 + 10% (v/v) SFB. Os diâmetros hidrodinâmicos exibidos na Tabela 1 mostram que houve agregação em função da concentração dos MWCNT-COOHs e tratamentos dispersos em água deionizada e DMEM/F12 apresentaram agregados maiores. Contudo, DMEM/F12 + 10% SFB se mostrou mais eficiente na dispersão desse NM, pois foi o meio com os menores valores de diâmetro

hidrodinâmico. De forma geral, a dispersão foi melhor nas concentrações de 0,1 µg/mL, 1 µg/mL e 10 µg/mL MWCNT-COOHs em DMEM/F12 + 10% SFB, mantendo valores de tamanho hidrodinâmico menores que 100 nm. Isso deve-se às proteínas presentes no SFB, principalmente a albumina, e outros constituintes do meio de cultura que podem influenciar o comportamento relacionado à agregação e dispersão dos NMs (JEMEC et al., 2016; ZHANG et al., 2019). A albumina tende a formar uma corona proteica ao redor dos NTCs, interagindo eletrostaticamente com os NTCs e os grupos carboxílicos livres. A carboxilação permite ligações com várias moléculas funcionais como fármacos, oligonucleotídeos, além de proteínas, diminuindo a hidrofobicidade dos MWCNT-COOHs. Portanto, devido à formação da corona, ocorreu uma melhora no comportamento coloidal dos MWCNT-COOHs (BAI et al., 2016).

Ademais, quando a análise das concentrações de MWCNT-COOHs foi feita dentro do mesmo grupo de meio de dispersão, pode-se notar que as concentrações de 50 µg/mL e 100 µg/mL (as maiores do grupo de tratamentos) apresentaram maior diâmetro hidrodinâmico. Neste caso, a formação de agregados pode ser devido a maior disponibilidade de MWCNT-COOHs na suspensão, aumentando as chances de encontro entre eles. Esses dados estão de acordo com trabalhos anteriores que demonstraram que quanto maior a concentração, mais formação de agregados (BAEK & AN, 2011; LEVARD et al., 2013; BAALOUSHA et al., 2016).

O PZ é um índice da magnitude da interação eletrostática entre as partículas coloidais. Por isso, estudos sugerem uma mudança de carga da superfície e PZ como resultado da funcionalização, indicando que isto pode fazer com que as partículas sejam mais ou menos interativas (HAMILTON et al., 2018). A funcionalização que já havia sido confirmada por FTIR, também pode ser sugerida pelos valores negativos de PZ obtidos. Os valores de PZ foram próximos dos encontrados em outros trabalhos que avaliaram NTCs carboxilados, que apresentaram outras funcionalizações, ou não funcionalizados (HAMILTON et al., 2013; ZEINABAD et al., 2016; MUNK et al., 2016; HAMILTON et al., 2018). Diferentemente, Bai et al. (2016) encontraram valores de PZ de NTCs funcionalizados maiores que -35 mV, enquanto os não funcionalizados apresentaram um PZ de aproximadamente -14 mV. Lee et al. (2007) encontraram resultados similares aos de Bai et al. (BAI et al., 2016). Sugere-se, portanto, que as variações dos valores entre

os PZs de MWCNT-COOHs encontrados neste e nos diferentes trabalhos citados acima deve-se às condições de síntese, pureza, contaminantes provenientes da síntese, como os catalisadores, pH do meio, quantidade de grupos funcionalizantes na superfície e outros fatores.

Os dados de DLS obtidos neste trabalho sugerem que apesar do MWCNT-COOH ser disperso em meio de cultura suplementado (DMEM/F12 + SFB + antibiótico) para aplicação dos tratamentos nas culturas *in vitro*, ainda ocorre formação de agregados. Portanto, verifica-se que as forças de Van der Waals superam as forças eletrostáticas de repulsão, levando a diferentes graus de agregação dos MWCNT-COOHs.

Os resultados da avaliação de morfologia celular (Figuras 6, 7 e 8) indicam que as CTMs mantiveram sua forma típica, em formato de fuso, similar à de fibroblastos, passando por uma forma triangular e até mesmo achatada de forma estrelar (AMARAL et al., 2019). Apesar da forma típica de uma CTM ter se mantido em todos os tratamentos, houve uma redução da área celular aderida (Tabela 2), principalmente nos tratamentos de maior concentração de MWCNT-COOHs, em todos os três tempos analisados. Esta redução da área celular em crescimento em monocamada aderente deve estar relacionada às interações dos MWCNT-COOHs com a membrana celular, o que também pode ser observado nesta análise por microscopia de luz (Figura 9). Sabe-se que MWCNTs oxidados tendem a ficar adsorvidos na membrana de vesículas compostas por bicamadas lipídicas, que são similares às membranas plasmáticas, interagindo com a porção polar dos fosfolipídios (PÉREZ-LUNA et al., 2018). Além disso, pode-se sugerir uma correlação entre a alteração de morfologia observada neste trabalho e uma possível diferenciação celular. A predição de diferenciação com base na morfologia das células já foi relatada anteriormente (KINO-OKA et al., 2009; KELLY et al., 2010; MATSUOKA et al., 2013). Contudo, essa correlação deve ser melhor estudada em experimentos futuros, tal como análise de expressão gênica para marcadores celulares específicos, dentre outros.

Os resultados da análise de atividade mitocondrial (Figura 7) mostraram que todos os tratamentos que incluem incubação de CTMs na presença de MWCNT-COOHs,

apresentaram uma formação reduzida de cristais de formazam. Isto indica uma atividade mitocondrial menor em comparação ao grupo controle. Dados da literatura relatam indução da citotoxicidade por NTCs mediante diminuição da atividade mitocondrial em diferentes tipos celulares (URSINI et al., 2015; AMINZADEH et al., 2016; LOTFIPANAH et al., 2019). Contudo, esta redução é principalmente vista nos tratamentos de maior concentração, acima de 50 µg/mL. Dados anteriores revelaram que MWCNT-COOHs reduziram a atividade mitocondrial de células branquiais humanas nas concentrações de 20, 40 e 100 µg/mL (URSINI et al., 2015). Diferentemente dos resultados encontrados neste trabalho, as concentrações de 0,1 e 1 µg/mL não afetaram a atividade mitocondrial de espermatozoides humanos (AMINZADEH et al., 2016) e concentrações de até 250 µg/mL não diminuíram a atividade mitocondrial de células de linfoma de camundongos (DEMIR & MARCOS, 2018). Células Jurkat (uma linhagem de linfócito T imortalizado humano) não apresentaram redução na atividade mitocondrial ao serem expostas à 100 µg/mL de MWCNT-COOHs (LOTFIPANAH et al., 2019). Diante disso, vemos que a resposta celular aos MWCNT-COOHs é específica para cada tipo celular e para as condições de exposição.

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) é um dos mecanismos de toxicidade dos NMs (WANG et al., 2014) e estes radicais livres produzidos causam peroxidação lipídica da membrana celular devido a interação eletrostática dos NMs com as células, desse modo pode causar danos nas membranas celulares, entrada e interação dos NMs com organelas intracelulares e macromoléculas biológicas (HOU et al., 2018). Contudo, no presente estudo não foi identificadas alterações na atividade da enzima SOD, principal enzima antioxidante em mamíferos, responsável por neutralizar ânions superóxido, combatendo o estresse oxidativo. Esses dados sugerem que os MWCNT-COOHs, nas concentrações testadas, não alteraram o estado redox das células CTMs cultivadas *in vitro*. Demir & Marcos (2018) também reportaram ausência de alteração na porcentagem de EROs intracelular, assim como mudanças na expressão gênica de marcadores relacionados ao estresse oxidativo foram inexistentes em células de linfoma de camundongo expostas às concentrações de até 250 µg/mL de MWCNT-COOHs por 24h. Por outro lado, Liu et al. (2012), relataram diminuição nos níveis da enzima SOD em fibroblastos de pulmão embrionário humano expostos às concentrações de MWCNT-COOHs que variaram de 5 a 200 µg/mL, por 24h. Estas observações indicam

que as respostas aos NMs, do ponto de vista da atividade da enzima SOD, variam com o tipo celular e as condições testadas.

Os resultados da citometria de fluxo para investigação da viabilidade celular, em acordo com os dados da atividade da SOD, não indicaram diminuição da viabilidade de CTMs expostas aos MWCNT-COOHs. Dessa forma, o presente estudo mostra que os tratamentos aplicados às CTMs diminuem a atividade mitocondrial, contudo, sem levar à morte das células. Por outro lado, estudos anteriores observaram que a concentração de 100 µg/mL de MWCNT-COOH levou a morte de fibroblastos de camundongo (VUKOVIC et al., 2009) e hepatócitos fetais humano (LIU et al., 2013) por apoptose celular.

Além disso, a oxidação e a aaminação para fins de funcionalização de MWCNTs são processos que reduzem o conteúdo de metais provenientes da síntese do NM (VUKOVIC et al., 2009). Assim, isso pode ser um fator adicional contribuinte para que o MWCNT-COOH utilizado em interação com CTMs neste estudo não tenha gerado mecanismos de citotoxicidade (dentre os aqui avaliados) além da redução da atividade mitocondrial e redução da área celular acima de 50 µg/mL. Contudo, Patlolla et al. (2010) observaram alterações na viabilidade, danos ao material genético e morte celular em fibroblastos da derme humana expostos a MWCNTs funcionalizados de diversas formas. Isso reforça a necessidade de se desenvolver, posteriormente, estudos toxicológicos *in vitro* validados internacionalmente para avaliação de toxicidades potenciais deste NM.

O CBPI é calculado baseando-se no número de células mononucleadas, binucleadas e multinucleadas encontradas nas células. Portanto, uma diminuição no valor deste índice indica perda nas funções celulares e/ou morte celular (OECD, 2014). A análise dos valores de CBPI (Tabela 4) mostram que as células estavam em processo de divisão celular, confirmando os resultados de viabilidade celular por citometria de fluxo para o período de 24h. Os resultados da frequência de micronúcleos (Tabela 3) em grupos de CTMs tratadas e não tratadas com MWCNT-COOHs sugerem que estes não levaram a formação de micronúcleos neste tipo celular, diante das condições testadas. De acordo com os estudos de Szendi e Varga (2008), linfócitos humanos tratados com 1 mg/ml de SWCNT ou MWCNT não apresentaram aumento na frequência de micronúcleos quando comparado ao grupo controle. Por outro lado, MWCNTs causaram

genotoxicidade por formação de micronúcleo em células epiteliais de pulmão de ratos (MULLER et al., 2008). Em outro estudo, MWCNT funcionalizados e não funcionalizados também aumentaram a frequência de micronúcleos em um tipo de resposta dose dependente dos tratamentos que variaram de 0,25 a 0,75 mg/kg (PATLOLLA et al., 2010). Assim, considerando que micronúcleos são consequências da formação de fragmentos acêntricos ou cromossomos extras, os resultados deste ensaio indicam que os MWCNT-COOHs não apresentaram efeitos clastogênicos ou aneugênicos nas concentrações testadas em CTMs de polpa dentária humana.

Sugere-se que a divergência destes dados em comparação com o reportado na literatura, pode estar relacionado com o fato de que diferentes tipos celulares variam em suas atividades metabólicas, receptores de superfície celular, interação com o NM e reparação do DNA (VEVERS & JHA, 2008). Portanto, os mecanismos de interação de cada célula com o material genético também são variáveis com o tipo celular, levando a diferentes padrões de resposta genotóxica. Além disso, em um sistema biológico, a absorção, distribuição, metabolismo e toxicidade de NTCs dependem das propriedades físico-químicas deste NM, como a funcionalização, tamanho, agregação e pureza (LINDBERG et al., 2009).

Em resumo, de acordo com as condições experimentais do presente estudo, os MWCNT-COOHs não alteraram a área celular aderida das células em baixas concentrações (0,1, 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$) no tempo de 24 e 72h. Porém em altas concentrações (50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) foi observada redução da área celular. Os dados de MTT revelaram que os MWCNT-COOHs reduziram a atividade mitocondrial em todos os grupos testados. Contudo, o ensaio de SOD mostrou que os MWCNT-COOHs não causaram estresse oxidativo nas CTMs, assim como a viabilidade celular avaliada por citometria de fluxo não foi diminuída e o ensaio de micronúcleo não apresentou indícios de genotoxicidade.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De modo geral, a exposição dos MWCNT-COOHs nas CTMs não alterou a viabilidade celular nem induziu genotoxicidade. Todavia, pesquisas futuras são necessárias para determinar os mecanismos pelos quais os MWCNT-COOH induzem alteração da morfologia celular e metabolismo energético nesse modelo biológico. Este trabalho avaliou alguns parâmetros toxicológicos dos MWCNT-COOHs em CTMs, fornecendo informações importantes para futuras aplicações seguras deste NM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUD, A. P. R.; KULIGOVSKI, C.; CORRÊA, N. C. R.; DE MORAES, E. C. P.; CARUSO, R. R. B.; SCHUCK, D. C.; BROHEM, C. A.; DALLAGIOVANNA, B.; DE AGUIAR, A. M. The inhibition of adipogenesis via an *in vitro* assay can reduce animal use by more precisely estimating the starting dose for the acute toxic class method. *Toxicology Letters*, v. 311, p.80-90, 2019.
- AFONSO, V.; CHAMPY, R.; MITROVIC, D.; COLLIN, P.; LOMRI, A. Reactive Oxygen Species And Superoxide Dismutases: Role In Joint Diseases. *Joint Bone Spine*, v.74, n. 4, p. 324-329, 2017.
- AGGARWAL, S.; PITTENGER, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, v. 105, n. 4, p. 1815–1822, 2005.
- ALBINI, A.; MUSSI, V.; PARODI, A.; VENTURA, A.; PRINCIPI, E.; TEGAMI, S.; ROCCHIA, M.; FRANCHESCHI, E.; SOGNO, I.; CAMMAROTA, R.; FINZI, G.; SESSA, F.; NOONAN, D. M.; VALBUSA, U. Interactions of single-wall carbon nanotubes with endothelial cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 6, p. 277–288, 2010.
- AMARAL, D. L. A. S.; ZANETTE, R. S. S.; ALMEIDA, C. G.; ALMEIDA, L. B. F.; OLIVEIRA, L. F.; MARCOMINI, R. F.; NOGUEIRA, B. V.; SANTOS, M. O.; BRANDÃO, H. M.; MARANDUBA, C. M. C.; MUNK, M. *In vitro* evaluation of barium titanate nanoparticle/alginate 3D scaffold for osteogenic human stem cell differentiation. *Biomedical Materials*, 2019.
- AMINZADEH, Z.; JAMALAN, M.; CHUPANI, L.; LENJANNEZHADIAN, H.; GHAFFARI, M. A.; ABEROMAND, M.; ZEINALI, M. In vitro reprotoxicity of carboxyl-functionalised single- and multi-walled carbon nanotubes on human spermatozoa. *Andrologia*, v. 49, n. 9, p. e12741, 2016.
- ARORA, S.; RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M. Nanotoxicology and *in vitro* studies: the need of the hour. *Toxicology Applied Pharmacology*, v. 258, n.2, p.151-165, 2012.
- BAALOUSHA, M.; SIKDER, M.; PRASAD, A.; LEAD, J.; MERRIFIELD, R.; CHANDLER, G. T. The concentration-dependent behaviour of nanoparticles. *Environmental Chemistry*, v. 13, n. , p. 1-3, 2016.
- BAEK, Y. W.; AN, Y. J. Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb₂O₃) to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus aureus*. *Science of the Total Environment*, v. 409, p. 1603, 2011.
- BAI, W.; WU, Z.; MITRA, S.; BROWN, J. Effects of multiwalled carbon nanotube surface modification and purification on bovine serum albumin binding and biological responses. *Journal of Nanomaterials*, v. 2016, 2016.
- BLANCO, E.; SHEN, H.; FERRARI, M. Principles of nanoparticles design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature Biotechnology*, v. 33, n. 9, p. 941–951, 2015.

BOTTINI, M.; BRUCKNER, S.; NIKA, K.; BOTTINI, N.; BELLUCCI, S.; MAGRINI, A. Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis. *Toxicology Letters*, v. 160, n. 121, p. 6, 2006.

CABALLERO-DÍAZ, E.; CASES, M.V. Analytical methodologies for nanotoxicity assessment. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 84, p. 160-171, 2016.

CHAMBERLAIN, G.; FOX, J.; ASHTON, B.; MIDDLETON, J. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *Stem Cells*, v. 25, n. 11, p. 2739–2749, 2007.

CHAUDHARI, A. A.; ASHMORE, D.; NATH S. D.; KATE, K.; DENNIS, V.; SINGH, S. R.; OWEN, D. R.; PALAZZO, C.; ARNOLD, R. D.; MILLER, M. E.; PILLAI, S. R. A novel covalent approach to bio-conjugate silver coated single walled carbon nanotubes with antimicrobial peptide. *Journal of Nanobiotechnology*, v. 14, n. 58, 2016.

CHE, M.; WANG, R.; LI, X.; WANG, H. Y.; ZHENG, X. F. S. Expanding Roles Of Superoxide Dismutases In Cell Regulation And Cancer. *Drug Discovery Today*, v., n. 1, p. 143-149, 2016.

CHEN, P.; MA, Y.; ZHENG, Z.; WU, C.; WANG, Y.; LIANG, G. Facile syntheses of conjugated polymers for photothermal tumour therapy. *Nature Communications*, v. 10, n. 1192, 2019.

CLARK, D.P. & PAZDERNIK, N. J. *Biotechnology*. Newnes, Academic Cells, 2015.

CORSI, I.; WINTHER-NIELSEN, M.; SETHI, R.; PUNTA, C.; DELLA TORRE, C.; LIBRALATO, G.; LOFRANO, G.; SABATINI, L.; AIELLO, M.; FIORDI, L.; CINUZZI, F.; CANESCHI, A.; PELLEGRINI, D.; BUTTINO, I. Ecofriendly nanotechnologies and nanomaterials for environmental applications: Key issue and consensus recommendations for sustainable and ecosafe nanoremediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 154, 237–244, 2018.

DANAEI, M.; DEGHANKHOLD, M.; ATAEI, S.; HASANZADEH DAVARANI, F.; JAVANMARD, R.; DOKHANI, A.; KHORASANI, S.; MOZAFARI, M. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*, v. 10, n. 2, p. 57, 2018.

DEKKERS, S.; OOMEN, A.G.; BLEEKER, E.A.J.; VANDEBRIEL, R.J.; MICHELETTI, C.; CABELLOS, J.; JANER, G.; FUENTES, N.; VÁZQUEZ CAMPOS, S.; BORGES, T.; SILVA, M.J.; PRINA-MELLO, A.; MOVIA, D.; NESSLANY, F.; RIBEIRO, A.R.; LEITE, O.E.; GROENEWOLD, M.; CASSEE, F.R.; WIJNHOFEN, S.W.P. Towards a nanospecific approach for risk assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 80, p. 46-59, 2016.

DEMIR, E.; MARCOS, R. Toxic and genotoxic effects of graphene and multi-walled carbon nanotubes. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, v. 81, n. 14, p. 645–660, 2018.

DENDISOVÁ, M.; JENIŠTOVÁ, A.; PARCHAŇSKÁ-KOKAISLOVÁ, A.; MATĚJKA, P.; PROKOPEC, V.; ŠVECOVÁ, M. The use of infrared spectroscopic techniques to characterize nanomaterials and nanostructures: A review. *Analytica chimica acta*, 2018.

DRASLER, B.; SAYRE, P.; STEINHAUSER, K.G.; PETRI-FINK, A.; ROTHEN-RUTISHAUSER, B. *In vitro* approaches to assess the hazard of nanomaterials, *NanoImpact*, Elsevier, v.8, p. 99–116, 2017.

DREXLER, K. E. *Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology*. Anchor Books, 1986.

DUAN, J.; YU, Y.; LI, Y.; YU, Y.; LI, Y. ZHOU, X. HUANG, P. SUN, Z. Toxic Effect of Silica Nanoparticles on Endothelial Cells through DNA Damage Response via Chk1-Dependent G2/M Checkpoint. *PLoS ONE*, v. 8, n. 4, 2013.

DYCK, O.; ZIATDINOV, M.; LINGERFELT, D.B.; UNOCIC, R. R.; HUDAK, B. M.; LUPINI, A. R.; JESSE, S.; KALININ, S. V. Atom-by-atom fabrication with electron beams. *Nature Reviews Materials*, 2058-8437, 2019.

EIVAZZADEH-KEIHAN, R.; MALEKIA, A.; GUARDIAB, M.; BANIC, M. S.; CHENABA, K. K.; PASHAZADEH-PANAHD, P.; BEHZAD BARADARANE, E.; AHAD MOKHTARZADEHE, F.; MICHAEL, R. Carbon based nanomaterials for tissue engineering of bone: Building new bone on small black scaffolds: A review. *HamblinJournal of Advanced Research*, p. 185–201, 2019.

EL-AZAZY, M. Introductory chapter: Infrared Spectroscopy- a synopsis of the fundamentals and applications. *Infrared Spectroscopy – Principles, advances and applications*, Capítulo 1, 2018.

ESFANDIARY, E.; VALIANI, A.; HASHEMIBENI, B.; MORADI, I.; NARIMANI, M. The evaluation of toxicity of carbon nanotubes on the human adipose-derived-stem cells *in-vitro*. *Advances in Biomedical Research*, v. 3, n. 40, 2014.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial. *Official Journal of the EU*, 2011/696/EU, L275, p. 38–40, 2011.

FADEEL, B.; FARCAL, L.; HARDY, B.; VÁZQUEZ-CAMPOS, S.; HRISTOZOV, D.; MARCOMINI, A.; SAVOLAINEN, K. Advanced tools for the safety assessment of nanomaterials. *Nature Nanotechnology*, v. 13, n. 7, p. 537–543, 2018.

FATIN, M. F.; RUSLINDA, A. R.; ARSHAD, M. K. M.; HASHIM, U.; NORHAFIZAH, S.; FAREHANIM, M. A. Surface functionalization of multiwalled carbon nanotube for biosensor device application. *IEEE International Conference on Semiconductor Electronics, ICSE2014*, 2014.

FERREIRA, L. S.; DINIZ, I. M. A.; MARANDUBA, C. M. S.; MIYAGI, S. P. H.; RODRIGUES, M. F. S. D.; MOURA-NETTO, C.; MARQUES, M. M. Short-term evaluation of photobiomodulation therapy on the proliferation and undifferentiated status of dental pulp stem cells. *Lasers in Medical Science*, 2018.

FRESHNEY, R.I. *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. John Wiley & Sons, 2015.

FU, P. P., XIA, Q., HWANG, H-M., RAY, P. C., & YU, H. Mechanisms Of Nanotoxicity: Generation Of Reactive Oxygen Species. *Journal Of Food And Drug Analysis*, v. 22, n. 1, p. 64-75, 2014.

FUENTES-MERA, L.; CAMACHO, A.; MONCADA-SAUCEDO, N. K.; PEÑA-MARTÍNEZ, V. Current Applications of Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Tissue Engineering. Mesenchymal Stem Cells - Isolation, Characterization and Applications, 2017.

GARIBALDI, S.; BRUNELLI, C.; BAVASTRELLO, V.; GHIGLIOTTI, G.; NICOLINI, C. Carbon nanotube biocompatibility with cardiac muscle cells. Nanotechnology, v. 17, p. 391–397, 2005.

GAZIT, Z.; PELLÉD, G.; SHEYN, D.; YAKUBOVICH, D. C.; GAZIT, D. Mesenchymal Stem Cells. Principles of Regenerative Medicine, p. 205–218, 2019.

GHASEMPOUR, R., & NAREI, H. CNT Basics and Characteristics. Carbon Nanotube. Reinforced Polymers, p. 1–24, 2018.

GIESE, B.; KLAESSIG, F.; PARK, B.; KAEGI, R.; STEINFELDT, M.; WIGGER, H.; GLEICH, A. V. G.; GOTTSCHALK, F. Risks, Release and Concentrations of Engineered Nanomaterial in the Environment. Nature Scientific Reports, v.8, p. 1565, 2018.

GOLSHADI, M., WRIGHT, L. K., DICKERSON, I. M., & SCHRLAU, M. G. High-Efficiency Gene Transfection of Cells through Carbon Nanotube Arrays. Small, v.12, n. 22, p. 3014–3020, 2016.

GOTTARDI, R.; DOURADINHA, B. Carbon nanotubes as a novel tool for vaccination against infectious diseases and cancer. Journal of Nanobiotechnology, v. 11, n. 30, 2013.

GOYAL, P.; BASNIWAL, R. K. Toxicity of Nanoparticles and Their Impact on Environment. Springer, Soil Biology, v. 48, p. 531–543, 2017.

GUNSOLUS, I. L.; HAYNES, C. L. Analytical aspects of nanotoxicology. Analytical Chemistry, v. 88, n. 1, p. 451-479, 2015.

HAMILTON, R. F.; WU, Z.; MITRA, S.; SHAW, P. K.; HOLIAN, A. Effect of MWCNT size, carboxylation, and purification on *in vitro* and *in vivo* toxicity, inflammation and lung pathology. Particle and Fiber Toxicology, v. 10, n. 57, 2013.

HAMILTON, R. F.; WU, Z.; MITRA, S.; HOLIAN, A. The effects of varying degree of MWCNT carboxylation on bioactivity in various *in vivo* and *in vitro* exposure models. International Journal of Molecular Sciences, v. 19, n. 354, 2018.

HANDRAL, H. K.; TONG, H. J.; ISLAM, I.; SRIRAM, G.; ROSA, V.; CAO, T. Pluripotent stem cells: An *in vitro* model for nanotoxicity assessments. Journal of Applied Toxicology, v. 36, n. 10, p. 1250–1258, 2016.

HE, X., DENG, H., & HWANG, H. The current application of nanotechnology in food and agriculture. Journal of Food and Drug Analysis, v. 27, n. 1, p. 1-21, 2018.

HINTZSCHE, H.; HEMMANN, U.; POTH, A.; UTESCH, D.; LOTT, J.; STOPPER, H. Fate of micronuclei and micronucleated cells. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, v. 771, p. 85-98, 2017.

HORWITZ, E. M.; LE BLANC, K.; DOMINICI, M.; MUELLER I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F. C. Clarification of the nomenclature for MSC: The

International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, v. 7, p. 393-395, 2005.

HOU, J.; WANG, L.; WANG, C.; ZHANG, S.; LIU, H.; LI, S. WANG, X. Toxicity and mechanisms of action of titanium dioxide nanoparticles in living organisms. *Journal of Environmental Sciences*, 2018.

HUI, H.; TANG, Y.; HU, M.; ZHAO, X. *Stem Cells: General Features and Characteristics. Stem Cells in Clinic and Research*, 2011.

IIJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, v.354, n. 6348, p. 56-58, 1991.

JAIN, K. K. *The handbook of nanomedicine*. Humana Press, 3a ed., 2017.

JACKSON, P.; KLING, K.; JENSEN, K. A.; CLAUSEN, P. A.; MADSEN, A. M.; WALLIN, H.; VOGEL, U. Characterization of genotoxic response to 15 multiwalled carbon nanotubes with variable physicochemical properties including surface functionalizations in the FE1-Muta(TM) mouse lung epithelial cell line. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 56, p. 183-203, 2014.

JAYARAM, A. K.; PITSALIDIS, C.; TAN, E.; MOYSIDOU, C-M.; DE VOLDER, M. F.L.; KIM, J-S.; OWENS, R. M. 3D Hybrid Scaffolds Based on PEDOT:PSS/MWCNT Composites. *Frontiers in Chemistry*. V. 7, n. 363, 2019.

JEEVANANDAM, J.; BARHOUM, A.; CHAN Y. S.; DUFRESNE, A.; DANQUAH, M. K. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology*. V. 9, p. 1050–1074, 2018.

JEMEC, A.; MESARIC, T.; SOPOTNIK, M. SEPCIC, K. DROBNE, D. Biological characterization of nanomaterials. *Nanomaterial Characterization: Introduction*, cap.12, p. 253-268, 2016.

JOPLING, C.; BOUE, S.; BELMONTE, J. C. I. Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 12, n. 2, p. 79–89, 2011.

JORIO, A.; PIMENTA, M. A.; FILHO, A. G. S.; SAITO, R.; DRESSELHAUS, G.; DRESSELHAUS, M. S. Characterizing carbon nanotube samples with resonance Raman scattering. *New Journal of Physics*, v. 5, p. 139–139, 2003.

KAGAN, V., KONDURU, N., FENG, W. Carbon nanotubes degraded by neutrophil myeloperoxidase induce less pulmonary inflammation. *Nature Nanotechnology*, v. 5, p. 354–359, 2010.

KAVOSI, A.; NOEI, S. H. G.; MADANI, S.; KHALIGHFARD, S.; KHODAYARI, S.; KHODAYARI, H.; MIRZAEI, M.; KALHORI, M. R.; YAVARIAN, M.; ALIZADEH, A. M.; FALAHATI, M. The toxicity and therapeutic effects of single-and multi-wall carbon nanotubes on mice breast cancer. *Nature Scientific Reports*, v. 8, n. 8375, 2018.

KELLY, D.J.; JACOBS, C.R. The role of mechanical signals in regulating chondrogenesis and osteogenesis of mesenchymal stem cells. *Birth Defects Research: Embryo Today*, v. 90, p. 75–85, 2010.

KIM, K.M.; SONG, J. H.; KIM, M.K.; CHUNG, S.T.; JEONG, J.; YANG, J.Y.; CHOI, A.J.; CHOI, H.J.; OH, J.M. Physicochemical analysis methods for nanomaterials considering their toxicological evaluations. *Mol. Cell. Toxicol.*, v.10, p.347-360, 2014.

KINO-OKA, M.; MAEDA, Y.; SATO, Y.; MARUYAMA, N.; TAKEZAWA, Y. Morphological evaluation of chondrogenic potency in passaged cell populations. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 107, p. 544–551, 2009.

KIRSCH-VOLDERS, M. Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Research*, v. 392, p. 1-4, 1997.

KUMAR, P.; CHOONARA, Y.; TOIT, L.; MODI, G.; NAIDOO, D.; PILLAY, V. Novel High-Viscosity Polyacrylamidated Chitosan for Neural Tissue Engineering: Fabrication of Anisotropic Neurodurable Scaffold via Molecular Disposition of Persulfate-Mediated Polymer Slicing and Complexation. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 13, n. 12, p. 13966–13984, 2012.

KUMMROW, A.; FRANKOWSKI, M.; BOCK, N.; WERNER, C.; DZIEKAN, T.; NEUKAMMER, J. Quantitative assessment of cell viability based on flow cytometry and microscopy. *Cytometry Part A*, v. 83, n. 2, p. 197–204, 2012.

LEE, J.; KIM, M.; HONG, C. K.; SHIM, S. E. Measurement of the dispersion stability of pristine and surface-modified multiwalled carbon nanotubes in various nonpolar and polar solvents. *Measurement Science and Technology*, v.18, p. 3707–3712, 2007.

LEVARD, C.; MITRA, S.; YANG, T.; JEW, A. D.; BADIREDDY, A. R.; LOWRY, G. V.; BROWN, G. E. Effect of chloride on the dissolution rate of silver nanoparticles and toxicity to *E. coli*. *Environmet Science Technology.*, v. 47, p. 5738, 2013.

LI, C.; WANG, L.; YANG, Z.; KIM, G.; CHEN, H.; GE, Z. A Viscoelastic Chitosan-Modified Three-Dimensional Porous Poly(L-Lactide-co- ϵ -Caprolactone) Scaffold for Cartilage Tissue Engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, v. 23, p. 405–424, 2012.

LIAO, S. Y.; TSE, H. F. Multipotent (adult) and pluripotent stem cells for heart regeneration: What are the pros and cons? *Stem Cell Research & Therapy*, v. 4, n. 6, p. 151, 2013.

LINDBERG, H. K.; FALCK, G. C.-M.; SUHONEN, S.; VIPPOLA, M.; VANHALA, E.; CATALÁN, J.; SAVOLAINEN, K.; NORPPA, H. Genotoxicity of nanomaterials: DNA damage and micronuclei induced by carbon nanotubes and graphite nanofibres in human bronchial epithelial cells *in vitro*. *Toxicology Letters*, 186(3), 166–173, 2009.

LIU, J. Scanning transmission electron microscopy and its application to the study of nanoparticles and nanoparticle systems. *Microscopy*, v. 54, p. 251–278, 2005.

LIU, S.; CHEN, J.; ZHANG, K.; WU, S.; LIU, R.; GAO, X. Cytotoxicity of carboxyl carbon nanotubes on human embryonic lung fibroblast cells and its mechanism. *Journal of Experimental Nanoscience*, v. 9, p. 210–220, 2012.

LIU, Y., ZHAO; Y.; SUN, B.; CHEN, C. Understanding the Toxicity of Carbon Nanotubes. *Accounts of Chemical Research*, v. 46, n. 3, p. 702–713, 2013.

- LIU, Z. J.; ZHUGE, Y.; VELAZQUEZ, O. C. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of Cell Biochemistry*, v. 106, p. 984-991, 2009.
- LOTFIPANAH, S.; ZEINALI, M.; YAGHMAEI, P. *Induction of caspase-2 gene expression in carboxyl-functionalized carbon nanotube-treated human T-cell leukemia (Jurkat) cell line. Drug and Chemical Toxicology*, p. 1–6, 2019.
- MARTIN, C. R., & KOHLI, P. The emerging field of nanotube biotechnology. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 2, n. 1, p. 29–37, 2013.
- MALLAKPOUR, S.; DINARI, M.; BEHRANVAND, V. Anionic clay intercalated by multi-walled carbon nanotubes as an efficient 3D nanofiller for the preparation of high-performance l-alanine amino acid containing poly(amide-imide) nanocomposites. *Journal of Materials Science*, v. 49, n. 20, p. 7004–7013, 2014.
- MATSUOKA, F.; TAKEUCHI, I.; AGATA, H.; KAGAMI, H.; SHIONO, H.; KIYOTA Y.; HONDA, H.; KATO, R. Morphology-Based Prediction of Osteogenic Differentiation Potential of Human Mesenchymal Stem Cells. *Plos One*, v. 8, n. 2, 2013.
- MAYNARD, A. D., & AITKEN, R. J. “Safe handling of nanotechnology” ten years on. *Nature Nanotechnology*, v.11, n.12, p. 998–1000, 2016.
- MCCLEMENT, D.J.; XIAO, H. Is nano safe in foods? Establishing the factors impacting the gastrointestinal fate and toxicity of organic and inorganic food-grade nanoparticles. *NPJ Science of Food* v. 1, p. 6, 2017.
- MIERNICKI, M.; HOFMANN, T.; EISENBERGER, I.; KAMMER, F. V. D.; PRAETORIUS, A. Legal and practical challenges in classifying nanomaterials according to regulatory definitions. *Nature Nanotechnolog*, v. 14, p. 208-2016, 2019.
- MIRZAEI, H.; SAHEBKAR, A.; SICHANI, L. S.; MORIDIKIA, A.; NAZARI, S.; SADRI NAHAND, J.; SALEHI, H.; STENVANG, J.; MASOUDIFAR, A.; MIRZAEI, H. R.; JAAFARI, M. R. Therapeutic application of multipotent stem cells. *Journal of Cellular Physiology*, v. 233, n. 4, p. 2815–2823, 2017.
- MISHRA, S. K.; TRIPATHI, S. N.; CHOUDHARY, V.; GUPTA, B. D. Surface Plasmon Resonance-Based Fiber Optic Methane Gas Sensor Utilizing Graphene-Carbon Nanotubes-Poly(Methyl Methacrylate) Hybrid Nanocomposite. *Plasmonics*, v.10, n. 5, p. 1147–1157, 2015.
- MONTANHEIRO, T. L. A.; CRISTÓVAN, F. H.; MACHADO, J. P. B.; TADA, D. B.; DURÁN, N.; LEMES, A. P. Effect of MWCNT functionalization on thermal and electrical properties of PHBV/MWCNT nanocomposites. *Journal of Materials Research*, v. 30, p. 55–65, 2015.
- MULLER, J.; DECORDER, I.; HOET, P. H.; LOMBAERT, N.; THOMASSEN, L.; HUAUX, F.; LISON, D.; KIRSCH-VOLDERS, M. Clastogenic and aneugenic effects of multi-wall carbon nanotubes in epithelial cells. *Carcinogenesis*, v. 29, n. 2, p. 427–433, 2008.
- MUNK, M.; CAMARGO, L. S. A. ; QUINTÃO, C. C. R. ; SILVA, S. R.; SOUZA, E. D.; RAPOSO, N. R. B.; MARCONCINI, J. M.; JORIO, A.; LADEIRA, L.O.; BRANDÃO, H.

M. Biocompatibility assessment of fibrous nanomaterials in mammalian embryos. *Nanomedicine*, v. 12, p. 1151-1159, 2016.

MUNK, M.; LADEIRA, L.O. ; CARVALHO, B. C. ; CAMARGO, L S A ; BARBOSA, N. R. ; SERAPIAO, R. V. ; QUINTÃO, C.C.R. ; DA SILVA, S.R. ; SOARES, J.S. ; JORIO, A.; BRANDÃO, H.M. . Efficient delivery of DNA into bovine preimplantation embryos by multiwall carbon nanotubes. *Scientific Reports*, v. 6, p. 33588, 2016.

MUNK, M.; ZANETTE, R. S. S.; CAMARGO, L. S. A. ; DE SOUZA, N. L. G. D.; DE ALMEIDA, C. G.; GERN, J. C.; GUIMARAES, A. S.; LADEIRA, L. O.; DE OLIVEIRA, L. F. C.; BRANDÃO, H. M. Using carbon nanotubes to deliver genes to hard-to-transfect mammalian primary fibroblast cells. *Biomedical Physics & Engineering Express*, v. 3, p. 045002, 2017.

MURPHY, H.; PAPAKONSTANTINO, P.; OKPALUGO, T. I. T. Raman study of multiwalled carbon nanotubes functionalized with oxygen groups. *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures*, v. 24, p. 715, 2006.

NAGAI, H.; OKAZAKI, Y.; CHEW, S. H.; MISAWA, N.; YAMASHITA, Y.; AKATSUKA, S.; ISHIHARA, T.; YAMASHITA, K.; YOSHIKAWA, Y.; YASUI, H.; JIANG, L.; OHARA, H.; TAKAHASHI, T.; ICHIHARA, G.; KOSTARELOS, K.; MIYATA, Y.; SHINOHARA, H.; TOYOKUNI, S. Diameter and rigidity of multiwalled carbon nanotubes are critical factors in mesothelial injury and carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, n. 49, p. E1330–E1338, 2011.

NOMBELA-ARRIETA, C.; RITZ, J.; SILBERSTEIN, L. E. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 12, n. 2, p. 126–131, 2011.

OBERLIN, A; ENDO, M; KOYAMA, T. Filamentous growth of carbon through benzene decomposition. *J. Cryst. Growth*, v. 32, n. 3, p. 335–349, 1976.

OMRANI, A. N.; ESMAEILZADEH, E; JAFARI, M.; BEHZADMEHR, A. Effects of multi walled carbon nanotubes shape and size on thermal conductivity and viscosity of nanofluids. *Diamond & Related Materials*, v. 93, p. 96-104, 2019.

ORGANISATION DE COOPÉRATION ET DE DÉVELOPPEMENT ÉCONOMIQUES
Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. OECD Publishing, 2016.

PALMER, B. C.; PHELAN-DICKENSON, S. J.; DELOUISE, L. A. Multi-walled carbon nanotube oxidation dependent keratinocyte cytotoxicity and skin inflammation. *Particle and Fibre Toxicology*, v.16, n. 3, 2019.

PARK, M. V. D. Z.; NEIGH, A. M.; VERMEULEN, J. P.; DE LA FONTEYNE, L. J. J.; VERHAREN, H. W.; BRIEDÉ, J. J.; VAN LOREN, H.; DE JONG, W. H. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials*, v. 32, p. 9810–9817, 2011.

PATLOLLA, A.; KNIGHTEN, B.; TCHOUNWOU, P. Multi-walled carbon nanotubes induce cytotoxicity, genotoxicity and apoptosis in normal human dermal fibroblast cells. *Ethnicity & Disease*, v. 20, p. 65-72, 2010.

PÉREZ-LUNA, V.; MORENO-AGUILAR, C.; ARAUZ-LARA, J. L.; ARANDA-ESPINOZA, S.; QUINTANA, M. Interactions of Functionalized Multi-Wall Carbon Nanotubes with Giant Phospholipid Vesicles as Model Cellular Membrane System. *Nature Scientific Reports*, v. 8, n. 1, 2018.

PRASEK, J.; DRBOHLAVOVA, J.; CHOMOUCKA, J.; HUBALEK, J.; JASEK, O.; ADAM, V.; KIZEK, R. Methods for carbon nanotubes synthesis—review. *Journal of Materials Chemistry*, v. 21, n. 40, 2011

QIAN, S.; YAN, Z.; XU, Y.; TAN, H.; CHEN, Y.; LING, Z.; NIU, X. Carbon nanotubes as electrophysiological building blocks for a bioactive cell scaffold through biological assembly to induce osteogenesis. *Royal Society of Chemistry Advances*, v. 9, p. 12001-12009, 2019.

RADUSHKEVICH, L.V. AND LUKYANOVICH, V.M. The Structure of Carbon Forming in Thermal Decomposition of Carbon Monoxide on an Iron Catalyst. *Russian Journal of Physical Chemistry*, v. 26, p. 88-95, 1952.

REBELO, S. L. H.; GUEDES, A.; SZEFCZYK, M. E.; PEREIRA, A. M.; ARAÚJO, J. P.; FREIRE, C. Progress in the Raman spectra analysis of covalently functionalized multiwalled carbon nanotubes: unraveling disorder in graphitic materials. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 18, p. 12784–12796, 2016.

RISS, T. L. *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the Nacional Center for Advancing Translational Sciences, 2004.

ROBLES-GARCÍA, M. A.; RODRÍGUEZ-FÉLIX, F.; MÁRQUEZ-RÍOS, E.; AGUILAR, J. A.; BARRERA-RODRÍGUEZ, A.; AGUILAR, J.; DEL-TORO-SÁNCHEZ, C. L. Applications of nanotechnology in the agriculture, food, and pharmaceuticals. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 16, n. 8, p. 8188-8207, 2016.

RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, M.; VEGA-RUIZ, B.; RAMOS-ZÚÑIGA, R.; SALDAÑA-KOPPEL, D. A.; QUIÑONES-OLVERA, L. F. Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine. *BioMed Research International*, v. 2015, p. 1–15, 2015.

SAHU, D.; KANNAN, G. M.; TAILANG, M.; VIJAYARAGHAVAN, R. *In Vitro* Cytotoxicity of Nanoparticles: A Comparison between Particle Size and Cell Type. *Journal of Nanoscience*, p. 1–9, 2017.

SAHU, S. C.; HAYES, A. W. Toxicity of nanomaterials found in human environment. *Toxicology Research and Application*, v. 1, p. 1-13, 2017.

SANTOS, K. F.; SOUSA, M. S.; VALVERDE, J. V. P.; OLIVATI, C. A.; SOUTO, P. C. S.; SILVA, J. R.; SOUZA, N. C. Fractal analysis and mathematical models for the investigation of photothermal inactivation of *Candida albicans* using carbon nanotubes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 180, p.393-400, 2019.

SAPSFORD, K. E.; TYNER, K. N.; DAIR, B. J.; DESCHAMPS, J. R.; MEDINTZ, I. L. Analyzing nanomaterial bioconjugates: A review of current and emerging purification and characterization techniques. *Analytical Chemistry*, v. 83, n. 12, p. 4453–4488, 2011.

SCHMID, G. The relevance of shape and size of Au₅₅ clusters. *Chemical Society Reviews*, v. 37, p. 1909, 2008.

SHARMA, N.; JANDAİK, S.; KUMAR, S.; CHITKARA, M.; SANDHU, I. S. Synthesis, characterisation and antimicrobial activity of manganese- and iron-doped zinc oxide nanoparticles. *Journal of Experimental Nanoscience*, v. 11, p. 54–71, 2015.

SILVA, W. M.; RIBEIRO, H.; SEARA, L. M.; CALADO, H. D. R.; FERLAUTO, A. S.; PANIAGO, R. M.; LEITE, C. F.; SILVA, G. G. Surface properties of oxidized and aminated multi-walled carbon nanotubes. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 23, p. 1078–1086, 2012.

SINGH, S.; MOIRANGTHEM, R. D.; VAIDYA, A.; JALNAPURKAR, S.; LIMAYE, L.; KALE, V. AKT Signaling Prevailing in Mesenchymal Stromal Cells Modulates the Functionality of Hematopoietic Stem Cells via Intercellular Communication. *Stem Cells*, v. 34, p. 2354–2367, 2016.

SOARES, S.; SOUSA, J.; PAIS, A.; VITORINO, C. Nanomedicine: Principles, Properties, and Regulatory Issues. *Frontiers in Chemistry*, v. 6, p.360, 2018.

STETEFELD, J.; MCKENNA, S. A.; PATEL, T. R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews*, v. 8, p. 409–427, 2016.

SUKHANOVA, A.; BOZROVA, S.; SOKOLOV, P.; BERESTOVOY, M.; KARAULOV, A.; NABIEV, I. Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties. *Nanoscale Research Letters*, v. 13, 2018.

SUN, Z.; IKEMOTO, K.; FUKUNAGA, T. M.; KORETSUNE, T.; ARITA, R.; SATO, S.; ISOBE, H. Finite phenine nanotubes with periodic vacancy defects. *Science*, v. 363, n. 6423, p. 151–155, 2019.

SZENDI, K.; VARGA, C. Lack of genotoxicity of carbon nanotubes in a pilot study. *Anticancer Research*, v. 28, p. 349-352, 2008.

TAN, J. M.; KARTHIVASHAN, G.; ARULSELVAN, P.; FAKURAZI, S.; & HUSSEIN, M. Z. Characterization and *In Vitro* Sustained Release of Silibinin from pH Responsive Carbon Nanotube-Based Drug Delivery System. *Journal of Nanomaterials*, v. 2014, p. 1–10, 2014.

THIMIRI, G. R., DEEPAK B.; KHAN, N. A. Designer nanoparticle: nanobiotechnology tool for cell biology. *Nano Convergence*, v. 3, n. 1, p. 22, 2016.

TONDER, A. V.; JOUBERT, A. M.; CROMARTY, A. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Research Notes*, v. 8, n. 1, p. 47, 2015.

TRINH, P. V.; ANH, N. N.; TAM, N. T.; HONG, N. T.; HONG, P. N.; MINHAB, P. N.; THANG, B. H. Influence of defects induced by chemical treatment on the electrical and thermal conductivity of nanofluids containing carboxyl-functionalized multi-walled carbon nanotubes *Royal Society of Chemistry Advances*, v. 7, p. 49937–49946, 2017.

URSINI, C. L.; MAIELLO, R.; CIERVO, A.; FRESEGNA, A. M.; BURESTI, G.; SUPERTI, F.; MARCHETTI, M.; IAVICOLI, S.; CAVALLO, D. Evaluation of uptake, cytotoxicity and inflammatory effects in respiratory cells exposed to pristine and -OH and -COOH functionalized multi-wall carbon nanotubes. *Journal of Applied Toxicology*, v. 36, p. 394–403, 2015.

VAHABI, S.; SALMAN, N. B.; JAVANMARD, A. Atomic Force Microscopy Application in Biological Research: A Review Study *Iran Journal of Medical Science*, v. 38, 2013.

VERSIANI, A. F.; ASTIGARRAGA, R. G.; ROCHA, E. S. O.; BARBOZA, A. P. M.; KROON, E. G.; RACHID, M. A.; SOUZA, D. G. LADEIRA, L. O.; STANCIOLI, E. F. B.; JORIO, A.; FONSECA, F. G. Multi-walled carbon nanotubes functionalized with recombinant Dengue virus 3 envelope proteins induce significant and specific immune responses in mice. *Nanobiotechnology*, v. 15, n. 26, 2017.

VEVERS, W.F.; & JHA, AWADHESH N. Genotoxic and cytotoxic potential of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on fish cells in vitro. *Ecotoxicology*, v. 17, n. 5, p. 410-420, 2008.

VUKOVIĆ, G.; MARINKOVIĆ, A.; OBRADOVIĆ, M.; RADMILOVIĆ, V.; ČOLIĆ, M.; ALEKSIĆ, R.; USKOKOVIĆ, P. S. Synthesis, characterization and cytotoxicity of surface amino-functionalized water-dispersible multi-walled carbon nanotubes. *Applied Surface Science*, v. 255, p. 8067–8075, 2009.

WANG, J. Y.; CHEN, C.; LIN, J.; JIA, L.; TIAN, K.; YANG, L.; ZHAO, N.; LAI, Q. J.; IANG, Y.; SUN, N.; ZHONG, P.; RAN, W. L. Effects of chronic exposure to cigarette smoke on canonical transient receptor potential expression in rat pulmonary arterial smooth muscle. *American Journal Physiological Cellular Physiological*, v. 306, p. 364–73, 2014.

WEAVER, J. L. Estimation of Cell Viability by Flow Cytometry. *Flow Cytometry Protocols*, v. 97, p. 77–84, 1998.

WEISSMAN, I. L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*, v. 100, p. 157–168, 2000.

WENNERSTEN, R.; FIDLER, J.; SPITSYNA, A. Nanotechnology: A New Technological Revolution in the 21st Century. *Handbook of Performability Engineering*, Springer, p. 943–952, 2018.

WEPASNICK, K. A.; SMITH, B. A.; SCHROTE, K. E.; WILSON, H. K.; DIEGELMANN, S. R.; FAIRBROTHER, D. H. Surface and structural characterization of multi-walled carbon nanotubes following different oxidative treatments. *Carbon*, v. 49, p. 24–36, 2011.

YANG, H.; LEOW, W. R.; CHEN, X. 3D Printing of Flexible Electronic Devices. *Small Methods*, v. 2, n. 1, p. 1700259, 2017.

YEHIA, H. N.; DRAPER, R. K.; MIKORYAK, C.; WALKER, E.; BAJAJ, P.; MUSSELMAN, I. H.; DAIGREPONY, M. C.; DIECKMANN, G. R.; PANTANO, P. Single-walled carbon nanotube interactions with HeLa cells. *Journal of Nanobiotechnology*, v. 5, p. 8, 2007.

YILDRIM, A., & SEÇKIN, T. *In situ* preparation of polyether amine functionalized MWCNT nanofiller as reinforcing agents. *Advances in Materials Science and Engineering*, v. 1, n. 6, 2014.

ZANETTE, R. S. S. Produção de matrizes biológicas a partir de valvas cardíacas de suínos e recelularização com células tronco da polpa dentária humana. Universidade Federal de Juiz de Fora, 2016. Disponível em: <<https://repositorio.ufjf.br/jspui/handle/ufjf/2337>>

ZEINABAD, H. A.; ZARRABIAN, A.; SABOURY, A. A.; ALIZADEH, A. M.; FALAHATI, M. Interaction of single and multiwall carbon nanotubes with the biological systems: tau protein and PC12 cells as targets. *Scientific Reports*, v. 6, p. 26508, 2016.

ZHANG, T.; TANG, M.; YAO, Y.; MA, Y.; PU, Y. MWCNT interactions with protein: surface-induced changes in protein adsorption and the impact of protein corona on cellular uptake and cytotoxicity. *International Journal of Nanomedicine*, v. 14, p.v993–1009, 2019.

ZHOU, L.; FORMAN, H. J.; GE, Y.; LUNEC, J. Multi-walled carbon nanotubes: A cytotoxicity study in relation to functionalization, dose and dispersion. *Toxicology In Vitro*, v. 42, p. 292–298, 2017.

ZHAO, Z.; YANG, Z.; HU, Y.; LI, J.; FAN, X. Multiple functionalization of multi-walled carbon nanotubes with carboxyl and amino groups. *Applied Surface Science*, v. 276, p. 476–481, 2013.

ANEXO

Publicações no Período

Anexo A - Publicação de resumo expandido em anais do evento II SNNB - Simpósio Nacional de Nanobiotecnologia, intitulado “Citocompatibilidade de nanotubos de carbono multicamadas carboxilados: análise em cultura *in vitro* de células-tronco mesenquimais humanas”, 2018, página 83.

Anexo B - Apresentação de pôster no II Encontro de Morfofisiologia: Novas Abordagens Diagnósticas e Terapêuticas em Ciências Morfofuncionais, intitulado “Análise da viabilidade de células-tronco de polpa dentária humana cultivadas *in vitro* com nanotubos de carbono”, 2019, página 86.

Anexo C – Apresentação de pôster na XLII Semana da Biologia e XXV Mostra de Produção Científica da UFJF, intitulado “Análise *in vitro* da citocompatibilidade de nanotubos de carbono multicamadas funcionalizados em células-tronco de polpa dentária humana”, 2019, página 87.

Anexo D - Menção Honrosa como terceiro lugar em III Encontro de Morfofisiologia: Novas Abordagens Diagnósticas e Terapêuticas em Ciências Morfofuncionais, pelo trabalho “Análise da viabilidade de células-tronco de polpa dentária humana cultivadas *in vitro* com nanotubos de carbono”, 2019, página 88.

Anexo E – Prêmio de melhor pôster na área de Biotecnologia e Produção na XLII Semana da Biologia e XXV Mostra de Produção Científica da UFJF, pelo trabalho “Análise *in vitro* da citocompatibilidade de nanotubos de carbono multicamadas funcionalizados em células-tronco de polpa dentária humana”, 2019, página 89.



**II SNNB - Simpósio Nacional de
Nanobiotecnologia**

**UFABC- Universidade Federal do ABC
06 e 07 de dezembro de 2018**

de controles de interferência, a fim de se eliminar os possíveis impactos físico-químicos das nanoestruturas de carbono nos reagentes de viabilidade, contribuindo assim para veracidade dos resultados.

Agências de fomento: CAPES, FAPEMIG, CNPq, CNEN, INCT – Nanomateriais de Carbono, Rede Nacional de Nanotoxicologia (FURG), Rede SisNANO/MCTIC.

NT 303 ESTUDO DA CITOTOXICIDADE DAS NANOPÁTICULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO IN VITRO EM CÉLULAS CHO

Leonara B.F. Almeida¹; Juliana T.C. Siqueira¹; Rafaella S. S. Zanette¹; Eduarda R. Oliveira¹; Camila G. Almeida²; Juliana C. Gem²; Humberto M. Brandão²; Michele Munk^{1*}

¹ – Laboratório de Nanobiotecnologia, Departamento de Biologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, Brasil.

² – Laboratório de Nanotecnologia, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil.

* michele.munk@ufjf.edu.br

Introdução: As nanopartículas de dióxido de titânio (NPTiO₂) possuem propriedades físico-químicas específicas, como absorção ultravioleta e fotocatalítica. Assim, é um dos nanomateriais mais fabricados no mundo, podendo ser aplicado em cosméticos, biomateriais cerâmicos para implantes e terapia fotodinâmica para câncer. Com a crescente exposição à NPTiO₂ é necessário estudar seu potencial citotóxico, logo o objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade in vitro das NPTiO₂ em células de ovário de hamster Chinês (CHO). **Metodologia:** As NPTiO₂ (JRCNM01001a, Comissão Europeia) foram caracterizadas através da espectroscopia Infravermelho (IV) e microscopia de força atômica (AFM). Posteriormente, foram dispersas em meio de cultura DMEM-F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico e sonicadas durante 16 min à 400 W. Células CHO cultivadas em placas de 96 poços com DMEM-F12 suplementado, em estufa com atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37°C foram expostas por 24h as concentrações de 0,1; 1; 5 e 10µg/mL, em seguida realizou-se os ensaio de MTT (Sigma) e Superóxido Dismutase (SOD,

Sigma). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 570nm e 450nm, respectivamente. Os resultados foram submetidos à análise estatística por ANOVA e post-hoc Tukey. Resultados: As bandas observadas no espectro do IV de 542cm⁻¹ e 686cm⁻¹ estão associadas a vibração das ligações Ti-O, enquanto a banda de 3427cm⁻¹ sugere a presença de superfícies com hidroxilas. As imagens por AFM revelaram que as NPTiO₂ estão sob variadas geometrias e formas. O ensaio de MTT mostrou que a apenas a concentração de 0,1µg/mL alterou a atividade mitocondrial das células CHO (p<0,05), enquanto ao ensaio de SOD, nenhuma concentração afetou a atividade dessa enzima (p>0,05). Conclusão: De acordo com as condições experimentais testadas, as NPTiO₂ afetaram a viabilidade celular na concentração de 0,1µg/mL, contudo nenhum dos tratamentos causaram estresse oxidativo em células CHO.

Agências de Fomento: Programa Institucional de Iniciação Científica XXX BIC/UFJF 2017-2018; CNPq; CAPES; FAPEMIG; Rede Mineira de Pesquisa e Inovação para Bioengenharia de Nanossistemas (RM PI-BEN) Processo No. TEC - RED-00282-16; EMBRAPA Gado de Leite, Inmetro e AGRONANO.

NT 304 CITOCOMPATIBILIDADE DE NANOTUBOS DE CARBONO MULTICAMADAS CARBOXILADOS: ANÁLISE EM CULTURA IN VITRO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS

Eduarda R. de Oliveira¹; Leonara B. F. de Almeida¹; Rafaella de S. S. Zanette¹; Luiz. O. Ladeira²; Humberto de M. Brandão²; Michele Munk^{1*}

¹ Departamento de Biologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG.

² Departamento de Física, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG

* Laboratório de Nanobiotecnologia, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.

Introdução: Nanotubos de carbono de parede múltipla funcionalizados (MWCNT-COOH) são nanomateriais constituídos de camadas concêntricas de grafeno com grupos carboxila ligados. São atrativos para aplicações biomédicas por apresentarem condução

térmica, elétrica e mecânica, peso ultraleve, resistência mecânica, capilaridade e grande superfície de contato. Por isso, tomam-se necessários estudos para avaliação dos possíveis efeitos do MWCNT-COOH em células humanas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a citocompatibilidade em células-tronco mesenquimais humanas expostas aos MWCNT-COOH. Metodologia: A presença de cargas superficiais dos MWCNT-COOH em meio de cultura celular (pH 7,4) foi estimada por análise do Potencial Zeta (PZ) utilizando DLS. As células-tronco de polpa dentária humana foram expostas às concentrações 0; 0,1; 10; 50; 100 µg/mL de MWCNT-COOH por 24h para avaliação da morfologia celular por microscopia de luz invertida e viabilidade celular pelo ensaio de MTT. Os resultados foram avaliados por ANOVA, seguido de teste Tukey (p<0,05). Assim, podemos hipotetizar que os MWCNT-COOH alteraram a morfologia das células-tronco, porém, não parece ser um indicativo de citotoxicidade, pois a viabilidade celular foi mantida. Conclusão: Nas condições testadas, a exposição in vitro aos MWCNT-COOH não altera a viabilidade das células-tronco de polpa dentária humana.

Agências de Fomento: CAPES, FAPEMIG, CNPq, Agronano, Rede Mineira de Pesquisa e Inovação para Bioengenharia de Nanossistemas (RED-00282-16), EMBRAPA Gado de Leite, PPGCBIO-UFJF.

NT 305 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS QUÍMICOS E HISTOLOGIA DE FÍGADO DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS À NANOESTUTURAS DAS PROTEÍNAS β-LACTOGLOBULINA E LACTOFERRINA

Camila, Saraiva¹; Jane, Coimbra²; Hércia, Martino³; Adenilson, Monteiro⁴; Marcelo, dos Santos⁵; Sérgio, da Matta⁶; Lahys, Portugal⁷

¹ Laboratório de Operações e Processos, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. camilasaraivaa@gmail.com

² Laboratório de Operações e Processos, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. jcoimbra@ufv.br

³ Laboratório de Nutrição Experimental, Departamento de Nutrição e Saúde,

Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. hercia@ufv.br

⁴ Colégio de aplicação CAP-COLUNI, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. aam@ufv.br

⁵ Laboratório de Síntese de Agroquímicos, Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. marcelo.santos@ufv.br

⁶ Laboratório de Biologia Estrutural, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. smattia@ufv.br

⁷ Laboratório de Operações e Processos, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. lahysportugal@gmail.com

Nanotecnologia é um meio promissor de renovação industrial, porém é necessário estudar a toxicidade de seus produtos. No intuito de avaliar a toxicidade desses materiais, nanoestruturas de proteínas do soro de leite bovino, β-lactoglobulina e lactoferrina, produzidas por auto-associação empregando a gelificação térmica e ajuste de pH, foram submetidas a um teste agudo em ratos wistar durante 15 dias, sendo analisado histologicamente o fígado e bioquimicamente o sangue. Foram usados 50 ratos (n= 10/grupo) Wistar machos, randomizados em cinco grupos, com dieta e água ad libitum. Os animais receberam doses de 0, 30, 60, 90 e 120 mg/kg/dia das nanoestruturas por meio de gavagem em dose diária de 500 µL. Após a administração, a variação de peso foi observada a cada 2 dias. Após eutanásia dos animais, o fígado foi pesado e analisado histologicamente. O sangue foi coletado por punção cardíaca para análises bioquímicas. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de médias Student-Newman-Keuls a 5% de probabilidade, utilizando o software Statística 7 (p<0,05). Os pesos médios dos animais de cada grupo se diferiram significativamente (p<0,05) a partir do nono dia de gavagem, sendo que os animais que receberam a dosagem de 30 mg/kg/dia apresentaram maior média de peso. Nenhuma concentração das variáveis bioquímicas (glicose, colesterol total, HDL, LDL, triglicérides, TGO, TGP e creatinina) nos grupos se diferiu significativamente (p<0,05) do controle, o que pode ser um indicativo de que o tratamento aplicado não ocasiona alteração no funcionamento do organismo dos animais. Os



NOVAS ABORDAGENS DIAGNÓSTICAS E
TERAPÊUTICAS EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS
14, 15 e 16 de Maio de 2019/ Campus Dom Bosco/UFSJ

CERTIFICADO

Certificamos que **Eduarda Rocha de Oliveira** apresentou o trabalho intitulado “ANÁLISE DA VIABILIDADE DE CÉLULAS-TRONCO DE POLPA DENTÁRIA HUMANA CULTIVADAS IN VITRO COM NANOTUBOS DE CARBONO” de autoria de: Eduarda Rocha de Oliveira; Leonara Beatriz Fayer de Almeida; Rafaela de Souza Salomão Zanette; Luiz Orlando Ladeira; Humberto de Mello Brandão; Michele Munk; durante o **III Encontro de Morfofisiologia: Novas Abordagens Diagnósticas e Terapêuticas em Ciências Morfofuncionais**, no 15 de maio de 2019, na Universidade Federal de São João del-Rei– MG, na forma de pôster.

Prof^ª. Erika Lorena Fonseca Costa de Alvarenga
(Presidente da comissão organizadora)

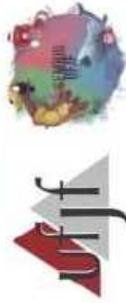


Universidade Federal
de São João del-Rei



Realização:

CERTIFICADO



Certificamos que o trabalho científico intitulado **ANÁLISE IN VITRO DA CITOCOMPATIBILIDADE DE NANOTUBOS DE CARBONO MULTICAMADAS FUNCIONALIZADOS EM CÉLULAS-TRONCO DE POLPA DENTÁRIA HUMANA** com os autores Eduarda Rocha de Oliveira; Leonara Beatriz Fayer de Almeida; Lívia Maciel Vidigal; Rafaela de Souza Salomão Zanette; Luiz Orlando Ladeira; Humberto de Mello Brandão; Michele Munk, foi apresentado como pôster na XLII Semana de Biologia e XXV Mostra de Produção Científica da UFJF no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, realizada entre 04 e 08 de novembro de 2019, sob a área de Biotecnologia e Produção.

Juiz de Fora, 08 de novembro de 2019.

LYDERSON FACIO VICCINI

DIRETOR DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

VITOR ANDRE RODRIGUES

PRESIDENTE DA XLII SEMBIO



NOVAS ABORDAGENS DIAGNÓSTICAS E
TERAPÊUTICAS EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS
14, 15 e 16 de Maio de 2019/ Campus Dom Bosco/UFSJ

CERTIFICADO

A comissão científica do III Encontro de Morfofisiologia confere **Menção Honrosa** aos autores: **“Eduarda Rocha de Oliveira; Leonara Beatriz Fayer de Almeida; Rafaela de Souza Salomão Zanette; Luiz Orlando Ladeira; Humberto de Mello Brandão; Michele Munk”** pelo trabalho intitulado **“ANÁLISE DA VIABILIDADE DE CÉLULAS-TRONCO DE POLPA DENTÁRIA HUMANA CULTIVADAS IN VITRO COM NANOTUBOS DE CARBONO”** Selecionado como o terceiro lugar apresentado no encontro, realizado na Universidade Federal de São João Del-Rei.

Profª. Erika Lorena Fonseca Costa de Alvarenga
(Presidente da comissão organizadora)



Realização:

Universidade Federal
de São João del-Rei

CERTIFICADO



Certificamos que o trabalho científico intitulado “Análise *in vitro* da citocompatibilidade de nanotubos de carbono multicamadas funcionalizados em células-tronco de polpa dentária humana” com os autores Eduarda Rocha de Oliveira, Leonara Beatriz Fayer de Almeida, Livia Maciel Vidigal, Rafaella de Souza Salomão Zanette, Luiz Orlando Ladeira, Humberto de Mello Brandão, Michele Munk, ganhou como **melhor pôster** na XLII Semana de Biologia e XXV Mostra de Produção Científica da UFJF no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, realizada de 04 a 08 de novembro de 2019, sob a área de **Biotecnologia e Produção**.

Juiz de Fora, 08 de novembro de 2019.


LYDERSON FACIO VACCINI

DIRETOR DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS


VITOR ANDRE RODRIGUES
PRESIDENTE DA XLII SEMBIO