

**Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP**



**Instituto de Química**



**Departamento de Química Inorgânica**

**Laboratório de Química do Estado Sólido - LQES**

**Tese de Doutorado**

**Nanotubos de Carbono: aspectos químicos e  
interação com biosistemas**

**Diego Stéfani Teodoro Martinez**

**Orientador: Prof. Dr. Oswaldo Luiz Alves**

**Campinas, 2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE  
QUÍMICA DA UNICAMP

M364n      Martinez, Diego Stéfani Teodoro (1982 - ).  
Nanotubos de carbono: aspectos químicos e  
interação com biosistemas / Diego Stéfani Teodoro  
Martinez. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientador: Prof. Dr. Oswaldo Luiz Alves.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Instituto de Química.

1. Nanotecnologia. 2. Biotecnologia.  
3. Nanopartículas. 4. Nanotoxicologia. I. Alves,  
Oswaldo Luiz. II. Universidade Estadual de  
Campinas. Instituto de Química. III. Título.

**Título em inglês:** Carbon nanotubes: chemical aspects and interaction with  
biological systems

**Palavras-chaves em inglês:** Nanotechnology, Biotechnnology, Nanoparticles,  
Nanotoxicology.

**Área de concentração:** Química Inorgânica

**Titulação:** Doutor em Ciências

**Banca examinadora:** Oswaldo Luiz Alves (orientador)

Letícia Veras Costa Lotufo

Israel Felzenszwalb

Pedro Luiz Onófrio Volpe

Nelson Eduardo Durán Caballero

**Data de defesa:** 05/09/2011

**Programa de Pós-Graduação:** Química



*Dedico esta tese à minha mãe Sandra Aparecida Teodoro da Silva  
e avó Alvira Maria da Silva pelos exemplos e ensinamentos para vida.*



*"Hoje, a questão básica já não é mais se podemos produzir alimentos, fármacos, energia, produtos em quantidade suficiente, mas quais as consequências ambientais disso. Na velocidade vertiginosa da destruição da biosfera, da atmosfera e até da estratosfera, cujas composições químicas afetam os organismos em geral e a humanidade em particular, dentro de algumas dezenas de anos custará uma inconcebível fortuna à pesquisa básica visando a uma extensão do período remanescente do homem no planeta. O drama não consiste tanto na capacidade do homem de alterar o ambiente, mas no desejo de alterá-lo antes de entender com precisão os fatores que governam a estrutura e o funcionamento desse meio"*

*Prof. Otto Richard Gottlieb  
1921-2011*



## Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Oswaldo Luiz Alves pela orientação. Sou muito grato pela oportunidade de entrar para a "Escola LQES", onde aprendi a exercitar e valorizar a liberdade intelectual e a importância do compromisso com a busca da excelência. Obrigado pelo entusiasmo e otimismo operante, e acima de tudo, por compartilhar suas experiências ao longo desses anos de vida acadêmica;

A toda minha Família, e em especial aos meus irmãos Murilo Teodoro Martinez e Gustavo Teodoro Martinez, por sempre me apoiarem e compreenderem minha ausência durante estes anos de doutoramento;

A minha amada Camila Marques de Freria, pelo amor e carinho durante a realização desta tese. Agradeço a sua compreensão e apoio na busca por uma vida intelectual ao meu lado;

Aos colegas membros do LQES: Artur Madeira (Tatu), Renan (Foka), Guilherme (Turco), Vitor Maurício, Flávio Henrique, José Matheus (Pepeca) e Luciana (Luzinha), Roberto Araújo-Junior (Tuca), Rafaela O. Nascimento (Raffa), Ana Carolina M. Moraes, Dra. Carolina Rodrigues Martins (Carol) e Dra. Priscila Marcato. E, em especial, aos amigos Rafael Dias Holtz e Amauri Jardim de Paula. Foi um prazer compartilhar com vocês esta importante etapa de minha vida;

Aos amigos químicos Dr. Odair Pastor Ferreira e Dra. Larissa Otubo por todo apoio quando minha iniciativa na área de química e acolhimento no LQES. Muito obrigado pela paciência, carinho, amizade e ensinamentos. E, aos meus grandes amigos biólogos do MS, Wander Laizo dos Santos, Dr. Fabrício de Souza Delite e Aderildo Bueno da Cunha, pelas discussões fundamentais nesta infinita busca na compreensão dos Biosistemas;

Um agradecimento especial ao geógrafo, Dr. Rodrigo Dutra-Gomes, por ter sido um grande amigo durante estes anos pós-graduação e meu professor particular em Sistemas Complexos. Agradeço pelas muitas discussões que ajudaram a dar ordem aos meus pensamentos, além disso, por ter sido um exemplo de coragem e crença na ciência enquanto forma de libertação;

Aos amigos Carlos Eduardo de Andrade, Raykleison Igor dos Reis Moraes, Deleon Nascimento Correa, Aleixo Júnior e Carlos H. Z. Martins, por me ensinarem a importância e a necessidade de desenvolver projetos com base na realidade. E, especialmente, ao amigo Moraes por ter me apresentado o livro *A Arte de Ler*, de Mortimer J. Adler;

Ao Prof. Dr. Antônio Gomes Souza Filho e a Doutoranda Nádia F. Andrade do Departamento de Física da UFC, pelas análises de Espectroscopia Raman Confocal. Sou muito grato ao amigo e Prof. Gomes pelo apoio durante a realização deste trabalho e pelas discussões científicas em torno dos nanotubos de carbono, onde tive o privilégio de trabalhar com um excelente físico e conhecedor destes nanomateriais. Agradeço também pela oportunidade de participar do Projeto NeuroNano, juntamente com a UCD-Irlanda;

Aos membros do Laboratório de Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental (LEAL) da UNICAMP em Limeira, por todo o apoio, em especial a Profa. Dr. Gisela A. Umbuzeiro e Prof. Vitor R. Coluci e aos excelentes técnicos Gilberto Almeida e Ádria Caloto-Oliveira pela paciência, disposição ao trabalho e persistência durante a realização dos experimentos de ecotoxicidade aguda com o organismo *Daphnia similis*;



Um agradecimento especial para a Dra. Andréia Fonseca de Faria pelo fornecimento do biosurfactante (BioS) e pela excelente parceria, muito obrigado pela amizade e por todo o seu apoio, incentivo e companheirismo durante estes anos de pós-graduação. Também agradeço a Profa. Lucia R. Durrant do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana (LFSM) da FEA-UNICAMP pela colaboração;

Aos colegas, Antônio Lage, Dr. José Luiz Mazzei e Prof. Dr. Israel Felzenszwalb do Laboratório de Mutagênese Ambiental (LabMut) da UERJ pela ótima parceria e empenho durante a realização dos testes de mutagenicidade;

Ao Prof. Dr. Osvaldo Augusto Sant'Anna e Dra. Denise V. Tambourgi, pela parceria e oportunidade de conhecer este belo trabalho de longos anos de pesquisa envolvendo as linhagens de camundongos geneticamente selecionados, junto ao Instituto Butantan. Em especial, a Dr. Luciana V. Carvalho pelos ensinamentos e disposição durante a realização dos experimentos de ELISA;

Ao Prof. Alexandre R. L. Oliveira do Laboratório de Regeneração Nervosa do IB-UNICAMP, pela parceria, especialmente, a doutoranda Camila Marques de Freria, pelo exemplo de dedicação em um projeto de colaboração. Agradeço pela rigorosidade científica durante a condução e realização dos experimentos com os astrócitos primários;

Ao Dr. Boniek G. Vaz e Prof. Dr. Marcos N. Eberlin pela realização das análises de espectrometria de massas de alta resolução e precisão da amostra DEBRIS;

Ao Dr. Rodrigo A. Silva, Prof. Dra. Gisele Z. Justo e Profa. Dra. Carmen V. Ferreira do IB-UNICAMP e UNIFESP, pela parceria e realização dos experimentos de citotoxicidade dos DEBRIS e dos nanotubos de carbono sobre fibroblastos e queratinócitos;

Aos colegas do *Centre for BioNano Interactions* na UCD-Irlanda: Daithi Garry, Mattia Bramini, Felippo Bertoli, Andrzej Pitek, Dong Ye e Fengjuan Wang. Em especial aos Dr. Marco P. Monopoli, Dra. Francesca Bandeli-Bombeli, Dra. Micheli Nic Raghnaill, Dr. Eugene Mahon, Profa. Dra. Iseul Lynch e Prof. Kenneth A. Dawson pela oportunidade de aprofundar meus estudos na bionanointerface e conhecer o modelo *Protein Corona*;

A Prof. Dra. Ana Paula Leme (UNIFESP) e Prof. Nelson Durán (IQ-UNICAMP) pelo fornecimento da primeira amostra nanotubos de carbono, permitindo assim, iniciar meus estudos com estes nanomateriais;

A todos os funcionários do IQ-UNICAMP, em especial aos técnicos: Paulo Amaral (LQES), Bel (CPG), Daniel (Microscopia) e Fabiana (Análise de Térmicas);

A Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campus de Três Lagoas. Também agradeço as professoras Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo e Profa. Maria das Graças Machado Freire pelo papel fundamental durante minha iniciação na Ciência.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutoramento, ao Instituto de Materiais Complexos Funcionais (INCT-Inomat), a Rede de Nanotubos de Carbono (CNPq-MCT) e FAPESP pelo apoio financeiro e infra-estrutura durante a realização desta tese;

A UNICAMP e ao Instituto de Química (IQ), pelas ótimas condições de trabalho, ambiente científico-cultural e pela constante busca da excelência na qualidade do ensino, pesquisa e extensão.

## **Súmula Curricular**

### **Dados Pessoais:**

Nome: Diego Stéfani Teodoro Martinez

Nome em citações: Stéfani, D.; Martinez, D. S. T.

Filiação: Wladimir Antônio Martinez e Sandra Aparecida Teodoro da Silva

Data de Nascimento: 18/10/1982    Naturalidade: Três Lagoas – MS

### **Formação Acadêmica:**

Doutorado em Ciências (Química), Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química (2006 a 2011).

Mestrado em Biologia Funcional e Molecular (Bioquímica), Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia (2004 a 2006).

Licenciado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Departamento de Ciências Naturais (2000 a 2003).

### **Formação complementar:**

Estágio no *Centre for BioNano Interactions, University College Dublin*, Irlanda (Maio a Dezembro de 2010). Projeto: *Protein corona associated with Carbon Nanotubes and Graphene Oxide*

### **Prêmio:**

Melhor trabalho científico do Congresso Brasileiro de Toxicologia (2009), apresentado como pôster, organizado pela SBTox. Título: Ecotoxicidade de Nanotubos de Carbono sobre *Daphnia similis*: influência da dispersão/estabilidade em água de cultivo.

### **Artigos científicos:**

STÉFANI, D. ; Paula, A. J.; Vaz, B. G.; Silva, R. A.; Andrade, N. F.; Justo, G. Z.; Ferreira, C. V.; Filho, A. G. Souza; Eberlin, M. N.; Alves, O. L. Structural and proactive safety aspects of oxidation debris from multiwalled carbon nanotubes. **Journal of Hazardous Materials**, 189, 391-6, 2011.

Paula, A. J.; STÉFANI, D.; Souza Filho, A. G.; Kim, Y. A.; Endo, M.; Alves, O. L. Surface chemistry in the process of coating mesoporous SiO<sub>2</sub> onto carbon nanotubes driven by the formation of SiOC bonds. **Chemistry**, 17, 3228-37, 2011.

Alves, O. L.; STÉFANI, D.; Parizotto, N. V.; Souza Filho, A. G. Hydrotalcites: a highly efficient ecomaterial for effluent treatment originated from carbon nanotubes chemical processing. **Journal of Physics: Conference Series**, 304, 2011.

Umbuzeiro, G.A.; Coluci, V.R.; Honório, J.G.; Giro, R.; Morales, D.A.; Lage, A.S.G.; Mazzei, J.L.; Felzenszwalb, I.; Souza Filho, A.G.; STÉFANI, D.; Alves, O. L. Understanding the interaction of multi-walled carbon nanotubes with mutagenic organic pollutants using computational modeling and biological experiments. **Trends in Analytical Chemistry**, 30, 437-46, 2011.

Faria, A. F.; STÉFANI, D.; Vaz, B. G.; Silva, I. S.; Garcia, J. S.; Eberlin, M. N.; Grossman, J.; Alves, O. L.; Durrant, L. R. Purification and structural characterization of Fengycin homologues produced by *Bacillus subtilis* LSFM-05 grown in raw glycerol. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 38, 863-71, 2011.

### **Pedido de Patente:**

MARTINEZ, D. S. T.; Alves, O. L.; Souza Filho, A. G.; Parizotto, N. V. Processos de tratamento de efluentes contendo fragmentos de carbono carboxilados provenientes de nanotubos de carbono (Pedido Internacional de Patente, PCT/BR2010/000372), 2010.

### **Resumos em Congressos:**

STÉFANI, D.; Faria, A. F.; Souza Filho, A. G. ; Almeida, G.; Vaz, B. G.; Eberlin, M. N.; Durrant, L. R.; Umbuzeiro, G. A.; Alves, O. L. Biosurfactant from *Bacillus subtilis* microorganism as a stabilizing agent for carbon nanotubes ecotoxicity studies. In: **Nanotoxicology 2010**, Edinburgh, Escócia, 2010.

Lage, A. S. G.; STÉFANI, D.; Mazzei, J. L.; Alves, O. L.; Felzenszwalb, I. Absence of cytotoxicity and mutagenicity of acid-treated multiwalled carbon nanotubes. **Nanotoxicology 2010**, Edinburgh, Escócia, 2010.

STÉFANI, D.; Carvalho, L. V.; Souza Filho, A. G.; Sant'Anna, O. A.; Alves, O. L. Carbon nanotubes enhanced antibody response in genetically selected mice. **11th International Conference on the Science and Application of Nanotubes - NT10**, In: 3rd Carbon nanotubes in biology, medicine and toxicology satellite symposium, Montreal, Canadá, 2010.

Freria, C. M.; STÉFANI, D. ; Souza Filho, A. G. ; Zanon, R. G.; Mendes Filho, J.; Oliveira, A. L. R.; Alves, O. L. Influence of cell-penetrating carbon nanotubes on siRNA transfection in primary astrocyte cultures. **11th International Conference on the Science and Application of Nanotubes – NT10** In: 3rd Carbon nanotubes in biology, medicine and toxicology satellite symposium, Montreal, Canadá, 2010.

STÉFANI, D.; Carvalho, L. V. ; Sant'Anna, O. A.; Alves, O. L. Purificação de nanotubos de carbono e interação com veneno de *Bothrops jararaca*. In: **31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Águas de Lindóia, 2008.

STÉFANI, D.; Alves, O. L. Tratamento ácido de nanotubos de carbono (MWNT): análises termogravimétricas, avaliação do resíduo metálico e biodisponibilidade do ferro *in vitro*. In: **III Workshop da Rede Nacional de Pesquisa em Nanotubos de Carbono**, Curitiba, 2008.

## Resumo

Neste trabalho foram estudados aspectos de purificação e caracterização de nanotubos de carbono de parede múltiplas, bem como suas interações com diferentes níveis de organização dos biosistemas. Os nanotubos foram purificados e caracterizados após tratamentos químicos com HNO<sub>3</sub>, HCl e NaOH em sistema de refluxo convencional, sendo obtido nanotubos com pureza > 98,5 % (livres de ferro) e livres de resíduos carbonáceos. Para expressar os reflexos da interação dos nanotubos purificados com os biosistemas selecionados foi adotada uma abordagem sistêmica (Nível Ecológico > Nível Imunológico > Nível Celular-molecular). Os principais resultados desta interação foram: i) ausência de ecotoxicidade aguda para o organismo aquático *Daphnia similis*, quando dispersos em biosurfactantes produzidos pelo microorganismo *Bacillus subtilis*; ii) ausência de efeito mutagênico sobre linhagens de *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames); iii) desenvolvimento de um eficiente processo para tratamento de efluente contendo resíduos carbonáceos provenientes da etapa de purificação dos nanotubos; iv) efeito imunoestimulatório (adjuvante) em camundongos geneticamente selecionados e, v) capacidade de internalização celular e efeito citotóxico em astrócitos primários *in vitro*, via indução de morte celular programada (apoptose).



## Abstract

In this work, aspects of the purification and characterization of multiwalled carbon nanotubes were studied as well as their interactions with different organization levels of biological systems. The carbon nanotubes were purified and characterized after chemical treatments with HNO<sub>3</sub>, HCl and NaOH under conventional reflux system. It was obtained nanotubes with purity > 98.5% (iron free) and without carbonaceous byproducts. A systemic approach (Ecological level > Immunological level > Cellular-molecular level) was used to represent the carbon nanotube interactions with biological systems. The main results regarding the interactions were: i) absence of acute ecotoxicity to *Daphnia similis* aquatic organism when the nanotubes were dispersed with biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* microorganism; ii) absence of mutagenic effect to *Salmonella typhimurium* strains (Ames Test); iii) development of an effective process for effluent treatment containing carbonaceous byproducts originated from carbon nanotube purification process; iv) immunostimulant effect (adjuvant) in genetically selected mice; v) cellular internalization capacity and cytotoxicity effect on *in vitro* primary astrocytes by inducing programmed cell death (apoptosis).



## Índice

Lista de Figuras.....	xxi
Lista de Tabelas.....	xxix
Abreviaturas, siglas e símbolos.....	xxxii
1. Considerações iniciais.....	1
2. Introdução .....	4
2.1. Nanotubos de Carbono .....	4
2.2. Sobre os Biosistemas e a Bionanointerface .....	9
2.3. O surgimento da Nanotoxicologia.....	15
3. Objetivos .....	20
4. Materiais e Métodos.....	21
4.1. Purificação dos nanotubos de carbono .....	21
4.2. Caracterização físico-química dos nanotubos de carbono purificados .....	23
4.3. Avaliação <i>in vitro</i> da biodisponibilidade do resíduo metálico .....	25
4.4. Estudo dos fragmentos de carbono carboxilados .....	25
4.5. Interação com Biosistemas .....	27
4.5.1. Nível Ecológico: ecotoxicologia e tratamento de efluentes .....	27
4.5.2. Nível Imunológico: imunização dos camundongos geneticamente selecionados.....	32



4.5.3.	Nível Celular-molecular: efeito sobre Astrócitos primários <i>in vitro</i> .....	35
5.	Resultados e Discussão .....	38
5.1.	Aspectos químicos da purificação e caracterização dos nanotubos de carbono.....	38
5.2.	A superfície química dos nanotubos de carbono oxidados e os fragmentos de carbono carboxilados .....	48
5.3.	Interação com Biosistemas .....	56
5.3.1.	Nível Ecológico: ecotoxicologia e tratamento de efluentes .....	56
5.3.2.	Nível Imunológico: efeito adjuvante em camundongos geneticamente selecionados .....	76
5.3.3.	Nível Celular-molecular: efeito sobre Astrócitos primários <i>in vitro</i> .....	85
6.	Conclusões .....	98
7.	Considerações finais .....	100
8.	Apêndices.....	104
8.1.	Visão geral da tese.....	104
8.2.	Biosistemas: pontos centrais <sup>58</sup> .....	104
8.3.	Análises termogravimétricas .....	107
8.4.	Espectroscopia Raman confocal.....	108
8.5.	Ecotoxicidade aguda sobre <i>Daphnia similis</i> (influência da aglomeração) ...	109

8.6. Ecotoxicidade aguda sobre <i>Daphnia similis</i> (modulação da toxicidade do sulfato de cobre) .....	109
8.7. Espectroscopia infravermelho e Difractometria de raios-X das hidrotalcitas após adsorção dos DEBRIS.....	110
9. Referências Bibliográficas.....	111



## Lista de Figuras

- Figura 1. Ilustração dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas (esquerda) e de parede simples (direita). Adaptado de A. J. G. Zarbin<sup>23</sup>. ..... 4
- Figura 2. Tipos de funcionalização de nanotubos de carbono: (A) *não-covalente*; esquema demonstrando os três modos como surfactantes atuam na dispersão dos nanotubos de carbono de parede simples; a) micelar, b) hemi-micelar e c) aleatório<sup>38</sup>; (B) *covalente*; esquema ilustrando a funcionalização de nanotubos de carbono de parede simples com peptídeos via reação de cicloadição 1,3-dipolar<sup>39</sup>. ..... 6
- Figura 3. Esquema representando a geração de grupamentos oxigenados superficiais e fragmentos de carbono carboxilados (FCCs) adsorvidos na superfície dos NTCs após o tratamento oxidativo com HNO<sub>3</sub>. Adaptado de Salzmann e colaboradores<sup>41</sup>. ..... 7
- Figura 4. Níveis hierárquicos da organização dos biosistemas. Adaptado do *Committee on New Biology for 21st century*<sup>58</sup>. ..... 10
- Figura 5. A formação da bionanointerface. Adaptado de Lynch e colaboradores<sup>70</sup>. .. 12
- Figura 6. Convergência de algumas disciplinas científicas e tecnológicas para a nanoescala. .... 14
- Figura 7. Surgimento da Nanotoxicologia: convergência de conhecimentos e disciplinas envolvendo materiais particulados. Adaptado de Oberdorster e colaboradores<sup>102</sup>. ..... 17
- Figura 8. (A) Nanotubos de carbono de paredes múltiplas da marca *Ctube 100* obtidos da empresa CNT Co. Ltd.; (B) Fotografia dos nanotubos no estado sólido. .... 21
- Figura 9. Fotografia do sistema de refluxo utilizado para a purificação dos nanotubos de carbono de parede múltiplas. .... 22

Figura 10. Tratamentos químicos empregados na purificação dos nanotubos de carbono de parede múltiplas estudados nesta tese: (A) CNT-LQES, (B) CNT-LQES<sub>1</sub> e (C) CNT-LQES<sub>2</sub>. ..... 22

Figura 11. Tubos Falcon utilizados no teste de ecotoxicidade aguda. Estão representados em ordem crescente (da esquerda para direita) as concentrações de CNT-LQES<sub>1</sub> avaliadas (1, 5, 10, 20, 30, 50, 70 e 100 mg/L) em água mineral reconstituída. Esta fotografia representa 5 minutos após a introdução dos organismos nas suspensões. .... 28

Figura 12. Obtenção da fração solúvel contendo os biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* LSFM-05(BioS): (A) Extrato bruto no estado sólido contendo os biossurfactantes produzidos pelo microorganismo; (B) Extração em água mineral reconstituída (10 mg/mL) sob agitação magnética; (C) Fração solúvel contendo os biossurfactantes, denominada BioS, após a etapa de centrifugação..... 29

Figura 13. Efluente-Estoque: solução de NaOH 0,1M contendo os fragmentos de carbono carboxilados (DEBRIS)..... 32

Figura 14. Imagens de microscopia eletrônica de varredura [SEM] (A, C, E) e de transmissão [TEM] (B, D, F) dos CNT-LQES (A,B); CNT-LQES<sub>1</sub> (C,D) e CNT-LQES<sub>2</sub> (E,F), respectivamente..... 43

Figura 15. Dispersões dos nanotubos de carbono estudados em água deionizada: (A) CNT-L3 [raw]; (B) CNT-LQES; (C) CNT-LQES<sub>1</sub>; e (D) CNT-LQES<sub>2</sub>. Esta fotografia foi retirada após um intervalo de 30 minutos da etapa de sonicação em banho ultrassônico [Cole-parmer 8891] por 15 minutos..... 45

Figura 16. Influência dos FCCs durante a determinação *in vitro* da biodisponibilidade do resíduo metálico (Ferro) dos nanotubos de carbono purificados pelo Método Ferrozina. (A) Espectroscopia UV-Vis da solução tampão Ferrozine após incubação

por 6 horas com os CNT-LQES<sub>1</sub> (com FCCs) e CNT-LQES<sub>2</sub> (sem FCCs, devido o tratamento com NaOH 0,1M durante a etapa de purificação); (B) Fotografia da solução tampão Ferrozina: (a) branco; (b) após lixiviação do Fe<sup>2+</sup> dos CNT-LQES<sub>1</sub> (c/ FCCs) e (c) após lixiviação do Fe<sup>2+</sup> dos CNT-LQES<sub>2</sub> (s/ FCCs). ..... 47

Figura 17. (A) Avaliação da formação dos fragmentos de carbono carboxilados (FCCs) gerados durante o tratamento oxidativo dos nanotubos de carbono com HNO<sub>3</sub>, conforme descrito no item 4.3. (B) Fotografia ilustra as soluções de NaOH 0,1M contendo os FCCs dispersos que foram isolados das Amostras de 1 a 8 do planejamento experimental (item 4.3.). ..... 49

Figura 18. Análise termogravimétrica [TGA] dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas de partida (CNT-L3). Condições da corrida: 3,5 mg de CNT-L3 sob atmosfera oxidante (ar sintético; fluxo de 100 mL/minuto) com taxa de aquecimento de 5 °C/minuto. .... 50

Figura 19. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão [TEM] da amostra de partida (CNT-L3), demonstrando a predominância dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas nesta amostra. Barra = 300 nm. .... 51

Figura 20. (A) Espectroscopia ultravioleta visível [UV-vis] e (B) Espectroscopia Infravermelho [FT-IR] dos fragmentos de carbono carboxilados (DEBRIS) isolados dos nanotubos de carbono oxidados. As fotografias ilustram os DEBRIS dispersos em solução de NaOH 0,1M (A) e no estado sólido após o processo de diálise e liofilização (B). ..... 52

Figura 21. (A) Espectrometria de massas de alta resolução [ESI FT-ICR/MS] da amostra DEBRIS isolados dos nanotubos de carbono oxidados proveniente do Ensaio 8. (B) Diagrama de van Krevelen, construído a partir dos dados de análise elementar obtidos da análise de espectrometria de massas de alta resolução dos DEBRIS. .... 54

Figura 22. Espectroscopia ultravioleta-visível [UV-Vis] dos fragmentos de carbono carboxilados (DEBRIS) dispersos em uma solução de HCl 0,1M no intervalo 0 hora e após 72 horas. ....	55
Figura 23. (A) Imobilidade de <i>Daphnia similis</i> após 48 horas de exposição aos CNT-LQES <sub>1</sub> (triplicatas independentes); (B) Estabilidade das suspensões de CNT-LQES <sub>1</sub> em água mineral reconstituída utilizada no teste de ecotoxicidade aguda.....	58
Figura 24. Medidas de Espalhamento de Luz Dinâmico [DLS] das suspensões de CNT-LQES <sub>1</sub> (5 mg/L) em água deionizada (linha vermelha) e em água mineral reconstituída (linha verde) utilizada nos testes de ecotoxicidade com <i>Daphnia similis</i> . Os CNT-LQES <sub>1</sub> apresentaram um diâmetro médio de ~ 123 ± 2,0 nm e ~ 468 ± 109 nm em água deionizada e em água mineral reconstituída, respectivamente. Estas análises foram realizadas no intervalo de tempo inferior a 10 minutos após a preparação das suspensões.....	59
Figura 25. Imobilidade de <i>Daphnia similis</i> após 48 horas de exposição aos biossurfactantes produzidos pelo microorganismo <i>Bacillus subtilis</i> LSFM-05 (BioS). ....	61
Figura 26. (A) Fotografia das suspensões de CNT-LQES <sub>1</sub> em diferentes concentrações (1 a 90 mg/L) e intervalos de tempo (3 a 48 horas) após a dispersão com os biossurfactantes produzidos por <i>Bacillus subtilis</i> LSFM-05 (BioS, 0,25 g/L) em água mineral reconstituída; (B) Estabilidade das suspensões de CNT-LQES <sub>1</sub> após a dispersão com o BioS (0,25 g/L) em água mineral reconstituída; (C) Imobilidade de <i>Daphnia similis</i> após 48 horas de exposição aos CNT-LQES <sub>1</sub> (1 a 30 mg/L) dispersos com o BioS. ....	62
Figura 27. Medidas de Espalhamento de Luz Dinâmico [DLS] das suspensões de CNT-LQES <sub>1</sub> (5 mg/L) em água deionizada (linha vermelha) e em água mineral	

reconstituída (linha verde) após a dispersão com os biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* LFSM-05 (BioS; 0,25g/L). Os CNT-LQES<sub>1</sub> apresentaram um diâmetro médio de  $\sim 129 \pm 2,0$  nm e  $\sim 126 \pm 2,8$  nm em água deionizada e em água mineral reconstituída contendo o BioS, respectivamente. Estas medidas foram realizadas após 48 horas da preparação das suspensões..... 63

Figura 28. Estrutura primária dos biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* LFSM-05 presentes na amostra BioS: (A) Surfactina e (B) Fengicina..... 65

Figura 29. Imagens de microscopia óptica do microcrustáceo *Daphnia similis* em água mineral reconstituída após 48 horas de exposição: (A) Controle, biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* LFSM-05 (BioS) (0,25 g/L); (B) CNT-LQES<sub>1</sub> (10 mg/L); (C) CNT-LQES<sub>1</sub> (10 mg/L) disperso com BioS (0,25 g/L). ..... 66

Figura 30. Microscopia eletrônica de transmissão [TEM] da *Salmonella typhimurium*, linhagem TA 98, após incubação com os nanotubos de carbono purificados (CNT-LQES<sub>1</sub>). As setas indicam os nanotubos interagindo com superfície externa da membrana da bactéria. .... 70

Figura 31. Capacidade de remoção dos FCCs (DEBRIS) da solução de NaOH 0,1M (Efluente-Estoque) originados durante o processo de purificação dos nanotubos de carbono (CNT-L3) em função da quantidade hidrotalcita (HDT). ..... 73

Figura 32. Esquema do processo para tratamento de efluente contendo os fragmentos de carbono carboxilados (FCCs) pela utilização do material Hidrotalcita (HDT). (A) Os nanotubos oxidados após tratamentos com ácidos oxidantes contendo os FCCs adsorvidos na superfície; (B) Geração de efluente contendo FCCs dispersos em solução de NaOH (C) Etapa de remoção dos fragmentos da solução pela utilização do material HDT e (D) reciclagem do material HDT via tratamento térmico. .... 74



Figura 33. Capacidade de remoção dos FCCs (DEBRIS) da solução de NaOH 0,1M (Efluente-Estoque) originados durante o processo de purificação dos nanotubos de carbono (CNT-L3) em função da quantidade de sulfato de alumínio.....	75
Figura 34. (A) Efluente-Estoque contendo os FCCs dissolvidos em uma solução de NaOH 0,1M oriundos da purificação dos nanotubos de carbono (CNT-L3); (B) Efluente-Estoque após a remoção dos FCCs com a hidrotalcita (5 mg/mL); (C) Efluente-Estoque após a remoção dos FCCs com sulfato de alumínio (15 mg/mL)..	76
Figura 35. Porcentagem de adsorção da proteína albumina sérica bovina [BSA] nos nanotubos de carbono purificados (CNT-LQES) após a incubação por 12 horas [overnight] em solução tampão PBS pH 7.4, conforme descrito no item 4.4.2.....	80
Figura 36. Média $\pm$ desvio padrão dos títulos de IgG anti-BSA produzidos por camundongos geneticamente selecionados: (A) Linhagem H <sub>III</sub> ; alta resposta na produção de anticorpos; (B) Linhagem L <sub>III</sub> ; baixa resposta na produção de anticorpos. Os camundongos foram imunizados pela via subcutânea (n= 3 animais/grupo). RP – Resposta Primária; RS – Resposta Secundária. <sup>a,b</sup> Letras diferentes indicam que os valores são estatisticamente diferentes segundo o Teste-t com p<0,05.....	81
Figura 37. Imagens de microscopia de fluorescência dos Astrócitos primários após 72 horas de exposição aos CNT-LQES <sub>2</sub> (A) Controle; (B) 2,5 $\mu$ g/mL; (C) 5 $\mu$ g/mL; (D) 10 $\mu$ g/mL; (E) 25 $\mu$ g/mL e (F) 50 $\mu$ g/mL. As regiões em azul representam os núcleos celulares que foram marcados com DAPI.....	87
Figura 38. Número de células de Astrócitos primários após 24, 48 e 72 horas de exposição a concentrações crescentes de CNT-LQES <sub>2</sub> (0 a 50 $\mu$ g/mL). Foram inicialmente semeadas 2,0 x 10 <sup>4</sup> células/concentração de nanotubos no tempo zero hora (0h).....	87

Figura 39. Microscopia óptica das células de astrócitos primários após 72 horas de crescimento em placa. (A) Controle; (B) CNT-LQES<sub>2</sub> (25 µg/mL). ..... 88

Figura 40. Microscopia eletrônica de transmissão [TEM] dos astrócitos primários após a exposição aos CNT-LQES<sub>2</sub>. (A) A região limitada pelo círculo pontilhado indica os nanotubos aglomerados envoltos por um compartimento intracelular; (B) As setas indicam alguns nanotubos isolados e dispersos no citoplasma, localizados próximos a uma mitocôndria (organela citoplasmática). ..... 91

Figura 41. Microscopia de fluorescência dos astrócitos primários expostos aos CNT-LQES<sub>2</sub> (2,5; 5 e 10 µg/mL), após 72 horas de tratamento. As figuras A,D,G,J representam a marcação dos núcleos celulares (DNA) com o reagente DAPI (azul); as figuras B,E,H,K representam a marcação dos núcleos celulares (DNA lesionado) em processo de apoptose pelo teste de TUNEL (verde). As figuras C,F,I,L representam a sobreposição das duas marcações anteriores [DAPI + TUNEL]. ..... 93

Figura 42. Teste-RN: avaliação da influência dos CNT-LQES<sub>2</sub> sobre a remoção de nutrientes presentes no meio de cultura sobre o crescimento dos astrócitos primários. .... 95

Figura 42. Estabilidade dos CNT-LQES<sub>2</sub> em meio de cultura celular, após 72 horas: (A) Meio de cultura DMEM contendo 10% de soro fetal bovino (SFB); (B) CNT-LQES<sub>2</sub> (50 µg/mL) dispersos meio de cultura DMEM (sem adição de SFB); (C) CNT-LQES<sub>2</sub> (50 µg/mL) dispersos em meio de cultura DMEM contendo 10% de SFB. .... 96

Figura 43. Medidas de Espalhamento de Luz Dinâmico [DLS] das suspensões de CNT-LQES<sub>1</sub> (5 µg/mL) em água deionizada (linha vermelha). A linha verde representa os CNT-LQES<sub>2</sub> (5 µg/mL), após interação com o meio de cultura celular [DMEM com 10% de soro fetal bovino] em água deionizada (linha verde). Os CNT-LQES<sub>1</sub> apresentaram um diâmetro médio de ~ 123 ± 2,0 nm em água deionizada e ~

222 ± 66 nm após interação com meio de cultura celular (CNT-LQES<sub>2</sub>@corona). Estas análises foram realizadas para demonstrar a formação do revestimento de biomoléculas [corona] sobre os nanotubos provenientes do teste de remoção de nutrientes (Teste-RN), conforme descrito no item 4.4.3..... 96

Figura A-1. Análises termogravimétricas (TGA) dos nanotubos de carbono estudados. (A) CNT-L1 e CNT-LQES; (B) CNT-L3 e CNT-LQES<sub>1</sub> e (C) CNT-L3 e CNT-LQES<sub>2</sub>. As figuras inseridas dentro dos gráficos representam a temperatura de decomposição das amostras (T<sub>0</sub>). Estas análises foram realizadas em atmosfera oxidante (ar sintético) a 5°C/minuto e massa de 3,5 mg de amostra em cada corrida. .... 107

Figura A-2. Distribuição de frequência da relação entre a intensidade da banda D sobre a intensidade da banda G (I<sub>D</sub>/I<sub>G</sub>) originadas a partir das análises de espectroscopia Raman confocal das amostras no estado sólido: (A) CNT-LQES; (B) CNT-LQES<sub>1</sub> e (C) CNT-LQES<sub>2</sub>. .... 108

Figura A-3. Imobilidade das *Daphnia similis* após 48 horas de exposição aos CNT-LQES<sub>1</sub>. Neste teste foi esperado um intervalo de 2 horas após a preparação das suspensões para a introdução dos organismos no teste. .... 109

Figura A-4. Imobilidade de *Daphnia similis* após 48 horas de exposição a 60 µg/L de sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>) [Grupo I]. O Grupo II representa a modulação da toxicidade do CuSO<sub>4</sub> (60 µg/L) sobre a imobilidade de *Daphnia similis* após incubação com os CNT-LQES<sub>1</sub> (1 mg/L) e exposição por 48 horas no teste de toxicidade aguda..... 109

Figura A-5. (A) Espectroscopia infravermelho [FT-IR] e (B) Difractometria de raio- X [XRD] das amostras de hidrotalcitas (HDT) após adsorção com os DEBRIS. A Fotografia ilustra o material HDT (Mg-Al) sintetizado no LQES e após adsorção com DEBRIS. .... 110

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Alguns fatores que diferenciam os nanomateriais durante a avaliação dos seus efeitos adversos sobre os biossistemas *	18
Tabela 2. Condições experimentais empregadas para avaliação da formação dos fragmentos de carbono carboxilados (FCCs) após o tratamento oxidativo dos CNT-L3 com HNO <sub>3</sub> .	26
Tabela 3. Protocolo de imunização subcutânea dos camundongos H <sub>III</sub> e L <sub>III</sub>	33
Tabela 4. Caracterização físico-química dos nanotubos de carbono estudados.	40
Tabela 5. Avaliação da atividade mutagênica dos CNT-LQES <sub>1</sub> sobre linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i> na ausência (-) e presença (+) de ativação metabólica [S9]	69



## Abreviaturas, siglas e símbolos

$\delta$  = deformação

$\nu$  = estiramento

$\lambda$  = comprimento de onda

ABNT = Associação Brasileira de Normas Técnicas

Annexin-V = *cellular protein in the annexin group (cytotoxicity assay)*

BET = método para avaliação da área superficial

BioS = biossurfactante bruto de *Bacillus subtilis* LSFM-05

BSA = *bovine serum albumin*

CVD = deposição química de vapor (método de síntese de NTCs)

CL<sub>50</sub> = dose mínima para causar a morte de 50% da população estudada

CE<sub>50</sub> = dose mínima para causar uma resposta em 50% da população estudada

CE(I)<sub>50</sub> = dose mínima para causar a imobilidade de 50% das *Daphnia similis* no teste de toxicidade aguda.

CENO = concentração de efeito não observado

DLS = *Dynamic Scattering Light*

DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (meio para cultura de células)

DAPI = *diamidino phenylidole (DNA staining)*

EU = *European Union*

ELISA = *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

ESI FT-ICR/MS = *Electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry*

EDS = *energy-dispersive X-ray spectroscopy*

FCCs = fragmentos de carbono carboxilados [*oxidation debris*]

FT-IR = *Fourier transform infrared spectroscopy*

HDT = hidrotalcita (argila sintética)

LDH = *lactate dehydrogenase (citotoxicity assay)*

MTT = *Dimethylthiazol diphenyltetrazolium bromide (citotoxicity assay)*

NR = *neutral red (citotoxicity assay)*

N&N = nanociência e nanotecnologia

NTCs = nanotubos de carbono

NTCPS = nanotubos de carbono de parede simples

NTCPM = nanotubos de carbono de parede múltiplas

OPD = *o-phenylenediamine (ELISA reagent)*

PA = para análise

PBS = *phosphate buffered saline*

PI = *propidium iodide (citotoxicity assay)*

REACH = *Registration, Evaluation, Authorisation of Chemicals*

Raw = nanotubos bruto (amostra pós-síntese)

SEM = scanning electronic microscopy

SFB = soro fetal bovino

TUNEL = *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (citotoxicity assay)*

TEM = *Transmission electronic microscopy*

TGA = *Thermogravimetric analysis*

UV-Vis = *Ultraviolet-visible spectroscopy*

u.a. = unidades arbitrárias

## 1. Considerações iniciais

Um dos maiores desafios deste século é o desenvolvimento com sustentabilidade. Para isto, é consenso, que devemos buscar um modelo de gestão que contemple: viabilidade econômica, equilíbrio ambiental, inclusão com justiça social e preservação da diversidade cultural<sup>1-3</sup>. Naturalmente, a nanotecnologia deve ser incluída nessas discussões, por ser uma tecnologia em expansão e seus produtos (nanomateriais) apresentarem elevada reatividade química com aplicações em diversos setores industriais<sup>4,5</sup>.

As implicações da nanotecnologia podem ser observadas, por um lado, pela participação e cobrança de alguns setores da sociedade organizada em estabelecer marcos regulatórios, medidas de precaução e avaliação dos possíveis riscos para a saúde humana e ambiental<sup>6-9</sup>, e por outro, para a exploração do seu potencial econômico e científico-tecnológico, com o desenvolvimento de processos, metodologias e protocolos para síntese, preparação, purificação, funcionalização e caracterização físico-química de materiais em escala nanométrica. Segundo estimativas recentes, existem cerca de 2.450 tipos de nanomateriais disponíveis comercialmente [Nanowerk Nanomaterial Database<sup>TM</sup>]<sup>10</sup>.

Dentro deste contexto, duas novas áreas do conhecimento denominadas Bionanotecnologia e Nanotoxicologia estão emergindo, onde somente práticas de pesquisa multidisciplinares serão capazes de explorar a bionanointerface e responder, de maneira proativa, aos potenciais efeitos nocivos dos nanomateriais frente aos biosistemas<sup>11,12</sup>.

Contudo, neste emergente campo, uma das questões básicas é o próprio tratamento conceitual das entidades. Sem, obviamente, tirar a relevância dos



trabalhos, é, por exemplo, muito comum nos trabalhos da área de nanotecnologia a utilização da seguinte frase: *...interação de nanomateriais com sistemas biológicos...*; contudo, não se esclarece o que se entende por sistemas biológicos ou biosistemas. Pela bibliografia observa-se que, não existe uma definição consensual estabelecida, e nem rigor na utilização destes termos<sup>13-15</sup>. Aparentemente, o que temos é uma noção ou conceitos em construção<sup>16-18</sup>. Na Biologia, o conceito corrente adotado para estes termos advém da influência de abordagens sistêmicas depois da década de 50, com os biosistemas podendo ser entendidos como um complexo conjunto de elementos correlacionados envolvendo componentes do mundo vivo<sup>19,20</sup>.

Um dos aspectos fundamentais ressaltados pela abordagem sistêmica no estudo de sistemas vivos é o fato de concebê-los como sendo hierarquicamente organizados (das biomoléculas à biosfera), e sua essência é a interconectividade entre todos os níveis envolvidos na organização, construída e apurada ao longo de 3,5 bilhões de anos de vida na Terra<sup>21</sup>. É, portanto, primordial tratar as interações entre os nanomateriais e os sistemas biológicos a partir de níveis hierárquicos.

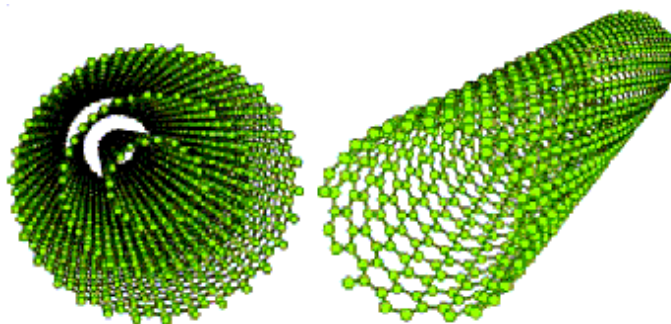
Assim, direcionado a explorar a interface entre os nanomateriais e os biosistemas, tendo em vista perspectivas de sua utilização de maneira segura e ambientalmente equilibrada, buscamos neste trabalho estudar os aspectos químicos da purificação e caracterização físico-química de nanotubos de carbono, bem como suas interações com diferentes níveis da organização dos biosistemas (**Apêndice, item 8.1**). Embora não foi possível, por limitações teóricas, utilizar abordagens sistêmicas como referência nas discussões dos nossos resultados, a forma como este trabalho foi estruturalmente organizado busca refletir estas perspectivas. Por isso, o trabalho foi experimentalmente estruturado, as interações entre os nanotubos purificados e os biosistemas selecionados, destacando alguns dos bem definidos

níveis de organização hierárquica, conforme prescreve a abordagem sistêmica: o ecológico, o imunológico e o celular-molecular. Desse modo, este trabalho foi uma iniciativa na direção destas necessárias pesquisas multidisciplinares na interface teoria-experimento.

## 2. Introdução

### 2.1. Nanotubos de Carbono

Atualmente há um grande interesse em Nanociência e Nanotecnologia (N&N)<sup>22</sup> e os nanotubos de carbono (NTCs) estão em foco<sup>23,24</sup>, uma vez que eles apresentam diversificadas aplicações nas indústrias de eletrônica, materiais e biotecnologias voltadas para saúde, agricultura e meio ambiente, devido suas exclusivas propriedades físicas e versatilidade química<sup>25,26</sup>. Os NTCs foram anunciados por Morinobu Endo (1988)<sup>27</sup> e Sumio Iijima (1991)<sup>28</sup>, e podem ser descritos como uma camada de grafite (grafeno) enrolada, produzindo cilindros ou tubos. Os NTCs podem ser classificados em: a) nanotubos de carbono de parede simples (NTCPS), formados por apenas um cilindro de grafite e b) nanotubos de carbono de paredes múltiplas (NTCPM) constituídos de vários cilindros concêntricos de grafite, com espaçamento de 0,34-0,39 nm entre as paredes. Os NTCPS possuem diâmetro variando de 0,5 a 1,5 nm e comprimento de poucos nanômetros até micrometros. Os NTCPM adotam maior número de configurações e formas do que os NTCPS, com maior variação no diâmetro (2 a 100 nm) e comprimento de poucos micrometros até centenas de micrometros<sup>29</sup> (**Figura 1**).

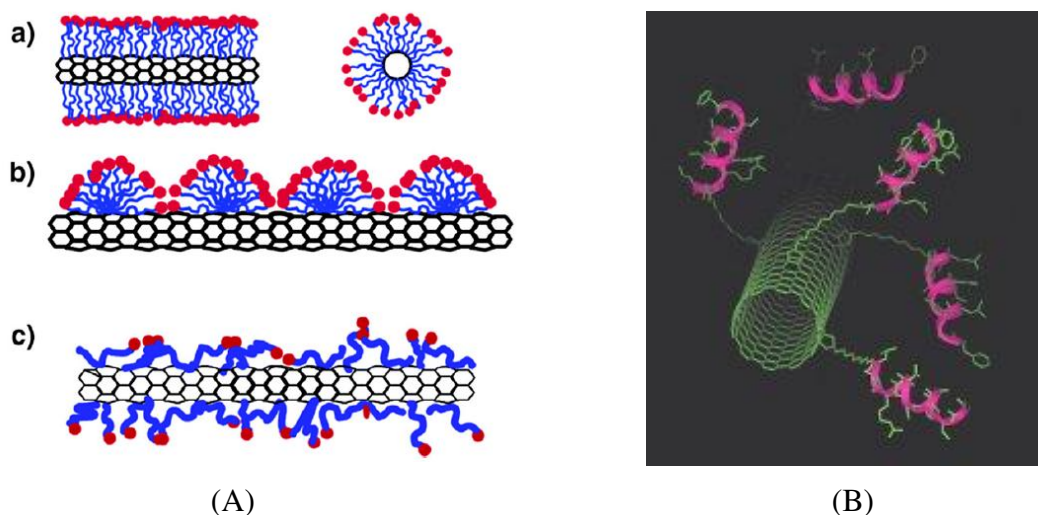


**Figura 1.** Ilustração dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas (esquerda) e de parede simples (direita). Adaptado de A. J. G. Zarbin<sup>23</sup>.

Existem muitos métodos para síntese de nanotubos de carbono relatados na literatura, e as três técnicas comumente utilizadas são: descarga por arco, ablação por laser e deposição química de vapor [CVD]<sup>30</sup>. Frequentemente, os grupos de pesquisa adquirem os NTCs de laboratórios acadêmicos ou comercialmente, pois há dezenas de empresas comercializando estes nanomateriais para fins industriais e de pesquisa científica<sup>31</sup>. Atualmente, a produção mundial de NTCs ultrapassa 1.000 toneladas/ano<sup>32</sup>. No Brasil, a Petrobras, juntamente com a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) está implantando uma fábrica para produção de nanotubos de carbono<sup>33</sup>.

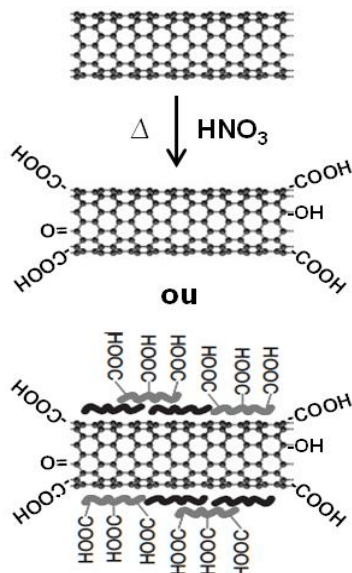
Os NTCs no estágio pós-síntese [raw] estão altamente aglomerados e com baixa dispersabilidade em qualquer tipo de solvente. Esta aglomeração se dá pela ocorrência das forças de van der Waals entre nanotubos, levando a formação de feixes [bundles]. Desse modo, dependendo das aplicações almejadas, há a necessidade de desfazer estes aglomerados e obter os NTCs no seu estado isolado ou disperso em meio líquido via funcionalização.

Funcionalização é um processo de modificação das paredes, pontas ou do interior dos nanotubos de carbono pela introdução de espécies químicas de interesse. Este processo é crucial para as aplicações destes nanomateriais, pois abre a perspectiva para obtenção de diferentes funcionalidades (idéia de finalidade) a estes materiais, permitindo assim, a exploração e modulação de suas propriedades físicas intrínsecas, a obtenção de novas propriedades e o desenvolvimento de sistemas híbridos multifuncionais através de modificações químicas<sup>34,35</sup>. Nesse sentido, várias abordagens para funcionalização de NTCs vêm sendo propostas, e com base na natureza das ligações químicas envolvidas podemos classificar os tipos de funcionalização em: não-covalente e covalente<sup>36,37</sup> (**Figura 2**).



**Figura 2.** Tipos de funcionalização de nanotubos de carbono: (A) *não-covalente*; esquema demonstrando os três modos como surfactantes atuam na dispersão dos nanotubos de carbono de parede simples; a) micelar, b) hemi-micelar e c) aleatório<sup>38</sup>; (B) *covalente*; esquema ilustrando a funcionalização de nanotubos de carbono de parede simples com peptídeos via reação de cicloadição 1,3-dipolar<sup>39</sup>.

De igual importância aos processos de funcionalização, são os processos de purificação de NTCs, pois as amostras apresentam quantidades variáveis de resíduos após seu processo de síntese, geralmente, estes são resíduos de catalisadores metálicos (e.g. Fe, Ni, Co) e materiais carbonáceos (e.g. carbono amorfo)<sup>40</sup>. Assim, dependendo das aplicações almejadas, é necessário purificar estas amostras. Contudo, dependendo do processo de purificação empregado, grupamentos oxigenados (e.g. -OH, -COOH, C=O) e fragmentos de carbono carboxilados (FCCs) serão gerados na superfície dos nanotubos após tratamentos químicos com ácidos oxidantes (e.g. HNO<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), amplamente utilizados nos processos de purificação de NTCs<sup>41</sup> (**Figura 3**). Entretanto, a geração e influência destes FCCs durante os processos de purificação de nanotubos de carbono foram pouco estudadas até o momento<sup>42</sup>. Em alguns casos, se faz necessário revisitar trabalhos publicados na literatura, pois a presença destes FCCs na superfície dos nanotubos pode interferir na funcionalização de NTCs<sup>43</sup>.



**Figura 3.** Esquema representando a geração de grupamentos oxigenados superficiais e fragmentos de carbono carboxilados (FCCs) adsorvidos na superfície dos NTCs após o tratamento oxidativo com  $\text{HNO}_3$ . Adaptado de Salzmann e colaboradores<sup>41</sup>

No campo das ciências biológicas e biotecnologias os NTCs emergem como uma plataforma de pesquisa para interação com sistemas biológicos<sup>44-47</sup>. As principais motivações são:

[a] tamanho nanométrico equivalente com as dimensões das biomacromoléculas e células;

[b] capacidade de penetração intracelular;

[c] as superfícies e o interior dos nanotubos podem ser estrategicamente funcionalizados;

[d] potencial de inovação tecnológica.

Por outro lado, recentemente, começaram as discussões sobre a necessidade de padronização, regulamentação e certificações para os nanomateriais<sup>48</sup>. Nesta mesma direção, estão as questões relacionadas à segurança dos nanomateriais para

saúde humana e ambiental<sup>7</sup>. Alguns motivos para atenção e cautela com os NTCs são:

[a] produção industrial em larga escala (aumento do risco de exposição);

[b] alta reatividade química (área superficial elevada);

[c] enorme diversidade composicional e estrutural (síntese, modificações e impurezas);

[d] os estudos toxicológicos tradicionais não estão adaptados para nanomateriais, dado o rápido avanço da área e a carência de trabalhos sistemáticos e integrados.

Desse modo, ainda não existe consenso sobre a biosegurança dos nanotubos de carbono. Uma das raízes do problema está na etapa de síntese destes materiais, pois não é ainda possível controlar todos os parâmetros ou características dos NTCs durante o processo de síntese e, dependendo da metodologia de síntese empregada, ocorrerá a produção de NTCs com diferentes morfologias, defeitos estruturais, dopantes, distribuição de tamanhos e impurezas. Portanto, uma consequência direta deste fato é a dificuldade na comparação dos resultados publicados na literatura<sup>49,50</sup>.

Diante do exposto, uma importante etapa em estudos biológicos envolvendo nanotubos de carbono é compreender (qualitativa e quantitativamente) a amostra estudada, uma vez que os reflexos e interações com os biosistemas serão, em grande parte, orientados por suas características físico-químicas<sup>51</sup>. No entanto, o desenvolvimento de uma completa caracterização de NTCs não é uma tarefa fácil, uma vez que é necessário o emprego de várias técnicas ou métodos físico-químicos de caracterização de materiais de maneira integrada<sup>52-57</sup>.

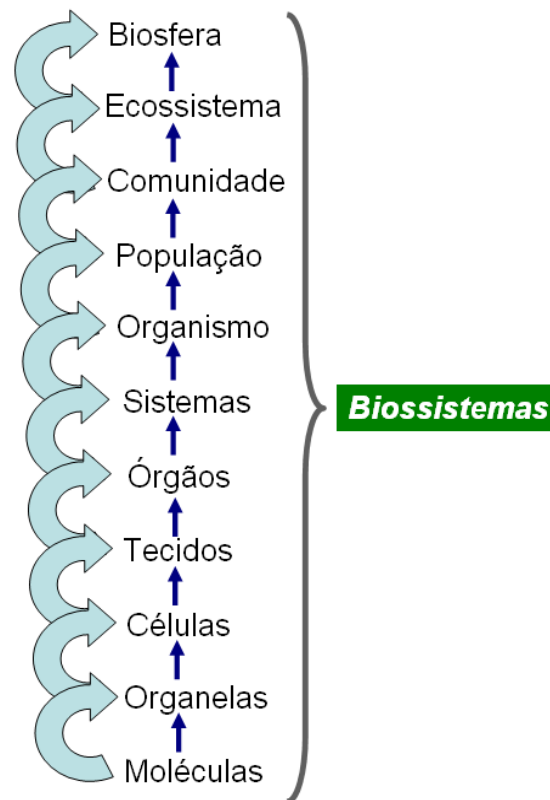
## 2.2. Sobre os Biosistemas e a Bionanointerface

O termo "Biosistema" representa um complexo conjunto de elementos correlacionados envolvendo componentes do mundo vivo, os quais estão estruturados em níveis hierárquicos de organização: biomoléculas < vias metabólicas < organelas < células < tecidos < órgãos < sistemas < organismos < comunidades < ecossistemas < biosfera<sup>58</sup> (**Figura 4**). Os biosistemas são termodinamicamente abertos, encontram-se permeados por ordens e desordens em um equilíbrio dinâmico (longe do equilíbrio termodinâmico), absorvem, transformam, armazenam e produzem compostos, energia e informação de maneira sofisticada, construída ao longo do processo evolutivo da vida na terra<sup>21,59,60</sup>. No **item 8.2. (Apêndice)**, estão apresentados os *pontos centrais* da organização e dinâmica dos biosistemas, os quais devem balizar discussões envolvendo componentes do mundo vivo. O reconhecimento da relevância destes pontos centrais pode proporcionar uma "unidade conceitual" rumo à implantação e consolidação de uma Nova Biologia [New Biology], capaz de integrar e re-integrar conhecimentos para promover um profundo entendimento dos biosistemas, um dos pilares para o desenvolvimento sustentável<sup>58</sup>.

O reconhecimento destes *níveis de organização* teve um papel fundamental na transformação da História Natural em Biologia enquanto disciplina, isto é, na passagem de ciência da classificação das características morfológicas à dos mecanismos de funcionamento. A partir do momento em que a relação órgão-função foi estabelecida, a noção de organização, com a sua dupla implicação estrutural e funcional, tornou-se uma das noções fundamentais da biologia<sup>61</sup>. Com a elucidação da estrutura do DNA e dos "mecanismos" da expressão gênica a partir de 1953, uma verdadeira revolução molecular ocorreu no pensamento biológico, que culminou nas modernas biotecnologias (e.g. tecnologia do DNA recombinante,



terapias gênicas, clonagens, transgênicos e etc)<sup>62</sup>. Assim, em função destes níveis de organização, foram criados os principais periódicos científicos, disciplinas (e.g. biofísica, bioquímica, genética, microbiologia, citologia, histologia, imunologia, neurologia, ecologia e etc) e departamentos universitários da área biológica, tendo como objetivo avançar no entendimento da relação estrutura-função [structure-function relationship] nos diferentes níveis da organização biológica.



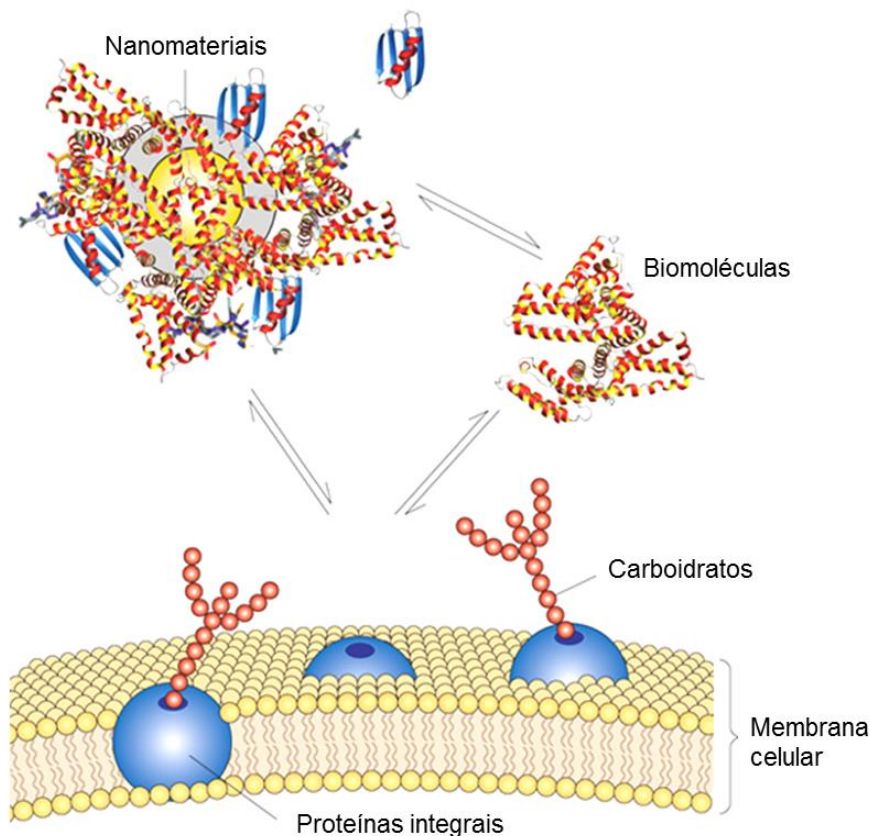
**Figura 4.** Níveis hierárquicos da organização dos biossistemas. Adaptado do *Committee on New Biology for 21st century*<sup>58</sup>.

Nos dias atuais, o estudo de sistemas vivos pode ser dividido em dois ramos bem definidos: *biologia funcional* (mecanicista) e *biologia histórica* (evolucionista). A biologia funcional lida com o entendimento da fisiologia dos organismos, sobretudo de todos os processos celulares. Sendo que, em geral, estes processos podem ser explicados de maneira puramente mecanicista através de

química e física. Assim, conhecimentos de história não são necessários para a explicação de um processo puramente funcional. No entanto, são indispensáveis para a explicação de todos os aspectos do mundo vivo que envolve a dimensão de *tempo histórico*, em outras palavras, aspectos que lidam com a evolução. Este campo é a biologia histórica. A distinção atual destes dois ramos da biologia é devido ao fato que todo fenômeno ou processo em organismos vivos ser o resultado de duas causas separadas, que são chamadas geralmente de "causas próximas" (funcionais) e "causas últimas" (evolutivas)<sup>63,64</sup>.

Como representantes desta dualidade operante em biosistemas e sua importância para a resolução de problemas, visando à sustentabilidade, temos incentivos para a adoção de abordagens sistêmicas<sup>19,65</sup>. Estas novas formas de pensamento trazem propostas mais amplas para a problemática<sup>66</sup>. Embora tenhamos uma imensa soma de dados da organização biológica (das biomoléculas aos ecossistemas) não temos uma teoria ‘sobre’ a organização biológica, isto é, um modelo conceitual que permita a explicação de fatos empíricos<sup>67</sup>. Esta tendência em abordagens de sistemas pode ser claramente observada pela recente disseminação das disciplinas denominadas: biologia sistêmica [systems biology], biologia computacional [computational biology] e biologia sintética [synthetic biology], as quais estão sendo consideradas como as ciências de base para a consolidação de uma Nova Biologia [New Biology] no século XXI<sup>58</sup>. Contudo, podemos considerar que foi o desenvolvimento de ferramentas para a manipulação e visualização de biomacromoléculas (ácidos nucleicos, carboidratos e proteínas) e células que suportaram os principais avanços nas ciências biológicas ao longo do século XX, especialmente, no ramo da biologia funcional. Todavia, em paralelo a estes desenvolvimentos, as ciências físicas e químicas desenvolveram grande capacidade de *entender, modificar e controlar* a matéria inanimada na nanoescala, ficando cada

vez mais evidente que a redução do tamanho dos materiais leva ao surgimento de novas propriedades físicas e químicas, devido ao aparecimento de efeitos quânticos de tamanho e de superfícies<sup>68,69</sup>. Ou seja, um material com seu tamanho reduzido à escala nanométrica pode apresentar propriedades eletrônicas, mecânicas e térmicas diferentes quando em seu estado de sólido estendido [bulk]. Outra consequência da redução do tamanho dos materiais é o aumento da área superficial específica, devido o aumento significativo na quantidade de átomos superficiais em relação ao volume total da partícula, alterando assim, sua reatividade química. Logicamente, uma vez que as biomacromoléculas e a unidade básica da vida (células) estão compreendidas na mesma escala de tamanho que estes nanomateriais, eles podem interagir quando colocados em contato, havendo a formação da bionanointerface<sup>70-72</sup> (Figura 5).



**Figura 5.** A formação da bionanointerface. Adaptado de Lynch e colaboradores<sup>70</sup>.

As implicações tecnológicas desta bionanointerface vêm sendo denominada como Bionanotecnologia, Nanobiotecnologia ou Nanotecnologia Biológica, com desdobramentos nas áreas da saúde, agricultura e meio ambiente, visto que estão sendo planejados e construídos nanossistemas com a capacidade de interagir com os níveis inferiores da organização biológica<sup>73-75</sup>. Desse modo, dependendo da natureza destas interações, irão ocorrer reflexos sobre os níveis superiores da organização do biosistemas, dado a interconectividade entre todos os níveis<sup>76</sup>.

O interesse pela nanotecnologia biológica pode ser claramente observado pela surpreendente quantidade de livros editados, artigos publicados, pedidos de patente e investimentos de empresas e governos nesta área nos últimos 10 anos. Por exemplo, somente para nanotubos de carbono e sua interface biológica existem aproximadamente 6.700 trabalhos indexados no *ISI Web of Science* até o momento (agosto de 2011), relatando em geral:

[a] sistemas para transporte de moléculas biologicamente ativas, como fármacos, proteínas e ácidos nucleicos<sup>77-79</sup>;

[b] materiais para implantes e engenharia de tecidos<sup>80</sup>;

[c] sensores biológicos<sup>81</sup>;

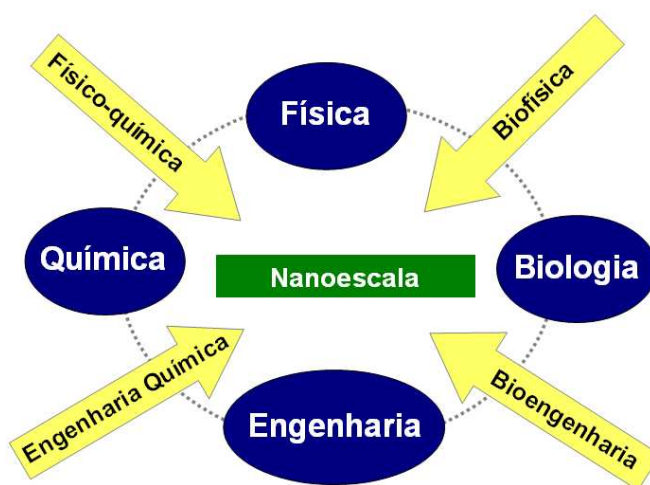
[d] bionanocompósitos<sup>82,83</sup>;

[e] materiais para remediação de poluentes ambientais<sup>84</sup>;

[d] interação com biomacromoléculas<sup>85</sup>;

[f] estudos de toxicidade *in vitro*, *in vivo* e *in silico*<sup>13,51</sup>.

Na verdade, é especial e particular esse momento histórico da ciência, tecnologia & inovação (CT&I), caracterizado pela convergência de diferentes disciplinas para a escala nanométrica<sup>86</sup> (**Figura 6**). O surgimento de centros de pesquisa, programas de pós-graduação e graduação em nanossistemas reforçam esta tendência, dado que o interesse na nanoescala advém não apenas em explorar a miniaturização dos materiais, mas sim, a possibilidade de se obter propriedades intermediárias aos regimes moleculares e macroscópicos, como nos sólidos estendidos [bulk]<sup>69</sup>.



**Figura 6.** Convergência de algumas disciplinas científicas e tecnológicas para a nanoescala.

Entretanto, apesar da grande expectativa quanto ao potencial da N&N, devido "domínio" sobre a matéria em nanoescala, é importante e necessário manter uma visão abrangente sobre a interação de nanomateriais com biosistemas, pois estes são sistemas auto-organizados (espaço-temporalmente) através de redes, onde propriedades emergentes surgem a cada nível de organização<sup>87</sup>. De tal modo que, a "morte" de um biosistema ocorre quando há a desintegração dessas redes. Ou então, podem surgir "processos de adaptação" pela seleção de novas redes pelo sistema, dado que as conexões entre os elementos dessas redes estão diretamente

relacionadas com a estabilidade química e bioquímica do sistema vivo (e.g. homeostase)<sup>88</sup>. Desse modo, evidentemente, desenvolver um entendimento integrado da interação dos nanomateriais sobre os diferentes níveis da organização biológica e suas inter-relações constitui um dos maiores desafios destas áreas do conhecimento<sup>14</sup>.

### 2.3. O surgimento da Nanotoxicologia

É consenso que devemos proteger a biodiversidade em todos os três níveis (genes, espécies e ecossistemas), pois os seres humanos são dependentes desta diversidade biológica para sua permanência sustentável na Terra<sup>89</sup>. A conferência de Estocolmo em 1972 e a ECO-92 (Rio de Janeiro, 1992) foram marcos mundiais desta preocupação, reunindo chefes de estados para discutir medidas para preservação da biodiversidade global e dos recursos naturais. Certamente, este é um dos maiores desafios já postos para humanidade. Dado que, em última instância, preservar a biodiversidade e os recursos naturais é uma questão cultural. No entanto, os diferentes setores da sociedade devem contribuir e de forma rápida<sup>90,91</sup>

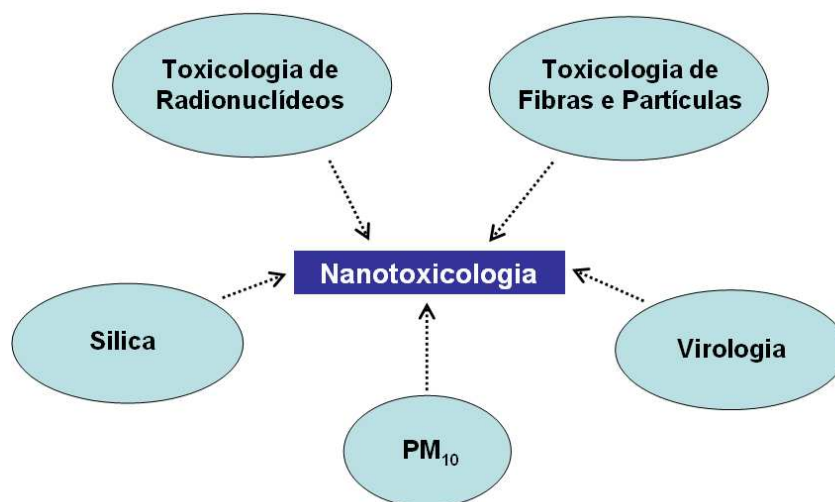
Em 2007, a União Européia [EU] estabeleceu um marco legislativo para *tentar* garantir o uso de agentes químicos de maneira segura, o qual foi denominado REACH [Registration, Evaluation, Authorisation of Chemicals]<sup>92</sup>. Apenas para exemplificar a problemática, existem atualmente cerca de 30.000 agentes químicos que precisam ser avaliados ou re-avaliados quanto aos seus potenciais efeitos adversos para a saúde humana e ambiental. Também para contribuir nesta direção, a Agência de Proteção Ambiental [EPA], dos Estados Unidos fundou um programa estratégico denominado *ToxCast Programme*<sup>93</sup>. Neste cenário, a toxicologia passa a ser uma disciplina central dentro da cadeia do desenvolvimento industrial sustentado. Esta disciplina combina conceitos e métodos de várias áreas do

conhecimento para estudar os efeitos adversos de agentes de natureza física, química ou biológica sobre os biosistemas, tendo como meta: diagnosticar, tratar e prevenir a intoxicação<sup>94,95</sup>. A toxicologia que no seu início teve como foco principal a saúde humana, entretanto, mais recentemente, incorporou em seu escopo a saúde ambiental. Para isto, diferentes divisões foram criadas dentro desta disciplina (e.g. toxicologia experimental, toxicologia analítica, toxicologia forense, toxicologia ocupacional, toxicologia ambiental, toxicologia regulatória e etc).

Apesar de a toxicologia ser uma disciplina clássica, algumas divisões dentro desta disciplina ainda não estão bem consolidadas, como por exemplo, a toxicologia regulatória, cujo métodos ainda não estão robustos o suficiente para garantir correlações diretas ou predições entre os resultados obtidos nos modelos experimentais, utilizando animais de laboratório, com a adoção de medidas para biossegurança. Considerando estes aspectos, Thomas Hartung, aponta para uma mudança radical nas ciências toxicológicas para este século frente à complexidade dos problemas e objetivos propostos<sup>96,97</sup>.

Dentro do contexto da N&N, o problema da avaliação toxicológica e a adoção de medidas de biossegurança se agravam, pois tem sido demonstrado que estudos toxicológicos envolvendo nanomateriais exigem atenção especial, pois estes materiais apresentam características exclusivas e dependentes do tamanho, as quais podem influenciar na determinação dos seus efeitos toxicológicos<sup>6,98</sup>. Todavia, o cerne destas discussões reside na diferença físico-química fundamental entre os toxicantes estudados. A toxicologia clássica, em geral, está fortemente comprometida com o estudo de agentes toxicantes que geralmente são *moléculas*, enquanto que em N&N são estudados *partículas* cujo tamanho está na escala nanométrica.

As implicações toxicológicas desta dualidade (moléculas *versus* nanopartículas) e o rápido crescimento na quantidade e diversidade de nanomateriais motivaram o surgimento da nanotoxicologia, uma nova disciplina científica que tem como missão nortear o desenvolvimento seguro e sustentável da N&N<sup>99</sup>. Os principais conceitos da nanotoxicologia foram pioneiramente apresentados na revisão, altamente citada, de Oberdorster e colaboradores, em 2005<sup>100</sup>. Em 2007, foi lançado o periódico científico denominado *Nanotoxicology*<sup>101</sup>, juntamente com o primeiro livro desta área [Nanotoxicology: Characterization, Dosing and Health Effects] pela editora *Informa Healthcare*. No entanto, historicamente, a toxicologia de nanomateriais pode ser compreendida como a convergência para a nanoescala de diferentes disciplinas envolvidas com o estudo de partículas ultrafinas, de origem antropogênica ou natural, que ocorre há mais de 20 anos<sup>102</sup> (**Figura 7**).



**Figura 7.** Surgimento da Nanotoxicologia: convergência de conhecimentos e disciplinas envolvendo materiais particulados. Adaptado de Oberdorster e colaboradores<sup>102</sup>

Na **Tabela 1** estão relacionados os principais fatores que justificam a atenção especial durante a avaliação toxicológica de nanomateriais, uma vez que estes



fatores podem influenciar no alicerce da toxicologia: a determinação da curva dose-resposta<sup>103</sup>.

**Tabela 1.** Alguns fatores que diferenciam os nanomateriais durante a avaliação dos seus efeitos adversos sobre os biossistemas\*.

Toxicologia Clássica	Nanotoxicologia
[1] dose-concentração	[1] dose-concentração [2] tamanho [3] composição, estrutura e morfologia [4] área superficial [5] grupos superficiais [6] carga superficial

\*Esta comparação foi realizada considerando apenas a natureza dos agentes toxicantes estudados na toxicologia clássica (moléculas) e em nanotoxicologia (partículas), pois estes fatores nortearão as explicações mecanicistas dos efeitos adversos sobre os biossistemas.

Um aspecto necessário para a gestão de informações toxicológicas é a definição dos agentes estudados em diferentes categoriais ou classes. Nesse sentido, a União Européia estabeleceu um comitê executivo para classificar os nanomateriais de acordo com as diretrizes da legislação REACH. Porém, surge uma questão básica. Quais pré-requisitos devem ter um agente para ser considerado um nanomaterial? Em 2009, o comitê executivo da EU apresentou a seguinte definição para nanomateriais: *"a material that consists of particles with one or more external dimensions in the size range 1 nm–100 nm for more than 1% of their number"; and/or "has internal or surface structures in one or more dimensions in the size range 1 nm–100 nm"; and/or "has a specific surface area by volume greater than 60 m<sup>2</sup> cm<sup>-3</sup>, excluding materials consisting of particles with a size lower than 1 nm"*<sup>104</sup>.

Apesar da necessidade de definições para fins classificatórios e regulatórios, envolvendo os nanomateriais, no entanto, é preciso ter a consciência que esta definição proposta pelo comitê executivo da EU, foi uma decisão *política*, pois ainda não existem evidências ou argumentos *científicos* que suportem a necessidade de uma definição para nanomateriais capaz de distingui-los de seu estado de sólido estendido [bulk] ou de outros materiais particulados convencionais. Nesse sentido, Andrew Maynard, diretor do *Risk Science Centre* da Universidade de Michigan sugere: "*Don't define nanomaterials*"<sup>105</sup>. Esta afirmação vem no sentido de que devemos tentar classificar os nanomateriais com base na observação científica de novas propriedades e fenômenos oriundos da nanoescala, e não apenas pelo tamanho nanométrico<sup>106</sup>. Aparentemente, após uma análise destes últimos cinco anos desta emergente área, podemos constatar que será necessário desenvolver uma toxicologia capaz de lidar, proativamente, com materiais que estão ficando cada vez mais sofisticados<sup>98,105,107</sup>. Um exemplo desta necessidade é que além dos fatores citados na **Tabela 1**, que são relacionados às características físico-químicas intrínsecas dos nanomateriais, uma nova *identidade* denominada de *protein corona* está surgindo na área de nanotoxicologia<sup>108</sup>. Basicamente, os nanomateriais ao entrar em contato com fluidos biológicos (e.g. plasma sanguíneo, fluidos intersticiais, meios de cultura celulares e matéria orgânica dissolvida) rapidamente interagirão com as biomoléculas presentes nestes fluidos. De modo que, dependendo da natureza destas interações, as biomoléculas formarão um revestimento [corona] sobre a superfície dos nanomateriais, o qual influenciará no modo como as células reconhecem os nanomateriais<sup>109</sup>. Assim, os aspectos físico-químicos desta nova identidade [nanomaterials@corona] e suas implicações biológicas-toxicológicas precisam ser elucidadas<sup>110,111</sup>.

### 3. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi estudar os aspectos químicos da purificação e caracterização de nanotubos de carbono de paredes múltiplas, bem como suas interações com diferentes níveis de organização dos biosistemas: Ecológico, Imunológico e Celular-molecular.

#### **Objetivos específicos (aspectos químicos):**

[1] Purificar nanotubos de carbono de parede múltiplas via tratamentos químicos;

[2] Desenvolver uma caracterização físico-química integrada e concisa dos nanotubos purificados;

[3] Estudar a formação dos fragmentos de carbono carboxilados (FCCs) durante o tratamento oxidativo dos nanotubos de carbono com  $\text{HNO}_3$  através de planejamento fatorial experimental;

[4] Caracterizar os FCCs através das técnicas de Espectroscopia de Ultravioleta-visível [UV-Vis] e Infravermelho [FT-IR], e Espectrometria de massas de alta resolução [ESI FT-ICR/MS].

#### **Objetivos específicos (interação com biosistemas):**

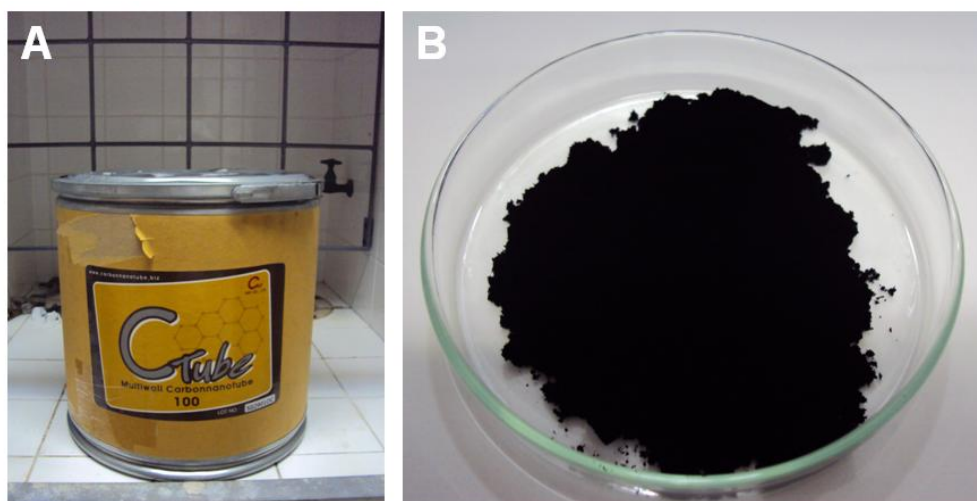
[1] *Nível Ecológico*: a) avaliar os efeitos ecotoxicológicos dos nanotubos de carbono purificados (toxicidade aguda sobre *Daphnia similis* e mutagenicidade sobre linhagens de *Salmonella typhimurium*); b) aplicar conceitos da área de Ecologia Industrial no tratamento de efluente contendo FCCs gerados durante a purificação dos nanotubos de carbono utilizando materiais do tipo hidrotalcitas e sulfato de alumínio;

[2] *Nível Imunológico*: avaliar o efeito imunomodulatório dos nanotubos de carbono purificados em camundongos geneticamente selecionados;

[3] *Nível Celular-molecular*: avaliar a citotoxicidade de nanotubos de carbono purificados sobre células de Astrócitos primários *in vitro*.

## 4. Materiais e Métodos

Neste trabalho foram utilizados nanotubos de carbono de paredes múltiplas (NTCPM), marca *Ctube 100*, obtidos da empresa CNT Co. Ltd [Incheon, Coréia] (**Figura 8**). Foram utilizados dois lotes obtidos em períodos diferentes, que foram denominados NTCPM *raw* Lote 1 (CNT-L1) e NTCPM *raw* Lote 3 (CNT-L3). Estes NTCPM *raw* foram sintetizados pelo método de deposição química de vapor [CVD] e apresentam distribuição de tamanho entre 10 a 40 nm (diâmetro) e 1 a 25  $\mu\text{m}$  (comprimento).



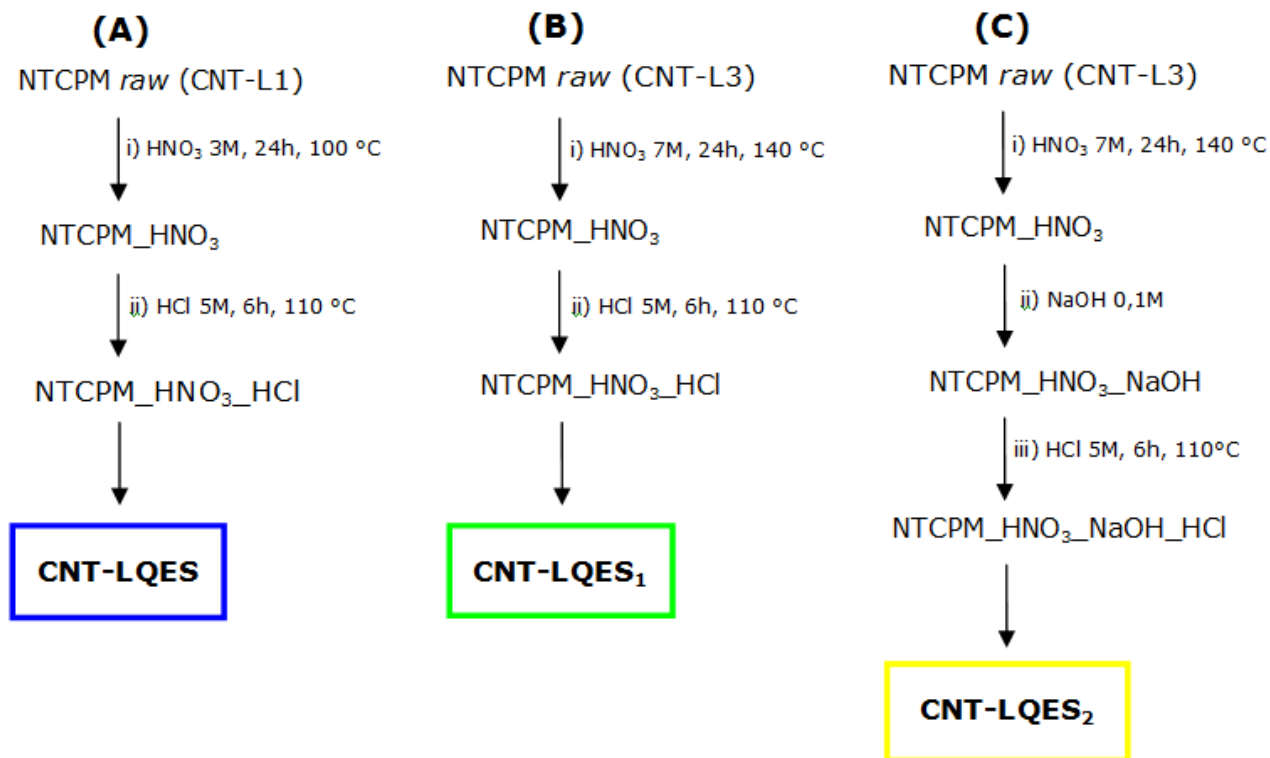
**Figura 8.** (A) Nanotubos de carbono de paredes múltiplas da marca *Ctube 100* obtidos da empresa CNT Co. Ltd.; (B) Fotografia dos nanotubos no estado sólido.

### 4.1. Purificação dos nanotubos de carbono

Os NTCPMs *raw* (CNT-L1 e CNT-L3) foram purificados através de tratamentos químicos com  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{HCl}$  e  $\text{NaOH}$  sob agitação magnética em sistema de refluxo convencional (**Figura 9**). As etapas empregadas para obtenção das amostras finais (CNT-LQES, CNT-LQES<sub>1</sub> e CNT-LQES<sub>2</sub>) estão representadas na **Figura 10**.



**Figura 9.** Fotografia do sistema de refluxo utilizado para a purificação dos nanotubos de carbono de parede múltiplas.



**Figura 10.** Tratamentos químicos empregados na purificação dos nanotubos de carbono de parede múltiplas estudados nesta tese: (A) CNT-LQES, (B) CNT-LQES<sub>1</sub> e (C) CNT-LQES<sub>2</sub>.

Em todos os tratamentos foi mantida a relação 5:1 (mg de nanotubos/mL de solução). Após cada etapa destes tratamentos, as amostras foram lavadas com água destiladas até  $\text{pH} > 6,0$  utilizando sistema de microfiltração da Millipore<sup>®</sup> (membrana de PVDF 0,2  $\mu\text{m}$ ). Em seguida, os nanotubos foram secos em linha de vácuo e armazenados à temperatura ambiente. O tratamento com NaOH 0,1M [15 minutos em ultra-som de banho (Cole-Parmer 8891) seguido de agitação magnética convencional por 1 hora em temperatura ambiente] foi empregado durante a preparação da amostra CNT-LQES<sub>2</sub> para remoção dos fragmentos de carbono carboxilados (FCCs).

#### 4.2. Caracterização físico-química dos nanotubos de carbono purificados

As amostras de nanotubos de carbono de paredes múltiplas denominadas CNT-L1, CNT-L3, CNT-LQES, CNT-LQES<sub>1</sub> e CNT-LQES<sub>2</sub> foram caracterizadas pelos seguintes métodos:

- a) *Espectroscopia de energia dispersiva* [EDS]: As amostras no estado sólido foram depositadas sobre uma fita de carbono, comumente utilizada para análise elementar qualitativa por raios-X, utilizando o analisador acoplado ao microscópio eletrônico de varredura da marca JEOL 6360-VL.
- b) *Análise termogravimétrica* [TGA]: 3,5 mg de cada amostra foi adicionada em uma panelinha de platina e analisadas no equipamento SDTQ600 da *TA Instruments*. Condições da corrida: fluxo de ar sintético (100 mL/min.) com taxa de aquecimento de 5°C/min.
- c) *Pesagem do resíduo metálico*: Após as corridas de TGA os resíduos metálicos finais (óxido de ferro) retidos nas panelinhas de platina foram

cuidadosamente removidos e pesados em microbalança analítica (*AD-6 Perkin Elmer*). Para determinação da pureza das amostras foi subtraído o valor do resíduo metálico final da massa inicial de nanotubos antes corrida do TGA<sup>112</sup>.

- d) *Microscopia eletrônica de varredura* [SEM]: As micrografias das amostras de nanotubos foram obtidas em microscópio eletrônico da marca *FEI NanoLab200*. Primeiramente, suspensões diluídas das amostras em Etanol PA foram preparadas e em seguida 10  $\mu$ L de cada amostra foram gotejados sobre uma placa de silício. Após a secagem em temperatura ambiente, as amostras foram analisadas sem nenhum tratamento.
- e) *Microscopia eletrônica de transmissão* [TEM]: As imagens de microscopia eletrônica de transmissão foram adquiridas em microscópio da *Carl Zeiss CEM-902* operando em 80 kV. Para preparação das amostras, uma gota das suspensões dos nanotubos em Etanol PA foi adicionada sobre a grade de Cu (400 mesh), recoberta com filme de carbono contínuo e deixada evaporar.
- f) *Espectroscopia Raman confocal*: Os espectros Raman foram obtidos em um espectrômetro da marca *WITECH TS-150*, acoplado a um microscópio confocal. Foi utilizado um laser de Nd-YAG (532 nm) com potência de excitação de 0,3 mV. O valor médio da intensidade da banda D sobre a intensidade da banda G ( $I_D/I_G$ ) foi calculado após aquisição de 1600 espectros em uma área de 10  $\mu$ m x 10  $\mu$ m para amostras de nanotubos no estado sólido<sup>113</sup>.

- g) *Análise de área superficial [BET]*: As amostras no estado sólido ( $\pm 70$  mg) foram analisadas pelo método BET (isoterma de adsorção de nitrogênio) no equipamento da *Quantachrome Instruments NOVA Win*.
- h) *Análise de carga superficial [Potencial-Zeta]*: Foram preparadas suspensões das amostras de nanotubos em água deionizada Milli-Q (10  $\mu\text{g/mL}$ ) e em seguida analisadas no equipamento da *Malvern Instruments nano-ZS*.

### 4.3. Avaliação *in vitro* da biodisponibilidade do resíduo metálico

O ensaio *in vitro* de lixiviação ou mobilização do resíduo metálico (ferro) dos CNT-LQES<sub>1</sub> e CNT-LQES<sub>2</sub> foram realizados segundo o Método Ferrozina<sup>114</sup>, adaptado de Guo e colaboradores<sup>115</sup>. As amostras foram dispersas em tampão MOPS (50 mM pH 7,0) contendo 1mM de ascorbato [Across Chemicals] e 1mM de ferrozina [3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina; Across Chemicals], protegidos da luz e deixados sobre agitação magnética por 6 horas. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado, utilizando membrana de PVDF (0,2  $\mu\text{m}$ ), e foi efetuada a análise do filtrado por espectroscopia UV-Vis [Shimadzu UV-1650PC]. Nestes experimentos foi mantida a proporção 1:1 (1,0 mg de nanotubos/mL da solução tampão ferrozina).

### 4.4. Estudo dos fragmentos de carbono carboxilados

Foi realizado um planejamento experimental fatorial ( $2^3 = 8$  ensaios), segundo Barros Neto e colaboradores<sup>116</sup>, para avaliação da formação dos fragmentos de carbono carboxilados (FCCs) após o tratamento oxidativo dos nanotubos CNT-L3 [raw] com HNO<sub>3</sub> sob agitação e refluxo convencional, conforme apresentado na **Tabela 2**.



**Tabela 2.** Condições experimentais empregadas para avaliação da formação dos fragmentos de carbono carboxilados (FCCs) após o tratamento oxidativo dos CNT-L3 com HNO<sub>3</sub>.

<b>Ensaio</b>	<b>1. Temperatura*</b>	<b>2. HNO<sub>3</sub></b>	<b>3. Tempo</b>
1	100 °C	3M	12h
2	100 °C	3M	24h
3	100 °C	9M	12h
4	100 °C	9M	24h
5	150 °C	3M	12h
6	150 °C	3M	24h
7	150 °C	9M	12h
8	150 °C	9M	24h

\*temperatura utilizada no banho de silicone durante o refluxo.

Em todos os experimentos foi mantida a relação 5:1 (1g CNT-L3 / 200 mL de solução de HNO<sub>3</sub>). Ao término de cada experimento, as amostras foram centrifugadas (3500 rpm por 10 minutos), sendo descartado o sobrenadante (solução ácida) e os nanotubos oxidados (precipitado) foram lavados com água deionizada até pH > 6.0. Em seguida, foram secos em linha de vácuo. Para avaliação da influência do tratamento oxidante na geração dos FCCs, 10 mg de nanotubos oxidados oriundos de cada ensaio do planejamento experimental foram sonicados por 15 minutos em 10 mL de NaOH 0,1M, e então filtrados, utilizando uma membrana de 0,2 µm PTFE. Os eluídos (FCCs dissolvidos) foram analisados por espectrofotometria (500 nm).

Para a obtenção dos FCCs no estado sólido, 500 mg dos nanotubos oxidados (Ensaio 8) foram homogeneizados em uma solução de NaOH 0,1M (200 mL), sonicados por 15 minutos e submetidos a agitação magnética por 1 hora e

temperatura ambiente. Posteriormente, os FCCs dispersos na solução de NaOH 0,1M foram separados dos nanotubos através de filtração em membrana 0,2 µm PVDF. Em seguida, esta solução contendo os FCCs dispersos foi dialisada por 3 dias e então liofilizada.

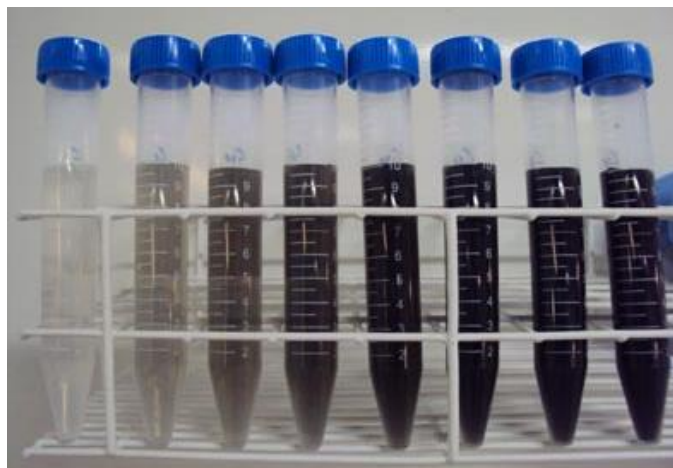
Os FCCs oriundos do Ensaio 8, agora no estado sólido, foi denominado DEBRIS e caracterizado pelas seguintes técnicas: espectroscopia no ultra-violeta visível [UV-Vis] obtidos no equipamento da *Shimadzu UV-1650PC*; espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier [FT-IR] obtidos no equipamento *ABB FTLA2000* e por espectrometria de massas de alta resolução [ESI FT-ICR/MS] no equipamento LQT-FT Ultra da *Thermo Scientific*.

## 4.5. Interação com Biosistemas

### 4.5.1. Nível Ecológico: ecotoxicologia e tratamento de efluentes

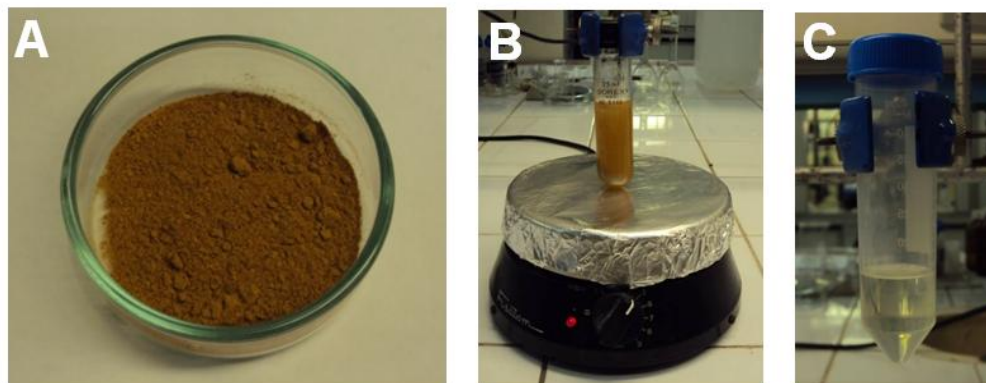
#### a) Ensaio de toxicidade aguda sobre *Daphnia similis*:

O teste de ecotoxicidade aguda para o CNT-LQES<sub>1</sub> foi realizado utilizando o microcrustáceo *Daphnia similis*, de acordo com a norma técnica ABNT-NBR 12713<sup>117</sup>. Foram realizados três experimentos independentes (n = 15) e avaliado a porcentagem de indivíduos imóveis após 48h de exposição aos CNT-LQES<sub>1</sub> (1 a 100 mg/L). Foi utilizada água mineral nos testes, proveniente da fonte São Clemente (Jacutinga, MG, Brasil), com dureza ajustada (reconstituição) para a faixa de 40-46 mg/L de carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>). Foram utilizados tubos de plástico do tipo Falcon, contendo 10 mL das suspensões de CNT-LQES<sub>1</sub> em água reconstituída (**Figura 11**).



**Figura 11.** Tubos Falcon utilizados no teste de ecotoxicidade aguda. Estão representados em ordem crescente (da esquerda para direita) as concentrações de CNT-LQES<sub>1</sub> avaliadas (1, 5, 10, 20, 30, 50, 70 e 100 mg/L) em água mineral reconstituída. Esta fotografia representa 5 minutos após a introdução dos organismos nas suspensões.

O extrato bruto liofilizado, contendo biossurfactantes produzido pelo microorganismo *Bacillus subtilis* LSFM-05, crescido em meio contendo glicerina residual como única fonte de carbono, foi fornecido pelo Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana (LSFM) da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, conforme descrito na Tese de Doutorado de Andréia Fonseca de Faria<sup>118</sup>. Assim, foi realizada a extração dos biossurfactantes a partir deste extrato bruto no LQES (**Figura 12**). Basicamente, 1,0 g de extrato bruto foi homogeneizado em 100 mL de água mineral reconstituída (a mesma água utilizada nos testes de ecotoxicidade para *D. similis*) e deixados em agitação magnética por 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida, esta preparação foi centrifugada a 3300 rpm por 10 minutos. O sobrenadante (fração solúvel contendo os biossurfactantes, principalmente Fengicina e Surfactina) foi denominado BioS, e então coletado e armazenado em geladeira. O precipitado (fração insolúvel) foi submetido a um processo de secagem em linha de vácuo e posterior pesagem para determinação indireta da porcentagem de BioS. A fração solúvel (BioS) representou cerca de 25% da massa do extrato bruto de partida.



**Figura 12.** Obtenção da fração solúvel contendo os biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* LSFM-05(BioS): (A) Extrato bruto no estado sólido contendo os biossurfactantes produzidos pelo microorganismo; (B) Extração em água mineral reconstituída (10 mg/mL) sob agitação magnética; (C) Fração solúvel contendo os biossurfactantes, denominada BioS, após a etapa de centrifugação.

Uma vez que objetivamos utilizar estes biossurfactantes para dispersão dos CNT-LQES<sub>1</sub> em estudos de ecotoxicidade sobre *D. similis*, primeiramente, foi realizado um teste para a determinação da toxicidade aguda do BioS sobre este organismo aquático. Foi verificado valores muito baixos de toxicidade aguda sobre *D. similis* para o biossurfactante [CE(I)<sub>50</sub>= 0,4 g/L]. Para evitar qualquer efeito tóxico proveniente do BioS, foi utilizado a concentração de 0,25 g/L nos experimentos de dispersão do CNT-LQES<sub>1</sub>. Assim, diferentes concentrações de CNT-LQES<sub>1</sub> (1 a 90 mg/L) em água mineral reconstituída contendo BioS (0,25 g/L) dissolvidos foram submetidas a sonicação por 60 minutos em ultra-som de banho [Cole-parmer 8891]. Em seguida, estas suspensões (10 mL) foram transferidas para tubos plásticos do tipo Falcon [Furlab Ltda] de 15 mL e deixadas em repouso. Alíquotas foram retiradas do topo destas suspensões nos intervalos entre 0 a 10 minutos e 48 horas para monitoramento da estabilidade por espectrofotometria (500 nm)<sup>119</sup> e análises de distribuição de tamanho das partículas nas suspensões por espalhamento de luz dinâmico [DLS, *Dynamic Light Scattering*, Malven nano-ZS]<sup>119</sup>.

Uma solução-estoque de CNT-LQES<sub>1</sub> (100 mg / 100 mL) em água deionizada foi preparada [30 minutos em banho de ultra-som] para a realização de todos os experimentos de ecotoxicidade aguda.

Os experimentos de ecotoxicidade aguda sobre *D. similis* foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental (LEAL) da Faculdade de Tecnologia da UNICAMP, em Limeira.

### **b) Ensaio de mutagenicidade sobre *Salmonella typhimurium*:**

Para avaliação do potencial efeito mutagênico dos CNT-LQES<sub>1</sub> foi realizado o ensaio de mutação reversa bacteriana (Teste de Ames) pela técnica de incorporação em placa, segundo a metodologia apresentada por Maron & Ames (1983)<sup>120</sup>. Foram utilizadas cinco linhagens de *Salmonella typhimurium* [TA97; TA98; TA100; TA102 e TA1535] na presença e ausência de ativação metabólica (Fração S9) [Sprague–Dawley rat liver homogenate, Aroclor]. Segundo esta metodologia, considera-se um efeito mutagênico quando o índice de mutagenicidade (IM) é > ou = 2. Foram utilizados como controles positivos os seguintes agentes mutagênicos: 1-óxido de 4-nitroquinolina [4-NQO], mitomicina C [MMC], 2-aminofluoreno [2-AF], 2-aminoantraceno [2-AA] e azida sódica [SA].

Soluções-estoque de CNT-LQES<sub>1</sub> (10 mg / 10 mL) em água deionizada Milli-Q foram preparadas [30 minutos em banho de ultra-som] e utilizadas dentro de um intervalo de uma semana nos testes de mutagenicidade. Todos os experimentos de mutagenicidade foram realizados no Laboratório de Mutagênese Ambiental (LabMut) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). A análise de microscopia eletrônica de transmissão de *S. typhimurium* TA98 após interação com os CNT-

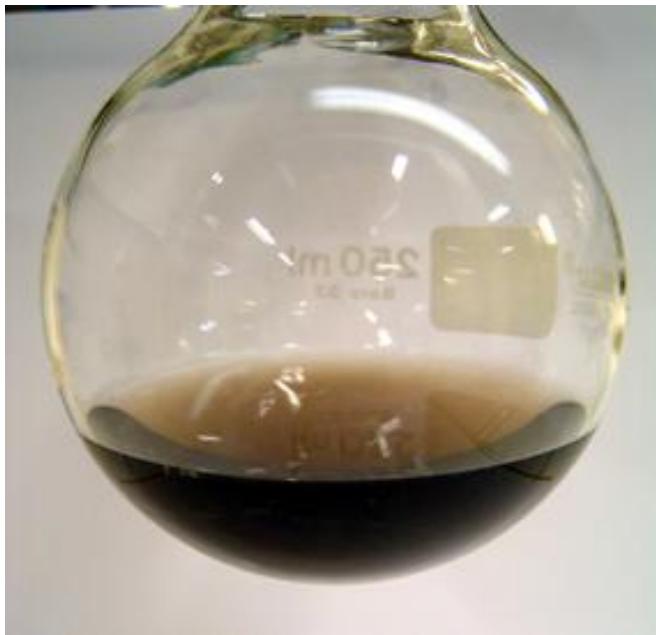
LQES<sub>1</sub> foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da UNICAMP<sup>184</sup>.

**c) Tratamento de efluente contendo fragmentos de carbono carboxilados:**

Para os experimentos de remediação e tratamento do efluente, contendo FCCs gerados durante o processo de purificação e funcionalização NTCs, foi preparada uma solução de Efluente-Estoque. Para isto, 500 mg de CNT-L3 foram oxidados conforme descrito no item 4.4 (Ensaio 8; Condições: HNO<sub>3</sub> 9M a 150 °C por 24h) e em seguida, os nanotubos oxidados foram submetidos a um tratamento com hidróxido de sódio 0,1 M (200 mL) e deixados sob agitação magnética por 1 hora. Em seguida, foram filtrados em membrana de 0,2 µm PVDF. O eluído de coloração marrom escuro é a solução de NaOH 0,1M (Efluente-Estoque, **Figura 13**) contendo os FCCs (DEBRIS) dispersos, que foi utilizada nos testes de remediação com hidrotalcita (Mg-Al-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e sulfato de alumínio [Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>.14H<sub>2</sub>O]. A hidrotalcita foi sintetizada e caracterizada no LQES.

O sulfato de alumínio foi obtido comercialmente da empresa Bauminas Ltda (Cataguases, MG, Brasil). Os experimentos foram realizados em tubos de centrífuga contendo 5 mL de solução Efluente-Estoque e quantidades crescentes de hidrotalcita e sulfato de alumínio (1 a 30 mg/mL). Estes tubos foram submetidos à agitação magnética por 90 minutos em temperatura ambiente e em seguida centrifugados a 3300 rpm por 10 minutos. A porcentagem de remoção dos FCCs foi avaliada através de espectrofotometria (400 nm).

Os resíduos ácidos provenientes deste trabalho foram tratados segundo as recomendações da Comissão de Segurança do Instituto de Química da UNICAMP. Os resíduos sólidos de nanotubos de carbono foram tratados pela incineração em fornos (800 °C por 1 hora) no LQES.



**Figura 13.** Efluente-Estoque: solução de NaOH 0,1M contendo os fragmentos de carbono carboxilados (DEBRIS).

#### **4.5.2. Nível Imunológico: imunização dos camundongos geneticamente selecionados**

A proteína albumina sérica bovina (BSA) foi escolhida como antígeno modelo para este estudo e obtida comercialmente da *Sigma-Aldrich*. Inicialmente, foi realizado um ensaio *in vitro* da adsorção de BSA nos CNT-LQES, para determinação da melhor relação BSA/nanotubos para as imunizações. Primeiramente, foram pesadas diferentes quantidades de CNT-LQES (100, 300, 500, 700, 1000, 1200 e 1500  $\mu\text{g}$ ) e colocadas em tubos plásticos Eppendorf (2,0 mL). Em seguida, foi adicionado 1 mL de tampão PBS pH 7,4 em cada tubo e sonificados por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se 1 mL da solução de BSA (100  $\mu\text{g}$  / mL PBS pH 7,4). Após 12 horas de incubação em geladeira ( $\pm 4^\circ\text{C}$ ), a proteína BSA não adsorvida nos nanotubos foi removida através de centrifugação (3000 rpm

por 5 minutos à 4°C). O sobrenadante resultante foi analisado pelo método de Bradford<sup>121</sup> para determinação da porcentagem de BSA adsorvida na amostra CNT-LQES. Como controle, utilizou-se a solução de BSA (100 µg / 2 mL PBS 7,4). Camundongos geneticamente selecionados para alta [H<sub>III</sub>] e baixa [L<sub>III</sub>] resposta na produção de anticorpos (n = 3 animais/grupo) foram imunizados pela via subcutânea (SC), segundo o protocolo descrito na **Tabela 3** abaixo:

**Tabela 3.** Protocolo de imunização subcutânea dos camundongos H<sub>III</sub> e L<sub>III</sub>

	<b>Grupo A</b>	<b>Grupo B</b>	<b>Grupo C</b>	<b>Grupo D</b>
	BSA	BSA + Al(OH) <sub>3</sub>	BSA + CNT-LQES	BSA : CNT-LQES
Linhagem H <sub>III</sub>	10 µg	10 µg + 100 µg	10 µg + 100 µg	10 µg : 100 µg
Linhagem L <sub>III</sub>	10 µg	10 µg + 100 µg	10 µg + 100 µg	10 µg : 100 µg

*Preparo dos complexos imunogênicos:*

Grupo A – 10 µg BSA em 200 µL de tampão PBS pH 7,4.

Grupo B - 10 µg BSA foram homogeneizados com 100 µg de hidróxido de alumínio [Al(OH)<sub>3</sub>] em 200 µL de tampão PBS pH 7,4.

Grupo C - Com base no estudo de absorção de BSA na amostra CNT-LQES, verificou-se que a proporção 1:10 [BSA/nanotubos] foi a melhor proporção para a imunização. Assim, 100 µg dos CNT-LQES foram dispersos em 100 µL de tampão PBS pH 7,4 em banho ultra-som por 30 minutos, em seguida foi adicionado 10 µg de BSA em 100 µL de tampão PBS pH 7,4.

Grupo D - Os camundongos foram primeiramente imunizados com 10 µg de BSA em 100 µl de tampão PBS pH 7,4, e em seguida, foram novamente imunizados com 100 µg CNT-LQES em 100 µL de tampão PBS pH 7,4. Deste



modo, estes animais receberam a mesma quantidade de CNT-LQES, porém a forma de apresentação de BSA é diferente, absorvido (Grupo B) ou livre (Grupo C).

Após 13 dias da primeira imunização, os camundongos foram sangrados e os soros estocados em *freezer* para determinação dos anticorpos IgG totais anti-BSA da resposta primária (RP). Decorridos 120 dias da primeira imunização, os camundongos foram novamente imunizados (dose-reforço ou *Booster*) somente com o antígeno BSA (10 µg/animal) pela via subcutânea. Após 21 dias da segunda imunização, os camundongos foram sangrados e os soros estocados em *Freezer* para determinação dos anticorpos IgG totais anti-BSA da resposta secundária (RS).

As dosagens de anticorpos totais nestes soros (IgG anti-BSA) foi realizada pelo método de ELISA [Enzyme-Linked Immunosorbent Assay]<sup>122</sup>. Basicamente, realizaram-se as dosagens em microplacas com propriedades de alta ligação de 96 poços [COSTAR], sensibilizadas com 10 µg mL de BSA diluídas em tampão Carbonato-Bicarbonato por 18 horas a 4°C. Após este período inicial de incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão PBS contendo Tween (PBS-T) a 0,05%. As placas foram bloqueadas com 0,01% de gelatina-PBS-T por 1 hora a temperatura ambiente. A seguir as amostras foram distribuídas e diluídas em série em PBS-T e incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente; as placas foram lavadas 3 vezes em PBS-T e 50 µL do anticorpo anti-IgG marcado com peroxidase [Promega] diluído 1:2500 em PBS-T foram adicionados e as placas incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente. Seguiram-se 3 lavagens com PBS-T. 100 µL do tampão substrato (20mg do reagente OPD diluído em 40 mL de tampão citrato/fosfato/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3%) foi adicionado as placas, as quais foram mantidas no escuro até a reação ser revelada. A reação foi interrompida com 50 µL/poço de ácido cítrico a 0,2M. A leitura foi feita em 450 nm utilizando-se um leitor de

ELISA [Multiskan, Labsystems]. Os títulos foram calculados desprezando-se 20% do valor da absorbância da diluição de saturação e expressos em  $\log_2$ .

As linhagens de camundongos geneticamente selecionados [ $H_{III}$  e  $L_{III}$ ] foram desenvolvidas pelo Instituto Butantan, e são objetos de estudos na área de imunogenética há mais de 25 anos<sup>123</sup>. Todos os experimentos de imunização e dosagens de ELISA foram realizados no Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan em São Paulo.

Estes experimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do Instituto Butantan (CEUAIB), Protocolo nº 754/10.

#### **4.5.3. Nível Celular-molecular: efeito sobre Astrócitos primários *in vitro***

Culturas primárias de astrócitos foram preparadas a partir de células extraídas do córtex cerebral de ratos Lewis (neonatos com 1 dia de vida), segundo o método utilizado por McCarthy & Vellis (1980)<sup>124</sup>. Os ratos foram anestesiados por hipotermia profunda, sendo os hemisférios corticais dissecados, livres de meninges e de vasos sanguíneos, e fragmentados. Os fragmentos foram lavados em tampão PBS e suspensos em meio DMEM [Dulbecco's Eagle's Medium], obtido da empresa Nutricell (Campinas, SP, Brasil). Em seguida, os fragmentos foram incubados em tripsina 0,05% em PBS 0,9% (0,1 M e pH 7,4) por 10 minutos sob temperatura de 37°C. Após este período, foi realizado o bloqueio com soro fetal bovino (Nutricell) e a suspensão resultante foi submetida à centrifugação (1300 rpm) por 10 minutos em albumina bovina (BSA) 4% em meio DMEM. O

sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em DMEM suplementado com soro fetal bovino 10%, penicilina e streptomicina (1,0  $\mu\text{L/mL}$ ), e semeado em garrafas de cultura celular (25  $\text{cm}^2$ ). As culturas primárias resultantes foram então incubadas a 37 °C, 5%  $\text{CO}_2$  e atmosfera umidificada. Atingida a confluência, as células foram submetidas novamente a tripsinização e centrifugadas (1100 rpm) em BSA 4% em meio DMEM, na intenção de separar os diferentes tipos celulares. Logo em seguida, células foram semeadas em placas de cultura. Para o teste de citotoxicidade, as células foram cultivadas em placas de 24 poços, sendo fixadas com paraformaldeído 4% após 24, 48 e 72 horas de tratamento com os CNT-LQES<sub>2</sub> nas concentrações de 2,5, 5, 10, 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$  em meio DMEM, contendo 10% de soro fetal bovino. Em todos os experimentos foram semeadas inicialmente  $2,0 \times 10^4$  células/poço.

Foi utilizado o marcador DAPI [diamidino phenylindole] para a contagem celular (núcleos) por microscopia de fluorescência, utilizando o software IMAGE J [1.33U, National Institute of Health, USA]. Análises estatísticas foram realizadas utilizando o Software BioEstat 5.0.

Análises de microscopia eletrônica de transmissão [TEM] foram realizadas para avaliar a capacidade de penetração dos CNT-LQES<sub>2</sub> nas células de astrócitos primários em cultura. O teste de TUNEL [terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling] foi realizado utilizando o *Kit ApopTag*<sup>®</sup> da *Chenson* para determinação do mecanismo envolvido na morte dos astrócitos primários após exposição aos CNT-LQES<sub>2</sub>.

Para verificar se os CNT-LQES<sub>2</sub> poderiam induzir efeito citotóxico através da depleção de nutrientes ou remoção de nutrientes do meio de cultura, foi realizado um procedimento de acordo com Casey e colaboradores (2008)<sup>125</sup>. Inicialmente,

1mg de CNT-LQES<sub>2</sub> foram dispersos em 20 mL de meio de cultura DMEN contendo 10% de soro fetal bovino e incubado por 1 hora a 37°C. Em seguida, os nanotubos foram removidos deste meio de cultivo através de centrifugação (14000 rpm por 30 minutos a 4°C) sendo que o sobrenadante e o precipitado foram utilizados. Primeiro o sobrenadante, agora livre dos CNT-LQES<sub>2</sub>, foi coletado e fornecido aos astrócitos e em seguida monitorado o crescimento celular durante 24, 48 e 72 horas. Este experimento foi denominado *Teste de Remoção de Nutrientes* (Teste-RN). O precipitado oriundo da centrifugação, CNT-LQES<sub>2</sub>, contendo componentes do meio de cultura adsorvidos foram coletados e analisados por DLS.

Uma solução-estoque de CNT-LQES<sub>2</sub> (10 mg / 10 mL) em água deionizada foi preparada [30 minutos em banho de ultra-som (Cole-parmer 8891)] para a realização de todos os experimentos com astrócitos. Esta solução-estoque foi submetida à autoclave por 30 minutos a 100°C para diminuir o risco de possíveis contaminações microbianas durante os experimentos.

Todos os procedimentos e experimentos com astrócitos primários foram realizados no Laboratório de Regeneração Nervosa do Instituto de Biologia da UNICAMP, sendo que ratos neonatos Lewis foram fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP. E, estes experimentos foram realizados com a autorização do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Biologia da UNICAMP.

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1. Aspectos químicos da purificação e caracterização dos nanotubos de carbono

Diversos trabalhos na literatura relatam a utilização de  $\text{HNO}_3$  e  $\text{HCl}$  para purificação e funcionalização de nanotubos de carbono<sup>40,126,127</sup>. Entretanto, é importante destacar que não existem protocolos universais para a purificação de NTCs, de modo que os protocolos de purificação vêm sendo desenvolvidos em função dos objetivos da pesquisa e do tipo de NTCs em questão<sup>40</sup>. Geralmente, estudos biológicos requerem amostras com elevado grau de pureza [livre de metais de transição (e.g. Ni, Fe, Co, Cu), oriundos do processo de síntese dos nanotubos], sendo que esses resíduos metálicos podem variar entre 1 a 40% na massa das amostras de NTCs após a síntese, pois são amplamente reconhecidos os efeitos adversos de metais de transição sobre o metabolismo antioxidante de sistemas vivos [e.g. geração de radicais livres por fibras (asbestos) contendo ferro]<sup>128</sup>. Assim, é evidente a importância dos processos de purificação, dado que tem sido demonstrado que estes resíduos metálicos presentes nas amostras de NTCs podem afetar os diferentes níveis da organização biológica<sup>129-131</sup>. Por exemplo, Hull e colaboradores (2009) demonstraram que os resíduos metálicos de cobre e ferro podem ser lixiviados de amostras sólidas de Fullerenos (um tipo de nanoestrutura de carbono) para o meio aquoso (água mineral). Ao realizarem estudos de ecotoxicidade aguda desta solução contendo os metais dissolvidos (lixiviados) sobre os organismos aquáticos *Pimephales promelas* e *Ceriodaphnia dubia* encontraram valores significativos de toxicidade<sup>129</sup>. Haniu e colaboradores (2010), utilizando uma abordagem proteômica, demonstraram que a citotoxicidade de NTCPM é fortemente dependente da quantidade de ferro presente na amostra,

sendo encontradas alterações no perfil das proteínas envolvidas no metabolismo, na biosíntese, na resposta ao estresse e na diferenciação e controle do ciclo celular<sup>130</sup>.

Diante desses trabalhos, demonstrando a influência dos resíduos metálicos presentes em NTCs sobre seus reflexos biológicos e toxicológicos, decidimos estudar três procedimentos para purificação de nanotubos de carbono de parede múltiplas obtidos da empresa CNT Co. Ltd: (A) tratamento menos oxidativo: CNT-LQES, (B) tratamento mais oxidativo: CNT-LQES<sub>1</sub> e (C) similar ao tratamento B, porém com a remoção dos FCCs através do tratamento com NaOH: CNT-LQES<sub>2</sub> (**Figura 10**).

Na **Tabela 4** estão apresentados os principais resultados da caracterização físico-química dos nanotubos preparados conforme descrito no **item 4.1**. Foi adotada a apresentação em tabela destes resultados para facilitar a comparação e visualização da informação. Decidimos nomear estas amostras com o nome da empresa fornecedora [CNT] e a sigla do laboratório onde estas amostras foram processadas e caracterizadas [LQES], pois acreditamos que a adoção destas denominações venha facilitar na indexação destes nanotubos na literatura científica, onde a falta de uma anotação adequada das amostras de NTCs estudadas até o momento vem gerando complicações durante a comparação dos resultados publicados, principalmente, quando envolvem sistemas biológicos que são altamente complexos. Cabe ainda ressaltar que estas amostras foram caracterizadas na tentativa de desenvolver uma integrada e concisa caracterização de NTCs segundo recomendações para estudos biológicos e toxicológicos<sup>53,132</sup>.

**Tabela 4.** Caracterização físico-química dos nanotubos de carbono estudados.

Propriedades	CNT-L1	CNT-LQES	CNT-L3	CNT-LQES <sub>1</sub>	CNT-LQES <sub>2</sub>
(A) Composição elementar <sup>a</sup>	C, O, Fe	C, O, Fe	C, O, Fe	C, O, Fe	C, O, Fe
(B) Resíduo metálico final (%) <sup>b</sup>	7,6 ± 0,4	1,0 ± 0,3	3,4 ± 0,3	0,9 ± 0,1	1,3 ± 0,3
(C) Temperatura de oxidação (°C) <sup>c</sup>	582 ± 2,0	608 ± 1,0	579 ± 2,0	610 ± 5,0	600 ± 13,0
(D) Defeitos estruturais (I <sub>D</sub> /I <sub>G</sub> ) <sup>d</sup>	0,85	0,89	0,93	1,31	1,45
(E) Comprimento (μm) <sup>e</sup>	1-25*	< 20	1-25*	< 10	< 10
(F) Diâmetro (nm) <sup>f</sup>	10-40*	10-40	10-40*	10-40	10-40
(G) Área superficial (m <sup>2</sup> /g) <sup>g</sup>	158 ± 15	164 ± 16	194 ± 19	292 ± 29	286 ± 28
(H) Carga superficial (mV) <sup>h</sup>	-	-14 ± 5,5	-	-17 ± 6,5	-22 ± 9,3

<sup>a</sup>Espectroscopia de energia dispersiva [EDS, JEOL 660-VL]; <sup>b</sup>Microbalança analítica [Perkin-Elmer AD-6]; <sup>c</sup>Análise termogravimétrica [TGA, TA SDTQ600]; <sup>d</sup>Espectroscopia Raman Confocal [WITECH TS-150]; <sup>e</sup>Microscopia eletrônica de varredura [SEM, FEI NanoLab200]; <sup>f</sup>Microscopia eletrônica de transmissão [TEM, Carl Zeiss CEM-902]; <sup>g</sup>Método BET [Quantachrome Instruments NOVA Win]; <sup>h</sup>Potencial Zeta [Malvern Instruments nano-ZS]; \*informações fornecidas pela empresa CNT Co. Ltd.

Análises elementares utilizando a espectroscopia de energia dispersiva [EDS] demonstraram a presença de ferro (Fe) nas amostras de partida CNT-L1 e CNT-L3, indicando que os nanotubos foram sintetizados utilizando ferro como catalisador (**Linha A, Tabela 4**).

A técnica de análise termogravimétrica (TGA) tem sido aplicada para determinação da pureza dos NTCs após processos de purificação<sup>133</sup>. Os parâmetros utilizados para a interpretação desses resultados são: i) porcentagem de resíduo metálico final, medido indiretamente pela quantidade de óxido metálico formado após a decomposição dos NTCs em atmosfera oxidante (ar sintético) e ii) NTCs purificados, geralmente são mais resistentes à decomposição térmica, podendo ser

atribuído à eliminação ou diminuição do teor dos metais nas amostras, pois estes atuam como catalisadores durante a decomposição térmica dos nanotubos de carbono<sup>134</sup>. Entretanto, recentemente, o NIST [National Institute of Standards and Technology, USA], publicou um manual técnico visando a padronização e validação das técnicas utilizadas para caracterização dos nanotubos de carbono<sup>112</sup>. Foi recomendada a realização de pelo menos três análises de TGA (triplicatas) para cada amostra de NTC estudada, e os resíduos metálicos finais devem ser coletados e pesados em microbalança analítica, pois geralmente estão fora da resolução confiável dos equipamentos de análise térmica<sup>112</sup>.

Conforme demonstrado na **Linha B, Tabela 4**, os nanotubos purificados CNT-LQES, CNT-LQES<sub>1</sub> e CNT-LQES<sub>2</sub> apresentam baixos teores de resíduo metálico final (óxido de ferro), com aproximadamente 1,0, 0,9 e 1,3%, respectivamente. Estas amostras purificadas também apresentaram um aumento na temperatura de decomposição (**Linha C, Tabela 4**) sendo outro indicativo da eficiência do processo de purificação. Os gráficos das análises termogravimétricas estão apresentados no **item 8.3. (Apêndice)**.

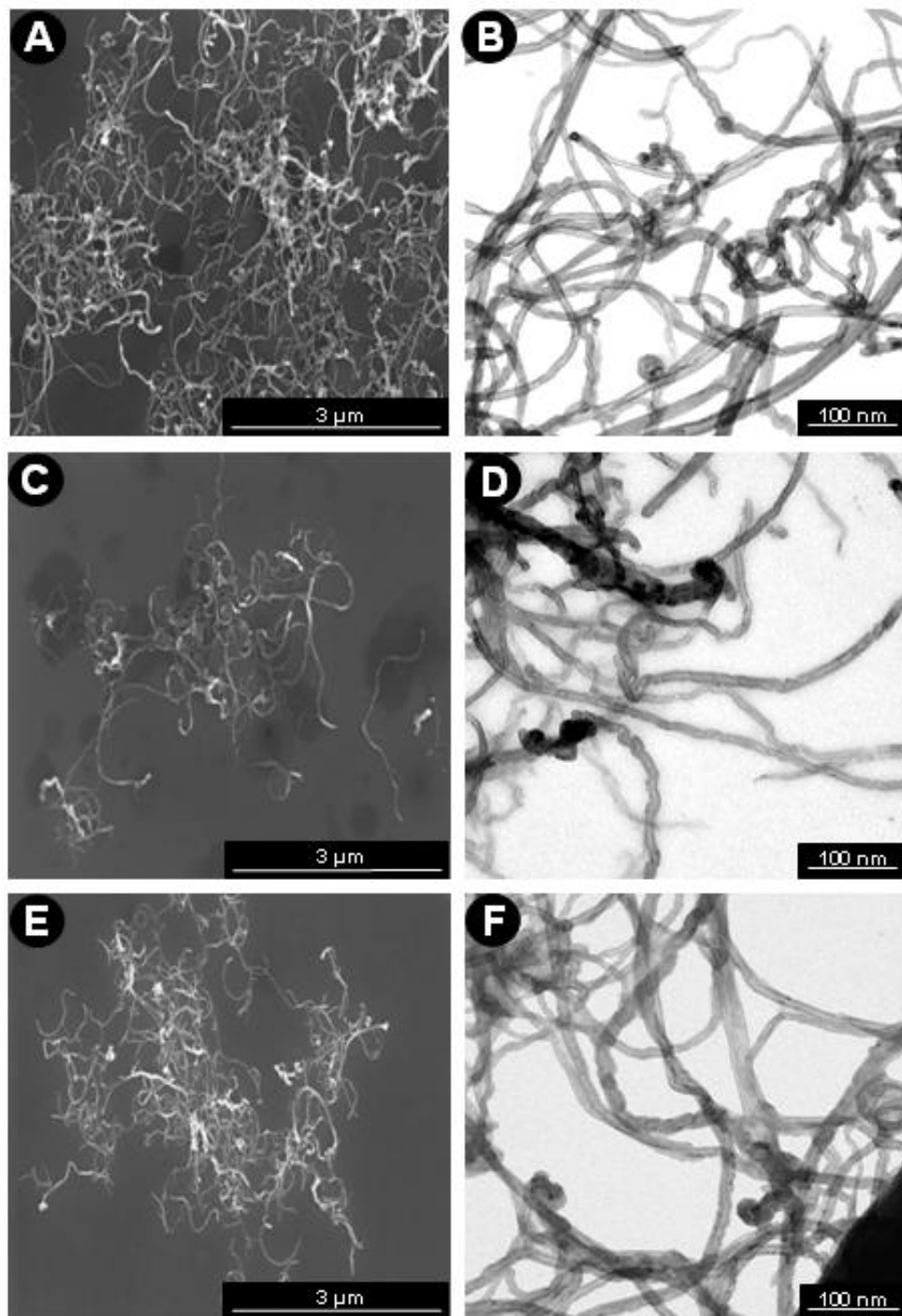
A espectroscopia Raman é uma das principais técnicas para caracterização de materiais a base de carbono. Nanotubos de carbono exibem, usualmente, três bandas características: G (~1580 cm<sup>-1</sup>), D (~1350 cm<sup>-1</sup>) e modos de respiração radial [RBMs], (100-400 cm<sup>-1</sup>)<sup>135</sup>. No entanto, na maioria dos casos os NTCPM não apresentam sinais de RBMs. A banda G está relacionada com os modos de vibração do grafite e a banda D pode ser entendida como a medida da desordem estrutural (defeitos e carbono amorfo). Assim, a relação entre a intensidade da banda D sobre a intensidade da banda G ( $I_D/I_G$ ) pode ser utilizada como um parâmetro para avaliação da organização estrutural dos NTCs após modificações químicas e funcionalizações, pois quanto maiores estes valores, maior a quantidade de defeitos



estruturais nas paredes dos NTCs<sup>136</sup>. Quando comparamos os valores de  $I_D/I_G$  das amostras purificadas (**Linha D, Tabela 4**), verificamos que os CNT-LQES não apresenta alterações significativas em relação à CNT-L1, o que indica que foi possível obter uma amostra com elevada pureza sem a introdução de defeitos estruturais (tratamento menos oxidativo,  $\text{HNO}_3$  3M). Por outro lado, os CNT-LQES<sub>1</sub> e CNT-LQES<sub>2</sub> apresentaram valores elevados de  $I_D/I_G$ , uma vez que foram purificadas pelo tratamento mais oxidativo ( $\text{HNO}_3$  7M) (**Apêndice, item 8.4.**).

Através da análise das imagens de microscopias de SEM e TEM dos nanotubos de carbono purificados, **Figura 14**, é possível observar um “efeito de encurtamento” nas amostras que passaram pelo tratamento mais oxidativo,  $\text{HNO}_3$  7M (CNT-LQES<sub>1</sub> e CNT-LQES<sub>2</sub>) em relação ao CNT-LQES (tratamento menos oxidativo,  $\text{HNO}_3$  3M) (**Linha E, Tabela 4**).

No entanto, é difícil quantificar esse “efeito de encurtamento” com precisão utilizando as técnicas de SEM e TEM, pois os nanotubos apresentam uma ampla faixa de distribuição de tamanhos. Nessa direção, utilizamos medidas de área superficial [BET] como um método indireto para mensurar este “efeito de encurtamento”, uma vez que é esperado que ocorra um aumento da área superficial em função da diminuição do tamanho dos nanotubos. Esta hipótese foi confirmada, pois os CNT-LQES<sub>1</sub> e CNT-LQES<sub>2</sub> apresentaram um aumento nos valores de área superficial de  $98 \text{ m}^2/\text{g}$  e  $92 \text{ m}^2/\text{g}$ , respectivamente, em relação ao CNT-L3 de partida (**Linha G, Tabela 4**). Por outro lado, CNT-LQES não apresentou diferença significativa nos valores de área superficial em relação à amostra de partida CNT-L1, ou seja, não ocorreu um “efeito de encurtamento” significativo para esta amostra. Não foram observadas alterações significativas no diâmetro dos nanotubos após os processos de purificação (**Linha F, Tabela 4**).

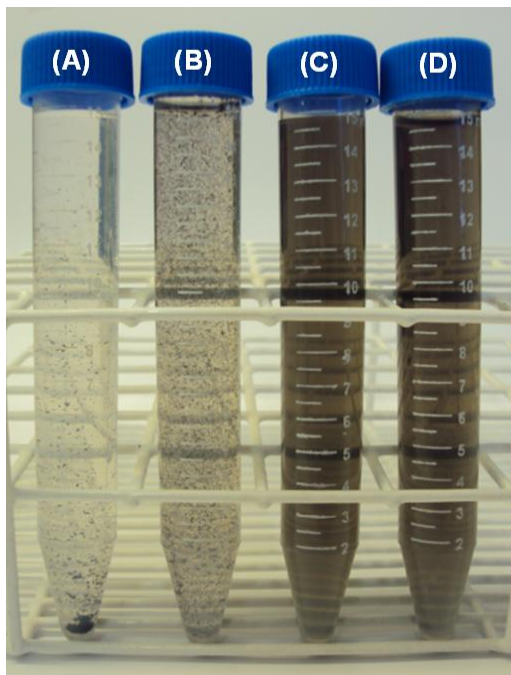


**Figura 14.** Imagens de microscopia eletrônica de varredura [SEM] (A, C, E) e de transmissão [TEM] (B, D, F) dos CNT-LQES (A,B); CNT-LQES<sub>1</sub> (C,D) e CNT-LQES<sub>2</sub> (E,F), respectivamente.

É comumente relatado na literatura que grupamentos oxigenados (e.g. hidroxilas, carboxilas, cetonas, aldeídos, etc.) são gerados na superfície dos nanotubos de carbono após o tratamento com ácido nítrico<sup>137-139</sup>. A introdução destes grupamentos superficiais permite a dispersão e estabilidade dos nanotubos de carbono oxidados em meio aquoso<sup>140-142</sup>. No entanto, não existem teorias que indiquem quais as melhores condições para geração destes grupamentos superficiais com o menor efeito destrutivo sobre a morfologia tubular, assim, a introdução de grupamentos oxigenados na superfície dos NTCs vem sendo empiricamente avaliadas, mas é consenso que existe influência da curvatura dos nanotubos durante a geração destes grupamentos funcionais superficiais<sup>143</sup>.

Deste modo, os valores negativos de potencial-zeta (carga superficial) indicam a presença de grupamentos oxigenados na superfície dos nanotubos purificados CNT-LQES, CNT-LQES<sub>1</sub> e CNT-LQES<sub>2</sub> (**Tabela 1-F**). E, como demonstrado na **Figura 15**, os tratamentos químicos empregados possibilitaram a dispersão dos nanotubos de carbono purificados em água deionizada, sendo possível observar que os CNT-LQES<sub>1</sub> e CNT-LQES<sub>2</sub> (tratamento mais oxidativo, HNO<sub>3</sub> 7M) estão mais dispersos do que os CNT-LQES (tratamento menos oxidativo, HNO<sub>3</sub> 3M). Verifica-se ainda, que os nanotubos de partida [raw] estão depositados no fundo dos tubos de ensaio, devido sua alta hidrofobicidade.

Assim, após o término das caracterizações, de modo geral, podemos constatar que ocorrem pronunciadas alterações das propriedades físico-químicas entre os nanotubos de partida submetidos ao *Tratamento A* (menos oxidante) em relação ao tratamento mais oxidante (*Tratamentos B e C*). Por outro lado, a etapa de remoção dos FCCs da superfície dos nanotubos, pela utilização de NaOH 0,1M, tem pouca ou nenhuma influência sobre estas propriedades físico-químicas (**Tabela 4**).



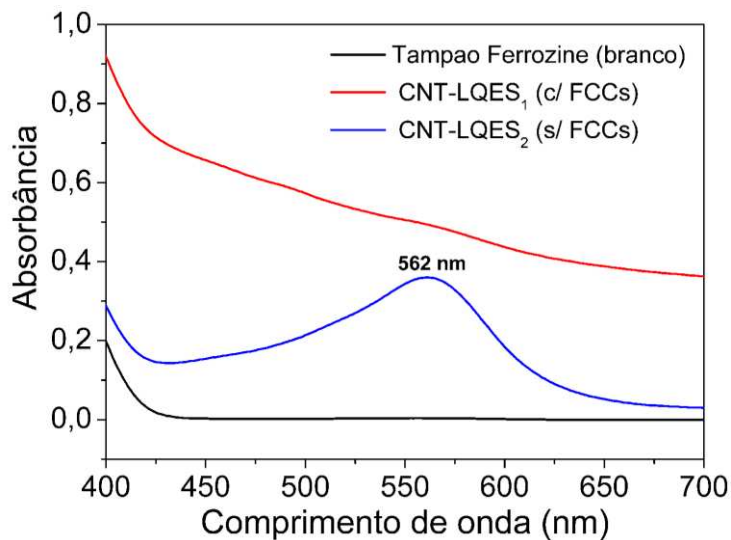
**Figura 15.** Dispersões dos nanotubos de carbono estudados em água deionizada: (A) CNT-L3 [raw]; (B) CNT-LQES; (C) CNT-LQES<sub>1</sub>; e (D) CNT-LQES<sub>2</sub>. Esta fotografia foi retirada após um intervalo de 30 minutos da etapa de sonicação em banho ultra-sônico [Cole-parmer 8891] por 15 minutos.

Motivados pelo trabalho pioneiro de Guo e colaboradores (2007)<sup>115</sup> e pela comprovada influência dos resíduos de ferro (Fe) na manifestação dos efeitos toxicológicos de nanotubos de carbono<sup>130,131</sup>, decidimos iniciar o estudo da lixiviação ou mobilização do ferro dos nanotubos purificados em solução tampão, pH 7,4, compatível com experimentos biológicos. Visto que foi demonstrado, nesse trabalho pioneiro, que não é suficiente utilizar apenas medidas do teor de resíduo metálico nas amostras de NTCs pelas técnicas de análise térmica e microbalança analítica, pois, para sua relevância toxicológica, é importante mensurar a quantidade de ferro livre nestas amostras, ou seja: sua biodisponibilidade. Neste sentido, foi proposta a utilização do Método Ferrozina para a determinação *in vitro* da biodisponibilidade do ferro em amostras de NTCs, uma vez que este é um método prático, rápido, de baixo custo e quantitativo para a determinação de ferro

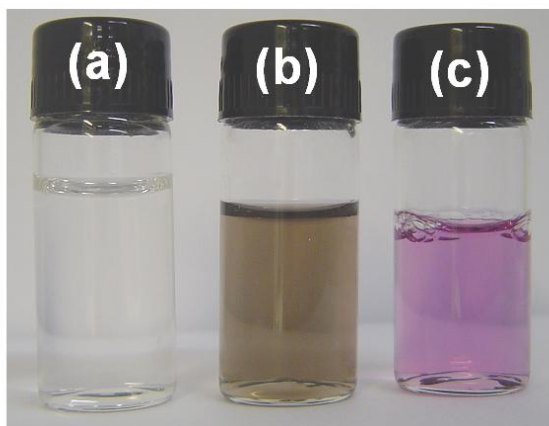
dissolvido em meio aquoso<sup>115</sup>. Este método é baseado na formação de um complexo de coordenação entre o íon  $\text{Fe}^{2+}$  (solúvel) e o reagente ferrozina, que após a formação do complexo apresenta coloração magenta, a qual pode ser mensurada por espectrofotometria em 562 nm<sup>114</sup>.

Todavia, de modo inesperado, verificamos que os FCCs adsorvidos na superfície dos nanotubos interferem no emprego do Método Ferrozina. A **Figura 16-A** representa o espectro UV-Vis da solução tampão ferrozina contendo os íons  $\text{Fe}^{2+}$  lixiviados dos nanotubos purificados CNT-LQES<sub>1</sub> e CNT-LQES<sub>2</sub>. Observa-se que não há a formação do complexo de coordenação de coloração magenta nos lixiviados dos CNT-LQES<sub>1</sub> (presença de FCCs na superfície), porém, após a remoção destes fragmentos da superfície dos CNT-LQES<sub>2</sub> temos a formação do complexo (pico de absorção em 562 nm). A **Figura 16-B** é uma fotografia destas soluções após o experimento de lixiviação ou mobilidade do ferro das amostras de nanotubos purificadas utilizando o Método Ferrozina. Estudos mais específicos são necessários para explicar estas observações, contudo, podemos supor que os FCCs estão interagindo com o reagente ferrozina, inibindo assim, a formação do seu complexo de coordenação com o  $\text{Fe}^{2+}$  solubilizado na solução tampão pH 7,4.

Estes resultados reforçam a necessidade de aprofundarmos o entendimento da superfície química dos NTCs após processos de purificação utilizando ácidos minerais oxidantes (e.g.  $\text{HNO}_3$  e  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), os quais levam a formação dos fragmentos de carbono carboxilados (FCCs).



(A)



(B)

**Figura 16.** Influência dos FCCs durante a determinação *in vitro* da biodisponibilidade do resíduo metálico (Ferro) dos nanotubos de carbono purificados pelo Método Ferrozina. (A) Espectroscopia UV-Vis da solução tampão Ferrozina após incubação por 6 horas com os CNT-LQES<sub>1</sub> (com FCCs) e CNT-LQES<sub>2</sub> (sem FCCs, devido o tratamento com NaOH 0,1M durante a etapa de purificação); (B) Fotografia da solução tampão Ferrozina: (a) branco; (b) após lixiviação do Fe<sup>2+</sup> dos CNT-LQES<sub>1</sub> (c/ FCCs) e (c) após lixiviação do Fe<sup>2+</sup> dos CNT-LQES<sub>2</sub> (s/ FCCs).

## 5.2. A superfície química dos nanotubos de carbono oxidados e os fragmentos de carbono carboxilados

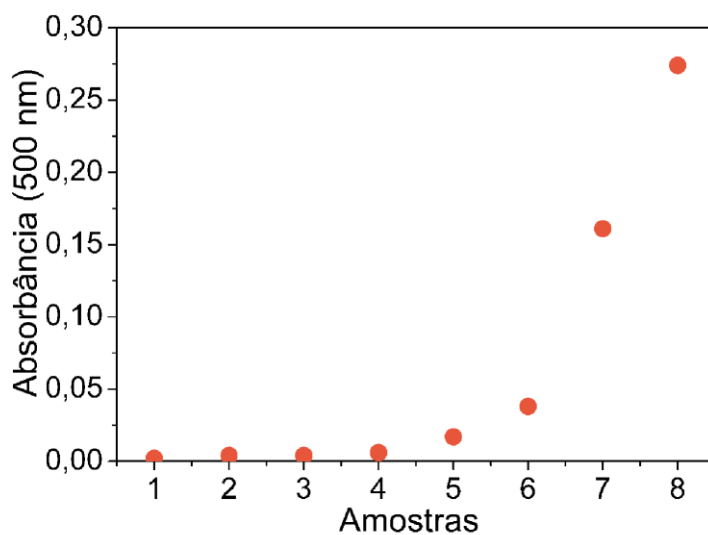
O controle dos processos de purificação e funcionalização dos nanotubos de carbono será crucial para as diversificadas aplicações propostas para estes nanomateriais. Assim sendo, existe uma intensa atividade de pesquisa visando entender a superfície química de NTCs<sup>138,144</sup>. Dentro deste contexto, Salzman e colaboradores, iniciaram uma importante discussão sobre a influência dos fragmentos de carbono carboxilados (FCCs) na funcionalização de nanotubos de carbono<sup>41</sup>. Estes FCCs, também conhecidos como *oxidation debris*, são vestígios carbonáceos gerados pela degradação das paredes dos nanotubos de carbono ou de carbono amorfo durante o tratamento oxidativo dos NTCs com ácido nítrico<sup>145</sup>. Trabalhos recentes demonstram que a remoção destes FCCs da superfície dos NTC oxidados é de fundamental importância para uma eficiente funcionalização covalente dos NTCs, bem como para o aumento da qualidade das amostras<sup>42,43,146</sup>.

Verdejo e colaboradores, em 2007, demonstraram que é possível remover estes FCCs da superfície de NTCs oxidados, utilizando tratamentos com soluções de NaOH, sem provocar alterações na estrutura dos nanotubos de carbono<sup>147</sup>.

Apesar da importância do entendimento da superfície química dos NTCs após processos de purificação com ácido nítrico, os fatores responsáveis pela geração destes resíduos carbonáceos foram pouco estudados até o momento. Nesse sentido, através da realização de um planejamento fatorial experimental (**item 4.3.**), estudamos a influência da temperatura, tempo e concentração de HNO<sub>3</sub> na formação dos FCCs, gerados durante o tratamento químico dos CNT-L3.

Conforme demonstrado na **Figura 17**, verificamos que a temperatura é o principal fator para a geração destes resíduos carbonáceos durante a oxidação dos

CNT-L3 com  $\text{HNO}_3$ , pois o aumento na concentração de  $\text{HNO}_3$  e no tempo de tratamento não ocasionou um aumento significativo na geração de FCCs, isto quando a temperatura foi mantida fixa em  $100\text{ }^\circ\text{C}$ .



(A)



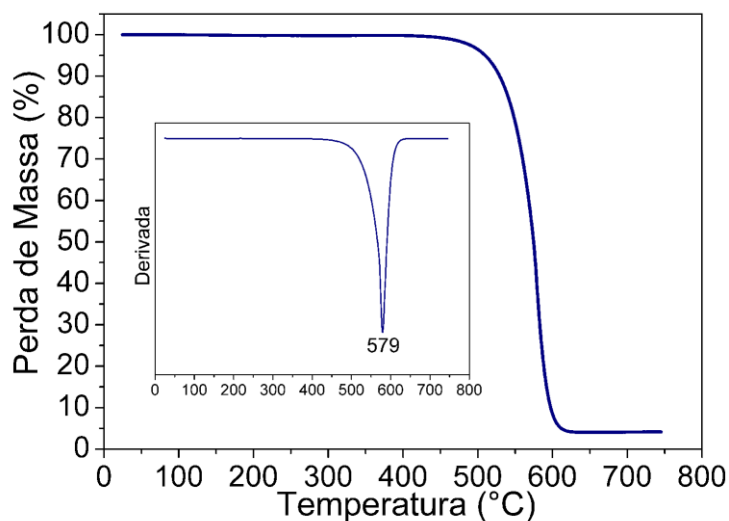
(B)

**Figura 17.** (A) Avaliação da formação dos fragmentos de carbono carboxilados (FCCs) gerados durante o tratamento oxidativo dos nanotubos de carbono com  $\text{HNO}_3$ , conforme descrito no item 4.3. (B) Fotografia ilustra as soluções de  $\text{NaOH}$  0,1M contendo os FCCs dispersos que foram isolados das Amostras de 1 a 8 do planejamento experimental (item 4.3.).

No entanto, um requisito importante para a avaliação da formação dos FCCs gerados durante o processo de purificação e funcionalização de nanotubos de carbono é conhecer a amostra de nanotubos de partida, uma vez que estes fragmentos também podem ser originados pela degradação de outras espécies



presentes na amostra de partida (e.g. carbono amorfo). Neste sentido, a técnica de análise termogravimétrica [TGA] é uma ferramenta importante para avaliação da superfície dos NTCs oxidados e do teor de resíduos carbonáceos nas amostras, visto que materiais carbonáceos (e.g. carbono amorfo) e grupamentos oxigenados superficiais são decompostos em temperaturas inferiores a 400 °C, sob atmosfera oxidante (ar sintético)<sup>133</sup>. Na **Figura 18**, temos a análise de TGA da amostra de nanotubos de carbono de paredes múltiplas de partida [raw] estudada nesta tese (CNT-L3). Podemos verificar que não há uma perda de massa significativa na amostra até 400 °C, o que indica que esta amostra de partida apresenta baixa quantidade de carbono amorfo (< 0,2 %). Além disso, os CNT-L3 apresentaram um único e bem definido pico para sua decomposição, em torno de 579 °C [DTGA].

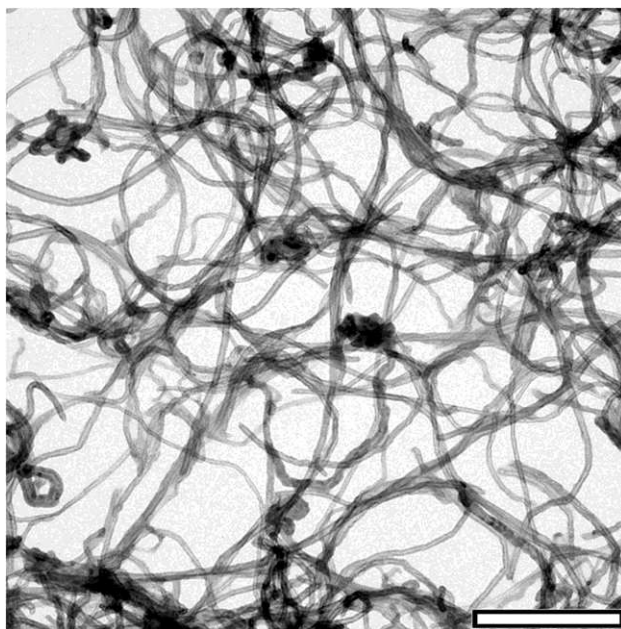


**Figura 18.** Análise termogravimétrica [TGA] dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas de partida (CNT-L3). Condições da corrida: 3,5 mg de CNT-L3 sob atmosfera oxidante (ar sintético; fluxo de 100 mL/minuto) com taxa de aquecimento de 5 °C/minuto.

Para confirmar o baixo teor de carbono amorfo nos CNT-L3, realizamos uma análise de microscopia eletrônica de transmissão, onde não foi verificada a presença destas espécies, prevalecendo predominantemente a morfologia de

nanotubos de carbono (**Figura 19**). Assim, podemos concluir que os FCCs gerados durante o tratamento oxidativo dos CNT-L3 com  $\text{HNO}_3$  são provenientes da degradação dos nanotubos.

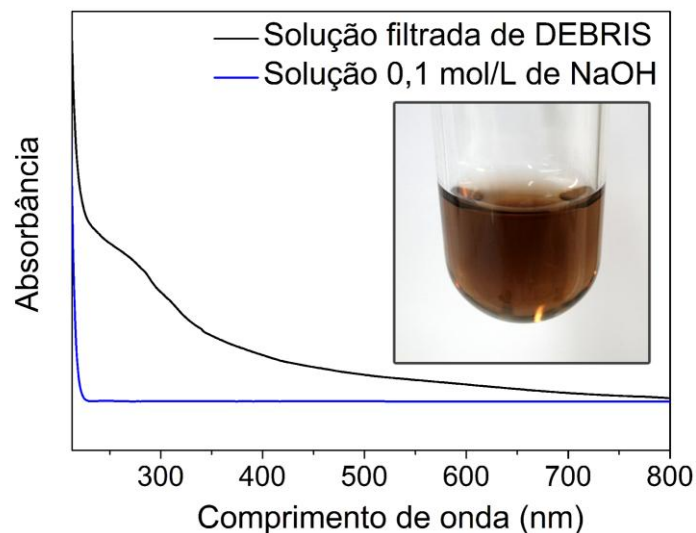
Desta forma, devido a importância da superfície química para os processos de funcionalização de NTCs e avaliação *in vitro* da biodisponibilidade do ferro pelo Método Ferrozina, decidimos isolar, quantificar e caracterizar estes resíduos carbonáceos presentes na superfície dos CNT-L3 oxidados<sup>148</sup>. Os FCCs foram isolados da Amostra 8 (item 4.3,  $\text{HNO}_3$  9M a 150 °C por 24h) e representam cerca de 2,6% da massa total desta amostra. Estes FCCs obtidos a partir da Amostra 8 foram denominados DEBRIS.



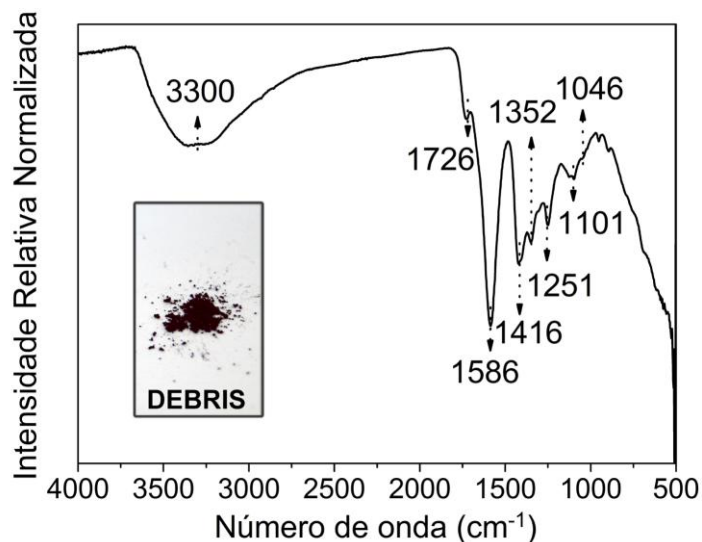
**Figura 19.** Imagem de microscopia eletrônica de transmissão [TEM] da amostra de partida (CNT-L3), demonstrando a predominância dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas nesta amostra. Barra = 300 nm.

Os DEBRIS dispersos em solução de NaOH 0,1M apresentam uma ampla faixa de absorção na região do Ultravioleta-visível, sendo observado um "ombro"

de absorção em torno de 280 nm, típico de sistemas cromóforos contendo ligações conjugadas (duplas ou triplas) ou substâncias aromáticas (**Figura 20-A**).



(A)

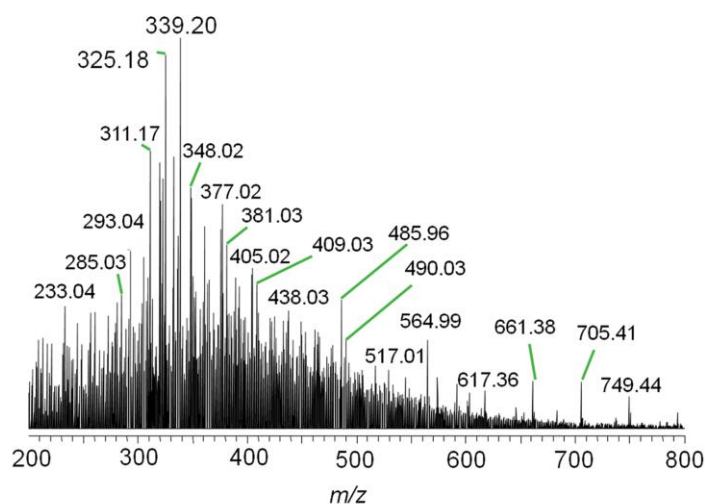


(B)

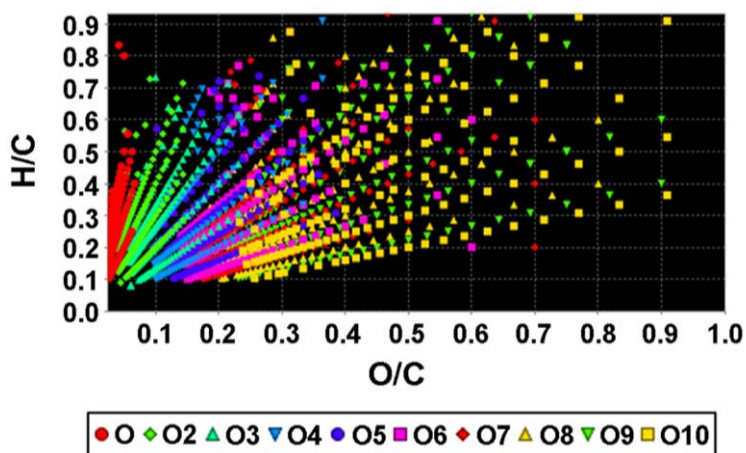
**Figura 20.** (A) Espectroscopia ultravioleta visível [UV-vis] e (B) Espectroscopia Infravermelho [FT-IR] dos fragmentos de carbono carboxilados (DEBRIS) isolados dos nanotubos de carbono oxidados. As fotografias ilustram os DEBRIS dispersos em solução de NaOH 0,1M (A) e no estado sólido após o processo de diálise e liofilização (B).

Na **Figura 20-B** está representado o espectro infravermelho [FT-IR] dos DEBRIS. As bandas observadas em 3300, 1726 e 1586  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas aos modos vibracionais dos grupamentos hidroxilas [ $\nu$  (O–H)], carbonilas ou carboxilas [ $\nu$ (C=O)] e ligações C-C de anéis aromáticos [ $\nu$ (C=C)], respectivamente. As bandas localizadas entre 1000 e 1450  $\text{cm}^{-1}$  podem ser atribuídas a vários modos vibracionais: C–H [ $\delta$ (CH<sub>2</sub>) +  $\delta_{\text{as}}$ (CH<sub>3</sub>) +  $\delta$ (CH<sub>3</sub>); 1300–1450  $\text{cm}^{-1}$ ], C–(CO)–C [ $\nu$  (C–CO–C) +  $\delta$ (C–CO–C): 1100–1300  $\text{cm}^{-1}$ , cetonas], C–O–C [ $\nu_{\text{as}}$ (C–O–C) +  $\nu$  (C–O–C): 1040–1275  $\text{cm}^{-1}$ , éteres] e C–O [ $\nu$  (C–O): 1000–1250  $\text{cm}^{-1}$ , alcoóis e fenóis]. Deste modo, uma mistura de grupamentos oxigenados como cetonas, éteres, fenóis, hidroxilas, ácidos carboxílicos, quinonas, lactonas e anidridos podem estar presentes nesta amostra DEBRIS. Considerando que estes FCCs são originados da superfície dos nanotubos de carbono, foram verificadas similaridades entre os tipos de grupamentos oxigenados nestes fragmentos com os grupamentos presentes na superfície de nanotubos de carbono oxidados<sup>138,149</sup>. A técnica espectrometria de massas de alta resolução [ESI FT-ICR/MS] tem sido amplamente utilizada para a caracterização estrutural de misturas complexas, como petróleo e matéria orgânica natural<sup>150,151</sup>. Assim, utilizamos esta técnica para caracterização estrutural dos DEBRIS. Cerca de 830 íons foram identificados (> 4% de abundância) na amostra DEBRIS, variando de 200 a 800  $m/z$  (**Figura 21-A**). Estes dados demonstram a natureza complexa destes FCCs originados durante o tratamento oxidativo dos CNT-L3 com HNO<sub>3</sub>. Diagramas de van Krevelen são comumente utilizados para visualização e interpretação dos dados de espectrometria de massas de alta resolução de misturas orgânicas complexas, fornecendo informações estruturais importantes como grau de aromaticidade, tipos de reações químicas e composição<sup>152,153</sup>. A **Figura 21-B** representa o diagrama de van Krevelen da amostra DEBRIS, construído a partir dos

dados de análise elementar, obtidos pela espectrometria de massas de alta resolução. Apesar da ampla distribuição de compostos orgânicos nesta amostra, a maioria dos fragmentos estão localizados entre as regiões de 0 a 0.7 (H/C) e 0 a 0.5 (O/C) do diagrama, as quais são típicas regiões de estruturas aromáticas altamente condensadas, porém com quantidades suficientes de oxigênio (O a O10) para solubilizá-los em solventes polares<sup>153-155</sup>.



(A)

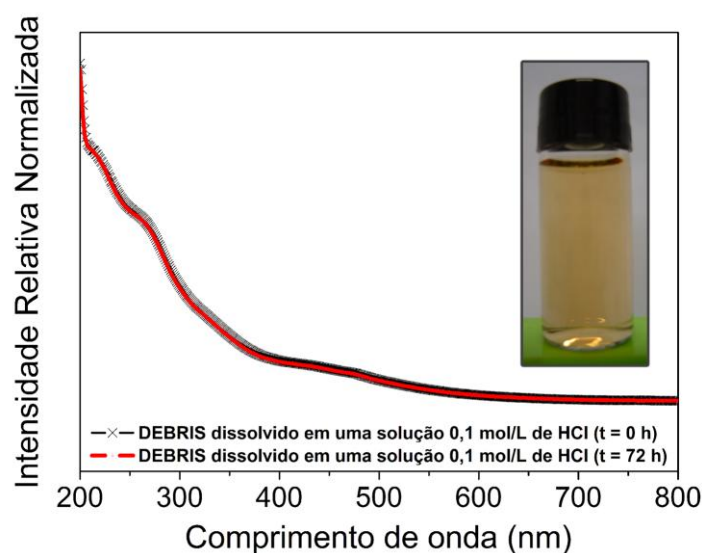


(B)

**Figura 21.** (A) Espectrometria de massas de alta resolução [ESI FT-ICR/MS] da amostra DEBRIS isolados dos nanotubos de carbono oxidados proveniente do Ensaio 8. (B) Diagrama de van Krevelen, construído a partir dos dados de análise elementar obtidos da análise de espectrometria de massas de alta resolução dos DEBRIS.

Propriedades de fluorescência e estudos de espectrometria de massas induziram alguns autores a classificar estes FCCs como espécies similares aos ácidos fúlvicos<sup>156</sup>. Assim, avaliamos se a amostra de FCCs obtida (DEBRIS) são solúveis em baixos pH, visto que é bem relatado na literatura que ácidos fúlvicos são solúveis nestes valores de pH, diferindo-os dos ácidos húmicos, que são insolúveis em baixos valores de pH<sup>157</sup>.

Na **Figura 22** demonstramos que os DEBRIS são solúveis e estáveis por longos períodos em uma solução de HCl 0,1 M (pH ~ 1,0), o que sugere similaridades destes resíduos gerados durante a purificação dos nanotubos de carbono com os ácidos fúlvicos de origem natural. No entanto, os DEBRIS apresentaram diagramas de van Krevelen diferentes dos ácidos fúlvicos convencionais, dado que estes são gerados pela decomposição de matéria orgânica natural (e.g. proteínas, carboidratos, lipídeos e compostos secundários)<sup>148</sup>.



**Figura 22.** Espectroscopia ultravioleta-visível [UV-Vis] dos fragmentos de carbono carboxilados (DEBRIS) dispersos em uma solução de HCl 0,1M no intervalo 0 hora e após 72 horas.

### 5.3. Interação com Biosistemas

A presença dos NTCs no ambiente não quer dizer que haverá a manifestação e observação de efeitos adversos ou nocivos (tóxicos) a eles associados. É importante lembrar que a expressão destes efeitos para uma espécie química depende das características da exposição e de seu comportamento no ambiente. Além das propriedades físico-químicas da espécie química em questão, devemos considerar, por exemplo: a magnitude, a duração e frequência da exposição, a suscetibilidade dos organismos e as vias de introdução nos biosistemas, estando esta última diretamente interligada aos processos cinéticos e dinâmicos da biointeração<sup>94,95,158</sup>.

A seguir serão apresentados e discutidos os principais resultados da interação dos nanotubos purificados nesta tese sobre os biosistemas selecionados. Foi adotada uma abordagem sistêmica [Top-down] (Nível Ecológico > Nível Imunológico > Nível Celular-molecular) para expressar as manifestações biológicas desta interação.

#### 5.3.1. Nível Ecológico: ecotoxicologia e tratamento de efluentes

Nanotubos de carbono são promissores materiais para a remediação de poluentes ambientais e no desenvolvimento de nanocompósitos e sensores. Assim, estas diversificadas aplicações poderão resultar em produtos finais contendo uma ampla quantidade de NTCs, desde poucos miligramas até quilogramas. Todavia, uma vez liberados no ambiente (intencional ou acidentalmente) poderão provocar impactos e efeitos adversos<sup>159</sup>. Desse modo, é urgente a realização de estudos ecotoxicológicos envolvendo NTCs<sup>160</sup>. Em seguida, com base nestes resultados ecotoxicológicos, tomadores de decisão estarão cientificamente subsidiados para

realizar e programar estudos e processos de avaliação e gestão dos riscos envolvendo estes nanomateriais e seus produtos<sup>161,162</sup>.

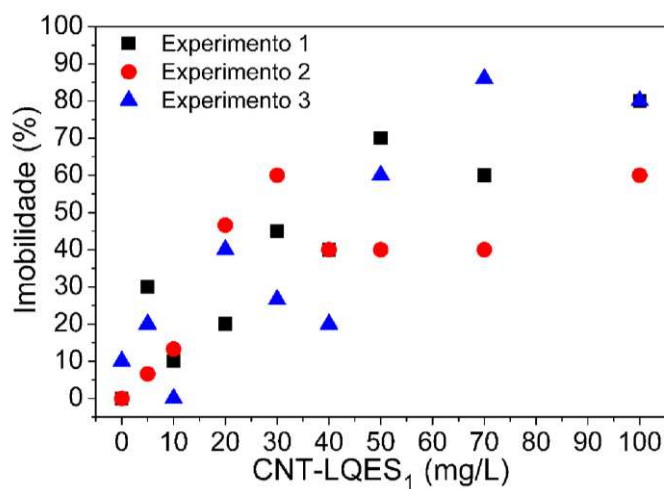
Para avaliar a toxicidade de uma determinada substância no ambiente, são realizados freqüentemente testes com organismos vivos, avaliando-se parâmetros como mudanças bioquímicas, fisiológicas, reprodutivas ou comportamentais. Em geral, estes testes consistem em submeter o organismo-teste a diferentes concentrações agente químico estudado, por um período de tempo pré-estabelecido de exposição, podendo ser avaliados efeitos agudos (curtos períodos) e crônicos (longos períodos), em função do tempo do ciclo de vida do organismo teste. Desta maneira, termos como  $CL_{50}$  e  $CE_{50}$  são comumente empregados, representando a concentração mínima para causar a morte em 50% da população estudada, ou a concentração mínima para causar uma resposta em 50% da população estudada, respectivamente. De fato, a determinação destes valores de  $CL_{50}$  e  $CE_{50}$  constitui um dos principais objetivos dos testes de toxicidade, pois testes toxicológicos não são planejados para demonstrar que um agente químico é seguro, mas sim para caracterizar que tipo de efeito tóxico um agente químico produz<sup>95</sup>.

#### a) Avaliação da toxicidade aguda sobre *Daphnia similis*

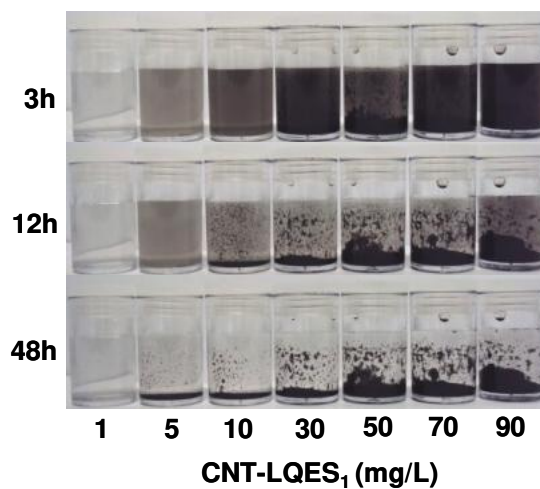
Microcrustáceos filtradores do gênero *Daphnia* são comumente utilizados na área de ecotoxicologia aquática como organismos-teste ou bioindicadores<sup>163,164</sup>. Assim, inicialmente, avaliamos o efeito dos CNT-LQES<sub>1</sub> sobre o organismo *Daphnia similis* conforme metodologia recomendada pela ABNT<sup>117</sup> (Teste de toxicidade aguda, 48 horas de exposição). No entanto, não foi possível obter uma curva dose-resposta reprodutível possivelmente devido aos “efeitos de aglomeração” dos CNT-LQES<sub>1</sub> na água mineral reconstituída utilizada neste teste de ecotoxicidade (**Figura 23-A**). Na **Figura 23-B** observamos nitidamente que os



CNT-LQES<sub>1</sub> encontram-se em um estado altamente aglomerado e depositado no fundo dos recipientes após 48h horas do preparo das suspensões em água mineral reconstituída. Para demonstrar a influência da aglomeração na toxicidade aguda, foi montado um experimento onde os organismos foram introduzidos nas dispersões contendo os CNT-LQES<sub>1</sub> após 2 horas do seu preparo. Neste caso, podemos verificar uma acentuada diminuição na porcentagem de organismos imóveis (**Apêndice, item 8.5.**).



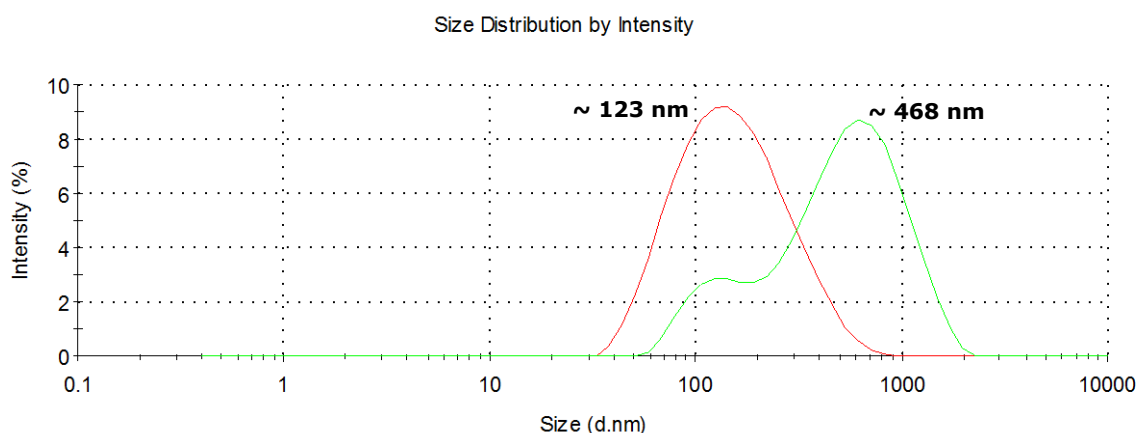
(A)



(B)

**Figura 23.** (A) Imobilidade de *Daphnia similis* após 48 horas de exposição aos CNT-LQES<sub>1</sub> (triplicatas independentes); (B) Estabilidade das suspensões de CNT-LQES<sub>1</sub> em água mineral reconstituída utilizada no teste de ecotoxicidade aguda.

Contudo, foi verificado que este processo de aglomeração dos CNT-LQES<sub>1</sub> em água mineral reconstituída [ $\sim 44$  mg/L de carbonato de cálcio (dureza)] é um evento que se inicia rapidamente, em tempo menor que 10 minutos, conforme demonstrado pelo aumento do tamanho do diâmetro médio das partículas nesta suspensão (**Figura 24**). Enquanto que os CNT-LQES<sub>1</sub> suspensos em água deionizada são estáveis por um período superior a uma semana, sem alterações significativas no tamanho das partículas. Estes efeitos de aglomeração dos nanotubos de carbono em água mineral tem sido um dos fatores que dificultam a comparação dos dados publicados na literatura utilizando os microcrustáceos do gênero *Daphnia*, uma vez que este evento influencia a biodisponibilidade dos NTCs para aos organismos durante os testes ecotoxicológicos<sup>165</sup>.



**Figura 24.** Medidas de Espalhamento de Luz Dinâmico [DLS] das suspensões de CNT-LQES<sub>1</sub> (5 mg/L) em água deionizada (linha vermelha) e em água mineral reconstituída (linha verde) utilizada nos testes de ecotoxicidade com *Daphnia similis*. Os CNT-LQES<sub>1</sub> apresentaram um diâmetro médio de  $\sim 123 \pm 2,0$  nm e  $\sim 468 \pm 109$  nm em água deionizada e em água mineral reconstituída, respectivamente. Estas análises foram realizadas no intervalo de tempo inferior a 10 minutos após a preparação das suspensões.

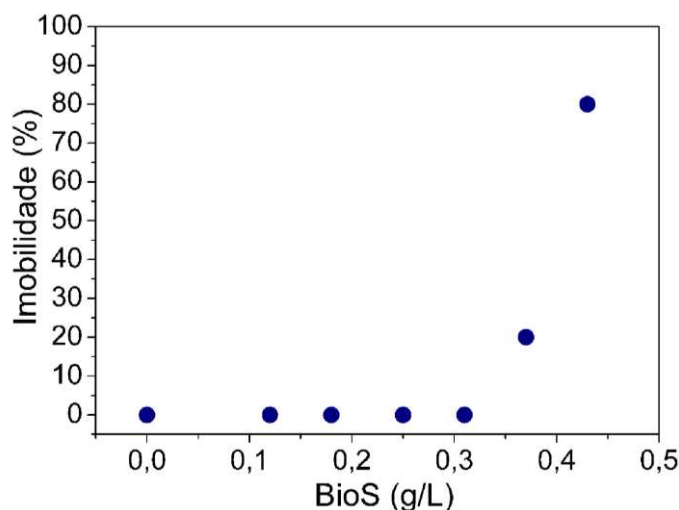
Desse modo, devem ser tomados cuidados na interpretação e extrapolação dos resultados<sup>166-168</sup>. Visto que, para o estabelecimento da curva dose-resposta e obtenção dos valores de CL<sub>50</sub> e CE<sub>50</sub> devem ser assumidas as seguintes afirmativas:

i) a resposta é inequivocamente devida à administração da substância ou agente estudado; ii) a resposta deve de fato estar relacionada com a dose e, iii) a avaliação da resposta deve ser feita por métodos quantificáveis e expressar exatamente a toxicidade<sup>169</sup>.

Diante destes problemas enfrentados para obtenção de suspensões estáveis de CNT-LQES<sub>1</sub> para realização do teste de toxicidade aguda com *D. similis*, partimos para a prospecção de moléculas naturais, ambientalmente relevantes, capazes de atuar como agentes estabilizadores destes nanotubos purificados em água mineral reconstituída, uma vez que o desenvolvimento de metodologias para avaliação da toxicidade de nanomateriais está em plena discussão na literatura<sup>170,171</sup>. Neste contexto, uma classe interessante de moléculas foram os biossurfactantes produzidos por microorganismos, visto que estas biomoléculas apresentam baixa toxicidade e possuem a capacidade de emulsificar substâncias hidrofóbicas<sup>172,173</sup>.

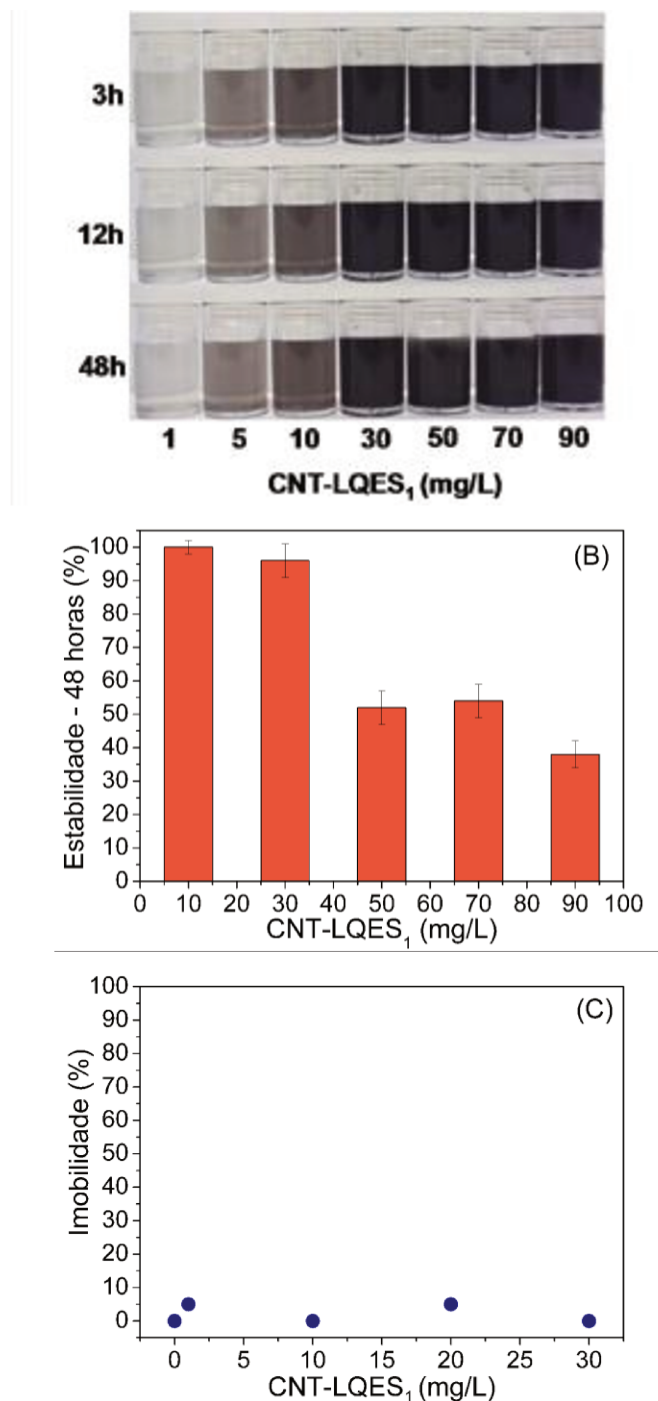
O Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana (LSFM) da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP desenvolve atividades de pesquisa envolvendo a produção de biossurfactantes de origem microbiana. Em parceria com o LQES, foi demonstrado que o microorganismo *Bacillus subtilis* LSFM-05, isolado de solos contaminados com petróleo na região da cidade de Paulínia-SP, é capaz de produzir biossurfactantes quando crescido em meio contendo glicerina (resíduo da produção de biodiesel) como única fonte de carbono<sup>118</sup>. Assim, este extrato bruto contendo o biossurfactante produzido por *B. subtilis* LSFM-05 foi homogeneizado em água mineral reconstituída para obtenção da fração solúvel do biossurfactante (item 4.4.1). Esta fração contendo os biossurfactantes solubilizados em água mineral reconstituída foi denominada BioS.

Uma importante propriedade das moléculas utilizadas para a suspensão de nanotubos de carbono visando estudos toxicológicos reside em apresentarem baixa toxicidade, como por exemplo, mostram os estudos com o surfactante sintético Pluronic<sup>®174</sup>. Assim, foi realizado um teste preliminar de toxicidade aguda do BioS sobre o organismo *D. similis*, onde verificamos que este biosurfactante obtido apresenta baixa toxicidade aguda [ $CE(I)_{50} = 0,4$  g/L ou 400 mg/L] (**Figura 25**). Portanto, foi utilizada a concentração de 0,25 g/L nos experimentos para avaliação da capacidade de dispersão dos CNT-LQES<sub>1</sub> com este biosurfactante em água de cultivo, uma vez que nesta concentração o BioS não apresenta nenhum efeito tóxico.



**Figura 25.** Imobilidade de *Daphnia similis* após 48 horas de exposição aos biosurfactantes produzidos pelo microorganismo *Bacillus subtilis* LSFM-05 (BioS).

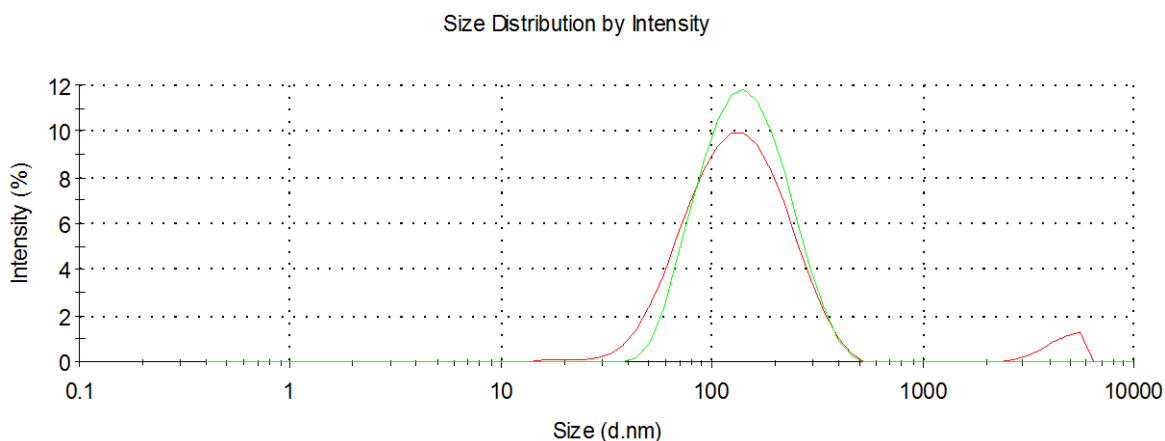
Na **Figura 26-A** demonstramos que o biosurfactante isolado do microorganismo *Bacillus subtilis* (BioS) foi capaz de estabilizar os CNT-LQES<sub>1</sub> em água mineral reconstituída utilizada nos testes de ecotoxicidade para *D. similis*, sendo que 30 mg/L de CNT-LQES<sub>1</sub> é a concentração limite para obtenção de uma suspensão estável até 48 horas (período de exposição exigido no teste de ecotoxicidade aguda), quando utilizado 0,25 g/L de BioS (**Figura 26-B**).



**Figura 26.** (A) Fotografia das suspensões de CNT-LQES<sub>1</sub> em diferentes concentrações (1 a 90 mg/L) e intervalos de tempo (3 a 48 horas) após a dispersão com os biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* LSFM-05 (BioS, 0,25 g/L) em água mineral reconstituída; (B) Estabilidade das suspensões de CNT-LQES<sub>1</sub> após a dispersão com o BioS (0,25 g/L) em água mineral reconstituída; (C) Imobilidade de *Daphnia similis* após 48 horas de exposição aos CNT-LQES<sub>1</sub> (1 a 30 mg/L) dispersos com o BioS.

Em seguida, foi avaliada a toxicidade aguda dos CNT-LQES<sub>1</sub> (1 a 30 mg/L) após a dispersão com o biossurfactante (0,25 g/L) sobre o organismo *D. similis*. Verificamos que os CNT-LQES<sub>1</sub> apresentam baixa toxicidade aguda após a dispersão com BioS, pois não foi observado efeito tóxico (imobilidade) para os microcrustáceos até a concentração de 30 mg/L [CENO = 30mg/L] (**Figura 26-C**).

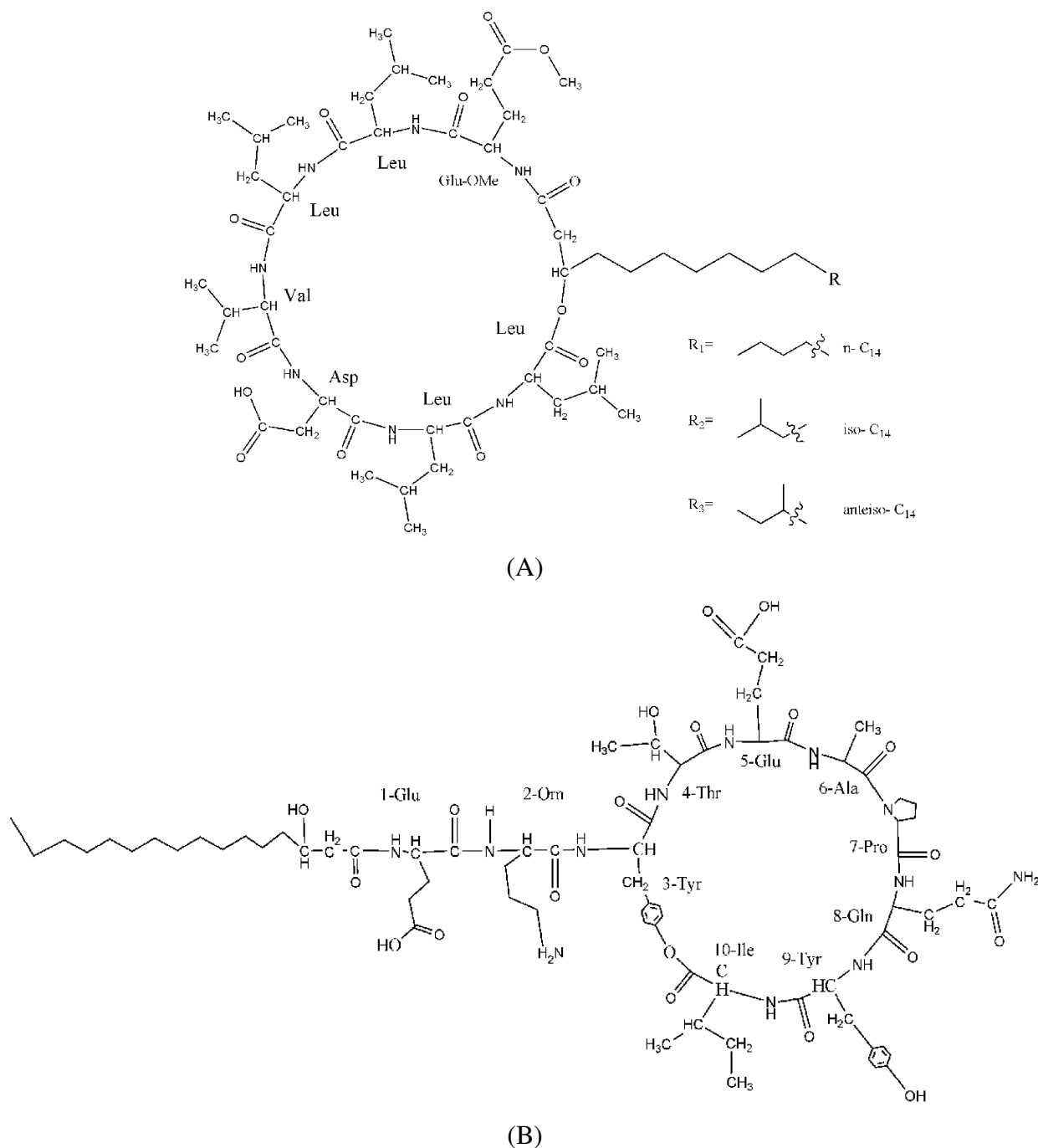
Análises de distribuição do tamanho de partículas por espalhamento de luz dinâmico demonstraram que os CNT-LQES<sub>1</sub> (5 mg/L) dispersos com BioS (0,25 g/L) em água mineral reconstituída não apresentam um aumento significativo no tamanho das partículas após 48 horas do preparo das suspensões, o que indica que não ocorreram "efeitos de aglomeração" dos nanotubos na presença do biossurfactante (**Figura 27**).



**Figura 27.** Medidas de Espalhamento de Luz Dinâmico [DLS] das suspensões de CNT-LQES<sub>1</sub> (5 mg/L) em água deionizada (linha vermelha) e em água mineral reconstituída (linha verde) após a dispersão com os biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* LSFM-05 (BioS; 0,25g/L). Os CNT-LQES<sub>1</sub> apresentaram um diâmetro médio de  $\sim 129 \pm 2,0$  nm e  $\sim 126 \pm 2,8$  nm em água deionizada e em água mineral reconstituída contendo o BioS, respectivamente. Estas medidas foram realizadas após 48 horas da preparação das suspensões.

Uma variedade de surfactantes sintéticos (aniônicos, catiônicos e neutros) tem sido estudada para a dispersão de nanotubos de carbono. Tem sido relatado que a eficiência da dispersão utilizando surfactantes não-carregados (neutros) é dependente do tamanho da cadeia carbônica alquilada, enquanto que para os surfactantes carregados, a eficiência da dispersão é mais influenciada pela quantidade de carga do que pelo tamanho da cadeia, devido os efeitos de repulsão eletrostática entre as cargas. Além disso, o tipo de nanotubo empregado (e.g. morfologia, superfície e etc.) e tempo de sonicação devem ser considerados<sup>175,176</sup>. Por conseguinte, dado a importância da estrutura dos surfactantes para a eficiência do processo de dispersão dos nanotubos em meio aquoso, os biosurfactantes produzidos pelo *B. subtilis* (amostra BioS) foram caracterizados utilizando as técnicas de espectrometria de massas [ESI FT-ICR/MS], espectroscopia de infravermelho [FT-IR] e ressonância magnética nuclear [RMN]<sup>177,178</sup>. A amostra BioS apresentou uma mistura predominante de dois tipos de biosurfactantes: Surfactina e Fengicina. As estruturas primárias destas moléculas estão apresentadas na **Figura 28**. Embora não tenha sido objetivo nesta Tese aprofundar nos mecanismos da interação e dispersão dos CNT-LQES<sub>1</sub> com BioS, os dados da caracterização estrutural dos biosurfactantes utilizados são fundamentais para os trabalhos futuros e discussões, pois ao nosso conhecimento, não existem trabalhos publicados na literatura relatando a dispersão de nanotubos de carbono de parede múltiplas com esta classe de moléculas produzidas por *B. subtilis*. Nesse sentido, existe apenas o trabalho publicado por Li e colaboradores em 2005<sup>179</sup>, utilizando a Surfactina para dispersão de NTCPS em *água deionizada*, onde relatam que esta molécula foi eficiente para dispersão dos nanotubos, levando a formação de suspensões contendo nanotubos individualizados. Neste caso específico, foi

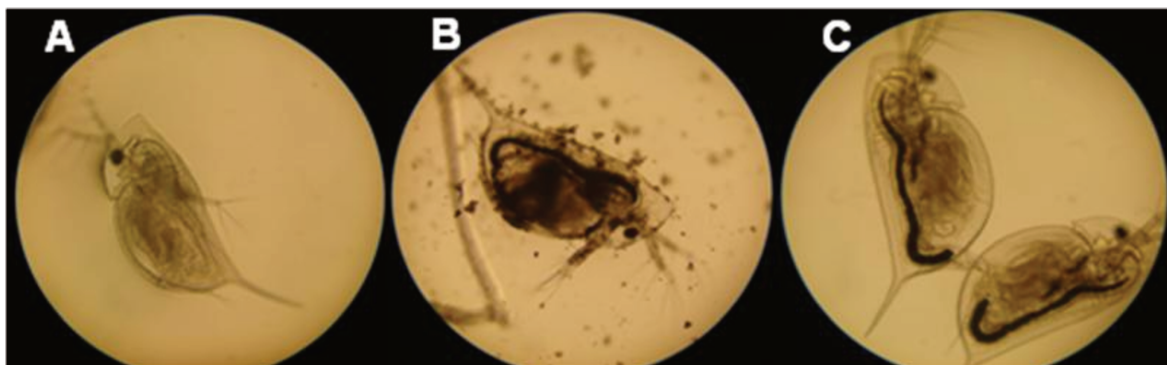
explorada a propriedade de fluorescência dos NTCPS para comprovar a eficácia do processo de dispersão.



**Figura 28.** Estrutura primária dos biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* LSFM-05 presentes na amostra BioS: (A) Surfactina e (B) Fengicina.



Retomando nossos experimentos, na **Figura 29**, podemos observar que os CNT-LQES<sub>1</sub> ficam aderidos na carapaça e articulações do microcrustáceo, bem como a presença de aglomerados de nanotubos. Este efeito físico de aderência foi também relatado por Zhu e colaboradores<sup>180</sup>, quando de estudos de toxicidade aguda (imobilidade) de NTCPM e NTCPS para *Daphnia magna* obtiveram valores de CE<sub>50</sub> = 8,7 mg/L e 1,3 mg/L, respectivamente. Contudo, é importante ressaltar que estes valores obtidos podem estar equivocados, uma vez que os autores não relataram a influência dos efeitos de aglomeração dos nanotubos na água de cultivo durante a realização destes estudos.



**Figura 29.** Imagens de microscopia óptica do microcrustáceo *Daphnia similis* em água mineral reconstituída após 48 horas de exposição: (A) Controle, biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* LFSM-05 (BioS) (0,25 g/L); (B) CNT-LQES<sub>1</sub> (10 mg/L); (C) CNT-LQES<sub>1</sub> (10 mg/L) disperso com BioS (0,25 g/L).

Por outro lado, após a dispersão dos CNT-LQES<sub>1</sub> com o BioS não verificamos este efeito físico de aderência e aglomerados (**Figura 29**), podendo ser este um dos motivos que levaram a redução do efeito sobre a imobilidade, permitindo que os organismos se locomovessem normalmente na coluna d'água. Estes resultados estão na mesma direção que os estudos realizados por Roberts e colaboradores<sup>170</sup>, onde foi demonstrado que a funcionalização de NTCPS com um lipídio [lysophosphatidylcholine] pode levar a dispersão dos nanotubos em água

mineral reconstituída com a redução da toxicidade aguda sobre *Daphnia magna*, principalmente, devido à redução dos efeitos de aglomeração e aderência dos nanotubos na carapaça e articulações do microcrustáceo. Neste caso, não foi verificado nenhum efeito tóxico até a concentração de 10 mg/L<sup>170</sup>. Embora os CNT-LQES<sub>1</sub> não terem apresentados elevados valores de toxicidade aguda para *D. similis*, eles podem ser ingeridos e acumulados no trato intestinal destes organismos, de modo que suas implicações sobre cadeia trófica e especiação química devem ser consideradas e estudadas<sup>181,182</sup>. Nesse sentido, utilizando concentrações mais realísticas para uma possível exposição ambiental de NTCs (< 1,0 mg/L) verificamos que os CNT-LQES<sub>1</sub> podem modular a toxicidade aguda de um importante contaminante ambiental, o sulfato de cobre, sobre o organismo *Daphnia similis*, ocasionando uma elevada redução do efeito toxicológico deste metal após a interação com os nanotubos purificados (**Apêndice, item 8.5.**). Este experimento é apenas uma demonstração da necessidade de estudos envolvendo a especiação química de nanotubos de carbono na presença de poluentes ambientais, visto que, é justamente esta capacidade de interação com poluentes ambientais que tornam os NTCs promissores materiais para remediação e tratamento de águas contaminadas com metais pesados e outros poluentes<sup>183,184</sup>. Desse modo, com base em nossos resultados, podemos considerar que os CNT-LQES<sub>1</sub> são materiais de baixa toxicidade aguda para o microcrustáceo do gênero *Daphnia* quando comparado aos poluentes aquáticos clássicos (e.g. metais, agroquímicos, detergentes e fármacos)<sup>163</sup> e, a modificação da superfície dos NTCs com biomoléculas naturais pode provocar uma alteração nos seus efeitos ecotoxicológicos. Considerando que biossurfactantes produzidos por microorganismos são encontrados em diferentes ambientes na Natureza, estas moléculas poderão interagir com os nanotubos, influenciando seu comportamento

no ambiente, assim como tem sido demonstrado nos estudos envolvendo a interação de NTCs com substâncias húmicas<sup>185,186</sup>.

### ***b) Avaliação de efeito mutagênico (Teste de Ames)***

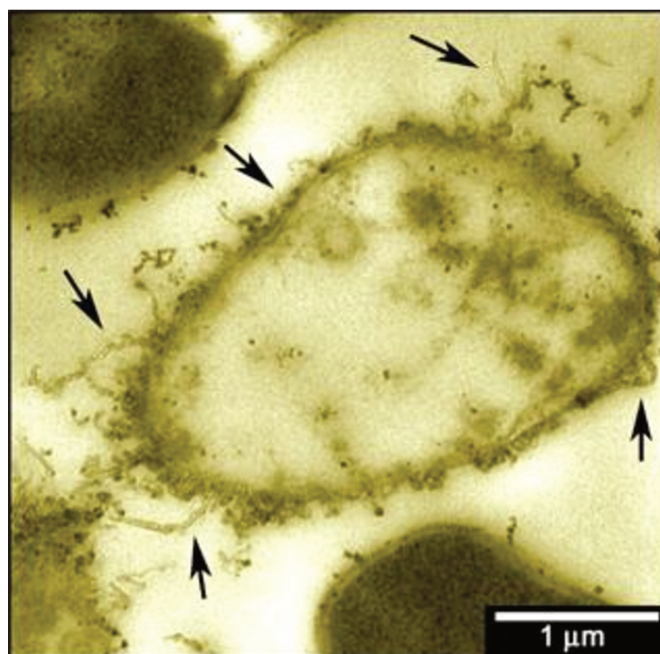
Um dos principais efeitos nocivos apresentados por poluentes ambientais são os efeitos causados sobre o material genético dos organismos (Genotoxicidade), os quais induzem a formação de carcinomas e o desenvolvimento de doenças hereditárias<sup>187</sup>. Trabalhos publicados na literatura relatam que NTCs podem induzir danos no material genético em modelos biológicos *in vitro*<sup>188,189</sup> e *in vivo*<sup>190</sup>. Contudo, recentemente, demonstramos que os CNT-LQES<sub>1</sub> não são capazes de induzir efeitos mutagênicos sobre diferentes linhagens de *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames)<sup>184</sup>, realizado de acordo com as recomendações da Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Econômico [OECD]. Este teste é baseado na utilização de linhagens de bactérias que perderam a capacidade de crescer em meio de cultivo isento de histidina, devido mutações em um conjunto de genes envolvidos na síntese deste aminoácido essencial. No entanto, quando estas linhagens são expostas a agentes mutagênicos, estes são capazes de induzir ou reverter esta mutação inicial, e as bactérias podem crescer em meio sem histidina, sendo então chamadas de revertentes. O número de revertentes é proporcional a potência e concentração do agente mutagênico. Considera-se um efeito mutagênico quando o índice I.M. (indução de mutação) é igual ou superior a 2. Além disso, utilizando um *pool* externo de enzimas extraídas de fígado de ratos (Fração S9), é possível identificar agentes mutagênicos que são dependentes de ativação metabólica<sup>184</sup>. Na **Tabela 5**, estão apresentados os resultados obtidos sobre as linhagens de *S. typhimurium*, o que indica a ausência de efeito mutagênico dos CNT-LQES<sub>1</sub> até a concentração de 100 µg/ml, quando empregado o Teste de Ames.

**Tabela 5.** Avaliação da atividade mutagênica dos CNT-LQES<sub>1</sub> sobre linhagens de *Salmonella typhimurium* na ausência (-) e presença (+) de ativação metabólica [S9].

Linhagens	CNT-LQES <sub>1</sub> (µg/placa)	S9 (-) No. de revertentes <sup>a</sup>	S9 (-) I. M. <sup>b</sup>	S9 (+) No. de revertentes <sup>a</sup>	S9 (+) I. M. <sup>b</sup>
TA97	0	191 ± 7	---	217 ± 88	---
	1	203 ± 20	1,06	259 ± 63	1,19
	4	199 ± 15	1,04	188 ± 39	0,87
	10	182 ± 7	0,96	243 ± 26	1,12
	40	180 ± 8	0,94	216 ± 11	1,12
	100	191 ± 11	1,00	0,93	0,99
	F <sup>c</sup>	1,57	---	---	---
	C. P. <sup>d</sup>	872 ± 109	4,57	570 ± 153	2,63
TA98	0	28 ± 8	---	31 ± 8	---
	1	33 ± 13	1,17	32 ± 11	1,04
	4	35 ± 8	1,25	38 ± 3	1,25
	10	27 ± 5	0,96	28 ± 5	0,90
	40	35 ± 8	1,26	31 ± 2	1,00
	100	30 ± 4	1,06	31 ± 10	1,01
	F <sup>c</sup>	0,58	---	1,11	---
	C. P. <sup>d</sup>	423 ± 63	15,1	173 ± 12	5,64
TA100	0	245 ± 9	---	134 ± 17	---
	1	241 ± 28	0,98	136 ± 26	1,01
	4	270 ± 9	1,11	152 ± 16	1,13
	10	275 ± 39	1,12	131 ± 26	0,98
	40	229 ± 27	0,94	145 ± 23	1,08
	100	210 ± 27	0,86	134 ± 27	1,00
	F <sup>c</sup>	2,62	---	0,34	---
	C. P. <sup>d</sup>	563 ± 71	2,3	2688 ± 640	20,1
TA1535	0	32 ± 4	---	19 ± 4	---
	1	34 ± 2	1,07	24 ± 11	1,27
	4	29 ± 7	0,91	17 ± 4	0,89
	10	33 ± 6	1,02	30 ± 5	1,59
	40	44 ± 8	1,38	17 ± 15	0,89
	100	31 ± 3	0,96	32 ± 12	1,72
	F <sup>c</sup>	1,46	---	1,48	---
	C. P. <sup>d</sup>	565 ± 44	17,6	135 ± 19	7,27
TA102	0	260 ± 44	---	225 ± 24	---
	1	243 ± 39	0,93	228 ± 43	1,01
	4	285 ± 23	1,09	214 ± 36	0,95
	10	261 ± 33	1,00	191 ± 47	0,85
	40	263 ± 27	1,01	184 ± 44	0,82
	100	210 ± 37	0,81	206 ± 36	0,92
	F <sup>c</sup>	2,10	---	0,49	---
	C. P. <sup>d</sup>	2609 ± 475	10,2	472 ± 19	2,10

<sup>a</sup> Média ± desvio-padrão do número de colônias de revertentes de histidina por placa após 48-72h de incubação. <sup>b</sup> I.M. (Indução de mutação) = taxa do número de colônias revertentes de histidina por placa induzidas pelo CNT-LQES<sub>1</sub> dividido pelo número de colônias espontâneas no Controle Negativo. <sup>c</sup> O valor F foi calculado pela análise de variância [ANOVA], onde o valor crítico para o F é 3,10 onde  $\alpha = 0.05$ . <sup>d</sup> Controles positivos (C.P.) foram: (a) Fração S9(-): 1 e 0,5µg de 4-QO/placa para TA97 e TA98, respectivamente; 0,5 e 1 µg de SA/placa para T100 e TA1535 respectivamente, e 0,5 µg de MMC/placa para TA102. (b) Fração S9(+): 5µg de 2-AF/placa para TA97 e 2-AA para TA98 (0,5 µg/placa), TA100, TA1535 (1 µg/placa) e TA102 (2,5 µg/placa).

Uma vez que o Teste de Ames é uma metodologia clássica e recomendada pela OECD para avaliação toxicológica de agentes químicos, a empresa Bayer Ltd, empregou esta metodologia para demonstrar que seus nanotubos de carbono de parede múltiplas [Baytubes<sup>®</sup>] não induzem efeito mutagênico até a concentração máxima testada de 5000  $\mu\text{g}/\text{placa}^{191}$ . No entanto, é preciso levar em consideração alguns requisitos durante a interpretação e extrapolação dos resultados do Teste de Ames para nanotubos de carbono<sup>192</sup>. Através de análises de microscopia eletrônica de transmissão verificamos que os CNT-LQES<sub>1</sub> não possuem a capacidade de internalização celular em *S. typhimurium* (**Figura 30**). Estes resultados sugerem que este teste amplamente utilizado na área de toxicologia genética pode não ser apropriado para a avaliação da mutagenicidade de nanotubos de carbono, pois para que ocorra a mutação os agentes devem penetrar no organismo, atingir o DNA e causar a lesão.



**Figura 30.** Microscopia eletrônica de transmissão [TEM] da *Salmonella typhimurium*, linhagem TA 98, após incubação com os nanotubos de carbono purificados (CNT-LQES<sub>1</sub>). As setas indicam os nanotubos interagindo com superfície externa da membrana da bactéria.

Nesse sentido, devido às controvérsias quanto à avaliação experimental dos efeitos mutagênicos e carcinogênicos envolvendo nanomateriais<sup>193</sup>, um grupo de trabalho da OECD [Working Party on Manufactured Nanomaterials (WPMNs)] está discutindo a padronização e validação de testes genotoxicológicos para estes materiais<sup>194</sup>.

### *c) Tratamento de efluentes contendo FCCs*

Apesar dos avanços na área de nanoecotoxicologia, de modo geral, os esforços atuais estão centralizados na avaliação dos efeitos adversos dos NTCs sobre organismos representativos dos diferentes níveis tróficos (produtores, consumidores e decompositores)<sup>195,196</sup>. Porém, poucos esforços têm sido realizados na direção de minimizar os riscos de contaminação através de estudos de ciclo de vida<sup>197,198</sup>. Nessa direção, Albrecht<sup>199</sup> e Hutchison<sup>200</sup> enfatizam a importância dos conceitos e metodologias empregadas pelas disciplinas conhecidas como Ecologia Industrial e Química Verde em N&N.

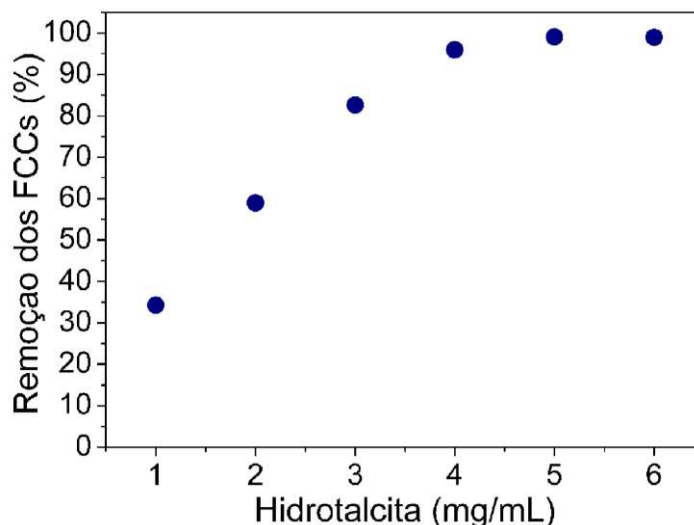
Um exemplo da necessidade destes estudos de ciclo de vida é o trabalho realizado por Plata e colaboradores (2009)<sup>197</sup>, onde demonstraram que durante a síntese de NTCs [método CVD] são gerados e liberados para o ambiente cerca de 45 tipos de compostos orgânicos voláteis [VOCs], incluindo hidrocarbonetos poliaromáticos [PHAs]. Desse modo, como já se conhecem os efeitos nocivos destes VOCs e PHAs devem ser tomadas medidas de precaução quanto à saúde ocupacional, pois o método CVD é o mais empregado na produção massiva de NTCs.

Diante deste cenário, embora a eliminação dos fragmentos de carbono carboxilados (FCCs) da superfície dos NTCs oxidados seja uma importante etapa

durante a purificação e funcionalização destes materiais<sup>42,147,201-203</sup>, por outro lado, este processo introduz um problema ambiental em potencial. Após a caracterização físico-química dos FCCs (DEBRIS), item 5.2, foi observado que estes resíduos carbonáceos apresentam características similares aos ácidos fúlvicos e a matéria orgânica dissolvida [DOM]<sup>148,156</sup>, sendo que, é amplamente reconhecido que ácidos fúlvicos e DOM interferem na qualidade da água para consumo humano, no bloqueio da luz solar, interação toxicantes, e são precursores de espécies mutagênicas e carcinogênicas<sup>204,205</sup>. Considerando a crescente expansão da indústria de NTCs, e sendo a etapa de remoção dos FCCs importante para o aumento da qualidade destes nanomateriais, constatamos que estes resíduos carbonáceos serão futuros efluentes dentro desta emergente indústria e precisam ser corretamente eliminados. Assim, de acordo com os paradigmas da Ecologia Industrial e Química Verde, desenvolvemos um processo [PCT/BR2010/000372] utilizando materiais inorgânicos do tipo hidrotalcitas (HDT) e sulfato de alumínio [Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>.14H<sub>2</sub>O] para a remoção destes resíduos carbonáceos que estão dispersos na solução de NaOH 0,1M (efluente oriundo da purificação e funcionalização de NTCs)<sup>206</sup>

Hidrotalcitas (HDT) são argilas aniônicas e de ocorrência natural. Estes compostos são representados pela fórmula geral: M<sup>2+</sup><sub>x</sub>M<sup>3+</sup><sub>y</sub>(OH)<sub>2x+3y-nz</sub>(A<sup>n-</sup>)<sub>z</sub>.tH<sub>2</sub>O. Uma grande variedade de materiais HDT pode ser sintetizada através da combinação de diferentes cátions metálicos (M<sup>2+</sup> e M<sup>3+</sup>) e ânions inorgânicos (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, Cl<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), ou ânions orgânicos [sulfonatos, carboxilatos e fosfonatos], além da possibilidade de variar a razão M<sup>2+</sup>/M<sup>3+</sup>. Há vários exemplos de aplicações tecnológicas destas argilas para remoção de espécies carregadas negativamente de meio aquoso através de sorção química (troca iônica e adsorção superficial)<sup>207</sup>.

Conforme demonstrado na **Figura 31** o material HDT sintetizado no LQES foi altamente eficiente ( $\sim 99\%$ ) na remoção dos FCCs dispersos em solução de NaOH 0,1M (Efluente-Estoque).

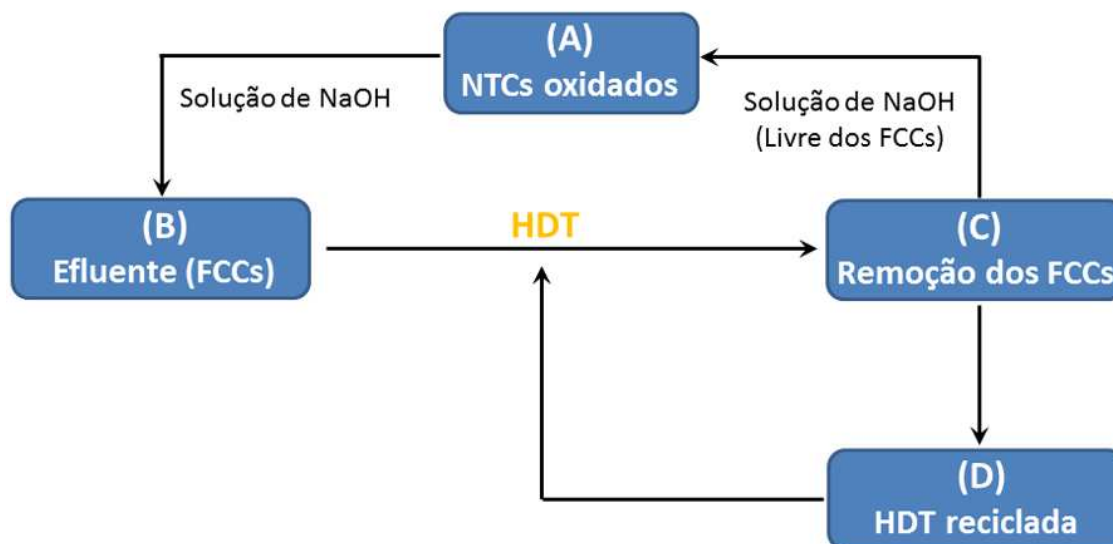


**Figura 31.** Capacidade de remoção dos FCCs (DEBRIS) da solução de NaOH 0,1M (Efluente-Estoque) originados durante o processo de purificação dos nanotubos de carbono (CNT-L3) em função da quantidade hidrotalcita (HDT).

Uma propriedade intrínseca destes materiais do tipo HDT é o chamado "efeito memória", que consiste na capacidade deste material retornar a sua estrutura lamelar original após serem submetidos a tratamentos térmicos, até aproximadamente  $500\text{ }^{\circ}\text{C}$ , em atmosfera oxidante. Devido este efeito memória, estes materiais estão sendo avaliados como possíveis "filtros recicláveis" durante o tratamento de efluentes ou em processos químicos industriais<sup>208</sup>. Desse modo, este efeito memória abre a possibilidade de remover os FCCs dispersos na solução de NaOH 0,1M com a reciclagem do material adsorvente (HDT). Além disto, também foi verificado que o pH e a molaridade desta solução permanece inalterados após a remoção dos FCCs com o material HDT. Assim, tais resultados suportam a reutilização desta solução de NaOH 0,1M em posteriores tratamentos de NTCs



oxidados, proporcionando economia de água via processo de reuso e diminuição de efluentes<sup>206</sup> (**Figura 32**).

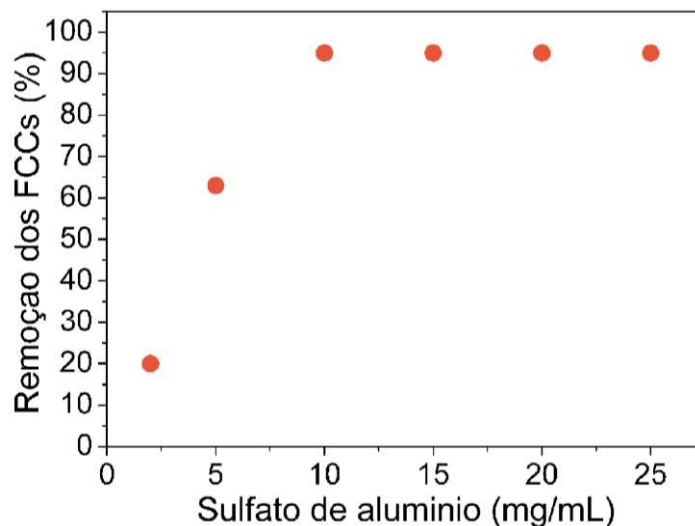


**Figura 32.** Esquema do processo para tratamento de efluente contendo os fragmentos de carbono carboxilados (FCCs) pela utilização do material Hidrotalcita (HDT). (A) Os nanotubos oxidados após tratamentos com ácidos oxidantes contendo os FCCs adsorvidos na superfície; (B) Geração de efluente contendo FCCs dispersos em solução de NaOH (C) Etapa de remoção dos fragmentos da solução pela utilização do material HDT e (D) reciclagem do material HDT via tratamento térmico.

A argila sintética HDT desenvolvida no LQES<sup>208</sup> já está disponível no mercado, devido o licenciamento de sua patente para a empresa Contech®, o que permite seu uso em escala industrial e laboratorial para o tratamento de efluentes contendo FCCs oriundos de NTCs, e mais recentemente, para resíduos provenientes do processo de purificação de óxidos de grafeno, um promissor nanomaterial de carbono<sup>209</sup>.

O sulfato de alumínio é um dos materiais mais empregados mundialmente no tratamento de efluentes industriais e na purificação de águas para o consumo humano<sup>210</sup>. Desse modo, decidimos testar sua eficiência na remediação dos resíduos carbonáceos oriundos da purificação dos CNT-L3. Na **Figura 33**

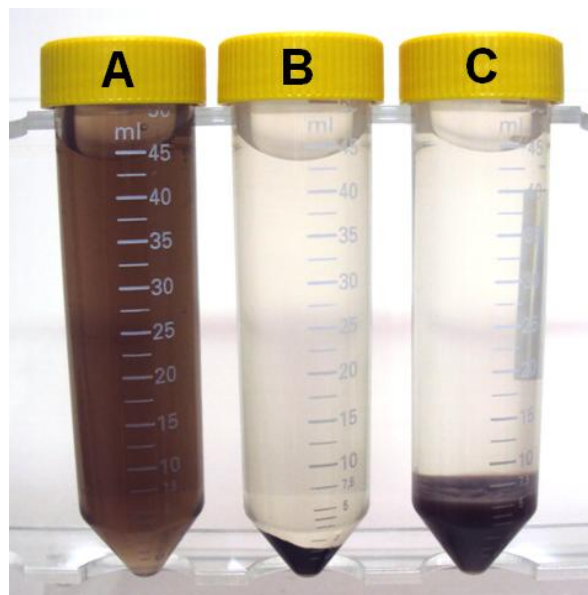
demonstramos que o sulfato de alumínio é capaz de remover os FCCs dispersos na solução de NaOH 0,1M (Efluente-Estoque), sendo verificado um valor máximo de 95% de eficiência, em nossas condições experimentais. Contudo, não foi possível a reutilização da solução de NaOH 0,1M, devido a alteração do pH da solução durante a remoção dos FCCs com o sulfato de alumínio<sup>206</sup>.



**Figura 33.** Capacidade de remoção dos FCCs (DEBRIS) da solução de NaOH 0,1M (Efluente-Estoque) originados durante o processo de purificação dos nanotubos de carbono (CNT-L3) em função da quantidade de sulfato de alumínio.

Análises de Potencial-Zeta dos FCCs (DEBRIS) indicam que estes fragmentos carbonáceos possuem carga negativa ( $-45 \text{ mV} \pm 5,0$ ), o que justifica sua afinidade pelos materiais do tipo hidrotalcitas e sulfato de alumínio, ambos positivamente carregados e os mecanismos propostos para esta interação é o de adsorção para o material HDT<sup>211</sup> (**Apêndice, item 8.6**). e de coagulação para o sulfato de alumínio<sup>207,212</sup>. Estes resultados sugerem que os resíduos carbonáceos provenientes do processo de purificação e funcionalização de nanomateriais de carbono com ácidos oxidantes podem ser remediados via métodos clássicos e modernos utilizados no tratamento águas e efluentes industriais convencionais,

sendo um bom exemplo de estudos de ciclo de vida envolvendo nanomateriais e a adoção de práticas proativas em N&N<sup>199,200</sup> (**Figura 34**).



**Figura 34.** (A) Efluente-Estoque contendo os FCCs dissolvidos em uma solução de NaOH 0,1M oriundos da purificação dos nanotubos de carbono (CNT-L3); (B) Efluente-Estoque após a remoção dos FCCs com a hidrotalcita (5 mg/mL); (C) Efluente-Estoque após a remoção dos FCCs com sulfato de alumínio (15 mg/mL).

### 5.3.2. Nível Imunológico: efeito adjuvante em camundongos geneticamente selecionados

Além de manter a homeostasia do organismo, a função do sistema imune é garantir a proteção mais eficaz de indivíduos, numa população natural, contra os mais diversos tipos de agentes infecciosos<sup>213</sup>. Deste modo, entender a interação de NTCs com o sistema imunológico será fundamental para a área de segurança ocupacional e suas aplicações biomédicas<sup>214,215</sup>. Entretanto, são muito recentes os estudos sobre a influência de nanotubos de carbono na resposta imune e seu efeito imunotoxicológico<sup>216,217</sup>. Em paralelo a estas discussões, tem sido demonstrado que

estes materiais podem ser aplicados no campo dos adjuvantes imunológicos, como transportadores de antígenos<sup>218,219</sup> e em imunoterapias<sup>220,221</sup>.

A resposta imunológica pode ser didaticamente dividida em duas categorias: resposta imune inata e resposta imune adaptativa. A imunidade inata atua como uma primeira linha de defesa, mas não tem a capacidade de reconhecer certos patógenos e de proporcionar uma imunidade protetora específica capaz de prevenir reinfecção. Por outro lado, a resposta imune adaptativa está baseada na seleção clonal de um repertório de linfócitos, portadores de diferentes receptores antígeno-específicos que permitem o hospedeiro reconhecer qualquer antígeno estranho<sup>222</sup>. Na resposta imune adaptativa, linfócitos antígeno-específicos proliferam e se diferenciam em células que eliminam os patógenos, exigindo assim, diferentes mecanismos para procura, reconhecimento e eliminação destes patógenos os quais podem estar fisicamente localizados em diversos locais no corpo do hospedeiro. Uma característica fundamental da imunidade adaptativa é o fato de que durante este processo de eliminação do agente invasor, há a geração de um grande número de linfócitos com memória, diferenciados pela seleção clonal, permitindo assim, uma resposta mais rápida e eficaz durante uma reinfecção<sup>222</sup>. A modulação e regulação da resposta imune seja para suprimi-la (imunossupressão) ou para estimulá-la (imunestimulação), quando desejado, constitui o principal objetivo da clínica médica em imunologia. Similarmente, a pesquisa em imunotoxicologia está baseada no monitoramento destes quadros de ativação/supressão do sistema imunológico, frente à exposição aos toxicantes, em relação às variações normais da resposta imune durante a manutenção da homeostasia do organismo<sup>222</sup>.

Um *adjuvante* é qualquer substância que aumente a imunogenicidade de outras substâncias injetadas misturadas com o adjuvante. Quimicamente, os adjuvantes constituem um grupo de compostos muito heterogêneos, e devido essa

diversidade, eles podem atuar através de mecanismos diversos que incluem: i) conversão do antígeno solúvel em material particulado [facilmente ingerido pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), tais como macrófagos, células dendríticas e linfócitos B]; ii) liberação lenta ou controlada do antígeno; iii) proteção do antígeno contra proteólise e, iv) estímulo da atividade das células APCs. Os adjuvantes tradicionais são o hidróxido de alumínio [Al(OH)<sub>3</sub>], o adjuvante de Freund (mistura óleo-água) e os ISCOMs (Complexos imunostimuladores, contendo o detergente Quil-A). Outros adjuvantes vêm sendo testados, como lipossomas, microesferas poliméricas e recentemente, sílica nanoestruturada SBA-15<sup>223</sup>.

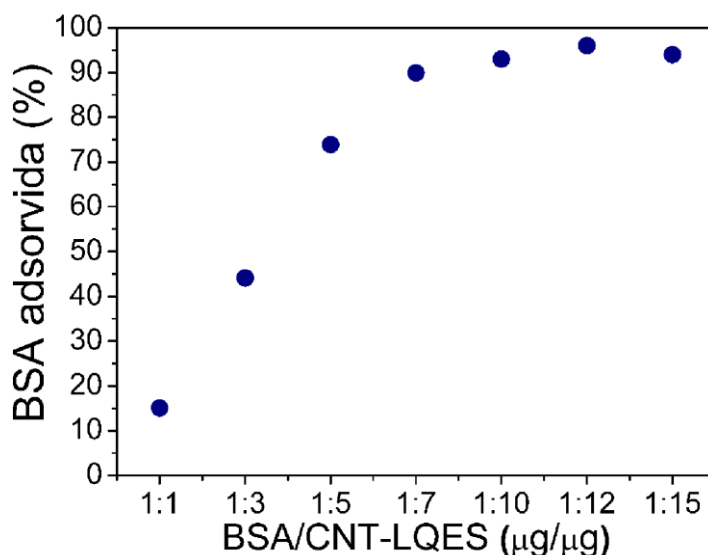
Nesta seção da tese, iniciamos o estudo do efeito imunomodulatório dos nanotubos de carbono purificados (CNT-LQES) sobre camundongos geneticamente selecionados. A vantagem de utilizar este modelo de camundongos reside, principalmente, na possibilidade de contar com indivíduos geneticamente homogêneos para os *loci* (regiões fixas nos cromossomos onde estão localizados determinados genes) relevantes para as principais características imunobiológicas, como *resposta inflamatória, produção de anticorpos e tolerância imunológica*<sup>213,224</sup>. Além disso, a possibilidade de reconstituir, por cruzamentos interlinhagens, uma população F2 segregante com distribuição normal dos fenótipos num fundo genético heterogêneo<sup>213</sup>.

Para avaliar o papel imunomodulatório dos CNT-LQES, camundongos geneticamente selecionados para alta [H<sub>III</sub>] e baixa [L<sub>III</sub>] resposta na produção de anticorpos<sup>123</sup> foram imunizados pela via subcutânea (SC), segundo o protocolo de imunização descrito no **item 4.4.2**. As vias pelas quais os antígenos são administrados (e.g. subcutânea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intranasal ou oral) afetam tanto a magnitude quanto o tipo de resposta imunológica obtida.

Geralmente, antígenos injetados no subcutâneo provocam uma forte resposta, provavelmente porque são capturados pelas células de Langerhans e apresentados, eficientemente, aos linfonodos locais. Portanto, a via SC foi utilizada neste trabalho, uma vez que o objetivo do nosso experimento foi avaliar a produção de anticorpos específicos contra a proteína albumina sérica bovina [BSA] em função da presença da amostra CNT-LQES. Foi escolhida a proteína BSA como antígeno modelo, uma vez que trabalhos na literatura relatam a interação desta proteína com nanotubos de carbono<sup>225,226</sup>.

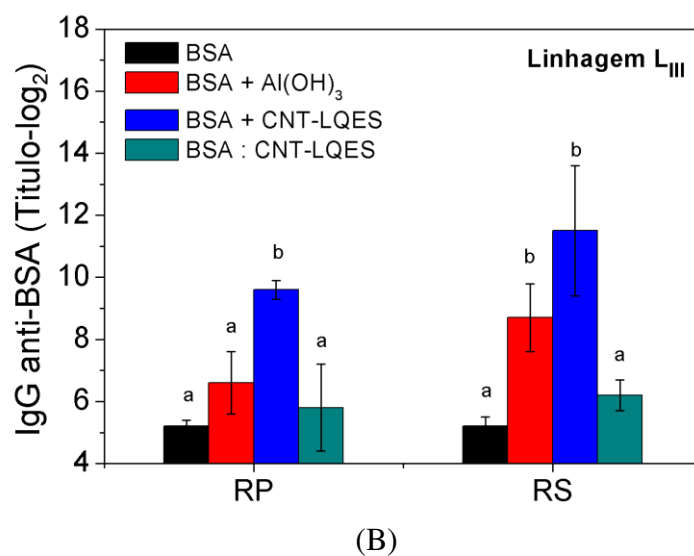
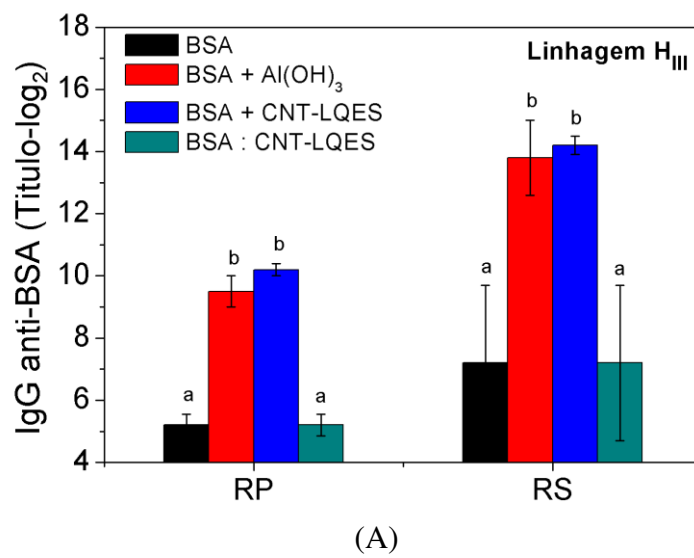
Devido à existência de estudos que reportam a relação entre a porcentagem de antígeno encapsulado em nanopartículas com o desenvolvimento da imunidade específica<sup>227</sup>, primeiramente, foi avaliado *in vitro* a capacidade de adsorção de BSA nos CNT-LQES. Na **Figura 35**, podemos observar que existe um aumento na porcentagem de BSA adsorvida em função da concentração dos nanotubos purificados CNT-LQES, sendo que um platô é atingido a partir da proporção de 1:10 (BSA/CNT-LQES). Nesta proporção, cerca de 90% do antígeno modelo BSA está adsorvido na superfície dos CNT-LQES. Assim, esta proporção de 1:10 foi utilizada para a preparação do complexo imunogênico e imunização dos camundongos. Zhao e colaboradores (2010)<sup>226</sup> estudaram os mecanismos envolvidos na adsorção (interação não-covalente) de BSA com a superfície de NTCPM purificados com HNO<sub>3</sub>. Análises das técnicas de espectroscopia UV-Vis e de dicroísmo circular [CD] revelaram que a proteína BSA sofre alterações em sua estrutura secundária e terciária, após interação com os nanotubos. Utilizando sondas fluorescentes específicas [digitoxin, phenylbutazone e flufenamic acid] demonstraram que ocorreu um mecanismo do tipo não específico (interação eletrostática) entre os resíduos dos aminoácidos da proteína com a superfície dos

nanotubos<sup>226</sup>. Resultados semelhantes foram obtidos por Man e colaboradores (2010)<sup>228</sup>.



**Figura 35.** Porcentagem de adsorção da proteína albumina sérica bovina [BSA] nos nanotubos de carbono purificados (CNT-LQES) após a incubação por 12 horas [overnight] em solução tampão PBS pH 7.4, conforme descrito no item 4.4.2

A **Figura 36** representa os resultados obtidos das dosagens dos anticorpos totais [IgG anti-BSA] nos soros dos camundongos H<sub>III</sub> e L<sub>III</sub> pelo método de ELISA, após a resposta primária (RP) e resposta secundária (RS). Quando comparamos os títulos obtidos, verificamos que o grupo BSA+CNT-LQES apresentaram títulos elevados que foram equivalentes ao grupo de camundongos imunizados com o hidróxido de alumínio [BSA+Al(OH)<sub>3</sub>], um tradicional adjuvante imunológico. Os animais imunizados somente com BSA apresentaram títulos de IgG anti-BSA em níveis basais, onde isto pode ser explicado pelo fato de a maioria das proteínas purificadas serem pouco imunogênicas quando administradas sozinhas<sup>222</sup>.



**Figura 36.** Média  $\pm$  desvio padrão dos títulos de IgG anti-BSA produzidos por camundongos geneticamente selecionados: (A) Linhagem H<sub>III</sub>; alta resposta na produção de anticorpos; (B) Linhagem L<sub>III</sub>; baixa resposta na produção de anticorpos. Os camundongos foram imunizados pela via subcutânea (n= 3 animais/grupo). RP – Resposta Primária; RS – Resposta Secundária. <sup>a,b</sup>Letras diferentes indicam que os valores são estatisticamente diferentes segundo o Teste-t com p<0,05.

Estes resultados demonstram que os CNT-LQES atuam como agentes imunoestimulatórios, com potencial aplicação no campo dos adjuvantes imunológicos, promovendo o aumento da imunogenicidade do antígeno BSA. Este



efeito adjuvante foi verificado para ambas as linhagens de camundongos estudadas. Observa-se também que os CNT-LQES foram capazes de manter uma eficiente memória imunológica, uma vez que foi verificado um aumento na produção IgG anti-BSA na resposta secundária (RS), em ambas as linhagens, sendo esta propriedade uma das principais vantagens do uso de adjuvantes na produção vacinas e soros<sup>223</sup>. E, considerando que estas linhagens de camundongos geneticamente selecionadas para alta [H<sub>III</sub>] e baixa [L<sub>III</sub>] resposta na produção de anticorpos são modelos representativos dos extremos fenotípicos de uma importante característica imunobiológica (produção de anticorpos), podemos concluir que os CNT-LQES quando submetidos a uma população natural poderão induzir efeito adjuvante e memória imunológica eficientes, pois eles foram capazes de modular até mesmo a resposta constitutiva de camundongos que apresentam baixa resposta na produção de anticorpos [L<sub>III</sub>] (**Figura 36**).

Outro ponto importante, é que este efeito adjuvante apresentado pelo CNT-LQES foi dependente da adsorção de BSA na sua superfície, visto que foi observado uma redução significativa na produção de anticorpos anti-BSA para o grupo BSA:CNT-LQES (imunização com BSA não adsorvida nos CNT-LQES) (**Figura 36**). Tais resultados indicam que os CNT-LQES estariam facilitando o reconhecimento de BSA pelas células apresentadoras de antígenos [APCs]. Entretanto, estudos mais aprofundados precisam ser realizados, pois são diversificados os mecanismos desempenhados pelos adjuvantes particulados (micro e nano)<sup>223,229</sup>. Nesse sentido, até o momento, foram demonstrados pelo menos dois mecanismos envolvidos no efeito imunoestimulatório de NTCs em camundongos imunizados pela via SC: i) ativação de linfócitos B específicos<sup>220</sup>; e ii) ativação do sistema complemento com produção de citocinas inflamatórias, levando à ativação dos macrófagos [immune activity boosted]<sup>221</sup>.

Na direção de entender a interação de NTCs com o sistema imunológico, um estudo *in vitro* publicado por Palomaki e colaboradores (2010) relatou que NTCPM e NTCPS não apresentam efeito citotóxico sobre as APCs (macrófagos e células dendríticas) de camundongos até a concentração de 300  $\mu\text{g/mL}$ <sup>230</sup>. Outro trabalho publicado por Wang e colaboradores, também relata que NTCPM não influenciam na atividade funcional de células dendríticas (reconhecimento de antígenos e ativação dos linfócitos T)<sup>231</sup>. Nesta mesma direção, Kostas Kostarelos havia reportado que NTCs < 15  $\mu\text{m}$  [short nanotubes] podem ser eficientemente fagocitados pelos macrófagos, enquanto que NTCs > 15  $\mu\text{m}$  [long nanotubes] induzem fagocitose frustrada<sup>232</sup>. Meng e colaboradores (2010) estudaram o efeito da imunização subcutânea (SC) de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (NTCPM) sobre a resposta imune de camundongos BALB/c. Foi demonstrado que os NTCPM induzem a ativação do sistema complemento e produção de citocinas pró-inflamatórias em um curto período de tempo, após a imunização dos camundongos. No entanto, os níveis plasmáticos do complemento e citocinas retornam aos seus valores normais em função do tempo. Com exceção dos linfonodos, não foi verificado a acumulação dos nanotubos no fígado, baço, rim e coração dos camundongos. Além disso, não foi verificada nenhuma alteração nestes órgãos ou linfonodos. Estes resultados indicam que a administração subcutânea de NTCPM induz óbvias reações imunológicas em um curto espaço de tempo, as quais são eliminadas com o passar do tempo<sup>233</sup>. Ainda em 2010, foi demonstrado que Neutrófilos, um tipo de célula do sistema imunológico, possui uma enzima (mieloperoxidase) capaz de degradar NTCs, diminuindo assim, seu efeito inflamatório *in vivo*<sup>234</sup>. Koyama e colaboradores demonstraram excelente biocompatibilidade para nanotubos de carbono de paredes múltiplas de elevada pureza [> 99 %, livre de resíduo metálico (ferro)], quando implantados pela via

subcutânea em camundongos. Por outro lado, nanotubos implantados contendo alto teor de resíduo metálico (ferro) induziram severas reações imunológicas no local da injeção, bem como a indução de reações imunológicas sistêmicas<sup>235</sup>. E, no campo dos adjuvantes, Yandar e colaboradores demonstraram que NTCPM funcionalizados covalentemente com o peptídeo AMA-1, isolado da membrana do *Plasmodium vivax* (protozoário parasita causador da doença Malária), foram eficientes na indução de imunidade específica protetora (memória imunológica) de camundongos, pois, após a infecção com os parasitas, estes, que foram imunizados com os nanotubos funcionalizados, não desenvolveram parasitemia em relação aos animais imunizados somente com o peptídeo AMA-1<sup>219</sup>.

Apesar da impossibilidade de comparação entre os resultados acima mencionados e com os descritos nesta tese, devido diferenças nas propriedades físico-químicas dos NTCs estudados (e.g. tipo de nanotubos, tamanho, defeitos, pureza e etc), estes resultados são positivos rumo à exploração do potencial dos NTCs no campo dos adjuvantes imunológicos. Contudo, estudos mais aprofundados precisam ser conduzidos, por exemplo: mecanismos da adjuvanticidade, influência da alteração da estrutura tridimensional dos antígenos, após a funcionalização com o desenvolvimento da resposta humoral (e.g. exposição de epítomos críticos), funcionalização com outros antígenos de interesse biomédico, estudos imunotoxicológicos, etc.

### 5.3.3. Nível Celular-molecular: efeito sobre Astrócitos primários *in vitro*

Nanotubos de carbono são promissores materiais para interação com sistemas celulares, sejam para o desenvolvimento de biosensores ou como plataformas para modulação de funções celulares específicas, sendo que, podemos encontrar muitos dados publicados na literatura, abordando os diferentes aspectos desta interação<sup>236</sup>. A importância desses estudos é justificada pelo fato das células corresponderem à unidade estrutural e funcional básica da organização dos seres vivos<sup>237</sup>. Assim, um profundo entendimento e controle destas interações permitirão o desenvolvimento de novas tecnologias biológicas, bem como medidas de segurança.

A Neurologia é uma área do conhecimento fortemente dependente do desenvolvimento de novos materiais e tecnologias para seu avanço, uma vez que o sistema nervoso é um dos mais intrincados e complexos da natureza. Contudo, NTCs estão sendo avaliados para o desenvolvimento de próteses neuronais<sup>238</sup>, tratamento de tumores cerebrais<sup>239</sup> e como ferramentas para pesquisa básica em Neurologia<sup>240</sup>. A principal motivação para aplicação de NTCs nesta área é a exploração das suas excelentes propriedades de condutividade elétrica e biocompatibilidade quando immobilizados sobre substratos. Nessa direção, Cellot e colaboradores (2009) demonstraram pela primeira vez que redes de NTCs podem modular a propagação do sinal elétrico de neurônios *in vitro*<sup>241</sup>. Conseqüentemente, o estudo da interação de nanotubos de carbono com as células que compõem o sistema nervoso é fundamental<sup>242</sup>.

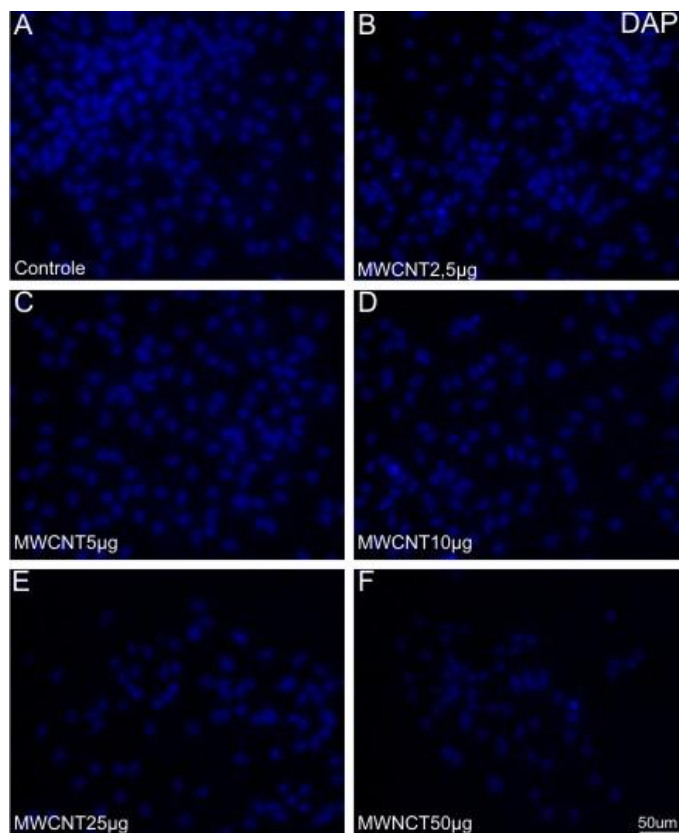
Astrócito é um tipo de célula que compõem o sistema nervoso central (cérebro e medula espinhal), e desempenham funções como a nutrição dos neurônios através da regulação e liberação de substâncias, sustentação do sistema nervoso através do preenchimento dos espaços entre os neurônios, suporte para as

células endoteliais que compõe a barreira hematoencefálica. Além disso, estão envolvidos em processos de natureza neuro-imunológica e na remoção de vestígios de células neuronais, via fagocitose. No entanto, apesar do interesse dos NTCs na área de neurociências, são limitados os estudos envolvendo nanotubos de carbono e astrócitos<sup>243,244</sup>, e em especial, sobre culturas primárias isoladas de cérebros de rato.

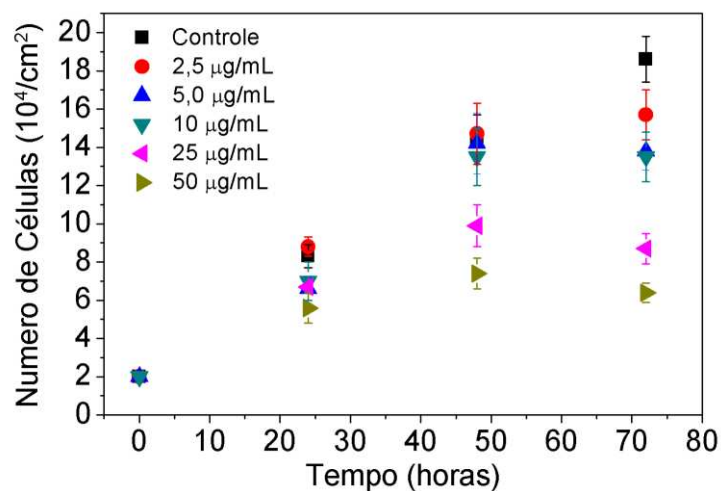
Dentro deste contexto, decidimos iniciar o estudo do efeito dos CNT-LQES<sub>2</sub> sobre células de astrócitos primários *in vitro*. Geralmente, astrócitos primários sadios (controle) em cultura apresentam um aumento linear no número de células em função do tempo. Assim, primeiramente, estas células foram expostas a cinco concentrações crescentes de CNT-LQES<sub>2</sub> (2,5 a 50 µg/mL) dispersos no meio de cultura, e em seguida, foi realizada a contagem do número de células após 24, 48 e 72 horas de tratamento.

Na **Figura 37** através da técnica de microscopia de fluorescência podemos observar a redução do número de células em função do aumento da concentração dos CNT-LQES<sub>2</sub> após 72 horas de tratamento quando comparado ao grupo controle.

Como podemos verificar na **Figura 38**, para a maior concentração testada (50 µg/mL), ocorreu uma inibição do crescimento a partir de 24 horas, com redução de aproximadamente 65% no número de células após 72 horas. Por outro lado, baixas concentrações de nanotubos (2,5 a 10µg/mL) não apresentaram efeito sobre o crescimento dos astrócitos até 48 horas de exposição. Estes resultados demonstram um efeito antiproliferativo dos CNT-LQES<sub>2</sub> sobre astrócitos primários, e uma tendência dose-resposta, em função da concentração e do tempo de exposição aos nanotubos.

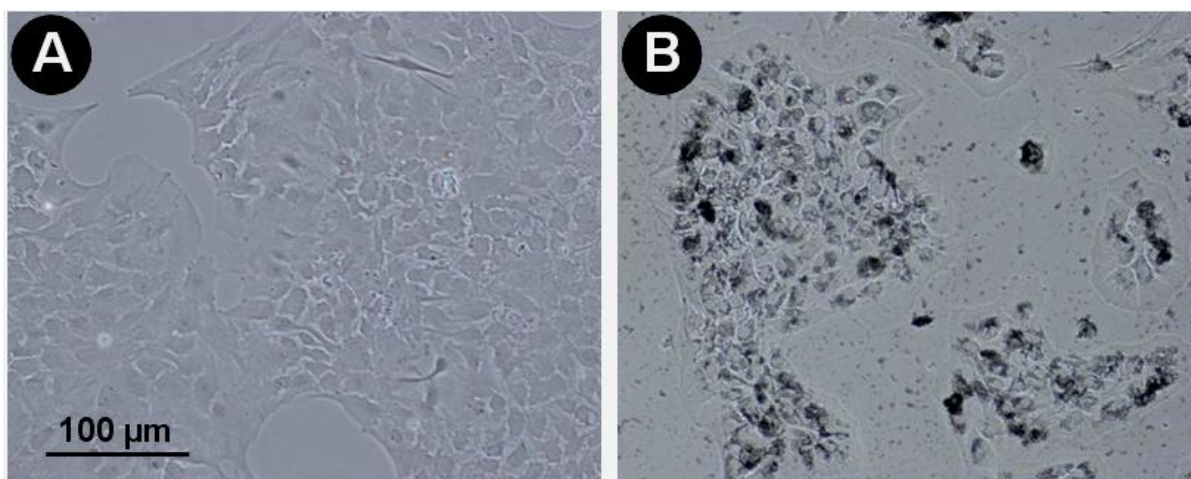


**Figura 37.** Imagens de microscopia de fluorescência dos Astrócitos primários após 72 horas de exposição aos CNT-LQES<sub>2</sub> (A) Controle; (B) 2,5 µg/mL; (C) 5 µg/mL; (D) 10 µg/mL; (E) 25 µg/mL e (F) 50 µg/mL. As regiões em azul representam os núcleos celulares que foram marcados com DAPI.



**Figura 38.** Número de células de Astrócitos primários após 24, 48 e 72 horas de exposição a concentrações crescentes de CNT-LQES<sub>2</sub> (0 a 50µg/mL). Foram inicialmente semeadas  $2,0 \times 10^4$  células/concentração de nanotubos no tempo zero hora (0h).

Embora nossos resultados suportam uma correlação dose-resposta, devemos entender o comportamento coloidal dos nanotubos no meio de cultivo, pois, como por exemplo, eventos de agregação e aglomeração podem influenciar neste processo, como já relatado na literatura<sup>245</sup>. Na **Figura 39** podemos observar através de imagens de microscopia óptica a formação de aglomerados de nanotubos interagindo sobre a superfície dos astrócitos. Observa-se que há a formação de aglomerados maiores sobre as células e aglomerados menores ao redor das células. A formação destes aglomerados influencia a disponibilidade dos CNT-LQES<sub>2</sub>, podendo interferir na reprodutibilidade e nos valores de citotoxicidade obtidos. Nesse sentido, os estudos de Lison e colaboradores (2011)<sup>246</sup> reforçam a necessidade de maior atenção quanto ao comportamento coloidal dos nanomateriais em meios de cultivo de células, pois foi demonstrado que além dos efeitos de agregação e aglomeração, a velocidade de sedimentação das nanopartículas nos meios de cultivo de células também pode influenciar nos testes de citotoxicidade.



**Figura 39.** Microscopia óptica das células de astrócitos primários após 72 horas de crescimento em placa. (A) Controle; (B) CNT-LQES<sub>2</sub> (25 µg/mL).

Assim, segundo a *International Alliance for NanoEHS Harmonization* [IANH] é altamente recomendado que estudos de dispersão e do comportamento

coloidal dos nanomateriais nos diferentes meios biológicos sejam realizados antes do início dos experimentos com células<sup>247</sup>. Este estudo foi uma iniciativa entre diferentes grupos de pesquisa sediados nos Estados Unidos e na União Européia, para tentar harmonizar as discrepâncias entre os resultados durante a realização de testes de citotoxicidade para nanomateriais, através da elaboração de protocolos robustos e métodos reprodutíveis para dispersão de nanomateriais.

Um importante tópico no estudo de NTCs com sistemas celulares é a elucidação dos mecanismos envolvidos no processo de internalização celular destes nanomateriais, pois este processo é fundamental para a aplicação dos nanotubos no campo dos *delivery systems*, bem como para o entendimento dos mecanismos de morte celular em estudos toxicológicos<sup>248</sup>.

Entretanto, ainda não existe um mecanismo bem definido para o processo de internalização celular dos nanotubos. Dois fatores contribuem para isto: i) dificuldade de comparação dos resultados publicados na literatura, pois na maioria das vezes, os grupos de pesquisa utilizam nanotubos de diferentes procedências e muitas vezes não é reportada uma completa caracterização físico-química da amostra estudada; ii) não existe um banco de dados público para a anotação e comparação destes estudos<sup>248</sup>. Raffa e colaboradores<sup>249</sup> publicaram recentemente uma revisão abordando este tópico, e foi relatado que existem três tipos de mecanismos envolvidos no processo de internalização celular dos nanotubos de carbono: a) fagocitose, b) endocitose e, c) difusão. O processo de internalização via fagocitose ocorre para os NTCs que apresentam comprimento  $> 1 \mu\text{m}$ , estejam eles no estado de aglomerados, em feixes [bundles] ou individualizados. Por outro lado, o processo de internalização via endocitose (mediado por receptores específicos na superfície celular) ocorre para NTCs que foram funcionalizados com proteínas, DNA e anticorpos, formando complexos supramoleculares. Nanotubos

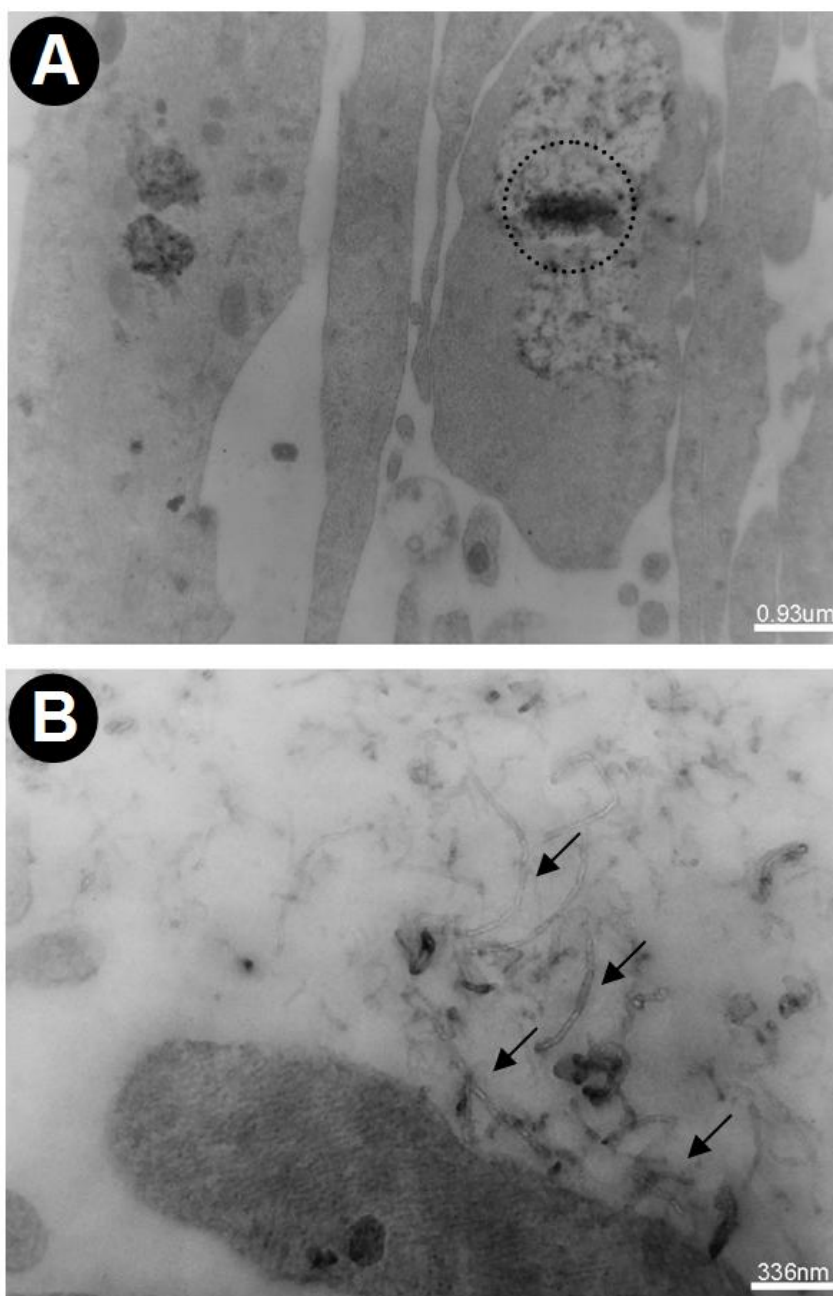


de carbono com comprimento  $< 1 \mu\text{m}$  podem ser internalizados via difusão, através da membrana plasmática [nano-needle hypothesis], desde que não ocorra a formação de complexos supramoleculares. Outros parâmetros estruturais, como por exemplo, diâmetro, quiralidade e defeitos nos NTCs têm sido pouco estudados. No entanto, é consenso que as propriedades físico-químicas dos NTCs são determinantes no processo de internalização celular destes materiais<sup>248,249</sup>.

Com o objetivo de verificar se os CNT-LQES<sub>2</sub> foram internalizados nas células primárias de astrócitos, realizamos análises de microscopia eletrônica de transmissão [TEM] das células expostas aos CNT-LQES<sub>2</sub>. Na **Figura 40** é possível visualizar os nanotubos envoltos em compartimentos intracelulares e no citoplasma dos astrócitos, estando eles apresentados na forma de aglomerados ou isolados.

Diante destas recentes discussões, podemos constatar que os CNT-LQES<sub>2</sub> estão sendo internalizados nos astrócitos via fagocitose, uma vez que estas células possuem comprovada capacidade fagocítica, inclusive de partículas de carbono coloidal<sup>250</sup>, além disso, podemos observar os nanotubos em aglomerados dentro do citoplasma (**Figura 40-A**). Existem nesta amostra (CNT-LQES<sub>2</sub>) nanotubos com comprimento  $> 1 \mu\text{m}$  (**Figura 14-E**), o que suporta o mecanismo de internalização via fagocitose.

Na **Figura 40-B** as setas indicam os nanotubos CNT-LQES<sub>2</sub> isolados no citoplasma dos astrócitos primários e localizados próximos a uma mitocôndria (organela citoplasmática envolvida no processo de respiração celular). Esta imagem indica que alguns nanotubos presentes na amostra CNT-LQES<sub>2</sub> podem ser translocados dentro do citoplasma dos astrócitos.



**Figura 40.** Microscopia eletrônica de transmissão [TEM] dos astrócitos primários após a exposição aos CNT-LQES<sub>2</sub>. (A) A região limitada pelo círculo pontilhado indica os nanotubos aglomerados envolvidos por um compartimento intracelular; (B) As setas indicam alguns nanotubos isolados e dispersos no citoplasma, localizados próximos a uma mitocôndria (organela citoplasmática).

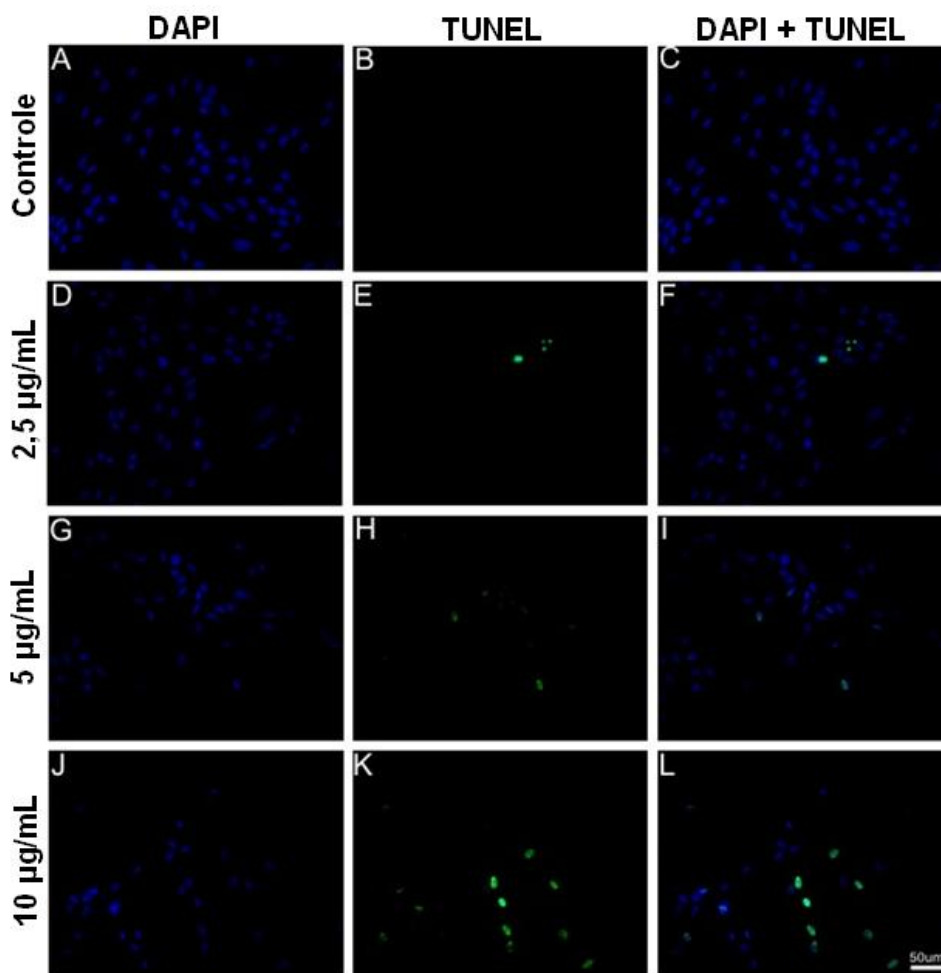
Utilizando uma combinação de várias técnicas microscópicas avançadas [energy-filtered TEM, high angle annular dark field scanning TEM, tomography e

confocal microscopy], Cheng e colaboradores<sup>251</sup>, construíram imagens em três dimensões (3D) de células após a exposição *in vitro* a nanotubos, e conseguiram determinar a distribuição espacial destas partículas no interior da célula. Neste estudo eles observaram NTCPM e NTCPS migrando pelo citoplasma, lisossomos e entre as membranas do núcleo celular, sendo proposta a hipótese da “nanoagulha” para estas translocações intracelulares. Diante deste estudo, é interessante mencionar que os nanotubos CNT-LQES<sub>2</sub> próximos a mitocôndria apresentam comprimento < 1 µm, uma premissa para que ocorra o mecanismo de difusão entre membranas plasmáticas [nano-needle hypothesis].

Com o intuito de iniciar o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos no processo de morte dos astrócitos, após a exposição aos CNT-LQES<sub>2</sub>, foi realizado um teste denominado TUNEL. Este teste é comumente utilizado na área de biologia celular e toxicologia para detectar a ocorrência de danos no DNA (fragmentação) após injúrias celulares de diferentes naturezas, em virtude da ativação de cascatas de sinais bioquímicos que acarretam na indução de morte celular programada (apoptose). Na **Figura 41**, é possível constatar através da técnica de TUNEL, que os astrócitos após a exposição aos CNT-LQES<sub>2</sub> iniciam um processo de morte celular programada, evidenciado pela presença de lesões no DNA (marcações na coloração verde). Assim, considerando explorar o comprovado potencial dos NTCs como agentes transportadores de moléculas biologicamente ativas, [e.g. siRNA]<sup>79</sup>, podemos supor com base nestes primeiros estudos de citotoxicidade, que nossos nanotubos purificados CNT-LQES<sub>2</sub> não devem ser utilizados em concentrações superiores a 2,5 µg/mL e por intervalos maiores a 24 horas de exposição para as células de astrócitos primários.

Apesar de não haver trabalhos publicados relatando o efeito de nanotubos de carbono sobre astrócitos primários isolados de cérebros de ratos Lewis,

pesquisadores utilizando o Teste de TUNEL têm demonstrado que NTCPMs induzem morte celular, via apoptose, em células epiteliais de pulmão de camundongos *in vitro*<sup>252</sup> e em tecidos pulmonares de camundongos *in vivo* após exposição pela via intratraqueal<sup>253</sup>. Em ambos os relatos, o processo de morte celular foi devido à geração de radicais livres (estresse oxidativo) com ativação de vias de sinalização, envolvendo enzimas caspases e conseqüente indução do processo de apoptose.

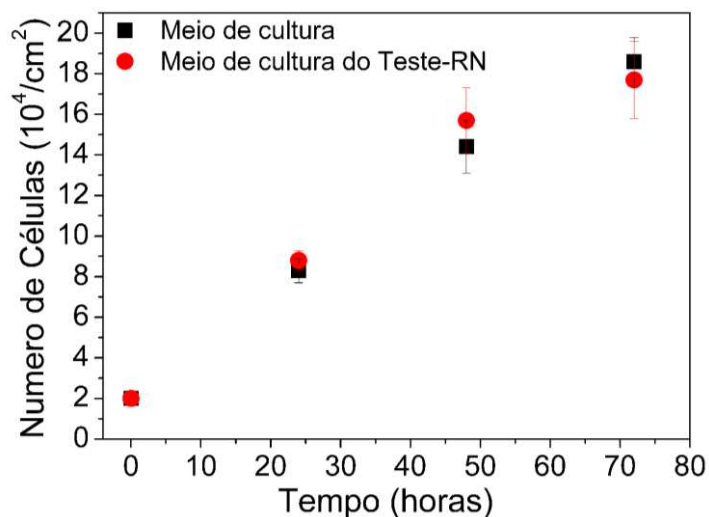


**Figura 41.** Microscopia de fluorescência dos astrócitos primários expostos aos CNT-LQES<sub>2</sub> (2,5; 5 e 10 µg/mL), após 72 horas de tratamento. As figuras A,D,G,J representam a marcação dos núcleos celulares (DNA) com o reagente DAPI (azul); as figuras B,E,H,K representam a marcação dos núcleos celulares (DNA lesionado) em processo de apoptose pelo teste de TUNEL (verde). As figuras C,F,I,L representam a sobreposição das duas marcações anteriores [DAPI + TUNEL].

. Em geral, a maioria dos trabalhos publicados, envolvendo a interação de NTCs com sistemas celulares tem focado na utilização de marcadores bioquímicos e moleculares de exposição (e.g. MTT, NR, LDH, caspases, citocinas, anexina-V/PI, TUNEL e etc), onde estas respostas biológicas são correlacionadas com os tipos de NTCs em questão<sup>51,236</sup>. No entanto, Casey e colaboradores (2008)<sup>125</sup> iniciaram uma importante discussão. Primeiramente, eles demonstraram que NTCs podem induzir efeito citotóxico de maneira indireta, via depleção, ou remoção de nutrientes do meio de cultura<sup>125</sup>. Posteriormente, o mesmo grupo relatou que reagentes comumente utilizados para avaliação da citotoxicidade nos testes de MTT e NR podem interagir com a superfície dos NTCs levando a resultados equivocados durante a realização destes experimentos. Nesse sentido, foi proposta a realização de outros métodos mais robustos para avaliação da citotoxicidade de nanoestruturas de carbono, como por exemplo, o ensaio clonogênico<sup>254</sup> e a espectroscopia Raman<sup>255</sup>.

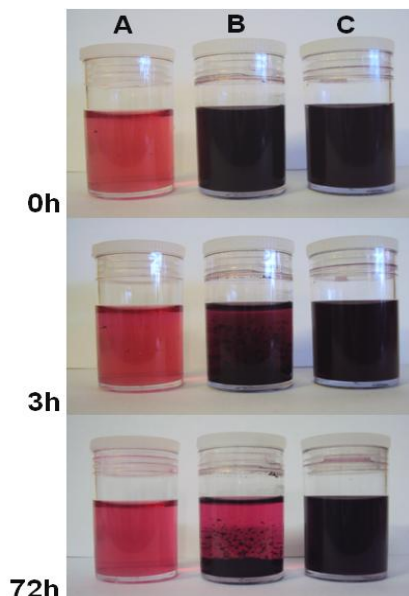
Motivados por estas discussões, decidimos avaliar se os CNT-LQES<sub>2</sub> estariam causando citotoxicidade via depleção de nutrientes ou remoção de componentes do meio de cultura (DMEM com 10% de soro fetal bovino), uma vez que os nanotubos possuem alta área superficial para adsorção destes nutrientes ou componentes do meio de cultura. Para isto, os CNT-LQES<sub>2</sub> (50 µg/mL) foram incubados com o meio de cultura por 1 hora a 37°C e, em seguida, os nanotubos foram removidos do meio de cultura por centrifugação e filtração. Este meio de cultura, livre dos CNT-LQES<sub>2</sub>, foi fornecido aos astrócitos saudáveis e monitorado o crescimento celular por 24, 48 e 72 horas (item 4.4.3). Como demonstrado na **Figura 42**, constatamos que os CNT-LQES<sub>2</sub> não exercem efeito citotóxico, via depleção de nutrientes ou remoção de componentes do meio de cultura celular, pois não verificamos diferenças significativas no padrão de crescimento e no número de

células entre os astrócitos cultivados em meio de cultura normal e no meio de cultura do teste de remoção de nutrientes, denominado Teste-RN. Entretanto, os componentes protéicos do meio de cultura, o soro fetal bovino (SFB)<sup>256</sup>, interagem com os CNT-LQES<sub>2</sub> e são os responsáveis pela estabilidade dos nanotubos nestas suspensões, visto que os nanotubos aglomeram no meio de cultura sem a adição de SFB, enquanto que na presença de 10% de SFB, estas suspensões são estáveis por mais de 72 horas (**Figura 42**). Todavia, esta estabilidade é um "comportamento macroscópico", sendo necessário acompanhar os "comportamentos microscópicos" dos CNT-LQES<sub>2</sub> nestas suspensões.

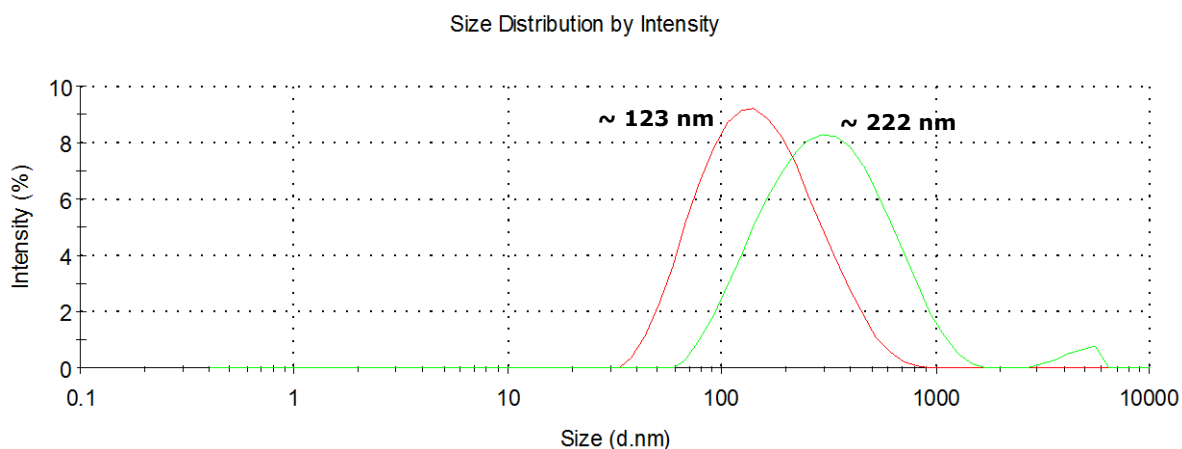


**Figura 42.** Teste-RN: avaliação da influência dos CNT-LQES<sub>2</sub> sobre a remoção de nutrientes presentes no meio de cultura sobre o crescimento dos astrócitos primários.

Análises de espalhamento de luz dinâmico [DLS] dos nanotubos removidos por centrifugação do meio de cultura (**item 4.4.3**) indicam que ocorreu a formação de um revestimento [coating] sobre a superfície dos CNT-LQES<sub>2</sub>, pois verificamos um aumento no tamanho das partículas (diâmetro médio) após a interação com o meio DMEM suplementado com SFB (**Figura 43**).



**Figura 42.** Estabilidade dos CNT-LQES<sub>2</sub> em meio de cultura celular, após 72 horas: (A) Meio de cultura DMEM contendo 10% de soro fetal bovino (SFB); (B) CNT-LQES<sub>2</sub> (50 µg/mL) dispersos meio de cultura DMEM (sem adição de SFB); (C) CNT-LQES<sub>2</sub> (50 µg/mL) dispersos em meio de cultura DMEM contendo 10% de SFB.



**Figura 43.** Medidas de Espalhamento de Luz Dinâmico [DLS] das suspensões de CNT-LQES<sub>1</sub> (5 µg/mL) em água deionizada (linha vermelha). A linha verde representa os CNT-LQES<sub>2</sub> (5 µg/mL), após interação com o meio de cultura celular [DMEM com 10% de soro fetal bovino] em água deionizada (linha verde). Os CNT-LQES<sub>1</sub> apresentaram um diâmetro médio de  $\sim 123 \pm 2,0$  nm em água deionizada e  $\sim 222 \pm 66$  nm após interação com meio de cultura celular (CNT-LQES<sub>2</sub>@corona). Estas análises foram realizadas para demonstrar a formação do revestimento de biomoléculas [corona] sobre os nanotubos provenientes do teste de remoção de nutrientes (Teste-RN), conforme descrito no item 4.4.3.

Assim, segundo os recentes avanços na bionanointerface, podemos supor que as proteínas do soro fetal bovino estão formando um revestimento [coating] sobre os nanotubos, o qual tem sido denominado *protein corona*<sup>111,257</sup>. O surgimento desta identidade [protein corona] para a área de nanotoxicologia de NTCs pode ter profundas implicações quanto à comparação dos resultados publicados na literatura, pois tem sido demonstrado que a procedência e tratamentos térmicos durante a preparação do soro fetal bovino podem influenciar na composição das proteínas da corona, bem como no processo de internalização e na citotoxicidade de nanopartículas<sup>258</sup>.

Portanto, devemos nos aprofundar no entendimento da interação de biomoléculas e fluidos biológicos com a superfície dos nanotubos de carbono, dado que, é neste domínio que temos a formação da bionanointerface e a marcada distinção entre o estudo de agentes toxicantes clássicos (moléculas) e os nanomateriais (partículas com diferentes funcionalidades e níveis sofisticação). Entretanto, é importante manter em foco que estamos lidando com fluidos biológicos, por exemplo, o SFB é uma mistura de proteínas (> 150)<sup>256</sup> e a maioria dos modelos teóricos e experimentais, envolvendo a interação de proteínas com superfícies sólidas estão baseadas na utilização de proteínas individuais (purificadas). Neste caso, será necessário desenvolver uma estratégia para lidar com os aspectos físico-químicos (e.g. equilíbrio químico, colóides e superfícies) nesta mistura altamente heterogênea, uma vez de cada proteína presente no SFB possui uma afinidade específica sobre a superfície dos nanomateriais, e estarão ocorrendo múltiplos efeitos cooperativos e/ou competitivos<sup>111,257</sup>.

Diante destes novos conceitos na bionanointerface, as implicações desta identidade *CNT-LQES<sub>2</sub>@corona* sobre os astrócitos primários precisam ser elucidadas e levadas em consideração em trabalho futuros.



## 6. Conclusões

### Aspectos químicos:

[1] Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas [*Ctube 100*, CNT Co. Ltd] podem ser purificados (> 98,5%, livres de ferro) através de tratamentos químicos com HNO<sub>3</sub> e HCl sob sistema convencional de refluxo e agitação. O tratamento químico com NaOH remove os fragmentos de carbono carboxilados (FCCs), adsorvidos na superfície dos nanotubos oxidados com HNO<sub>3</sub>, melhorando assim a qualidade da amostra;

[2] As técnicas clássicas de caracterização de materiais sólidos podem ser utilizadas de maneira integrada para caracterização de nanotubos de carbono. Todavia, devido à alta heterogeneidade destes materiais, é difícil obter uma precisa determinação da distribuição de tamanhos e grupos superficiais;

[3] A geração dos FCCs durante o tratamento oxidativo com HNO<sub>3</sub> é fortemente dependente da temperatura utilizada no sistema de refluxo. Estes FCCs adsorvidos na superfície dos nanotubos interferem na avaliação *in vitro* da biodisponibilidade do ferro (Fe<sup>2+</sup>) nas amostras de nanotubos pelo Método Ferrozina;

[4] Os FCCs (DEBRIS) são misturas complexas (> 800 fragmentos) de espécies orgânicas altamente aromáticas, contendo diferentes grupamentos oxigenados similares às substâncias fúlvicas e matéria orgânica dissolvida.

### **Interação com Biosistemas:**

[1] *Nível Ecológico:* a) Os CNT-LQES<sub>1</sub> não formam suspensões estáveis em água mineral reconstituída, tendendo à aglomeração e sedimentação, impossibilitando a determinação precisa da toxicidade aguda sobre o organismo bioindicador *Daphnia similis*. Porém, os biossurfactantes produzidos pelo microorganismo *Bacillus subtilis* estabiliza os CNT-LQES<sub>1</sub> em água mineral reconstituída. Testes de ecotoxicidade aguda (48 horas de exposição) sobre *D. similis* demonstraram que os CNT-LQES<sub>1</sub> dispersos neste biossurfactante não apresenta toxicidade aguda até 30 mg/L; b) Os CNT-LQES<sub>1</sub> não apresentam efeito mutagênico sobre linhagens de *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames); c) os materiais inorgânicos do tipo hidrotalcitas e sulfato de alumínio são altamente eficientes para o tratamento de efluentes contendo FCCs, provenientes da purificação de NTCs, sendo um bom exemplo da aplicação dos conceitos da Ecologia Industrial e Química Verde em N&N;

[2] *Nível Imunológico:* Os CNT-LQES apresentam efeito imunoestimulatório (adjuvante) sobre camundongos geneticamente selecionados para alta [Linhagem H<sub>III</sub>] e baixa [Linhagem L<sub>III</sub>] resposta na produção de anticorpos. Tal efeito adjuvante foi avaliado, utilizando a proteína BSA como antígeno modelo, sendo que a adsorção de BSA na superfície dos nanotubos é um fator importante para a manifestação deste efeito adjuvante;

[3] *Nível Celular-molecular:* Os CNT-LQES<sub>2</sub> podem ser internalizados nas células de astrócitos primários *in vitro*, e apresentam efeito citotóxico, via indução de morte celular programada (apoptose).

## 7. Considerações finais

Nanotubos de carbono apresentam um amplo potencial para inovação em diversos setores, principalmente, devido suas exclusivas propriedades físicas e versatilidade química. Entretanto, é necessário incluí-los na problemática da sustentabilidade. Observando o panorama científico e tecnológico, envolvendo os NTCs, é possível constatar que há uma busca para o entendimento da clássica relação (paradigma): *estrutura-propriedade-função*, uma vez que, só é possível o desenvolvimento de tecnologias e modelagens após o controle desta relação. Apesar dos avanços obtidos, é importante ressaltar que existem entraves a serem superados para o domínio desta clássica relação, sejam nos métodos de síntese e caracterização, nas etapas de purificação e separação, no desenvolvimento de rotas para funcionalização de alta precisão e biossegurança. Todavia, devemos levar em consideração que os nanotubos são materiais recentes na sociedade, e foram introduzidos na área biológica há menos de 10 anos.

No entanto, já existe uma indústria instalada, e em expansão, para a produção massiva (acima de mil toneladas/ano) com geração de economia e produtos em torno dos nanotubos de carbono. Diante deste fato, na medida do possível, devemos começar a construir cenários realísticos de exposição, frente aos biosistemas, levando em consideração as potenciais aplicações e produtos contendo NTCs. E, a partir desses cenários, visitar ou criar metodologias e protocolos para avaliação da toxicidade e seus riscos. A utilização de abordagens sistêmicas pode contribuir para o avanço do diálogo entre conhecimentos e disciplinas envolvidas nesta temática, pois trazem elementos para uma discussão mais abrangente durante a resolução dos problemas, e, além disso, podem auxiliar na identificação de novos problemas a serem abordados.

No que diz respeito aos aspectos químicos deste trabalho, devemos abandonar o conceito "Purificação de NTCs" e caminhar na construção de uma "Qualidade de NTCs", pois a adoção deste termo remete um maior número de propriedades ou características a serem alcançadas e determinadas nas amostras em função dos objetivos da pesquisa e aplicações, pois o termo pureza remete ao teor (porcentagem) de resíduo metálico nas amostras, sendo que, outros resíduos como os fragmentos de carbono carboxilados (FCCs) geralmente não são levados em consideração. Além disto, temos as questões relacionadas à biodisponibilidade destes resíduos metálicos nas amostras "purificadas" e a determinação precisa do tamanho e grupos superficiais dos nanotubos estudados. Portanto, será fundamental uma forte articulação entre os métodos de preparação e caracterização físico-química de materiais no estado sólido-coloidal. Todavia, cabe salientar que, algumas destas técnicas são de difícil acesso, exigem especialização e tempo para a obtenção e interpretação dos resultados. De fato, é preciso desenvolver, consolidar e difundir a idéia de que NTCs são materiais altamente heterogêneos e com diferentes níveis de sofisticação (funcionalizações), pois, do mesmo modo que esta enorme heterogeneidade e versatilidade apresentada pelos NTCs oferecem muitas oportunidades para inovação, também acarretam dificuldades para uma rigorosa avaliação dos seus efeitos biológicos e toxicológicos, uma vez que estamos lidando com sistemas complexos.

Quanto à interação com biosistemas, temos o desafio da integração das informações, pois são inúmeras as variáveis a serem tratadas e consideradas. Conforme demonstrado e discutido neste trabalho, os NTCs vão interagir em função dos níveis da organização hierárquica dos biosistemas. Mas deve ser realçado que, a presença dos nanotubos no ambiente biológico, não implica que haverá necessariamente a manifestação de efeitos nocivos (tóxicos). De modo que,

devemos considerar: "tipo de NTCs", os eventos de agregação, aglomeração e sedimentação, a dose, a frequência, o tempo de exposição, e principalmente, as vias de introdução ou entrada dos nanotubos nos biosistemas, sendo que esta última está diretamente relacionada com os aspectos cinéticos e dinâmicos da biointeração. Nesse sentido, considerando a entrada dos nanotubos no meio ambiente pela via aquática, demonstramos que nanotubos de carbono oxidados irão sofrer processos espontâneos de aglomeração nos corpos d'água, tendendo à sedimentação, e estes processos influenciarão profundamente na sua disponibilidade aos organismos aquáticos, por outro lado, processos de especiação química estarão sempre presentes (e.g. interações com matéria orgânica dissolvida, com biossurfactantes produzidos por microorganismos e com poluentes ambientais). Outro exemplo da importância das vias de introdução dos NTCs nos biosistemas está relacionado com o sistema imunológico, pois trabalhos na literatura relatam que os nanotubos podem causar processos inflamatórios agudos com geração de severos danos no pulmão de camundongos expostos pela via aérea, por outro lado, apontamos neste trabalho que a exposição pela via subcutânea pode ser eficaz e segura para aplicações biomédicas destes materiais no campo dos adjuvantes imunológicos. Sobre os estudos com sistemas celulares, não é possível comparar nenhum estudo *in vitro* publicado na literatura, envolvendo NTCs, dado que as etapas de dispersão destes nanomateriais nos meios utilizados para o cultivo das células foram negligenciadas até o momento. De acordo com as discussões correntes na bionanointerface, além da inerente diversidade estrutural e composicional dos NTCs, as etapas de dispersão e comportamento coloidal dos NTCs nos meios de cultivo exercerão papéis fundamentais na manifestação das respostas celulares. Além destas questões mencionadas anteriormente, devemos incentivar estudos de ciclo de vida, pois durante a preparação destes nanomateriais

podem ser gerados resíduos mais perigosos do que os próprios NTCs (e.g. PHAs e FCCs). Outro aspecto importante é que as metodologias clássicas empregadas para a avaliação de toxicidade não podem ser diretamente extrapoladas para nanomateriais, exigindo que sejam revisitadas.

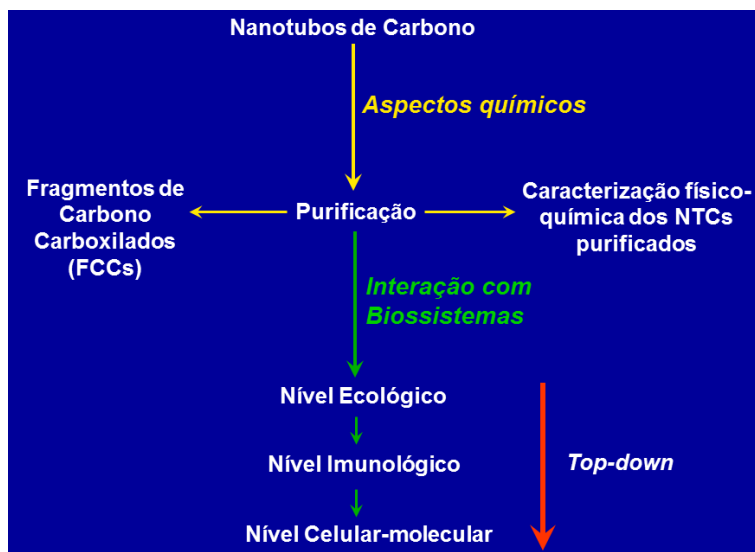
Diante do exposto, evidentemente, desenvolver uma abordagem capaz de entender os reflexos das interações dos NTCs com os níveis da organização biológica constitui, talvez, o maior desafio deste emergente campo de pesquisa, tendo em vista a utilização destes materiais de maneira equilibrada e em bases seguras. Portanto, obviamente, novas tecnologias de análise experimental e computacional ainda precisam ser desenvolvidas para acessarmos e interpretarmos a bionanointerface em profundidade e seus reflexos físico-químico-biológico-toxicológicos.

É importante termos consciência da amplitude do tema abordado. Assim, cabe aqui uma reflexão para os futuros trabalhos:

*As Ciências Biológicas e Toxicológicas ainda não atingiram o mesmo nível de discernimento que as Ciências Físicas e Químicas quanto ao entendimento dos nanossistemas. Portanto, devemos ser prudentes, evitar extrapolações simplistas e manter o foco nas interrelações. Precisamos favorecer e desenvolver uma forma de conciliar a **Criatividade** que torna os nanomateriais cada vez mais sofisticados, com a **Normatização** exigida para serem reprodutíveis, engenheirados e seguros para o meio ambiente, e conseqüentemente para o homem. Somente assim, avançaremos em direção a uma N&N sustentável.*

## 8. Apêndices

### 8.1. Visão geral da tese



O termo "sistema" utilizado neste trabalho é entendido como um conjunto de elementos em interação. E, o termo "interação" como a ação recíproca de dois ou mais elementos ou corpos uns nos outros.

### 8.2. Biosistemas: pontos centrais<sup>58</sup>

[a] Todos organismos vivos evoluíram de um ancestral comum, através de um processo que inclui seleção natural e deriva genética, atuando sobre os caracteres hereditários;

[b] Sistemas biológicos obedecem as leis da química e física;

[c] A complexidade estrutural e informacional são construídas pela combinação de simples subunidades em múltiplas unidades complexas;

[d] O entendimento dos sistemas biológicos requer abordagens reducionistas e holísticas de pensamento, porque novas propriedades emergem quando as subunidades se organizam para compor estruturas mais complexas;

[e] Sistemas vivos estão distantes do equilíbrio termodinâmico. Eles utilizam energia, amplamente derivada da fotossíntese, a qual é estocada em ligações químicas de alta energia ou em gradientes de concentração. A liberação desta energia é acoplada a reações termodinâmicas não favoráveis, para direcionar os processos biológicos;

[f] Embora os processos moleculares e celulares são conservados, sistemas biológicos e organismos são extremamente diversificados. Diferentemente de átomos e moléculas simples, estudadas em química e física, não existem duas células idênticas;

[g] Sistemas biológicos mantém a homeostasia pela ação de sistemas regulatórios complexos. Existem frequentemente redes interconectando sistemas parcialmente redundantes para tornar os biosistemas estáveis a mudanças internas ou externas;

[h] As células são a unidade fundamental dos sistemas vivos. Três tipos celulares fundamentais tem evoluído: bactéria, archea e eucariotos;

[i] Organismos vivos apresentam comportamento, o qual pode ser alterado pela experiência em muitas espécies;

[j] A informação codificada no DNA está organizada nos genes. Estas unidades hereditárias utilizam moléculas de RNA como intermediários informacionais para codificar sequências de proteínas, as quais se tornarão funcionais através de dobramentos em estruturas tridimensionais distintas. Em algumas situações, o RNA apresenta atividade catalítica;



[k] Muitos processos biológicos são controlados por múltiplas proteínas, as quais se agregam em unidades modulares para realizar e coordenar funções biológicas complexas;

[l] Lipídios se agregam com proteínas para formar membranas, as quais circundam as células separando-as do ambiente. Membranas também formam distintos compartimentos dentro de células eucarióticas;

[m] Redes de comunicação dentro e entre as células, e entre organismos, possibilitam os organismos coordenarem seu desenvolvimento e funções;

[n] Em organismos multicelulares, células dividem e diferenciam para formar tecidos, órgãos e sistemas com distintas funções. Estas diferenças surgem primariamente das mudanças na expressão gênica;

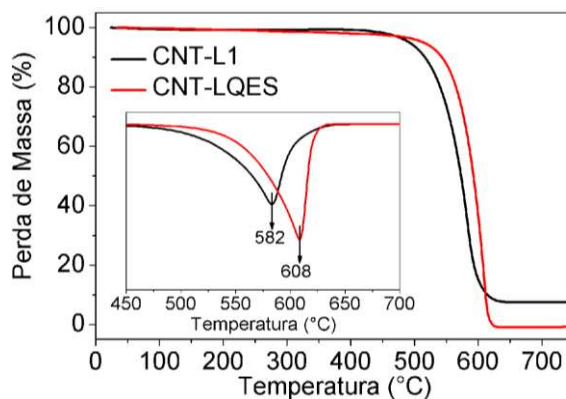
[o] Muitas doenças surgem da ruptura do processo de comunicação e coordenação celular, através da infecção, mutação, injúria química ou trauma;

[p] Grupos de organismos existem como espécies, onde há o cruzamento entre populações partilhando um pool gênico;

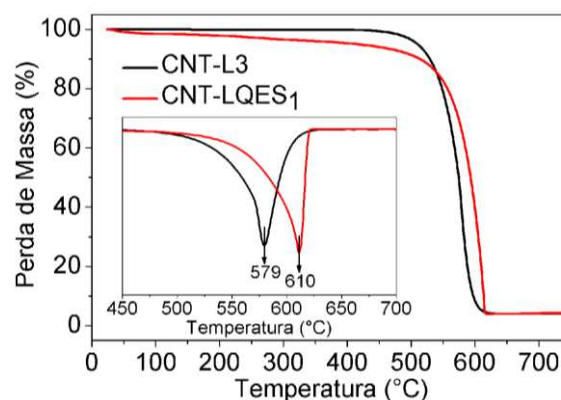
[q] Populações de espécies interagem entre si e com o ambiente para formar ecossistemas independentes, com fluxo de energia e matéria entre os diferentes níveis de organização dos biosistemas;

[r] Os seres humanos, assim como muitas outras espécies, são membros de múltiplos ecossistemas. A humanidade tem a capacidade de romper ou preservar os ecossistemas dos quais eles dependem.

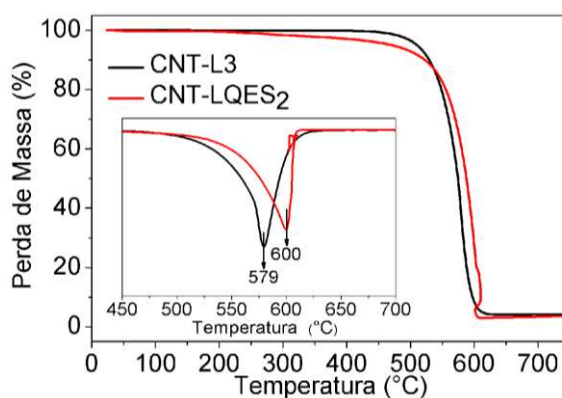
### 8.3. Análises termogravimétricas



(A)



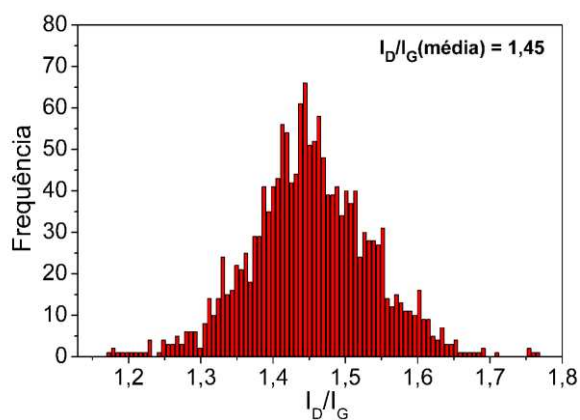
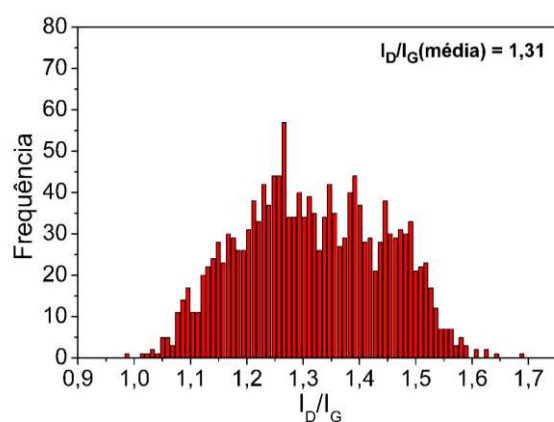
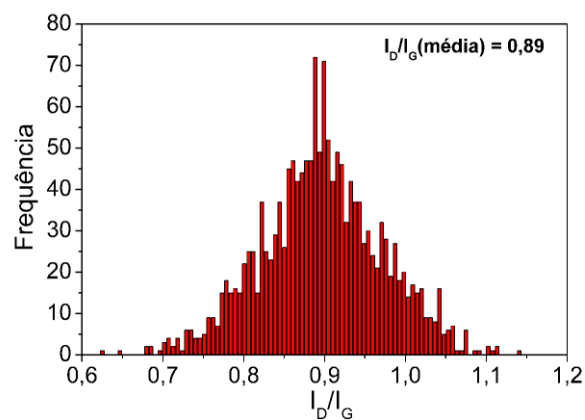
(B)



(C)

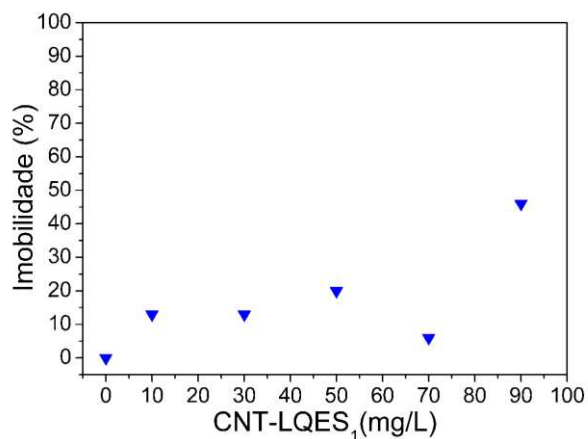
**Figura A-1.** Análises termogravimétricas (TGA) dos nanotubos de carbono estudados. (A) CNT-L1 e CNT-LQES; (B) CNT-L3 e CNT-LQES<sub>1</sub> e (C) CNT-L3 e CNT-LQES<sub>2</sub>. As figuras inseridas dentro dos gráficos representam a temperatura de decomposição das amostras ( $T_0$ ). Estas análises foram realizadas em atmosfera oxidante (ar sintético) a 5°C/minuto e massa de 3,5 mg de amostra em cada corrida.

## 8.4. Espectroscopia Raman confocal



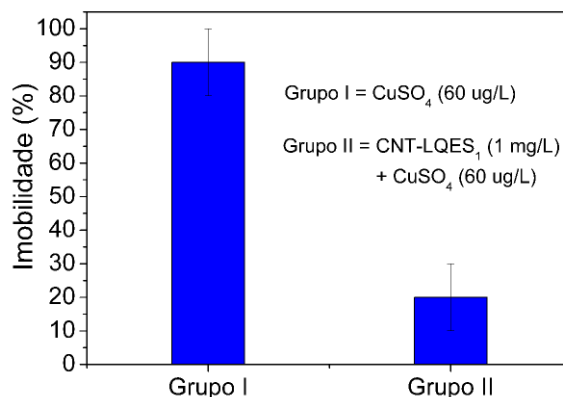
**Figura A-2.** Distribuição de frequência da relação entre a intensidade da banda D sobre a intensidade da banda G ( $I_D/I_G$ ) originadas a partir das análises de espectroscopia Raman confocal das amostras no estado sólido: (A) CNT-LQES; (B) CNT-LQES<sub>1</sub> e (C) CNT-LQES<sub>2</sub>.

### 8.5. Ecotoxicidade aguda sobre *Daphnia similis* (influência da aglomeração)



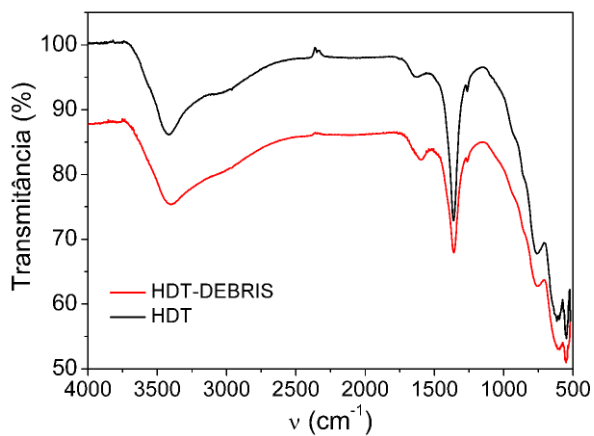
**Figura A-3.** Imobilidade das *Daphnia similis* após 48 horas de exposição aos CNT-LQES<sub>1</sub>. Neste teste foi esperado um intervalo de 2 horas após a preparação das suspensões para a introdução dos organismos no teste.

### 8.6. Ecotoxicidade aguda sobre *Daphnia similis* (modulação da toxicidade do sulfato de cobre)

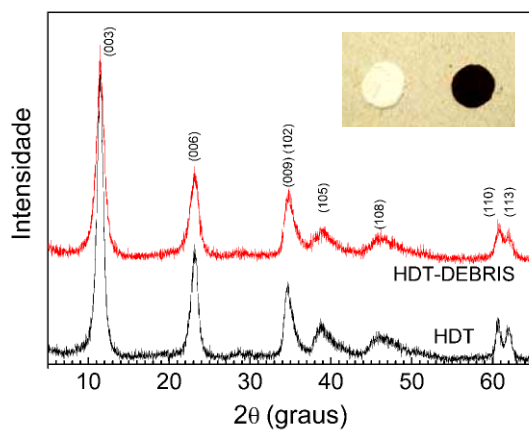


**Figura A-4.** Imobilidade de *Daphnia similis* após 48 horas de exposição a 60 µg/L de sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>) [Grupo I]. O Grupo II representa a modulação da toxicidade do CuSO<sub>4</sub> (60 µg/L) sobre a imobilidade de *Daphnia similis* após incubação com os CNT-LQES<sub>1</sub> (1 mg/L) e exposição por 48 horas no teste de toxicidade aguda.

## 8.7. Espectroscopia infravermelho e Difratoimetria de raios-X das hidrotalcitas após adsorção dos DEBRIS



(A)



(B)

**Figura A-5.** (A) Espectroscopia infravermelho [FT-IR] e (B) Difratoimetria de raio- X [XRD] das amostras de hidrotalcitas (HDT) após adsorção com os DEBRIS. A Fotografia ilustra o material HDT (Mg-Al) sintetizado no LQES e após adsorção com DEBRIS.

## 9. Referências Bibliográficas

1. McMichael, T., The biosphere, health, and "sustainability". *Science* **2002**, 297 (5584), 1093.
2. Sanderson, K., Chemistry: It's not easy being green. *Nature* **2011**, 469 (7328), 18-20.
3. Clarke, T., Sustainable development: Wanted: scientists for sustainability. *Nature* **2002**, 418 (6900), 812-4.
4. Pitkethly, M. J., Nanomaterials: the driving force. *Materials Today* **2004**, 7 (12), 20-9.
5. Alves, O. L., Nanotecnologia, nanociência e nanomateriais: quando a distância entre o presente e o futuro não é apenas questão de tempo. In *Nanotecnologia & Nanociência*. Editora CGEE-MCT: Brasília, DF, 2004.
6. Nel, A.; Xia, T.; Madler, L.; Li, N., Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* **2006**, 311 (5761), 622-7.
7. Hansen, S. F.; Maynard, A.; Baun, A.; Tickner, J. A., Late lessons from early warnings for nanotechnology. *Nature Nanotechnology* **2008**, 3 (8), 444-7.
8. Chun, A. L., Carbon nanotubes: Safe production? *Nature Nanotechnology* **2009**, 16 October. DOI: 10.1038/nnano.2009.339
9. Barnard, A. S., Nanohazards: knowledge is our first defence. *Nature Materials* **2006**, 5 (4), 245-8.
10. [http://www.nanowerk.com/phpscripts/n\\_dbsearch.php](http://www.nanowerk.com/phpscripts/n_dbsearch.php). Acessado em: 10/08/2011
11. Zhao, Y.; Nalwa, H. S., *Nanotoxicology: interactions of nanomaterials with biological systems*. American Scientific Publishers: Stevenson Ranch, CA, 2007.
12. Krug, H. F.; Wick, P., Nanotoxicology: an interdisciplinary challenge. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, 50(6), 1260-78.
13. Xia, X. R.; Monteiro-Riviere, N. A.; Riviere, J. E., An index for characterization of nanomaterials in biological systems. *Nature Nanotechnology* **2010**, 5 (9), 671-5.
14. Shvedova, A. A.; Kagan, V. E.; Fadeel, B., Close encounters of the small kind: adverse effects of man-made materials interfacing with the nano-cosmos of biological systems. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **2010**, 50 (2), 63-88.
15. Stark, W. J., Nanoparticles in biological systems. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, 50 (6), 1242-58.
16. Whitesides, G. M., The 'right' size in nanobiotechnology. *Nature Biotechnology* **2003**, 21 (10), 1161-5.
17. Jones, R., What can biology teach us? *Nature Nanotechnology* **2006**, 1 (2), 85-6.
18. Wickson, F., Narratives of nature and nanotechnology. *Nature Nanotechnology* **2008**, 3 (6), 313-5.

19. Esteves de Vasconcellos, M. J., *Pensamento Sistêmico - O novo Paradigma da Ciência*. Editora Papirus: Campinas, SP, 2003.
20. Mayr, E., *Isto é Biologia, a ciência do mundo vivo*. Editora Companhia das Letras: São Paulo, SP, 2008.
21. Campbell, N. A.; Reece, J. B.; Mitchell, L. G., *Biology - 5<sup>th</sup> Edition*. Benjamin Cummings Publisher: Menlo Park, CA, 1999.
22. Hornyak, G. L.; Tibbals, H. F.; Dutta, J.; Moore, J. J., *Introduction to Nanoscience and Nanotechnology* CRC Press: Boca Raton, FL, 2009.
23. Zarbin, A. J. G., Química de (nano)materiais. *Química Nova* **2007**, 30 (6) 1469-79.
24. Van Noorden, R., Chemistry: the trials of new carbon. *Nature* **2011**, 469 (7328), 14-6.
25. Ajayan, P. M.; Tour, J. M., Materials science: nanotube composites. *Nature* **2007**, 447 (7148), 1066-8.
26. Schnorr, J. M.; Swager, T. M., Emerging applications of carbon nanotubes. *Chemistry of Materials* **2011**, 23 (3), 646-57.
27. Endo, M., Grow carbon fibers in the vapor phase. *Chemical Technology* **1988**, 18, 568-76.
28. Iijima, S., Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* **1991**, 354 (6348), 56-8.
29. Jorio, A.; Dresselhaus, G.; Dresselhaus, M. S., *Carbon nanotubes : advanced topics in the synthesis, structure, properties, and applications*. Springer Press: New York, NY, 2008.
30. Kumar, M.; Ando, Y., Chemical vapor deposition of carbon nanotubes: a review on growth mechanism and mass production. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2010**, 10 (6), 3739-58.
31. <http://www.nanotube-suppliers.com/>. Acessado em: 10/08/2011
32. Thayer, A. M., Carbon nanotubes by the metric ton. *Chemical & Engineering News* **2007**, 85 (46), 29-30.
33. Santos, C. Minas Gerais dá largada na produção de nanotubos de carbono no Brasil *JC e-mail* **2010**, [on-line].
34. Paula, A. J.; Stefani, D.; Souza Filho, A. G.; Kim, Y. A.; Endo, M.; Alves, O. L., Surface chemistry in the process of coating mesoporous SiO<sub>2</sub> onto carbon nanotubes driven by the formation of Si-O-C bonds. *Chemistry - A European Journal* **2011**, 17 (11), 3228-37.
35. Balasubramanian, K.; Burghard, M., *Carbon Nanotubes: Methods and Protocols*. Humana Press: New York, NY, 2010.
36. Sun, Y. P.; Fu, K. F.; Lin, Y.; Huang, W. J., Functionalized carbon nanotubes: Properties and applications. *Accounts of Chemical Research* **2002**, 35 (12), 1096-1104.
37. Tasis, D.; Tagmatarchis, N.; Bianco, A.; Prato, M., Chemistry of carbon nanotubes. *Chemical Reviews* **2006**, 106 (3), 1105-36.
38. Yurekli, K.; Mitchell, C. A.; Krishnamoorti, R., Small-angle neutron scattering from surfactant-assisted aqueous dispersions of carbon nanotubes. *Journal of American Chemical Society* **2004**, 126 (32), 9902-3.

39. Pantarotto, D.; Briand, J. P.; Prato, M.; Bianco, A., Translocation of bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubes. *Chemical Communications* **2004**, 7 (1),16-7.
40. Hou, P. X.; Liu, C.; Cheng, H. M., Purification of carbon nanotubes. *Carbon* **2008**, 46 (15), 2003-25.
41. Salzmann, C. G.; Llewellyn, S. A.; Tobias, G.; Ward, M. A. H.; Huh, Y.; Green, M. L. H., The role of carboxylated carbonaceous fragments in the functionalization and spectroscopy of a single-walled carbon-nanotube material. *Advanced Materials* **2007**, 19 (6), 883-7.
42. Del Canto, E.; Flavin, K.; Movia, D.; Navio, C.; Bittencourt, C.; Giordani, S., Critical investigation of defect site functionalization on single-walled carbon nanotubes. *Chemistry of Materials* **2011**, 23 (1), 67-74.
43. Worsley, K. A.; Kalinina, I.; Bekyarova, E.; Haddon, R. C., Functionalization and dissolution of nitric acid treated single-Walled carbon nanotubes. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, 131 (50), 18153-8.
44. Liu, Z.; Tabakman, S.; Welsher, K.; Dai, H. J., Carbon nanotubes in biology and medicine: in vitro and in vivo detection, imaging and drug Delivery. *Nano Research* **2009**, 2 (2), 85-120.
45. Kostarelos, K.; Bianco, A.; Prato, M., Promises, facts and challenges for carbon nanotubes in imaging and therapeutics. *Nature Nanotechnology* **2009**, 4 (10), 627-33.
46. Liu, X. W.; Tao, H. Q.; Yang, K.; Zhang, S. A.; Lee, S. T.; Liu, Z. A., Optimization of surface chemistry on single-walled carbon nanotubes for in vivo photothermal ablation of tumors. *Biomaterials* **2011**, 32 (1), 144-51.
47. Menard-Moyon, C.; Kostarelos, K.; Prato, M.; Bianco, A., Functionalized carbon nanotubes for probing and modulating molecular functions. *Chemistry & Biology* **2010**, 17 (2), 107-15.
48. Milmo, S., Nanomaterials cause classification headache in REACH. *Chemistry World News* **2009**, 16 june [on-line].
49. Grobert, N., Carbon nanotubes: becoming clean. *Materials Today* **2006**, 10 (1), 28-35.
50. Alexander, A. J., Carbon nanotubes structures and compositions: implications for toxicological studies. In *Nanotoxicology: Characterization, Dosing and Health Effects*, Monteiro-Riviere, N. A.; Tran, C. L., Eds. Informa Healthcare Press: New York, NY, 2007.
51. Johnston, H. J.; Hutchison, G. R.; Christensen, F. M.; Peters, S.; Hankin, S.; Aschberger, K.; Stone, V., A critical review of the biological mechanisms underlying the in vivo and in vitro toxicity of carbon nanotubes: The contribution of physico-chemical characteristics. *Nanotoxicology* **2010**, 4 (2), 207-46.
52. Belin, T.; Epron, F., Characterization methods of carbon nanotubes: a review. *Materials Science and Engineering B-Solid State Materials for Advanced Technology* **2005**, 119 (2), 105-18.
53. Berhanu, D.; Dybowska, A.; Misra, S. K.; Stanley, C. J.; Ruenraroengsak, P.; Boccaccini, A. R.; Tetley, T. D.; Luoma, S. N.; Plant, J. A.; Valsami-Jones, E., Characterisation of carbon nanotubes in the context of toxicity studies. *Environmental Health* **2009**, 8 (S1) 1-4.



54. Gomme, C.; Blacher, S.; Dupont-Pavlovsky, N.; Bossuot, C.; Lamy, M.; Brasseur, A.; Marguillier, D.; Fonseca, A.; McRae, E.; Nagy, J. B.; Pirard, J. P., Comparison of different methods for characterizing multi-walled carbon nanotubes. *Colloids and Surfaces A - Physicochemical and Engineering Aspects* **2004**, 241 (1), 155-64.
55. Gomme, C.; Blacher, S.; Masenelli-Varlot, K.; Bossuot, C.; McRae, E.; Fonseca, A.; Nagy, J. B.; Pirard, J. P., Image analysis characterization of multi-walled carbon nanotubes. *Carbon* **2003**, 41 (13), 2561-72.
56. Lehman, J. H.; Terrones, M.; Mansfield, E.; Hurst, K. E.; Meunier, V., Evaluating the characteristics of multiwall carbon nanotubes. *Carbon* **2011**, 49 (8), 2581-02.
57. Fagan, J. A.; Bauer, B. J.; Hobbie, E. K.; Becker, M. L.; Hight Walker, A. R.; Simpson, J. R.; Chun, J.; Obrzut, J.; Bajpai, V.; Phelan, F. R.; Simien, D.; Huh, J. Y.; Migler, K. B., Carbon nanotubes: measuring dispersion and length. *Advanced Materials* **2011**, 23 (3), 338-48.
58. National Research Council Committee, *A New Biology for the 21st Century*. National Academic Press: Washington, DC, 2009.
59. <http://biosistemas.ufabc.edu.br/>. Acessado em: 12/01/2011
60. Ventura, M. M., *Ordem e Forma em Biosistemas - Base física* Editora UnB: Brasília, DF, 2009.
61. Atlan, H., Tentativas de definição da Organização Biológica. In *Organização biológica e a teoria da informação*, Editora Instituto Piaget: Lisboa, 2006.
62. Mir, L., *Genômica*. Editora Atheneu: São Paulo, SP, 2004.
63. Mayr, E., *Biologia, ciência única - Reflexões sobre a autonomia de uma disciplina científica*. Editora Companhia das Letras: São Paulo, SP, 2005.
64. Chediak, K., *Filosofia da Biologia*. Editora Zahar: Rio de Janeiro, RJ, 2008.
65. Service, R. F., Complex systems. Exploring the systems of life. *Science* **1999**, 284 (5411), 80-3.
66. Bonn, D., Biocomplexity: look at the whole, not the parts. *Lancet* **2001**, 357 (9252), 288.
67. von Bertalanffy, L., O significado da Teoria Geral dos Sistemas. In *Teoria Geral dos Sistemas: Fundamentos, desenvolvimento e aplicações*, Editora Vozes: Petrópolis, RJ, 2006.
68. Burda, C.; Chen, X.; Narayanan, R.; El-Sayed, M. A., Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes. *Chemical Review* **2005**, 105 (4), 1025-1102.
69. Cao, G., *Nanostructures and Nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications*. Imperial College Press: London, 2004.
70. Lynch, I.; Salvati, A.; Dawson, K. A., Protein-nanoparticle interactions: What does the cell see? *Nature Nanotechnology* **2009**, 4 (9), 546-7.
71. Nel, A. E.; Madler, L.; Velegol, D.; Xia, T.; Hoek, E. M. V.; Somasundaran, P.; Klaessig, F.; Castranova, V.; Thompson, M., Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature Materials* **2009**, 8 (7), 543-57.

72. Dawson, K. A.; Salvati, A.; Lynch, I., Nanotoxicology: nanoparticles reconstruct lipids. *Nature Nanotechnology* **2009**, 4 (2), 84-5.
73. Gewin, V., Nanobiotechnology: small talk. *Nature* **2006**, 444 (7118), 514-5.
74. Kane, R. S.; Stroock, A. D., Nanobiotechnology: protein-nanomaterial interactions. *Biotechnology Progress* **2007**, 23 (2), 316-9.
75. Knopfel, T.; Akemann, W., Nanobiotechnology: remote control of cells. *Nature Nanotechnology* **2010**, 5 (8), 560-61.
76. Moore, M. N., Biocomplexity: the post-genome challenge in ecotoxicology. *Aquatic Toxicology* **2002**, 59 (1-2), 1-15.
77. Benincasa, M.; Pacor, S.; Wu, W.; Prato, M.; Bianco, A.; Gennaro, R., Antifungal activity of amphotericin B conjugated to carbon nanotubes. *ACS Nano* **2011**, 5 (1), 199-208.
78. Wang, M.; Yu, S.; Wang, C.; Kong, J., Tracking the endocytic pathway of recombinant protein toxin delivered by multiwalled carbon nanotubes. *ACS Nano* **2010**, 4 (11), 6483-90.
79. Varkouhi, A. K.; Foillard, S.; Lammers, T.; Schiffelers, R. M.; Doris, E.; Hennink, W. E.; Storm, G., SiRNA delivery with functionalized carbon nanotubes. *International Journal of Pharmacology* **2011**, 426 (2), 419-25.
80. Nayak, T. R.; Jian, L.; Phua, L. C.; Ho, H. K.; Ren, Y.; Pastorin, G., Thin films of functionalized multiwalled carbon nanotubes as suitable scaffold materials for stem cells proliferation and bone formation. *ACS Nano* **2010**, 4 (12), 7717-25.
81. Yang, W.; Ratinac, K. R.; Ringer, S. P.; Thordarson, P.; Gooding, J. J.; Braet, F., Carbon nanomaterials in biosensors: should you use nanotubes or graphene? *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, 49 (12), 2114-38.
82. Kumar, N. A.; Bund, A.; Cho, B. G.; Lim, K. T.; Jeong, Y. T., Novel amino-acid-based polymer/multi-walled carbon nanotube bio-nanocomposites: highly water dispersible carbon nanotubes decorated with gold nanoparticles. *Nanotechnology* **2009**, 20 (22), 225608.
83. Yoon, S. H.; Jin, H. J.; Kook, M. C.; Pyun, Y. R., Electrically conductive bacterial cellulose by incorporation of carbon nanotubes. *Biomacromolecules* **2006**, 7 (4), 1280-4.
84. Ren, X. M.; Chen, C.; Nagatsu, M., Carbon nanotubes as adsorbents in environmental pollution management: a review. *Chemical Engineering Journal* **2011**, 170 (2), 395-410.
85. Wick, P.; Gasser, M.; Rothen-Rutishauser, B.; Krug, H. F.; Gehr, P.; Nelle, M.; Yan, B., The adsorption of biomolecules to multi-walled carbon nanotubes is influenced by both pulmonary surfactant lipids and surface chemistry. *Journal of Nanobiotechnology* **2010**, 8 (31), 1-9.
86. Roco, M. C., Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. *Current Opinion in Biotechnology* **2003**, 14 (3), 337-46.
87. Mazzocchi, F., Complexity in biology. Exceeding the limits of reductionism and determinism using complexity theory. *EMBO Rep* **2008**, 9 (1), 10-4.

88. Souza, G. M.; Manzatto, A. G., Hierarquia Auto-organizada em Sistemas Biológicos. In *Auto-organização: Estudos Interdisciplinares*, D'Ottaviano, I. M. L.; Gozales, M. E. Q., Eds, Coleção CLE, Editora da Unicamp: Campinas, SP, 2000.
89. Wilson, E. O.; Peter, F. M., *Biodiversidade*. Editora Nova Fronteira: Rio de Janeiro, RJ, 1997.
90. Assadourian, E., *Estado do Mundo, 2010: estado do consumo e consumo sustentável*. Editora UMA: Salvador, BA, 2010.
91. Wilson, E. O., *A Criação - Como salvar a vida na terra*. Editora Companhia das Letras: São Paulo, SP, 2008.
92. <http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/chemicals/reach/index>. Acessado em: 10/08/2011
93. <http://www.epa.gov/ncct/toxcast/>. Acessado em: 10/08/2011
94. Klaassen, C. D.; Watkins, J. B.; Casarett, L. J., *Casarett & Doull's essentials of toxicology*. McGraw-Hill Medical Press: New York, NY, 2010.
95. Oga, S.; Carmago, M. M. A.; Batistuzzo, J. A. O., *Fundamentos de Toxicologia*. Editora Atheneu: São Paulo, SP, 2008.
96. Hartung, T., Toxicology for the twenty-first century. *Nature* **2009**, *460* (7252), 208-12.
97. Hartung, T., A toxicology for the 21st century--mapping the road ahead. *Toxicological Science* **2009**, *109* (1), 18-23.
98. Maynard, A. D.; Warheit, D. B.; Philbert, M. A., The new toxicology of sophisticated materials: nanotoxicology and beyond. *Toxicological Science* **2011**, *120* (S1), 109-29.
99. Donaldson, K.; Stone, V.; Tran, C. L.; Kreyling, W.; Borm, P. J., Nanotoxicology. *Occupational and Environmental Medicine* **2004**, *61* (9), 727-8.
100. Oberdorster, G.; Oberdorster, E.; Oberdorster, J., Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives* **2005**, *113* (7), 823-39.
101. <http://informahealthcare.com/nan>. Acessado em: 10/08/2011
102. Oberdorster, G.; Stone, V.; Donaldson, K., Toxicology of nanoparticles: A historical perspective. *Nanotoxicology* **2007**, *1* (1), 2-25.
103. <http://www.nature.com/nnano/focus/nanotoxicology/index.html>. Acessado em: 10/08/2011
104. [http://ec.europa.eu/environment/consultations/pdf/recommendation\\_nano.pdf](http://ec.europa.eu/environment/consultations/pdf/recommendation_nano.pdf). Acessado em: 10/08/2011
105. Maynard, A. D., Don't define nanomaterials. *Nature* **2011**, *475* (7354), 31.
106. Auffan, M.; Rose, J.; Bottero, J. Y.; Lowry, G. V.; Jolivet, J. P.; Wiesner, M. R., Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nature Nanotechnology* **2009**, *4* (10), 634-41.
107. Maynard, A.; Bowman, D.; Hodge, G., The problem of regulating sophisticated materials. *Nature Materials* **2011**, *10* (8), 554-7.

108. Lundqvist, M.; Stigler, J.; Elia, G.; Lynch, I.; Cedervall, T.; Dawson, K. A., Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, 105 (38), 14265-70.
109. Walczyk, D.; Bombelli, F. B.; Monopoli, M. P.; Lynch, I.; Dawson, K. A., What the cell "sees" in bionanoscience. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, 132 (16), 5761-68.
110. Monopoli, M. P.; Walczyk, D.; Campbell, A.; Elia, G.; Lynch, I.; Baldelli Bombelli, F.; Dawson, K. A., Physical-chemical aspects of protein corona: relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, 133 (8), 2525-34.
111. Monopoli, M. P.; Bombelli, F. B.; Dawson, K. A., Nanobiotechnology: nanoparticle coronas take shape. *Nature Nanotechnology* **2011**, 6 (1), 11-2.
112. Freiman, S.; Hooker, S.; Migler, K.; Arepalli, S., Messurement issues in single wall carbon nanotubes. *National Institute of Standards and Technology*, Special Publication, 2008.
113. Andrade, N. F. Os efeitos da temperatura sobre a oxidação de nanotubos de carbono. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.
114. Stookey, L. L., Ferrozine: a new spectrophometric reagent for iron. *Analytical Chemistry* **1970**, 42 (7), 779-81.
115. Guo, L.; Morris, D. G.; Liu, X. Y.; Vaslet, C.; Hurt, R. H.; Kane, A. B., Iron bioavailability and redox activity in diverse carbon nanotube samples. *Chemistry of Materials* **2007**, 19 (14), 3472-78.
116. Barros Neto, B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E., *Como fazer experimentos*. Editora Unicamp: Campinas, SP, 2002.
117. ABNT-NBR 12713, Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda – Método de Ensaio com *Daphnia* spp (Cladocera, Crustácea), 2004.
118. Faria, A. F. Produção, Purificação e Caracterização Química de Biossurfactantes Produzidos por *Bacillus subtilis* em Glicerina Residual. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2010.
119. a) Marsh, D. H.; Rance, G. A.; Zaka, M. H.; Whitby, R. J.; Khlobystov, A. N., Comparison of the stability of multiwalled carbon nanotube dispersions in water. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2007**, 9 (40), 5490-96. b) Murdock, R. C., Braydich-Stolle, L., Schrand, A. M., Schlager, J. J., Hussain, S. M. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. *Toxicological Science* 101 (2), 239-53.
120. Maron, D. M.; Ames, B. N., Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* **1983**, 113 (3), 173-215.
121. Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **1976**, 72, 248-54.

122. Engvall, E.; Perlmann, P., Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **1971**, 8 (9), 871-4.
123. Sant'Anna, O. A.; Mouton, D.; Ibanez, O. M.; Bouthillier, Y.; Mevel, J. C.; Reis, M. H.; Biozzi, G., Basal immunoglobulin serum concentration and isotype distribution in relation to the polygenic control of antibody responsiveness in mice. *Immunogenetics* **1985**, 22 (2), 131-9.
124. McCarthy, K. D.; de Vellis, J., Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *Journal of Cellular Biology* **1980**, 85 (3), 890-92.
125. Casey, A.; Herzog, E.; Lyng, F. M.; Byrne, H. J.; Chambers, G.; Davoren, M., Single walled carbon nanotubes induce indirect cytotoxicity by medium depletion in A549 lung cells. *Toxicology Letters* **2008**, 179 (2), 78-84.
126. Matlhoko, L.; Pillai, S. K.; Moodley, M.; Augustyn, W. G.; Ray, S. S., A Comparison of Purification Procedures for Multi-Walled Carbon Nanotubes Produced by Chemical Vapour Deposition. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2009**, 9 (9), 5431-5.
127. Chen, X. H.; Chen, C. S.; Chen, Q.; Cheng, F. Q.; Zhang, G.; Chen, Z. Z., Non-destructive purification of multi-walled carbon nanotubes produced by catalyzed CVD. *Materials Letters* **2002**, 57 (3), 734-8.
128. Gulumian, M.; van Wyk, J. A., Hydroxyl radical production in the presence of fibers by a Fenton-type reaction. *Chemico-Biological Interactions* **1987**, 62, 89-97.
129. Hull, M. S.; Kennedy, A. J.; Steevens, J. A.; Bednar, A. J.; Weiss, C. A.; Vikesland, P. J., Release of Metal Impurities from Carbon Nanomaterials Influences Aquatic Toxicity. *Environmental Science & Technology* **2009**, 43 (11), 4169-74.
130. Haniu, H.; Matsuda, Y.; Takeuchi, K.; Kim, Y. A.; Hayashi, T.; Endo, M., Proteomics-based safety evaluation of multi-walled carbon nanotubes. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2010**, 242 (3), 256-262.
131. Kagan, V. E.; Tyurina, Y. Y.; Tyurin, V. A.; Konduru, N. V.; Potapovich, A. I.; Osipov, A. N.; Kisin, E. R.; Schwegler-Berry, D.; Mercer, R.; Castranova, V.; Shvedova, A. A., Direct and indirect effects of single walled carbon nanotubes on RAW 264.7 macrophages: role of iron. *Toxicology Letters* **2006**, 165 (1), 88-100.
132. Zuin, S.; Pojan, G.; Marcomini, A., Effect-oriented physicochemical characterization of nanomaterials. In *Nanotoxicology - Characterization, Dosing and Health Effects*, Monteiro-Riviere, N. A.; Tran, C. L., Eds. Informa Healthcare Press: New York, NY, 2007.
133. Bom, D.; Andrews, R.; Jacques, D.; Anthony, J.; Chen, B. L.; Meier, M. S.; Selegue, J. P., Thermogravimetric analysis of the oxidation of multiwalled carbon nanotubes: Evidence for the role of defect sites in carbon nanotube chemistry. *Nano Letters* **2002**, 2 (6), 615-19.
134. Huang, W.; Wang, Y.; Luo, G. H.; Wei, F., 99.9% purity multi-walled carbon nanotubes by vacuum high-temperature annealing. *Carbon* **2003**, 41 (13), 2585-90.
135. Dresselhaus, M. S.; Jorio, A.; Souza, A. G.; Saito, R., Defect characterization in graphene and carbon nanotubes using Raman spectroscopy. *Philosophical Transactions of the Royal Society a-Mathematical Physical and Engineering Sciences* **2010**, 368 (1932), 5355-77.

136. Osswald, S.; Havel, M.; Gogotsi, Y., Monitoring oxidation of multiwalled carbon nanotubes by Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy* **2007**, 38 (6), 728-36.
137. Rosca, I. D.; Watari, F.; Uo, M.; Akaska, T., Oxidation of multiwalled carbon nanotubes by nitric acid. *Carbon* **2005**, 43 (15), 3124-31.
138. Marques, R. R. N.; Machado, B. F.; Faria, J. L.; Silva, A. M. T., Controlled generation of oxygen functionalities on the surface of Single-Walled Carbon Nanotubes by HNO<sub>3</sub> hydrothermal oxidation. *Carbon* **2010**, 48 (5), 1515-23.
139. Li, X.; Huang, Y., Influence of acid treatment on dispersion of carbon nanotubes in PBO matrix. *Advanced Composites Letters* **2005**, 14 (6), 201-6.
140. Peng, X. J.; Jia, J. J.; Gong, X. M.; Luan, Z. K.; Fan, B., Aqueous stability of oxidized carbon nanotubes and the precipitation by salts. *Journal of Hazardous Materials* **2009**, 165 (1), 1239-42.
141. Smith, B.; Wepasnick, K.; Schrote, K. E.; Cho, H. H.; Ball, W. P.; Fairbrother, D. H., Influence of Surface Oxides on the colloidal stability of multi-walled carbon nanotubes: a structure-property relationship. *Langmuir* **2009**, 25 (17), 9767-76.
142. Smith, B.; Wepasnick, K.; Schrote, K. E.; Bertele, A. H.; Ball, W. P.; O'Melia, C.; Fairbrother, D. H., Colloidal properties of aqueous suspensions of acid-treated multi-walled carbon nanotubes. *Environmental Science & Technology* **2009**, 43 (3), 819-25.
143. Pumera, M.; Smid, B.; Veltruska, K., Influence of nitric acid treatment of carbon nanotubes on their physico-chemical properties. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2009**, 9 (4), 2671-6.
144. Karousis, N.; Tagmatarchis, N.; Tasis, D., Current progress on the chemical modification of carbon nanotubes. *Chemical Reviews* **2010**, 110 (9), 5366-97.
145. Fogden, S.; Verdejo, R.; Cottam, B.; Shaffer, M., Purification of single walled carbon nanotubes: the problem with oxidation debris. *Chemical Physics Letters* **2008**, 460 (1), 162-7.
146. Wang, Z.; Korobeinyk, A.; Whitby, R. L. D.; Meikle, S. T.; Mikhalovsky, S. V.; Acquah, S. F. A.; Kroto, H. W., Direct confirmation that carbon nanotubes still react covalently after removal of acid-oxidative lattice fragments. *Carbon* **2010**, 48 (3), 916-8.
147. Verdejo, R.; Lamoriniere, S.; Cottam, B.; Bismarck, A.; Shaffer, M., Removal of oxidation debris from multi-walled carbon nanotubes. *Chemical Communications* **2007**, 5, 513-5.
148. Stéfani, D.; Paula, A. J.; Vaz, B. G.; Silva, R. A.; Andrade, N. F.; Justo, G. Z.; Ferreira, C. V.; Filho, A. G.; Eberlin, M. N.; Alves, O. L., Structural and proactive safety aspects of oxidation debris from multiwalled carbon nanotubes. *Journal of Hazardous Materials* **2011**, 189 (1), 391-6.
149. Kundu, S.; Wang, Y. M.; Xia, W.; Muhler, M., Thermal Stability and Reducibility of Oxygen-Containing Functional Groups on Multiwalled Carbon Nanotube Surfaces: A Quantitative High-Resolution XPS and TPD/TPR Study. *Journal of Physical Chemistry C* **2008**, 112 (43), 16869-78.
150. Reemtsma, T., Determination of molecular formulas of natural organic matter molecules by (ultra-) high-resolution mass spectrometry: status and needs. *Journal of Chromatography A* **2009**, 1216 (18), 3687-3701.

151. Hertkorn, N.; Frommberger, M.; Witt, M.; Koch, B. P.; Schmitt-Kopplin, P.; Perdue, E. M., Natural organic matter and the event horizon of mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **2008**, 80 (23), 8908-19.
152. Visser, S. A., Application of Van krevelens graphical statistical-method for the study of aquatic humic material. *Environmental Science & Technology* **1983**, 17 (7), 412-7.
153. Kim, S.; Kramer, R. W.; Hatcher, P. G., Graphical method for analysis of ultrahigh-resolution broadband mass spectra of natural organic matter, the van Krevelen diagram. *Analytical Chemistry* **2003**, 75 (20), 5336-44.
154. Kramer, R. W.; Kujawinski, E. B.; Hatcher, P. G., Identification of black carbon derived structures in a volcanic ash soil humic acid by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Environmental Science & Technology* **2004**, 38 (12), 3387-95.
155. Sleighter, R. L.; Hatcher, P. G., The application of electrospray ionization coupled to ultrahigh resolution mass spectrometry for the molecular characterization of natural organic matter. *Journal of Mass Spectrometry* **2007**, 42 (5), 559-74.
156. Wang, Z. W.; Shirley, M. D.; Meikle, S. T.; Whitby, R. L. D.; Mikhalovsky, S. V., The surface acidity of acid oxidised multi-walled carbon nanotubes and the influence of in-situ generated fulvic acids on their stability in aqueous dispersions. *Carbon* **2009**, 47 (1), 73-9.
157. Rocha, J. C.; Rosa, A. H., *Substâncias Húmicas Aquáticas: Interações com espécies metálicas*. Editora Unesp: São Paulo, SP, 2003.
158. Azevedo, F. A.; Chasin, A. M., *As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia*. Editora InterTox: São Paulo, 2004.
159. Mauter, M. S.; Elimelech, M., Environmental applications of carbon-based nanomaterials. *Environmental Science and Technology* **2008**, 42 (16), 5843-59.
160. Farre, M.; Gajda-Schranz, K.; Kantiani, L.; Barcelo, D., Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment. *Analytical Bioanalytical Chemistry* **2009**, 393 (1), 81-95.
161. Kahru, A.; Dubourguier, H. C., From ecotoxicology to nanoecotoxicology. *Toxicology* **2010**, 269 (2), 105-19.
162. Philbrick, M., An anticipatory governance approach to carbon nanotubes. *Risk Analysis* **2010**, 30 (11), 1708-22.
163. Martins, J.; Oliva Teles, L.; Vasconcelos, V., Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. *Environmental International* **2007**, 33 (3), 414-25.
164. Rodgher, S.; Espindola, E. L.; Lombardi, A. T., Suitability of *Daphnia similis* as an alternative organism in ecotoxicological tests: implications for metal toxicity. *Ecotoxicology* **2010**, 19 (6), 1027-33.
165. Kennedy, A. J.; Gunter, J. C.; Chappell, M. A.; Goss, J. D.; Hull, M. S.; Kirgan, R. A.; Steevens, J. A., Influence of Nanotube Preparation in Aquatic Bioassays. *Environmental and Toxicological Chemistry* **2009**, 28 (9), 1930-38.

166. Kennedy, A. J.; Hull, M. S.; Steevens, J. A.; Dontsova, K. M.; Chappell, M. A.; Gunter, J. C.; Weiss, C. A., Jr., Factors influencing the partitioning and toxicity of nanotubes in the aquatic environment. *Environmental and Toxicological Chemistry* **2008**, 27 (9), 1932-41.
167. Li, M. H.; Huang, C. P., The responses of *Ceriodaphnia dubia* toward multi-walled carbon nanotubes: Effect of physical-chemical treatment. *Carbon* **2011**, 49 (5), 1672-9.
168. Kennedy, A. J.; Gunter, J. C.; Chappell, M. A.; Goss, J. D.; Hull, M. S.; Kirgan, R. A.; Steevens, J. A., Influence of nanotube preparation in aquatic bioassays. *Environmental and Toxicological Chemistry* **2009**, 28 (9), 1930-8.
169. Barros, S. B. M.; Davino, S. C., Avaliação da toxicidade. In *Fundamentos de Toxicologia*, Oga, S.; Camargo, M. M. A.; Batistuzzo, J. A. O., Eds. Editora Atheneu: São Paulo, SP, 2008.
170. Roberts, A. P.; Mount, A. S.; Seda, B.; Souther, J.; Qiao, R.; Lin, S.; Ke, P. C.; Rao, A. M.; Klaine, S. J., In vivo biomodification of lipid-coated carbon nanotubes by *Daphnia magna*. *Environmental Science and Technology* **2007**, 41 (8), 3025-9.
171. Kim, J. S.; Song, K. S.; Lee, J. H.; Yu, I. J., Evaluation of biocompatible dispersants for carbon nanotube toxicity tests. *Archives of Toxicology* **2011**, 6, 1-10.
172. Mulligan, C. N., Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution* **2005**, 133 (2), 183-98.
173. Mulligan, C. N., Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2009**, 14 (5), 372-8.
174. Mejia, J.; Tichelaar, F.; Saout, C.; Toussaint, O.; Masereel, B.; Mekhalif, Z.; Lucas, S.; Delhalle, J., Effects of the dispersion methods in Pluronic F108 on the size and the surface composition of MWCNTs and their implications in toxicology assessment. *Journal of Nanoparticle Research* **2011**, 13 (2), 655-67.
175. Vaisman, L.; Wagner, H. D.; Marom, G., The role of surfactants in dispersion of carbon nanotubes. *Advanced Colloids and Interface Science* **2006**, 128, 37-46.
176. Clark, M. D.; Subamanian, S.; Krishnamoorti, R., Understanding surfactant aided aqueous dispersion of multi-walled carbon nanotubes. *Journal of Colloids and Interface Science* **2011**, 354 (1), 144-51.
177. de Faria, A. F.; Stefani, D.; Vaz, B. G.; Silva, I. S.; Garcia, J. S.; Eberlin, M. N.; Grossman, M. J.; Alves, O. L.; Durrant, L. R., Purification and structural characterization of fengycin homologues produced by *Bacillus subtilis* LSFM-05 grown on raw glycerol. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **2011**, 38 (7), 863-71.
178. de Faria, A. F.; Martinez, D. S. T.; Barbosa, G. N. O.; Vaz, B. G.; Silva, I. S.; Garcia, J. S.; Tótola, M. R.; Eberlin, M. N.; Grossman, M. J.; Alves, O. L.; Durrant, L. R., Production and structural characterization of surfactin (C14/Leu7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from biodiesel industry. *Process Biochemistry* **2011**, 46 (10), 1951-7.
179. Li, L.-J.; Nicholas, R. J.; Chen, B. L.; Darton, R. C.; Baker, S. C., Comparative study of photoluminescence of single-walled carbon nanotubes wrapped with sodium dodecyl sulfate surfactin and polyvinylpyrrolidone. *Nanotechnology* **2005**, 16 (S2), 202-5.



180. Zhu, X.; Zhu, L.; Chen, Y.; Tian, S., Acute toxicities of six manufactured nanomaterial suspensions to *Daphnia magna*. *Journal Nanoparticle Research* **2009**, 11 (1), 67-75.
181. Baun, A.; Sorensen, S. N.; Rasmussen, R. F.; Hartmann, N. B.; Koch, C. B., Toxicity and bioaccumulation of xenobiotic organic compounds in the presence of aqueous suspensions of aggregates of nano-C(60). *Aquatic Toxicology* **2008**, 86 (3), 379-87.
182. Petersen, E. J.; Pinto, R. A.; Mai, D. J.; Landrum, P. F.; Weber, W. J., Jr., Influence of polyethyleneimine graftings of multi-walled carbon nanotubes on their accumulation and elimination by and toxicity to *Daphnia magna*. *Environmental Science and Technology* **2011**, 45 (3), 1133-8.
183. Sheng, G. D.; Li, J. X.; Shao, D. D.; Hu, J.; Chen, C. L.; Chen, Y. X.; Wang, X. K., Adsorption of copper(II) on multiwalled carbon nanotubes in the absence and presence of humic or fulvic acids. *Journal of Hazardous Materials* **2010**, 178 (1), 333-40.
184. Umbuzeiro, G. A.; Coluci, V. R.; Honorio, J. G.; Giro, R.; Moraes, D. A.; Lage, A. S. G.; Mazzei, J. L.; Felzenszwalb, I.; Souza Filho, A. G.; Stéfani, D.; Alves, O. L., Understanding the interaction of multi-walled carbon nanotubes with mutagenic organic pollutants using computational modeling and biological experiments. *Trends in Analytical Chemistry* **2011**, 30 (3), 437-46.
185. Saleh, N. B.; Pfefferle, L. D.; Elimelech, M., Aggregation kinetics of multiwalled carbon nanotubes in aquatic systems: measurements and environmental implications. *Environmental Science and Technology* **2008**, 42 (21), 7963-9.
186. Edgington, A. J.; Roberts, A. P.; Taylor, L. M.; Alloy, M. M.; Reppert, J.; Rao, A. M.; Mao, J.; Klaine, S. J., The influence of natural organic matter on the toxicity of multiwalled carbon nanotubes. *Environmental and Toxicological Chemistry* **2010**, 29 (11), 2511-8.
187. Preston, R. J.; Hoffmann, G. R., Genetic Toxicology. In *Casarett & Doull 's Toxicology The basic science of poisons*, Klaassen, C. D., Eds. McGraw-Hill Press: New York, NY, 2008.
188. Lindberg, H. K.; Falck, G. C.; Suhonen, S.; Vippola, M.; Vanhala, E.; Catalan, 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* **2009**, 186 (3), 166-73.
189. Wang, L.; Luanpitpong, S.; Castranova, V.; Tse, W.; Lu, Y.; Pongrakhananon, V.; Rojanasakul, Y., Carbon nanotubes induce malignant transformation and tumorigenesis of human lung epithelial cells. *Nano Letters* **2011**, 11(7), 2796-03.
190. Patlolla, A. K.; Hussain, S. M.; Schlager, J. J.; Patlolla, S.; Tchounwou, P. B., Comparative study of the clastogenicity of functionalized and nonfunctionalized multiwalled carbon nanotubes in bone marrow cells of Swiss-Webster mice. *Environmental Toxicology* **2010**, 25 (6), 608-21.
191. Wurnitzer, U.; Herbold, B.; Voetz, M.; Ragot, J., Studies on the in vitro genotoxicity of baytubes, agglomerates of engineered multi-walled carbon-nanotubes (MWCNT). *Toxicology Letters* **2009**, 186 (3), 160-5.

192. Di Sotto, A.; Chiaretti, M.; Carru, G. A.; Bellucci, S.; Mazzanti, G., Multi-walled carbon nanotubes: Lack of mutagenic activity in the bacterial reverse mutation assay. *Toxicology Letters* **2009**, 184 (3), 192-7.
193. Doak, S. H.; Griffiths, S. M.; Manshian, B.; Singh, N.; Williams, P. M.; Brown, A. P.; Jenkins, G. J., Confounding experimental considerations in nanogenotoxicology. *Mutagenesis* **2009**, 24 (4), 285-93.
194. Gonzalez, L.; Sanderson, B. J.; Kirsch-Volders, M., Adaptations of the in vitro MN assay for the genotoxicity assessment of nanomaterials. *Mutagenesis* **2011**, 26 (1), 185-91.
195. Scott-Fordsmand, J. J.; Krogh, P. H.; Schaefer, M.; Johansen, A., The toxicity testing of double-walled nanotubes-contaminated food to *Eisenia veneta* earthworms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2008**, 71 (3), 616-9.
196. Cheng, J.; Chan, C. M.; Veca, L. M.; Poon, W. L.; Chan, P. K.; Qu, L.; Sun, Y. P.; Cheng, S. H., Acute and long-term effects after single loading of functionalized multi-walled carbon nanotubes into zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology and Applied Pharmacology* **2009**, 235 (2), 216-25.
197. Plata, D. L.; Hart, A. J.; Reddy, C. M.; Gschwend, P. M., Early Evaluation of Potential Environmental Impacts of Carbon Nanotube Synthesis by Chemical Vapor Deposition. *Environmental Science & Technology* **2009**, 43 (21), 8367-73.
198. Meyer, D. E.; Curran, M. A.; Gonzalez, M. A., An examination of existing data for the industrial manufacture and use of nanocomponents and their role in the life cycle impact of nanoproducts. *Environmental Science and Technology* **2009**, 43 (5), 1256-63.
199. Albrecht, M. A.; Evans, C. W.; Raston, C. L., Green chemistry and the health implications of nanoparticles. *Green Chemistry* **2006**, 8 (5), 417-32.
200. Hutchison, J. E., Greener nanoscience: A proactive approach to advancing applications and reducing implications of nanotechnology. *ACS Nano* **2008**, 2 (3), 395-402.
201. Tobias, G.; Shao, L. D.; Ballesteros, B.; Green, M. L. H., Enhanced Sidewall functionalization of single-wall carbon nanotubes using nitric acid. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2009**, 9 (10), 6072-77.
202. Prato, M., Materials chemistry: controlled nanotube reactions. *Nature* **2010**, 465 (7295), 172-3.
203. Heister, E.; Lamprecht, C.; Neves, V.; Tilmaciu, C.; Datas, L.; Flahaut, E.; Soula, B.; Hinterdorfer, P.; Coley, H. M.; Silva, S. R. P.; McFadden, J., Higher Dispersion Efficacy of Functionalized Carbon Nanotubes in Chemical and Biological Environments. *ACS Nano* **2010**, 4 (5), 2615-26.
204. Yang, K.; Xing, B. S., Adsorption of fulvic acid by carbon nanotubes from water. *Environmental Pollution* **2009**, 157 (4), 1095-1100.
205. Fu, J. F.; Zhao, Y. Q.; Wu, Q. L., Optimising photoelectrocatalytic oxidation of fulvic acid using response surface methodology. *Journal of Hazardous Materials* **2007**, 144 (1), 499-505.

206. Martinez, D. S. T.; Alves, O. L.; Souza Filho, A. G.; Parizotto, N. V. Processos para tratamento de efluentes contendo fragmentos de carbono carboxilados provenientes de nanotubos de carbono [PCT/BR2010/000372], 2010.
207. Goh, K. H.; Lim, T. T.; Dong, Z., Application of layered double hydroxides for removal of oxyanions: a review. *Water Research* **2008**, 42 (6), 1343-68.
208. Ferreira, O. P. Desenvolvimento de Materiais Porosos Bidimensionais, à Base de  $Al^{3+}$  e  $M^{2+}$  (Zn, Mg) para Uso na Remediação de Efluentes de Indústrias Têxteis. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2001.
209. Rourke, J. P.; Pandey, P. A.; Moore, J. J.; Bates, M.; Kinloch, I. A.; Young, R. J.; Wilson, N. R., The real graphene oxide revealed: stripping the oxidative debris from the graphene-like sheets. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, 50 (14), 3173-7.
210. Dominguez, J. R.; Gonzalez, T.; Garcia, H. M.; Sanchez-Lavado, F.; de Heredia, J., Aluminium sulfate as coagulant for highly polluted cork processing wastewaters: Removal of organic matter. *Journal of Hazardous Materials* **2007**, 148 (1-2), 15-21.
211. Alves, O. L.; Stéfani, D.; Parizotto, N. V.; Souza Filho, A. G., Hydrotalcites: a highly efficient ecomaterial for effluent treatment originated from carbon nanotube chemical processing. *Journal of Physics : Conference Series* **2011**, 304 DOI: 10.1088/1742-6596/304/1/012024
212. Huang, C. P.; Shiu, H. L., Interactions between alum and organics in coagulation. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **1996**, 113 (1), 155-63.
213. Sant'Anna, O. A.; Lima, F. A.; De Franco, M.; Ribeiro, O. G., Imunogética e Resistência a Infecções. In *Genômica*, Mir, L., Ed. Editora Atheneu: São Paulo, 2004.
214. Dobrovolskaia, M. A.; McNeil, S. E., Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nature Nanotechnology* **2007**, 2 (8), 469-78.
215. Dobrovolskaia, M. A.; Germolec, D. R.; Weaver, J. L., Evaluation of nanoparticle immunotoxicity. *Nature Nanotechnology* **2009**, 4 (7), 411-4.
216. Yu, Y.; Zhang, Q.; Mu, Q.; Zhang, B.; Yan, B., Exploring the Immunotoxicity of Carbon nanotubes. *Nanoscale Research Letters* **2008**, 3, 271-7.
217. Moghimi, S. M.; Hunter, A. C., Complement monitoring of carbon nanotubes. *Nature Nanotechnology* **2010**, 5 (6), 382-3.
218. Pantarotto, D.; Partidos, C. D.; Graff, R.; Hoebeke, J.; Briand, J. P.; Prato, M.; Bianco, A., Synthesis, structural characterization, and immunological properties of carbon nanotubes functionalized with peptides. *Journal of American Chemistry Society* **2003**, 125 (20), 6160-4.
219. Yandar, N.; Pastorin, G.; Prato, M.; Bianco, A.; Patarroyo, M. E.; Manuel Lozano, J., Immunological profile of a Plasmodium vivax AMA-1 N-terminus peptide-carbon nanotube conjugate in an infected Plasmodium berghei mouse model. *Vaccine* **2008**, 26 (46), 5864-73.
220. Meng, J.; Duan, J.; Kong, H.; Li, L.; Wang, C.; Xie, S.; Chen, S.; Gu, N.; Xu, H.; Yang, X. D., Carbon nanotubes conjugated to tumor lysate protein enhance the efficacy of an antitumor immunotherapy. *Small* **2008**, 4 (9), 1364-70.

221. Meng, J.; Yang, M.; Jia, F.; Kong, H.; Zhang, W.; Wang, C.; Xing, J.; Xie, S.; Xu, H., Subcutaneous injection of water-soluble multi-walled carbon nanotubes in tumor-bearing mice boosts the host immune activity. *Nanotechnology* **2010**, 21 (14), 145104.
222. Janeway, C. A.; Traves, P.; Walport, M.; Shlomchik, M. J., *Imunobiologia - O sistema imune na saúde e na doença*. Editora Artmed: Porto Alegre, RS, 2007.
223. Carvalho, L. V.; Ruiz Rde, C.; Scaramuzzi, K.; Marengo, E. B.; Matos, J. R.; Tambourgi, D. V.; Fantini, M. C.; Sant'Anna, O. A., Immunological parameters related to the adjuvant effect of the ordered mesoporous silica SBA-15. *Vaccine* **2010**, 28 (50), 7829-36.
224. Ramos, A. T.; Goncalves, L. R.; Ribeiro, O. G.; Rocha Campos, A. C.; Sant'Anna, O. A., Effects of *Lonomia obliqua* (lepidoptera, saturniidae) toxin on clotting, inflammatory and antibody responsiveness in genetically selected lines of mice. *Toxicon* **2004**, 43 (7), 761-8.
225. Valenti, L. E.; Fiorito, P. A.; Garcia, C. D.; Giacomelli, C. E., The adsorption-desorption process of bovine serum albumin on carbon nanotubes. *Journal of Colloids and Interface Science* **2007**, 307 (2), 349-56.
226. Zhao, X.; Liu, R.; Chi, Z.; Teng, Y.; Qin, P., New insights into the behavior of bovine serum albumin adsorbed onto carbon nanotubes: comprehensive spectroscopic studies. *Journal of Physical Chemistry B* **2010**, 114 (16), 5625-31.
227. Lofthouse, S., Immunological aspects of controlled antigen delivery. *Advanced Drug Delivery Review* **2002**, 54 (6), 863-70.
228. Man, Y.; Jie, M.; Xiaobo, M.; Yang, Y.; Xuelian, C.; Hui, Y.; Chen, W.; Haiyan, X., Carbon nanotubes induce secondary structure changes of bovine albumin in aqueous phase. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2010**, 10 (1), 7550-53.
229. Balasse, E.; Odot, J.; Gatouillat, G.; Andry, M. C.; Madoulet, C., Enhanced immune response induced by BSA loaded in hydroxyethylstarch microparticles. *International Journal of Pharmacology* **2008**, 353 (1), 131-8.
230. Palomaki, J.; Karisola, P.; Pylkkanen, L.; Savolainen, K.; Alenius, H., Engineered nanomaterials cause cytotoxicity and activation on mouse antigen presenting cells. *Toxicology* **2010**, 267 (1), 125-31.
231. Wang, H.; Wang, J.; Sun, R. H.; Zhang, N.; Nie, H.; Liu, J. H.; Wang, J. N.; Liu, Y., Multi-walled carbon nanotubes do not impair immune functions of dendritic cells. *Carbon* **2009**, 47 (7), 1752-60.
232. Kostarelos, K., The long and short of carbon nanotube toxicity. *Nature Biotechnology* **2008**, 26 (7), 774-6.
233. Meng, J.; Yang, M.; Jia, F.; Xu, Z.; Kong, H.; Xu, H., Immune responses of BALB/c mice to subcutaneously injected multi-walled carbon nanotubes. *Nanotoxicology* **2010**, (11) 1, 1-10.
234. Kagan, V. E.; Konduru, N. V.; Feng, W.; Allen, B. L.; Conroy, J.; Volkov, Y.; Vlasova, II; Belikova, N. A.; Yanamala, N.; Kapralov, A.; Tyurina, Y. Y.; Shi, J.; Kisin, E. R.; Murray, A. R.; Franks, J.; Stolz, D.; Gou, P.; Klein-Seetharaman, J.; Fadeel, B.; Star, A.; Shvedova, A. A., Carbon nanotubes degraded by neutrophil myeloperoxidase induce less pulmonary inflammation. *Nature Nanotechnology* **2010**, 5 (5), 354-9.

235. Koyama, S.; Kim, Y. A.; Hayashi, T.; Takeuchi, K.; Fujii, C.; Kuroiwa, N.; Koyama, H.; Tsukahara, T.; Endo, M., In vivo immunological toxicity in mice of carbon nanotubes with impurities. *Carbon* **2009**, *47* (5), 1365-72.
236. Cui, H. F.; Vashist, S. K.; Al-Rubeaan, K.; Luong, J. H.; Sheu, F. S., Interfacing carbon nanotubes with living mammalian cells and cytotoxicity issues. *Chemical Research in Toxicology* **2010**, *23* (7), 1131-47.
237. Alberts, B.; Johnson, J. L.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P., *Biologia Molecular da Celula*. Editora Artmed: Porto Alegre, RS, 2004.
238. Lee, H. J.; Park, J.; Yoon, O. J.; Kim, H. W.; Lee do, Y.; Kim do, H.; Lee, W. B.; Lee, N. E.; Bonventre, J. V.; Kim, S. S., Amine-modified single-walled carbon nanotubes protect neurons from injury in a rat stroke model. *Nature Nanotechnology* **2011**, *6* (2), 121-5.
239. Kateb, B.; Van Handel, M.; Zhang, L.; Bronikowski, M. J.; Manohara, H.; Badie, B., Internalization of MWCNTs by microglia: possible application in immunotherapy of brain tumors. *NeuroImage* **2007**, *37* (S1), 9-17.
240. Parpura, V., Instrumentation: carbon nanotubes on the brain. *Nature Nanotechnology* **2008**, *3* (7), 384-5.
241. Cellot, G.; Cilia, E.; Cipollone, S.; Rancic, V.; Sucapane, A.; Giordani, S.; Gambazzi, L.; Markram, H.; Grandolfo, M.; Scaini, D.; Gelain, F.; Casalis, L.; Prato, M.; Giugliano, M.; Ballerini, L., Carbon nanotubes might improve neuronal performance by favouring electrical shortcuts. *Nature Nanotechnology* **2009**, *4* (2), 126-33.
242. Suh, W. H.; Suslick, K. S.; Stucky, G. D.; Suh, Y. H., Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience. *Progress in Neurobiology* **2009**, *87* (3), 133-70.
243. Coccini, T.; Roda, E.; Sarigiannis, D. A.; Mustarelli, P.; Quartarone, E.; Profumo, A.; Manzo, L., Effects of water-soluble functionalized multi-walled carbon nanotubes examined by different cytotoxicity methods in human astrocyte D384 and lung A549 cells. *Toxicology* **2010**, *269* (1), 41-53.
244. Chen, X.; Schluesener, H. J., Multi-walled carbon nanotubes affect drug transport across cell membrane in rat astrocytes. *Nanotechnology* **2010**, *21* (10), 1-10.
245. Wick, P.; Manser, P.; Limbach, L. K.; Dettlaff-Weglikowska, U.; Krumeich, F.; Roth, S.; Stark, W. J.; Bruinink, A., The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity. *Toxicology Letters* **2007**, *168* (2), 121-31.
246. Lison, D.; Huaux, F., In vitro studies: Ups and downs of cellular uptake. *Nature Nanotechnology* **2011**, *6* (6), 332-3.
247. Roebben, G.; Ramirez-Garcia, S.; Hackley, V. A.; Roesslein, M.; Klaessig, F.; Kestens, V.; Lynch, I.; Garner, C. M.; Rawle, A.; Elder, A.; Colvin, V. L.; Kreyling, W.; Krug, H. F.; Lewicka, Z. A.; McNeil, S.; Nel, A.; Patri, A.; Wick, P.; Wiesner, M.; Xia, T.; Oberdorster, G.; Dawson, K. A., Interlaboratory comparison of size and surface charge measurements on nanoparticles prior to biological impact assessment. *Journal of Nanoparticle Research* **2011**, *13* (7), 2675-87.

248. Raffa, V.; Ciofani, G.; Nitodas, S.; Karachalios, T.; D'Alessandro, D.; Masini, M.; Cuschieri, A., Can the properties of carbon nanotubes influence their internalization by living cells? *Carbon* **2008**, 46 (12), 1600-10.
249. Raffa, V.; Ciofani, G.; Vittorio, O.; Riggio, C.; Cuschieri, A., Physicochemical properties affecting cellular uptake of carbon nanotubes. *Nanomedicine* **2010**, 5 (1), 89-97.
250. Al-Ali, S. Y.; Al-Haussain, S. M., An ultrastructural study of the phagocytic activity of astrocytes in adult rat brain. *Journal of Anatomy* **1996**, 188 (pt2), 257-62.
251. Cheng, C.; Porter, A. E.; Muller, K., Imaging carbon nanotubes and related cytotoxicity. *Journal of Physics : Conference Series* **2009**, 151, DOI:10.1088/1742-6596/151/1/012030
252. Ravichandran, P.; Periyakaruppan, A.; Sadanandan, B.; Ramesh, V.; Hall, J. C.; Jejelowo, O.; Ramesh, G. T., Induction of apoptosis in rat lung epithelial cells by multiwalled carbon nanotubes. *Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology* **2009**, 23 (5), 333-4.
253. Roda, E.; Coccini, T.; Acerbi, D.; Barni, S.; Vaccarone, R.; Manzo, L., Comparative pulmonary toxicity assessment of pristine and functionalized multi-walled carbon nanotubes intratracheally instilled in rats: morphohistochemical evaluations. *Histology and Histopathology* **2011**, 26 (3), 357-67.
254. Herzog, E.; Casey, A.; Lyng, F. M.; Chambers, G.; Byrne, H. J.; Davoren, M., A new approach to the toxicity testing of carbon-based nanomaterials - the clonogenic assay. *Toxicology Letters* **2007**, 174 (1-3), 49-60.
255. Knief, P.; Clarke, C.; Herzog, E.; Davoren, M.; Lyng, F. M.; Meade, A. D.; Byrne, H. J., Raman spectroscopy - a potential platform for the rapid measurement of carbon nanotube-induced cytotoxicity. *Analyst* **2009**, 134 (6), 1182-91.
256. Hancock, W. S.; Zheng, X. Y.; Baker, H.; Fawaz, F.; McCaman, M.; Pungor, E., Proteomic analysis for the assessment of different lots of fetal bovine serum as a raw material for cell culture. Part IV. Application of proteomics to the manufacture of biological drugs. *Biotechnology Progress* **2006**, 22 (5), 1294-300.
257. Puentes, V.; Casals, E.; Pfaller, T.; Duschl, A.; Oostingh, G. J., Time evolution of the nanoparticle protein corona. *ACS Nano* **2010**, 4 (7), 3623-32.
258. Salvati, A.; Lesniak, A.; Campbell, A.; Monopoli, M. P.; Lynch, I.; Dawson, K. A., Serum heat inactivation affects protein corona composition and nanoparticle uptake. *Biomaterials* **2010**, 31 (36), 9511-8.