

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE BIOMEDICINA

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA BIODISTRIBUIÇÃO E EFEITOS TÓXICOS DE
NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDES MÚLTIPLAS EM CAMUNDONGOS**

Carolina Alvarenga Turini

UBERLÂNDIA

Abril/ 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE BIOMEDICINA

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA BIODISTRIBUIÇÃO E EFEITOS TÓXICOS DE
NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDES MÚLTIPLAS EM CAMUNDONGOS**

Carolina Alvarenga Turini

Monografia apresentada à
Universidade Federal de Uberlândia
como exigência parcial para
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientadora Prof.^a Dr.^a Paula Cristina
Batista de Faria Gontijo

UBERLÂNDIA

Abril/ 2018

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha família. Aos meus pais, Cláudio e Leide, por todo o incentivo, a dedicação e apoio. Pelos sacrifícios e esforços que tornaram possíveis os anos de estudo em uma universidade. Por todos os conselhos, os puxões de orelha, os abraços consoladores e por estarem sempre me ajudando a ser uma pessoa melhor: sou-lhes eternamente grata. Vocês são meus maiores exemplos de vida. Admiro e me espelho muito em vocês. Se eu cheguei até aqui, foi porque vocês batalharam muito, e me deram forças e oportunidades pra isso. Amo vocês. Essa conquista é nossa.

À minha irmã Luisa, por todos os momentos de distração, risadas, cantorias, brincadeiras e até pelas brigas. Por estar sempre ao meu lado e ser meu porto seguro sempre que preciso. Ficaria perdida sem você. Agradeço também à família Alvarenga e à família Turini, por me acompanharem e me apoiarem sempre nessa jornada.

Agradeço à minha orientadora Paula, pela oportunidade de trabalharmos juntas e por todo o conhecimento transmitido nessa trajetória, pela confiança depositada em mim, pelas conversas descontraídas e por nunca me deixar desanimar.

Um agradecimento especial à Letícia. Companheira de laboratório, de grupo de pesquisa, de festas, de sofrimentos, de viagens, de risadas, de confidências. Nunca imaginei que nos aproximaríamos tanto após o término das aulas juntas. Foi um grande presente que a pesquisa me deu. Você é uma pessoa maravilhosa, que quero levar como amiga para o resto da vida. Muito obrigada por toda a ajuda que tornou possível que eu concluísse esse trabalho. Ele também é seu.

Aos meus amigos mais próximos, Lucas e Lana, por tudo o que vivemos durante a graduação e fora dela. Estando longe ou perto, sempre soube que podia contar com vocês. Quando penso nos meus melhores momentos na faculdade, com certeza vocês estão neles. Obrigada por todas as fofocas, conselhos, apoio, carinho e compreensão.

À todos os meus amigos que me proporcionaram as melhores lembranças possíveis na graduação, às três Amandas, Arthur, Elisa, Katryn, Cíntia, Mariana, Fernanda, Yann, Vinícius, Danillo, Gustavo, e a todos os meus amigos da “Sexta Sexy”

e da graduação, que alegraram minha vida durante esses anos. Muito obrigada. Sem vocês, chegar até aqui não teria tido graça alguma.

Agradeço muito a todo o pessoal da bateria Virulenta, velha ou nova guarda. Começar a bateria do zero e ver no que a transformamos é um dos meus maiores orgulhos. O companheirismo e amizade de vocês são inexplicáveis. Não consigo descrever o quanto aprendi com vocês. Que não importa diferença de idade, curso, personalidade, no final quando se tem amor a alguma coisa, ela se torna maior que tudo, e aproxima as pessoas do jeito mais sincero possível.

Agradeço também ao Fabrício, à Stephanie e à Thaís, meus tesouros que a Bélgica trouxe de presente, e que mesmo longe ainda se fazem muito importantes em minha vida. Vocês foram minha segunda família por muito tempo, e a saudade que sinto de vocês só mostram o quanto nosso tempo juntos foi único e inesquecível.

A todos os professores, técnicos e companheiros de laboratório que colaboraram nesse trabalho e para a minha formação. Muito obrigada pela convivência e pelo conhecimento compartilhado.

E a todos que eu não citei o nome, mas de alguma forma contribuíram e me acompanharam nessa jornada, meu muito obrigada.

“Para uma mente ampla, nada é pequeno.”

Sherlock Holmes

RESUMO

A nanotecnologia vem sendo cada vez mais utilizada no campo de aplicações biomédicas. Dentre os nanomateriais mais utilizados encontram-se os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs), devido à sua alta e eficaz capacidade carreadora. Com o uso crescente, veio também uma maior preocupação quanto aos seus efeitos no organismo. O estudo da toxicidade de nanotubos é bastante complexo, devido à singularidade de cada nanopartícula fabricada, fornecendo resultados de avaliações de toxicidade discrepantes, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Tornou-se então essencial a avaliação da biodistribuição e da capacidade tóxica sistêmica de cada MWCNT. No presente estudo, procuramos esclarecer aspectos relacionados à biodistribuição de MWCNTs funcionalizados com grupamentos carboxila (COOH) e o seu efeito tóxico sistêmico *in vivo*. Para isso, injetamos camundongos Balb-c fêmeas com soluções contendo diferentes concentrações de nanotubos (10µg, 20µg e 50µg), e avaliamos em tempos diferentes de exposição (12 horas, 24 horas, 48 horas e 21 dias), através de duas vias de administração: intraperitoneal e subcutânea. Os animais permaneceram durante 24 horas em gaiola metabólica para coleta de urina. Foi realizado ainda o monitoramento da respiração desses animais através da espirometria, e o soro foi coletado para avaliação bioquímica dos níveis séricos de AST, ALT, GGT, CK e ureia. Foram retirados também os órgãos dos animais para o cálculo do índice peso órgão/peso corporal. Todos os animais sobreviveram à injeção das soluções de nanotubos e não apresentaram diferenças quanto ao volume de urina coletado. A espirometria indicou um aumento geral agudo do volume corrente após as nanoinjeções, que se restabeleceu após 21 dias da exposição. Esse aumento ocorreu de forma mais rápida para animais injetados intraperitonealmente do que pela via subcutânea. Não foram registradas diferenças nos indicadores bioquímicos, enquanto o índice acusou uma diminuição apenas no tamanho do baço na concentração de 10µg após 21 dias. Nossos resultados mostram que a síntese e funcionalização realizada para esses MWCNTs foi eficaz no sentido de produzir nanopartículas com boa compatibilidade sistêmica e baixa toxicidade a longo prazo, podendo em estudos futuros serem usadas com segurança como carreadores biológicos.

Palavras-chave: Nanotubos de carbono de paredes múltiplas, toxicidade sistêmica, função respiratória, avaliação bioquímica.

ABSTRACT

Nanotechnology has been increasingly used in the field of biomedical applications. Among the most used nanomaterials are the Multi-Walled Carbon Nanotubes (MWCNTs), due to its high and effective carrier capacity. With increasing use there was also increased concern about its effects on the organism. The toxicity study of nanotubes is quite complex, due to the uniqueness of each manufactured nanoparticle, providing discrepant results of toxicity assessments, both *in vitro* and *in vivo*. Therefore, the evaluation of the biodistribution and the systemic toxic capacity of each MWCNT became essential. In the present study, we sought to clarify aspects related to the biodistribution of MWCNTs functionalized with carboxyl groupings (COOH) and their systemic toxic effect *in vivo*. For this, we injected female Balb-c mice with solutions containing different concentrations of nanotubes (10µg, 20µg and 50µg), and evaluated at different times of exposure (12 hours, 24 hours, 48 hours and 21 days) through two administration routes: intraperitoneal and subcutaneous. The animals remained for 24 hours in metabolic cages for urine collection. Monitoring of the respiration of these animals through spirometry was performed, and the serum was collected for biochemical evaluation of AST, ALT, GGT, CK and urea. The organs of the animals were also removed for calculation of organ weight/body weight index. All animals survived the injection of nanotubes and showed no differences in the volume of urine collected. Spirometry indicated an overall acute increase in tidal volume after nanoinjections, which was restored after 21 days of exposure. This increase occurred more rapidly for animals injected intraperitoneally than for the subcutaneous route. No differences were recorded in the biochemical indicators, while the index showed a decrease in spleen size only at the concentration of 10µg after 21 days. Our results show that the synthesis and functionalization performed for these MWCNTs was effective in producing nanoparticles with good systemic compatibility and low long term toxicity, and in future studies could be safely used as biological carriers.

Keywords: Multi-walled carbon nanotubes, systemic toxicity, respiratory function, biochemical evaluation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da formação de CNTs a partir de folhas de grafeno	3
Figura 2. Caracterização de MWCNTs por microscopia eletrônica de transmissão.....	5
Figura 3. Mecanismos de internalização celular de CNTs	7
Figura 4. Principais formas de toxicidade <i>in vivo</i> apresentadas por nanomateriais	9
Figura 5. Esquema dos principais defeitos observados em CNTs	11
Figura 6. Mecanismos de citotoxicidade de CNTs	13
Figura 7. Pureza, morfologia e qualidade estrutural dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas antes e após oxidação	22
Figura 8. Representação gráfica do volume corrente (VC) de camundongos avaliados após 12h, 24h, 48h e 21 dias da injeção intraperitoneal com soluções de 10µg, 20µg e 50µg de MWCNTs.....	23
Figura 9. Representação gráfica do volume corrente (VC) de camundongos injetados com 10µg, 20µg e 50µg de solução de MWCNTs, via intraperitoneal, após 12h, 24h, 48h e 21 dias de exposição.....	24
Figura 10. Representação gráfica da frequência respiratória (FR) de camundongos injetados com 10µg da solução de MWCNTs, via intraperitoneal, após 12h, 24h, 48h e 21 dias de exposição.....	25
Figura 11. Representação gráfica do volume respiratório por minuto (VM) de camundongos avaliados após 12h, 24h, 48h e 21 dias da injeção intraperitoneal com soluções de 10µg, 20µg e 50µg de MWCNTs.....	26
Figura 12. Representação gráfica do volume respiratório por minuto (VM) de camundongos injetados com 10µg, 20µg e 50µg de solução de MWCNTs, via intraperitoneal, após 12h, 24h, 48h e 21 dias de exposição	27
Figura 13. Representação gráfica do volume corrente (VC) de camundongos avaliados após 12h, 24h, 48h e 21 dias da injeção subcutânea com soluções de 10µg, 20µg e 50µg de MWCNTs.....	29

Figura 14. Representação gráfica do volume corrente (VC) de camundongos injetados com 10µg, 20µg e 50µg de solução de MWCNTs, pela via subcutânea, após 12h, 24h, 48h e 21 dias de exposição.....	30
Figura 15. Representação gráfica da frequência respiratória (FR) de camundongos injetados com 20µg de solução de MWCNTs, pela via subcutânea, após 12h, 24h, 48h e 21 dias de exposição.....	31
Figura 16. Representação gráfica do volume respiratório por minuto (VM) de camundongos avaliados após 12h, 24h, 48h e 21 dias da injeção subcutânea de 10µg, 20µg e 50µg de MWCNTs.....	32
Figura 17. Representação gráfica do volume respiratório por minuto (VM) de camundongos injetados com 10µg, 20µg e 50µg de solução de MWCNTs, pela via subcutânea, após 12h, 24h, 48h e 21 dias de exposição.....	33
Figura 18. Representação gráfica do índice esplênico de animais injetados com 10µg de MWCNTs, através da via intraperitoneal.....	35

LISTA DE ABREVIACES

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
µg	Microgramas
µm	Micrmetros
ALT	Alanina aminotransferase
ARFIS	Área de Ciências Fisiológicas
AST	Aspartato transaminase
CBEA	Centro de Bioterismo e Experimentao Animal
CEUA	Comitê de Ética na Utilizao de Animais
CK	Creatinoquinase
CNT	<i>Carbon Nanotubes</i> (Nanotubos de carbono)
COOH	Grupamento carboxila
CVD	Deposio química a vapor
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
GGT	Gama glutamil transpeptidase
h	Horas
IL-1	Interleucina-1
i.p	Intraperitoneal
kg	Quilograma
mg	Miligrama
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
MWCNT	<i>Multi-walled carbon nanotubes</i> (Nanotubos de carbono de paredes múltiplas)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
nm	Nanmetros
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido ribonucleico)
RPM	Respiraes por minuto
rpm	Rotaes por minuto

ROS	Espécies reativas de oxigênio
SWCNT	<i>Single-walled carbon nanotubes</i> (Nanotubos de carbono de parede simples)
TEM	Microscopia de transmissão eletrônica
TNF	Fator de necrose tumoral
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Nanotecnologia.....	1
1.2. Nanotubos de carbono	1
1.2.1. Classificação	2
1.2.2. Métodos de crescimento	2
1.2.3. Caracterização	3
1.2.4. Propriedades.....	4
1.3. Biodistribuição de nanotubos de carbono.....	6
1.4. Toxicidade dos nanotubos de carbono	8
1.4.1. Mecanismos da toxicidade de nanotubos de carbono	12
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivos gerais.....	16
2.2. Objetivos específicos.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Síntese e Funcionalização dos nanotubos de carbono.....	17
3.2. Animais.....	17
3.3. Vias de administração	18
3.4. Avaliação da função renal	18
3.5. Avaliação da função respiratória	19
3.6. Avaliação bioquímica.....	19
3.7. Avaliação da biodistribuição	20
3.8. Análise Estatística	20
4. RESULTADOS	21
4.1. Síntese e Caracterização dos nanotubos de carbono	21
4.2. Função respiratória.....	22
4.2.1. Via intraperitoneal	22
4.2.1.1. Volume Corrente	22

4.2.1.2. Frequência respiratória	25
4.2.1.3. Volume minuto	25
4.2.2. Via subcutânea	28
4.2.2.1. Volume corrente	28
4.2.2.2. Frequência respiratória	30
4.2.2.3. Volume minuto	31
4.3. Avaliação urinária	34
4.4. Avaliação bioquímica.....	34
4.5. Índice	34
4.5.1. Via intraperitoneal	34
4.5.2. Via subcutânea	35
5. DISCUSSÃO	36
6. CONCLUSÃO.....	41
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1. INTRODUÇÃO

1.1. Nanotecnologia

A tecnologia de manipulação a nível molecular, embora seja uma área de muita importância atualmente, e já esteja inserida no nosso cotidiano, é uma ciência extremamente recente. A nanotecnologia pode ser definida como a habilidade de manipulação de átomos e moléculas em escala nanométrica, entre 0,1 e 100nm, para criar estruturas diferentes com uma nova organização molecular (MOGHIMI et al., 2005). Nesse nível, as estruturas formadas exibem propriedades e fenômenos físicos, químicos e biológicos únicos e diferentes do material original, devido à sua escala nanométrica, como maior resistência, maior grau de pureza, e até novas propriedades catalíticas e magnéticas (RAWAT et al., 2016). Dessa forma, as nanopartículas que possuem ao menos uma de suas dimensões menores que 100nm, tornam-se interessantes para fins comerciais e também para o campo de aplicações biomédicas. Elas oferecem novas possibilidades de interação com complexos biológicos funcionais, uma vez que operam à mesma escala que biomoléculas. Atualmente, as nanopartículas foram adaptadas para o emprego no desenvolvimento de drogas, sendo utilizadas como carreadores de diferentes agentes terapêuticos, incluindo pequenas moléculas, peptídeos, proteínas e ácidos nucleicos (PIEROTTI et al., 2008).

Existem vários tipos de nanopartículas como os dendrímeros, nanopartículas de ouro, quantum dots, fulerenos e lipossomos. Dentre os nanomateriais mais utilizados atualmente encontram-se os nanotubos de carbono (CNTs) (SMART et al., 2006).

1.2. Nanotubos de carbono

Os nanotubos de carbono representam a terceira forma alotrópica do carbono, juntamente com o grafite e o diamante (LACERDA et al., 2006). São estruturas formadas por átomos de carbono em arranjos hexagonais. Diversos arranjos, combinados, constituem uma folha de grafeno que, quando enrolada, forma um cilindro e dá origem ao nanotubo. Dessa forma, CNTs nada mais são que estruturas cilíndricas

nanométricas constituídas exclusivamente de átomos de carbono ligados entre si (AILLON et al., 2009).

1.2.1. Classificação

Existem dois tipos de CNTs, classificados de acordo com o número de camadas de grafeno em sua composição. Os nanotubos de carbono de parede simples ou *single-walled carbon nanotubes* (SWCNTs) são formados a partir de uma folha única de grafeno, com diâmetro variável entre 0.4 e 3.0nm (Figura 1A). Já os nanotubos de carbono de paredes múltiplas ou *multi-walled carbon nanotubes* (MWCNTs) são formados a partir de duas ou mais folhas de grafeno, enroladas de forma concêntrica. Possuem diâmetro variável entre 1.4 e 100nm (AILLON et al., 2009; VIDU et al., 2014) (Figura 1B).

1.2.2. Métodos de crescimento

Ambos os tipos de CNTs podem ser produzidos através dos métodos de descarga por arco, ablação a laser e deposição química de vapor ou *chemical vapor deposition* (CVD). O último é o mais utilizado atualmente na produção de nanotubos, e possibilita a síntese em larga escala com o menor custo de produção. O processo de CVD consiste na decomposição de um vapor ou gás precursor, geralmente um hidrocarboneto. Os átomos de carbono provenientes do precursor entram em contato com um catalisador metálico, que pode ser gerado *in situ* durante o processo ou ser colocado sobre um substrato. Os átomos são então excitados e passam a nuclear e crescer, formando os nanotubos (EATEMADI et al., 2014). Esse tipo de método apresenta alta pureza e maior controle sobre o alinhamento e ângulo dos átomos de carbono da estrutura construída. No entanto, a capacidade de reprodução do produto formado ainda é baixa, devido à dificuldade de controlar todos os parâmetros desse processo (KUNZMANN et al., 2011).

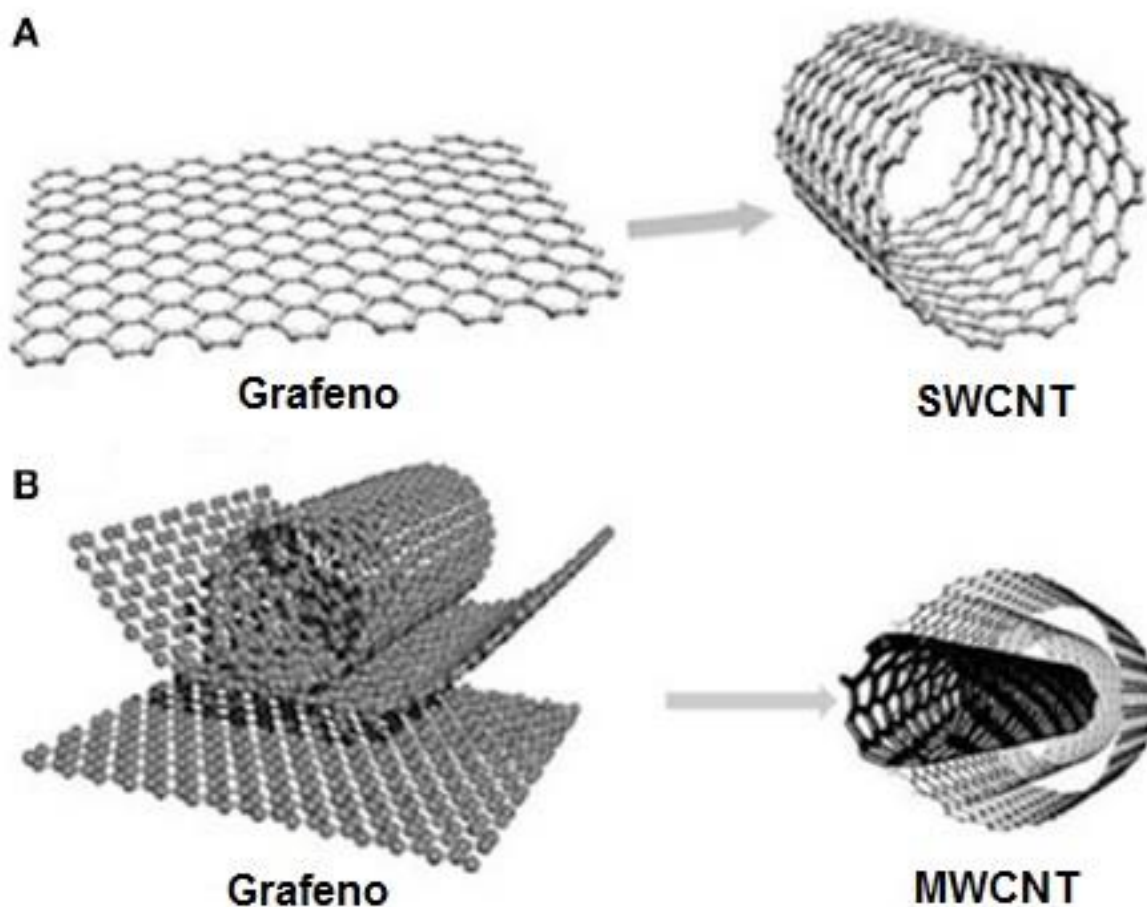


Figura 1. Esquema da formação de CNTs a partir de folhas de grafeno. A) Os nanotubos de carbono de parede simples (SWCNTs) são formados a partir do enrolamento de uma folha única de grafeno. B) Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) são formados a partir de duas ou mais folhas de grafeno, enroladas de forma concêntrica (VIDU et al., 2014).

1.2.3. Caracterização

A etapa de caracterização dos CNTs é muito importante para se estabelecer as características estruturais dos mesmos e averiguar o seu grau de pureza. Durante esse procedimento, procura-se avaliar alguns parâmetros específicos dessas nanopartículas, como a quiralidade, o diâmetro, o número de paredes, os defeitos estruturais e possíveis contaminantes (BELIN, EPRON, 2005; LEHMAN et al., 2011; AQEL et al., 2012).

Existem várias formas de realizar a caracterização de um nanotubo. Entre as técnicas mais comuns se encontram a espectroscopia Raman, a termogravimetria e a microscopia eletrônica de transmissão ou *transmission electron microscopy* (TEM).

A espectroscopia Raman é uma das ferramentas mais poderosas de caracterização de CNTs. É possível realizar uma análise rápida, sem que a amostra passe por qualquer tipo de preparação ou sofra alguma alteração. Ela fornece informações acerca do grau de pureza, defeitos e alinhamento tubular, e é capaz de auxiliar na distinção entre a presença de CNTs ou outros alótropos de carbono. Também é possível determinar a natureza eletrônica dos nanotubos, como por exemplo, se possui caráter metálico ou semicondutor. A posição, largura e intensidade das bandas fornecidas por essa técnica possibilitam a distinção das formas alotrópicas do carbono (BELIN, EPRON, 2005; LEHMAN et al., 2011).

A termogravimetria é um método de análise que fornece dados quantitativos acerca do peso das frações de carbono e metais presentes no nanomaterial. O equipamento monitora, de acordo com a temperatura, diferenças nesse peso devido a eventos oxidativos que acontecem na amostra com a variação térmica (AQEL et al., 2012).

A microscopia de transmissão é uma técnica um pouco mais elaborada e essencial para a caracterização de nanomateriais. É uma forma de observação direta do tamanho, formato e estrutura de nanopartículas. Na TEM, os nanotubos podem ser observados perpendicularmente ao seu eixo, para a obtenção de imagens de contraste de fase. Sendo assim, é possível ver o número de camadas presentes em MWCNTs, além de verificar se as extremidades dos tubos encontram-se abertas ou fechadas (AQEL et al., 2012; BELIN, EPRON, 2005) (Figura 2).

1.2.4. Propriedades

Os CNTs possuem como característica uma alta força tensora, são ultraleves, têm estabilidade térmica e química excelentes, e ainda propriedades eletrônicas condutoras e semi-condutoras dependendo da geometria de seus arranjos hexagonais (SMART et al., 2006).

Além disso, tanto SWCNTs quanto MWCNTs possuem uma razão comprimento/diâmetro relativamente grande, e uma área de superfície muito ampla, o que torna os nanotubos aptos à alta sensibilidade molecular para detecção ou reconhecimento. Consequentemente, uma grande fração da superfície dessas estruturas pode ser modificada com uma variedade de grupos funcionais, alterando o comportamento tanto *in vitro* quanto *in vivo* dos CNTs (FIRME, BANDARU, 2010).

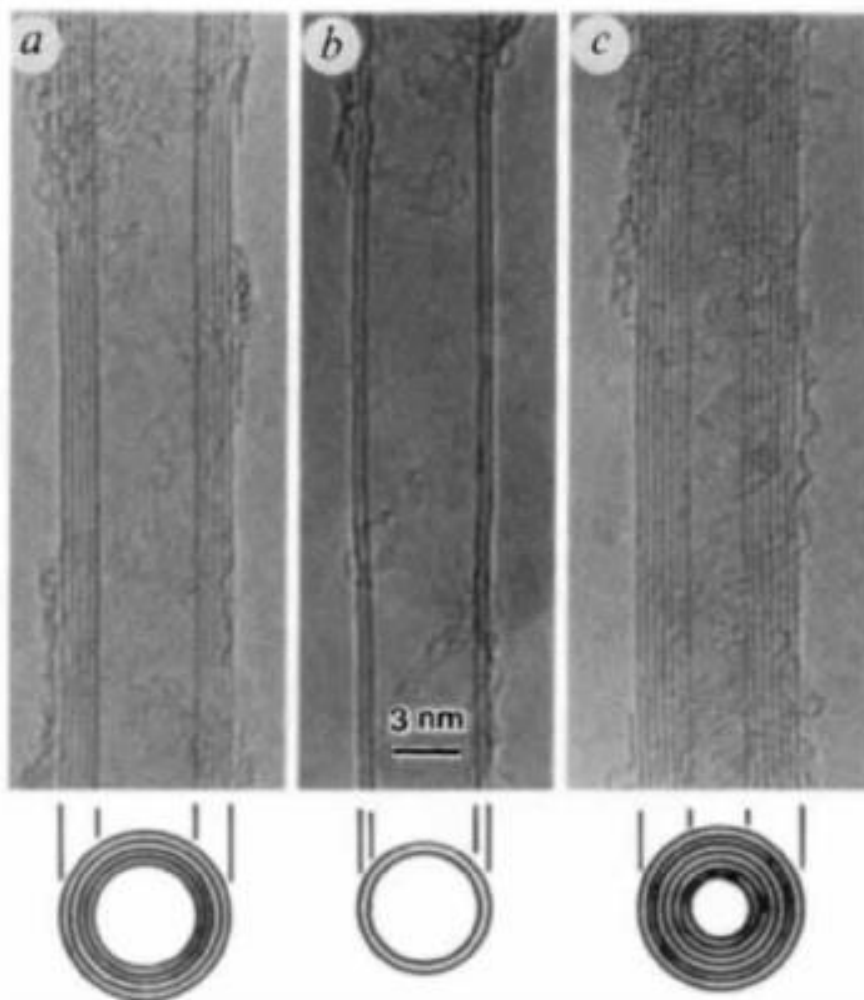


Figura 2. Caracterização de MWCNTs por microscopia eletrônica de transmissão. Cada linha preta paralela representa uma camada de grafeno. Cortes longitudinais e transversais de cada nanotubo são representados. a) Nanotubo consistindo de cinco folhas de grafeno. b) Nanotubo de duas camadas de grafeno. c) Nanotubo de sete folhas de grafeno (IIJIMA, 1991).

1.3. Biodistribuição de nanotubos de carbono

A biodistribuição de nanopartículas é bastante diversificada, e depende principalmente do tipo, diâmetro e comprimento de cada nanomaterial. Tais fatores definem ainda a velocidade desse processo.

Os mecanismos de internalização de nanomateriais são diversos. Especificamente para CNTs, pesquisas mostraram que a maioria dos nanotubos são capazes de atravessar a membrana de uma grande variedade de tipos celulares, independentemente de sua funcionalização. Devido à seu formato cilíndrico e sua grande proporção de área de superfície, os nanotubos funcionam como ‘nanoagulhas’, penetrando a membrana celular com facilidade, através de um mecanismo não-dependente de energia (KOSTARELOS et al., 2007; KUNZMANN et al., 2011) (Figura 3).

Outros mecanismos podem ocorrer para a internalização dessas nanopartículas, dependendo do tamanho do nanotubo e do tipo celular. Estudos mostram que CNTs de tamanhos bem pequenos interagem com receptores presentes na membrana plasmática de macrófagos, e são captados eficientemente por essas células através da fagocitose (HIRANO et al., 2008). Pesquisas adicionais mostram que certos tipos de CNTs podem também sofrer endocitose, geralmente mediada por clatrina, em um processo dependente de energia (KAM et al., 2006; KUNZMANN et al., 2011) (Figura 3).

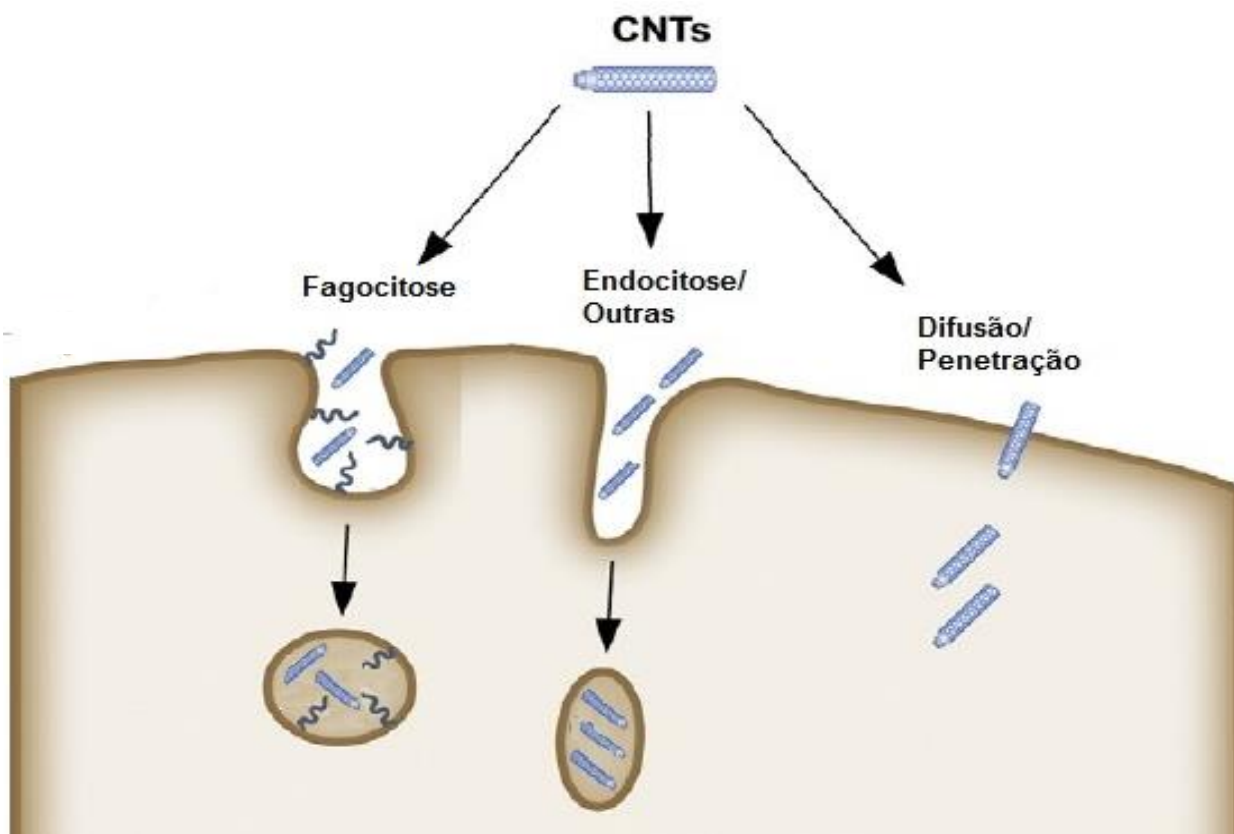


Figura 3. Mecanismos de internalização celular de CNTs. O principal mecanismo de internalização ocorre através da difusão ou penetração de CNTs na célula, agindo como uma 'nanoagulha' devido ao seu formato e área de superfície. Outros mecanismos de internalização não tão comuns incluem a fagocitose e a endocitose, que ocorre dependendo do tamanho da partícula e do tipo celular (Adaptado de KUNZMANN et al., 2011).

Com relação à distribuição sistêmica, diversos estudos *in vivo* demonstraram que o caminho dos CNTs depende da via de administração. Existem três vias de exposição natural a essas nanopartículas, que acontecem no ambiente externo: através da pele, trato intestinal e vias aéreas. Quando em contato com a pele, apenas os nanotubos de menor diâmetro conseguiriam ultrapassar a barreira epitelial e chegar à circulação. Sendo assim, essa via de exposição só seria preocupante em casos de cortes ou ferimentos na pele. O trato intestinal possui uma constituição bem diferente da pele, facilitando a absorção das nanopartículas. No entanto, essa absorção depende do tamanho da partícula e de sua carga elétrica. Partículas positivamente carregadas ficam presas no muco negativamente carregado, enquanto as negativas sofrem difusão para a circulação (LANONE, BOCZKOWSKI, 2006).

A via respiratória é a mais estudada uma vez que, atualmente, é a principal via de exposição do público geral através da poluição do ar e de trabalhadores envolvidos no processo de manufatura e manejo dessas partículas (SMART et al., 2006). Após a entrada pelas vias respiratórias, os CNTs podem ficar presos no muco respiratório e posteriormente serem evacuados em direção à boca, ou ainda, se atingirem regiões mais profundas do aparelho respiratório, como os pulmões e alvéolos, os nanotubos são captados pelos macrófagos alveolares e degradados (LANONE, BOCZKOWSKI, 2006).

Uma vez na circulação sanguínea, seja através das vias de exposição naturais ou através de injeções intravenosas, subcutâneas ou intraperitoneais, CNTs tendem à acumulação principalmente no fígado, baço e pulmões (AILLON et al., 2009).

1.4. Toxicidade dos nanotubos de carbono

Desde sua descoberta em 1991 (IIJIMA, 1991), os nanotubos de carbono têm atraído a atenção em vários campos, que abrangem desde a área de diagnósticos por imagem e biossensores a sistemas de entrega de drogas e veículos vacinais (DENG et al., 2007).

Com a rápida expansão do uso dos CNTs veio também uma crescente preocupação com os possíveis efeitos desses nanomateriais no organismo. Pouco se sabe sobre a toxicidade dos CNTs após a introdução na circulação sanguínea, o que é vital para suas aplicações biomédicas. Vários estudos mostraram que há um alto grau de complexidade no entendimento do metabolismo e formas de interação celular de nanopartículas em sistemas *in vivo*, devido à singularidade de sua biodistribuição, *clearance* e resposta imune (HUANG et al., 2010; RAWAT et al., 2016).

O estudo da toxicidade de nanopartículas é bastante complexo, devido à singularidade de cada nanopartícula fabricada e das propriedades diferenciadas que todas elas possuem. Sendo assim, a maioria dos resultados obtidos a partir de avaliações de toxicidade, tanto *in vitro* quanto *in vivo* são bastante discrepantes (JI et al., 2009). Devido a essas peculiaridades, alguns ensaios toxicológicos tradicionais e bem estabelecidos *in vitro* tornam-se obsoletos, como o próprio MTT (brometo de 3-

(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio), que já apresentou resultados falso-negativos para a citotoxicidade de CNTs (WORLE-KNIRSCH et al., 2006).

Para a avaliação da toxicidade de uma nanopartícula é indispensável conhecer suas formas de absorção, distribuição, metabolismo e excreção. Dessa forma, um estudo toxicológico deve focar nos principais órgãos responsáveis por essas funções no organismo, pois além de processarem os nanomateriais são os mais expostos aos mesmos por possuírem maior fluxo sanguíneo. São eles: pulmões, fígado, rins e baço (AILLON et al., 2009) (Figura 4).

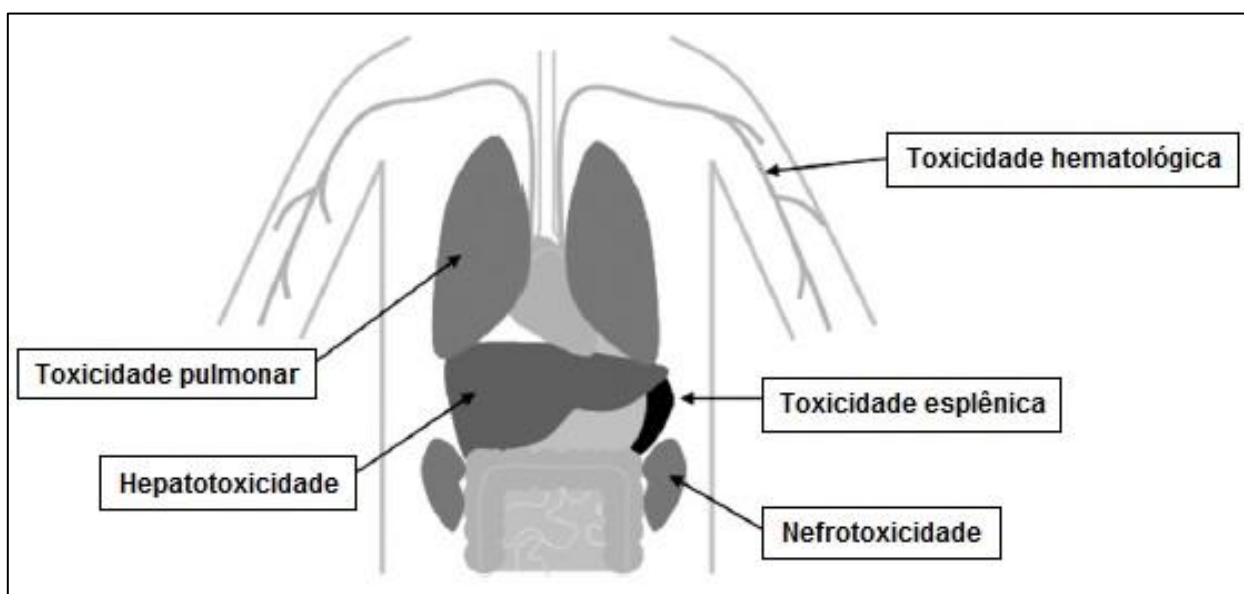


Figura 4. Principais formas de toxicidade *in vivo* apresentadas por nanomateriais (AILLON et al., 2009).

Existem seis fatores principais que determinam o potencial de uma nanopartícula de causar danos, sendo que eles interagem e influenciam uns aos outros (LANONE, BOCZKOWSKI, 2006). São eles:

- 1) Composição química,
- 2) Tamanho da partícula,
- 3) Área de superfície e sua reatividade,
- 4) Funcionalização da superfície,
- 5) Capacidade de aglomeração/ agregação,
- 6) Formato da partícula e/ ou potencial de atração eletrostática.

A composição química dos CNTs representa um papel muito importante para a determinação do tamanho da partícula, e pode incluir metais de transição e revestimentos. Tais arranjos podem deixar o nanotubo propenso a reagir com mais facilidade e liberar maior quantidade de radicais livres. Ela também influencia bastante no tamanho da nanopartícula. Por sua vez, esse fator pode ser determinante para a modulação da biodisponibilidade a nível celular e sistêmico, afetando a deposição das nanopartículas nos mesmos (SMART et al., 2006).

Com relação à área de superfície temos que, para CNTs, há uma razão área/massa muito aumentada, fornecendo uma enorme área de contato com as membranas biológicas e aumentando a capacidade de absorção e transporte dessas substâncias (SMART et al., 2006).

A funcionalização da superfície é um fator decisivo para a determinação da solubilidade do nanotubo, definindo o grau de hidrofobicidade da partícula e a capacidade de solubilização em meios biológicos (TANG et al., 2012). Nanotubos de carbono do tipo 'pristine' possuem como característica a não-funcionalização de sua estrutura. Estudos observaram que esse tipo de nanotubo é inerentemente hidrofóbico e altamente citotóxico, levando à uma preferência pela funcionalização na comunidade científica (YANG et al., 2008).

O tipo de funcionalização de um CNT afeta diretamente a capacidade de agregação da nanopartícula, de acordo com sua interação com o meio. Em geral, nanotubos de carbono possuem uma tendência à agregação em diversos tipos de meio, o que direciona os CNTs à acumulação tecidual (LANONE, BOCZKOWSKI, 2006).

A tendência à aglomeração pode variar também com o formato da nanopartícula. Os nanomateriais podem assumir diversas formas, como esferas, fibras, tubos, anéis, e formas planas. Apesar de possuírem forma bem definida, os nanotubos podem apresentar defeitos estruturais que alteram seu formato e tamanho usuais e mudam seu comportamento, causando toxicidade. Além disso, há outros defeitos como o formato da extremidade do CNT, resíduos da catálise do nanotubo que podem levar à formação de radicais livres e o defeito de Stone-Wales que consiste no pareamento de arranjos hexagonais e pentagonais dos átomos de carbono, podendo potencializar possíveis efeitos tóxicos (FIRME, BANDARU, 2010) (Figura 5).

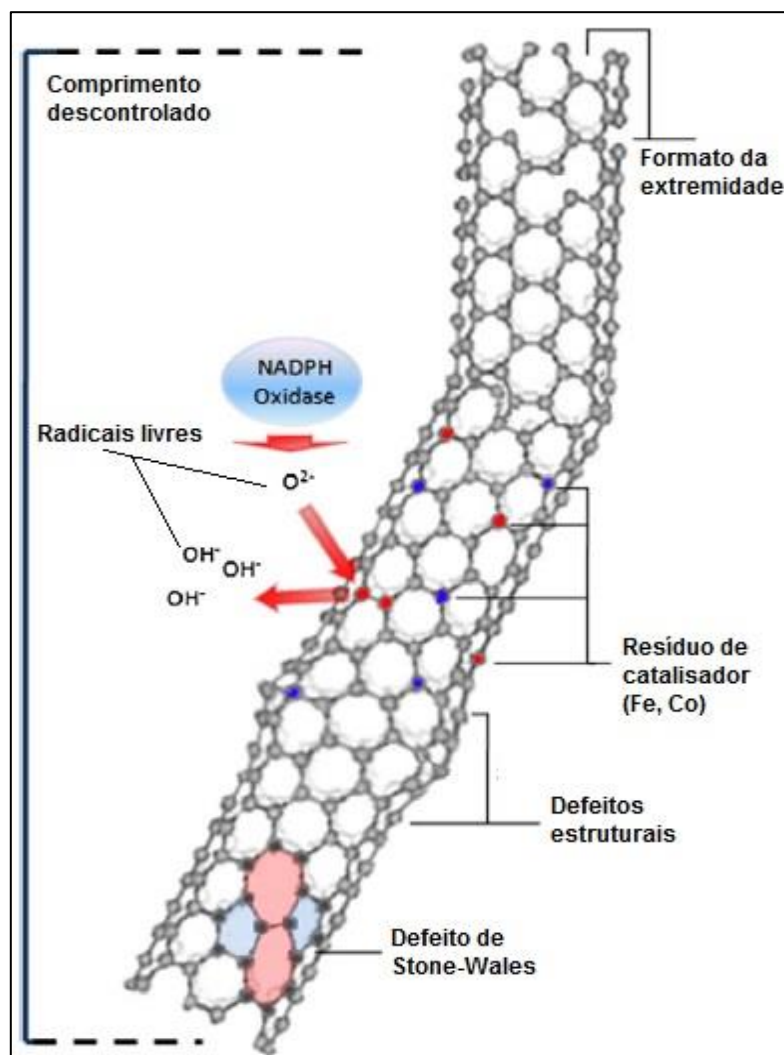


Figura 5. Esquema dos principais defeitos observados em CNTs. O comprimento descontrolado do CNT, defeitos no formato da extremidade do nanotubo e defeitos estruturais encontram-se entre os principais fatores que determinam o potencial toxicológico de uma nanopartícula. Defeitos na composição química, como resíduos provenientes de catalisadores, podem reagir com o superóxido produzido pela enzima NADPH oxidase e levar à formação de radicais livres na célula. Além disso, o nanotubo também pode apresentar o defeito de Stone-Wales, alterando possivelmente a forma e o potencial eletrostático do material (Adaptado de FIRME, BANDARU, 2010).

Fatores adicionais para a determinação da toxicidade incluem a taxa de degradabilidade, que é dependente do tipo de funcionalização do nanotubo, e a concentração de partículas inseridas no organismo ou célula. O efeito toxicológico de CNTs apresenta comportamento dose-dependente, devido à alteração do padrão de absorção celular e acumulação do nanotubo. Quando o nanotubo apresenta menor

padrão de degradação tecidual, pode dificultar seu *clearance*, levando à um maior depósito celular do nanomaterial (LANONE, BOCZKOWSKI, 2006). Estudos mostraram ainda que o padrão de biodistribuição, e consequentemente de toxicidade, se altera de acordo com a via de administração do nanotubo *in vivo* (AILLON et al., 2009).

1.4.1. Mecanismos da toxicidade de nanotubos de carbono

A etiologia dos efeitos tóxicos de nanotubos de carbono no organismo ainda não foi totalmente elucidada. Acredita-se que, uma vez internalizados, os CNTs exerçam a citotoxicidade através de três mecanismos principais: o nuclear, o citoplasmático e o mitocondrial (FIRME, BANDARU, 2010) (Figura 6).

Após entrada na célula, independentemente da via, CNTs podem atravessar a membrana nuclear e causar citotoxicidade por meio de danos no DNA, como por exemplo provocar o aprisionamento da célula em certas fases do ciclo celular, afetar sua proliferação e causar efeitos mutagênicos. Essas nanopartículas podem ainda permanecer no citoplasma e atuarem como RNA de interferência. Sendo assim, podem levar ao silenciamento gênico, regulando a expressão de genes decodificadores de proteínas e alterando o metabolismo celular. Tal alteração também pode levar à geração de sinais apoptóticos e à perda de viabilidade celular (FIRME, BANDARU, 2010; KUNZMANN et al., 2011).

O estresse oxidativo é tido como o principal mecanismo molecular de citotoxicidade mediada por CNTs e ocorre quando o equilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidantes sofre perturbações. Essa perturbação pode ocorrer quando, por exemplo, a formação de radicais livres excede as defesas antioxidantes disponíveis na célula ou organismo. Como resultado, temos um aumento nas concentrações de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos oxidados, e muitas dessas moléculas tornam-se inativas e incapazes de exercer suas funções básicas (BARBOSA et al., 2010).

Estudos prévios comprovaram que os nanomateriais possuem uma capacidade intrínseca de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS), tanto *in vitro* quanto *in vivo*, especialmente na presença de luz UV ou metais de transição. Essa produção pode

estar relacionada às propriedades físico-químicas únicas das nanopartículas. Além disso, os CNTs uma vez internalizados, podem se mobilizar nas mitocôndrias. Essas organelas possuem um papel importante não somente no fornecimento de energia à célula, mas também no controle da proliferação e apoptose, por meio de mecanismos dependentes da via redox. Assim, a mobilização de CNTs nas mitocôndrias poderia alterar essa via causando perda de viabilidade celular. Vários resultados mostraram que essa acumulação leva a um aumento na geração de radicais livres e peróxido e à depleção total de reservas antioxidantes e glutatona, uma proteína que atua como um poderoso antioxidante (LANONE, BOCZKOWSKI, 2006; SMART et al., 2006; RAWAT et al., 2016).

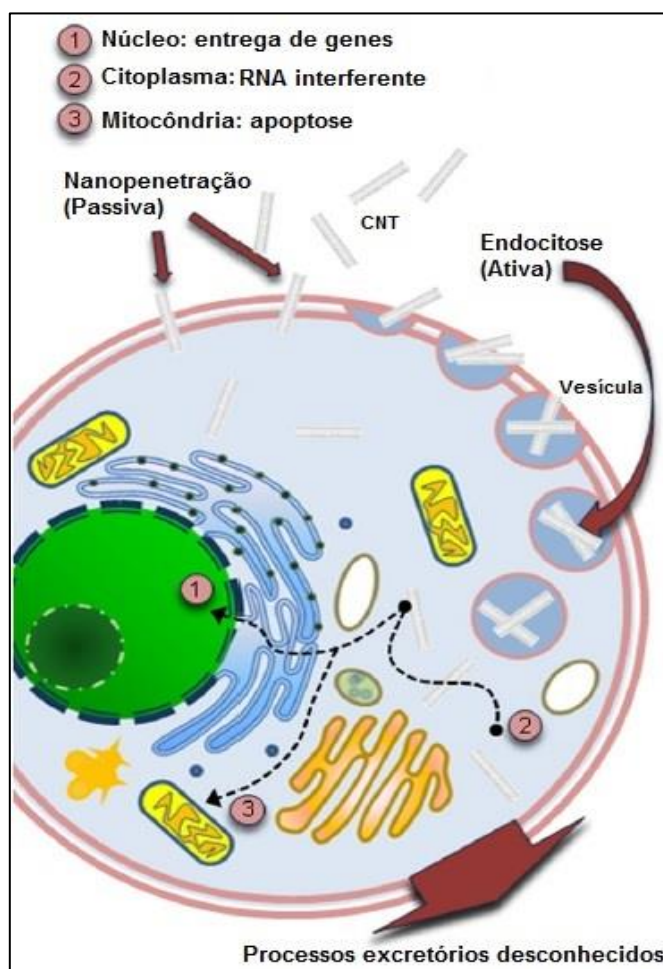


Figura 6. Mecanismos de citotoxicidade de CNTs. Após entrada via nanopenetração ou endocitose/fagocitose, CNTs podem ser direcionados a: 1) Núcleo celular, onde exercem citotoxicidade através de um mecanismo de 'entrega de genes'; 2) Citoplasma, onde atuam como RNA interferente; 3) Mitocôndria, onde preferencialmente se acumulam causando estresse oxidativo e gerando sinais apoptóticos (Adaptado de FIRME, BANDARU, 2010).

Assim como a biodistribuição, a toxicidade de CNTs varia de acordo com a via de administração da nanopartícula. A maior parte dos estudos de toxicidade abordam principalmente a via de exposição pulmonar, já que é a via primária de exposição ocupacional aos nanotubos. Os resultados são bastante discrepantes, no entanto, a grande maioria reporta respostas inflamatórias agudas após sua captação pelos macrófagos, com expressão de citocinas como TNF e IL-1, acompanhadas de granulomas pulmonares ao redor dos aglomerados de nanotubo, fibrose intersticial difusa progressiva e espessamento da parede alveolar. Marcadores de estresse oxidativo como acumulação de peróxido e depleção de glutathione também foram encontrados no tecido pulmonar afetado, sugerindo esse mecanismo como o responsável pela inflamação e toxicidade pulmonar (LANONE, BOCZKOWSKI, 2006; LIANG et al., 2010).

Quanto à via de exposição cutânea, alguns estudos demonstraram que, eventualmente, pode ocorrer a absorção de CNTs através da barreira cutânea levando ou não a efeitos nocivos. As manifestações de toxicidade cutânea incluem hiperplasia dérmica causada por citotoxicidade de queratinócitos, alopecia localizada e espessamento da pele (LIANG et al., 2010; RAWAT et al., 2016).

Os efeitos tóxicos causados através de administração de nanotubos via intraperitoneal, intravenosa e subcutânea são os mais preocupantes para suas possíveis aplicações biomédicas. Ainda há muitos resultados conflitantes nessa área, embora a maioria das pesquisas mostrem alta biocompatibilidade após injeções por essas vias. Geralmente, ocorre o acúmulo dos CNTs no fígado, pulmões, baço e rins poucas horas após a injeção. O tempo de degradação e *clearance* dos nanotubos injetados do organismo diferem bastante de acordo com o tipo de nanotubo. Grande parte é facilmente excretada via renal em um curto período de tempo. Em alguns casos, geralmente com nanotubos do tipo 'pristine', há a acumulação persistente nos órgãos supracitados, o que levanta uma certa preocupação com seus efeitos tóxicos a longo prazo (DENG et al., 2007; YANG et al., 2008; YANG et al., 2012; RAWAT et al., 2016).

É importante ressaltar a magnitude da interferência da funcionalização e caracterização do nanotubo injetado para os ensaios toxicológicos. Problemas de acumulação e *clearance* renal lento de nanopartículas são facilmente resolvidos com

funcionalizações que diminuam a taxa de agregação de CNTs. Da mesma forma, CNTs com um tamanho muito grande podem resultar em fagocitose ineficiente e em consequente ruptura de membranas macrofágicas. A presença de impurezas ou inclusive a purificação excessiva de um nanotubo pode levar à maior formação de ROS (AILLON et al., 2009).

Em se tratando de aplicações biomédicas, a existência de tantos resultados discrepantes, obtidos através de estudos com metodologias tão divergentes (quanto à síntese, funcionalização, via de administração do nanotubo), tornam um ensaio toxicológico sistêmico em modelo *in vivo* extremamente importante, para cada nanotubo em específico, devido à sua singularidade e imprevisibilidade.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O objetivo do estudo foi observar os efeitos da administração sistêmica de nanotubos de carbono de paredes múltiplas em modelo animal, avaliando sua biodistribuição e toxicidade quando aplicados em diferentes concentrações através das vias intraperitoneal e subcutânea.

2.2. Objetivos específicos

A) Avaliar a função respiratória de camundongos Balb-c injetados com diferentes concentrações das soluções de nanotubos (10µg, 20µg e 50µg), após diferentes tempos de exposição (12 horas, 24 horas, 48 horas e 21 dias).

B) Analisar os níveis de AST, ALT, CK, GGT e ureia de cada camundongo por meio de testes bioquímicos.

C) Comparar a razão entre peso do órgão e peso corporal do baço, rins, fígado, coração, pulmão e cérebro de animais controle e nanoinjetados.

D) Avaliar diferenças entre o peso corporal, volume de urina e consumo de água e ração de animais controle e nanoinjetados.

E) Comparar os efeitos tóxicos dos MWCNTs quando administrados através das vias intraperitoneal e subcutânea.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Síntese e Funcionalização dos nanotubos de carbono

Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas utilizados foram sintetizados por meio da técnica de Deposição Química de Vapor e, posteriormente, foram funcionalizados com grupamentos oxigenados ácidos (COOH) por ataque químico em solução ácida (H_2SO_4 e HNO_3). Para a avaliação da integridade e pureza das nanopartículas, foram utilizadas as técnicas de microscopia eletrônica, termogravimetria e espectroscopia Raman. Estas etapas foram realizadas no Laboratório de Nanomateriais do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

3.2. Animais

Para a realização do trabalho foram utilizadas 128 camundongos fêmeas da linhagem Balb/c, com idades entre 5 e 6 semanas. Os animais foram obtidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da UFU, e mantidos no biotério da Área de Ciências Fisiológicas (ARFIS) desta Universidade, sob condições normais e alimentadas *ad libitum* com ração extrusada.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA), sob número de protocolo 021/17.

Os animais foram submetidos à uma única injeção com volume final de 100µl de PBS (controle) ou solução de nanotubos nas concentrações de 10µg, 20µg ou 50µg. A administração das soluções foi realizada através da via intraperitoneal ou subcutânea. As avaliações respiratória, urinária e bioquímica foram realizadas após um período de 12h, 24h, 48h ou 21 dias após a administração.

Após as avaliações, os animais foram anestesiados com cetamina (100mg/kg, i.p) e xilasina (8mg/kg, i.p), e sacrificados por meio de exsanguinação por punção cardíaca.

3.3. Vias de administração

Os animais foram divididos em grupos para ambas as vias de administração, conforme descrito na tabela abaixo.

128 camundongos Balb-c fêmeas							
64 camundongos Via Intraperitoneal				64 camundongos Via Subcutânea			
Grupo 1 PBS 12 horas (n=4)	Grupo 2 10µg CNT 12 horas (n=4)	Grupo 3 20µg CNT 12 horas (n=4)	Grupo 4 50µg CNT 12 horas (n=4)	Grupo 1 PBS 12 horas (n=4)	Grupo 2 10µg CNT 12 horas (n=4)	Grupo 3 20µg CNT 12 horas (n=4)	Grupo 4 50µg CNT 12 horas (n=4)
Grupo 5 PBS 24 horas (n=4)	Grupo 6 10µg CNT 24 horas (n=4)	Grupo 7 20µg CNT 24 horas (n=4)	Grupo 8 50µg CNT 24 horas (n=4)	Grupo 5 PBS 24 horas (n=4)	Grupo 6 10µg CNT 24 horas (n=4)	Grupo 7 20µg CNT 24 horas (n=4)	Grupo 8 50µg CNT 24 horas (n=4)
Grupo 9 PBS 48 horas (n=4)	Grupo 10 10µg CNT 48 horas (n=4)	Grupo 11 20µg CNT 48 horas (n=4)	Grupo 12 50µg CNT 48 horas (n=4)	Grupo 9 PBS 48 horas (n=4)	Grupo 10 10µg CNT 48 horas (n=4)	Grupo 11 20µg CNT 48 horas (n=4)	Grupo 12 50µg CNT 48 horas (n=4)
Grupo 13 PBS 21 dias (n=4)	Grupo 14 10µg CNT 21 dias (n=4)	Grupo 15 20µg CNT 21 dias (n=4)	Grupo 16 50µg CNT 21 dias (n=4)	Grupo 13 PBS 21 dias (n=4)	Grupo 14 10µg CNT 21 dias (n=4)	Grupo 15 20µg CNT 21 dias (n=4)	Grupo 16 50µg CNT 21 dias (n=4)

Tabela 1. Distribuição dos animais em grupos, de acordo com a via de administração (intraperitoneal ou subcutânea), a injeção recebida (PBS ou 10µg, 20µg ou 50µg da solução de MWCNTs) e o tempo de exposição (12 horas, 24 horas, 48 horas ou 21 dias).

3.4. Avaliação da função renal

Para a avaliação da função renal, todas as fêmeas foram colocadas em gaiolas metabólicas durante 24 horas, para adaptação. Em seguida, permaneceram por mais 24 horas nas gaiolas para avaliação do consumo de água e ração e coleta de urina, previamente à avaliação respiratória e sacrifício. Para os grupos 1 a 4, de ambas as vias de administração, as fêmeas foram retiradas rapidamente das gaiolas para injeção com PBS ou solução de nanotubos e retornaram imediatamente às gaiolas metabólicas para completar as 12 horas restantes do tempo total de avaliação.

3.5. Avaliação da função respiratória

Para a avaliação dos parâmetros respiratórios, os camundongos foram colocados em um recipiente acoplado a um sensor de fluxo do espirômetro (ADInstruments), e avaliados durante 3 minutos, com intervalo de 30 segundos a cada minuto e meio. O espirômetro, por sua vez, estava acoplado ao amplificador BP100 (ADInstruments) e ao sistema de digitalização computadorizado de registro Power Lab/ 8 canais (ADInstruments). A aquisição dos dados foi obtida por meio de *software* correspondente ao sistema de registro (Lab Chart v 8.0). Ao final, foram obtidas informações acerca do Volume Corrente (VC), que corresponde ao volume de ar inspirado ou expirado em cada respiração normal do animal; Frequência Respiratória (FR), correspondente ao número de ciclos respiratórios realizados involuntariamente pelo animal por minuto; e Volume Minuto respiratório (VM), que se refere à quantidade total de ar que se movimenta pelas vias aéreas do animal por minuto e é obtido pela multiplicação do volume corrente pela frequência respiratória ($VC \times FR$) (GUYTON, HALL, 2011, p.493).

3.6. Avaliação bioquímica

Para a avaliação bioquímica foi realizada a coleta sanguínea através de punção cardíaca. O sangue coletado foi colocado em banho maria, à temperatura de 37°C, durante 20 minutos. Em seguida foi realizada a centrifugação do material, à 3000 rpm durante 5 minutos para a obtenção do soro. As amostras foram levadas ao Laboratório de Patologia Animal do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia para análise. Todas as análises foram processadas no analisador automático Labmax Plenno (LabTest), utilizando kits bioquímicos Gold Analisa. Os soros foram avaliados quanto à atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato transaminase (AST), creatinoquinase (CK), gama glutamil transpeptidase (GGT) e quanto aos níveis do composto orgânico ureia.

A ALT é uma enzima presente principalmente no citosol dos hepatócitos, o que a torna um indicador de dano hepático altamente específico. A AST também pode ser utilizada como um indicador de função hepática menos específico, pois está presente

em vários outros órgãos, como o fígado, músculos, cérebro, pâncreas e pulmões. (BURTIS, BRUNS, 2016, p.322).

A GGT é uma enzima de membranas e é um marcador de lesão no trato biliar (BURTIS, BRUNS, 2016, p.324). Já a CK é uma enzima catalisadora da fosforilação do ATP, e por isso encontra-se bastante presente no tecido muscular esquelético e no tecido cardíaco. Sua atividade sérica encontra-se elevada em casos de injúria, inflamação ou necrose dos mesmos (BURTIS, BRUNS, 2016, p.320).

A ureia é o principal produto metabólico do catabolismo de proteínas do organismo, e é excretada quase totalmente através dos rins. Portanto, os níveis séricos de ureia encontram-se elevados em casos de lesões renais (BURTIS, BRUNS, 2016, p.320).

3.7. Avaliação da biodistribuição

Após a exsanguinação, os pulmões, rins, fígado, coração, baço e cérebro dos animais foram retirados, mergulhados em PBS e pesados, para o cálculo do índice da relação peso do órgão/peso corporal de cada animal.

3.8. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software GraphPad Prism Version 7.00. A análise de distribuição normal foi feita usando o teste de *Kolmogorov-Smirnov*. As comparações múltiplas foram realizadas por meio do teste one-way ANOVA ou do teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis*. O nível de significância estabelecido foi de 5% (valor descritivo de $P < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. Síntese e Caracterização dos nanotubos de carbono

Após a síntese por CVD e processo de oxidação, foram obtidos nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados com grupamentos carboxila com pureza aproximada de 95%, comprimento médio de 600nm e poucos defeitos cristalinos (Figura 7a, b). As presenças de carbono amorfo e de defeitos nas extremidades e paredes dos nanotubos foram também caracterizadas nos espectros Raman. A presença de carbono amorfo residual (principalmente na amostra bruta) e os defeitos nas extremidades e paredes dos nanotubos quimicamente processados são caracterizados pela alta intensidade da banda D e a presença da banda D' na região 1620 cm^{-1} . A diminuição da intensidade relativa dessas bandas (I_D/I_G) na amostra oxidada é devido à remoção de carbono amorfo e outras impurezas provenientes do processo de síntese (Figura 7c, d).

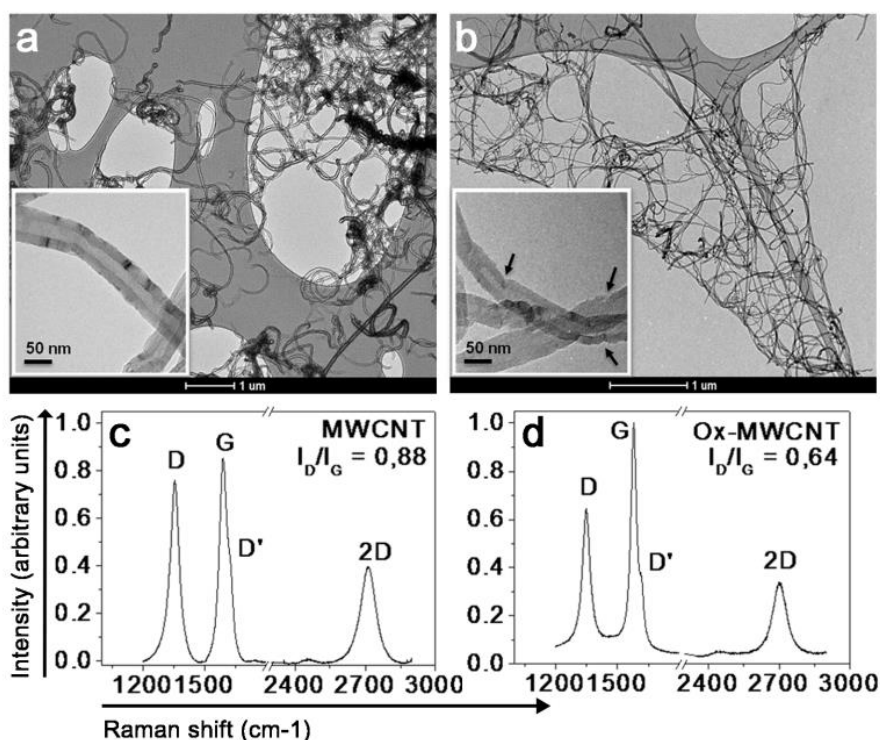


Figura 7. Pureza, morfologia e qualidade estrutural dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas antes e após oxidação. a,b) Imagens de TEM ilustrando o aspecto geral das amostras de nanotubos de carbono antes e após os procedimentos de purificação e oxidação. As setas mostram a criação de defeitos nas paredes após a oxidação, onde são inseridos os grupamentos funcionais. As imagens são representativas da amostra como um todo. c,d) Espectroscopia Raman ($\lambda = 514.5\text{nm}$) evidenciando as bandas características de materiais gráfiticos.

4.2. Função respiratória

4.2.1. Via intraperitoneal

4.2.1.1. Volume Corrente

O VC dos animais foi avaliado quanto aos controles de cada grupo, após 12, 24, 48 horas e 21 dias de exposição à injeção da solução de nanotubos. Foi observado um aumento geral no volume respiratório corrente dos animais tratados com 20 μg e 50 μg durante as primeiras 48 horas de exposição. Para os grupos avaliados após 21 dias, a elevação do VC foi observada também para os animais tratados com 10 μg de nanotubos (Figura 8).

Diferentemente, ao comparar os diferentes tempos de exposição à solução de MWCNTs, de acordo com as concentrações das mesmas, registrou-se um aumento do VC, principalmente durante as primeiras 24 horas que se restabelece em um período mais crônico pós-injeção, de 21 dias (Figura 9).

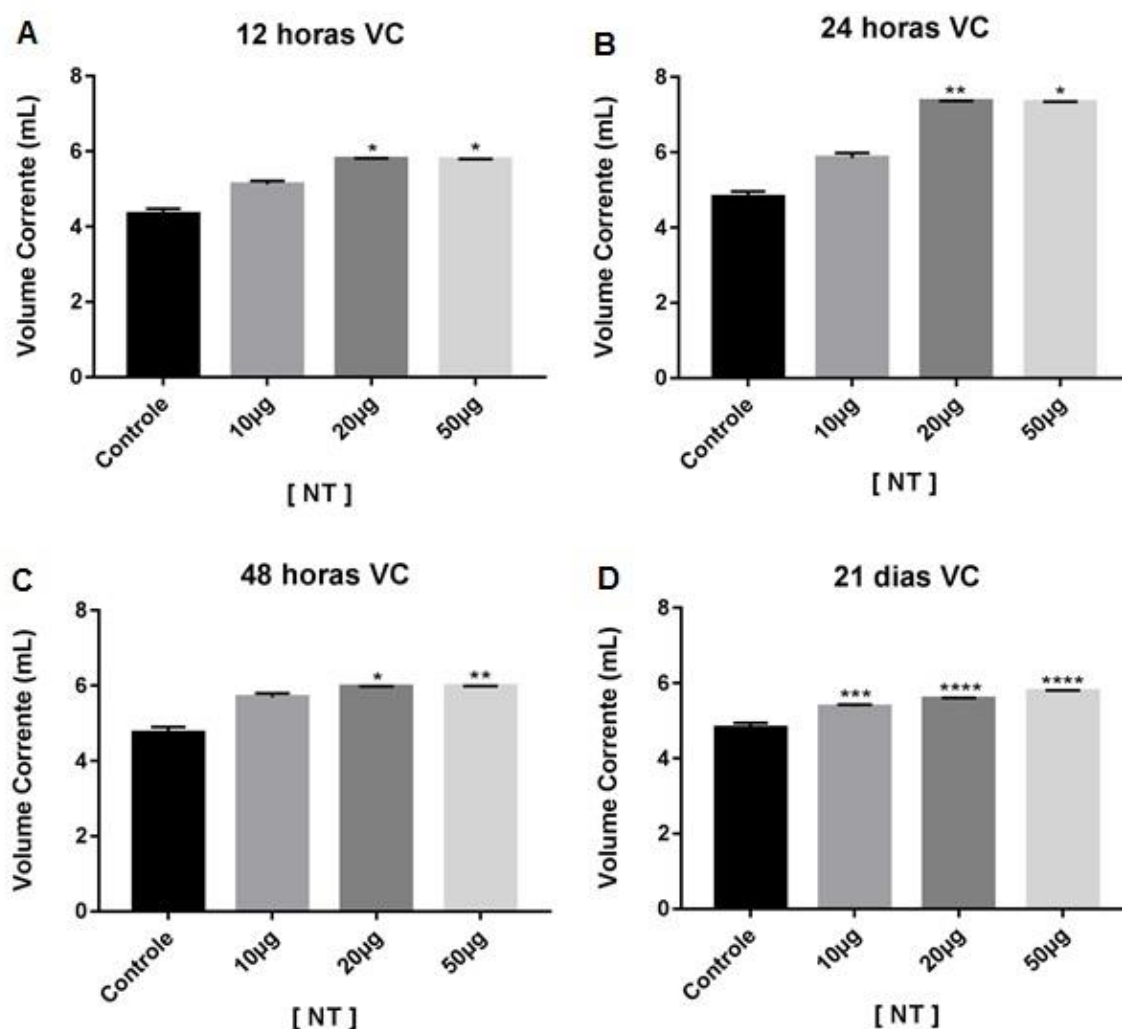


Figura 8. Representação gráfica do volume corrente (VC) de camundongos avaliados após 12h, 24h, 48h e 21 dias da injeção intraperitoneal com soluções de 10µg, 20µg e 50µg de MWCNTs . A) Comparação do grupo controle com relação aos grupos tratados com 10µg, 20µg e 50µg, após 12 horas de exposição. **B)** Comparação do grupo controle com relação aos grupos tratados com 10µg, 20µg e 50µg, após 24 horas de exposição. **C)** Comparação do grupo controle com relação aos grupos tratados com 10µg, 20µg e 50µg, após 48 horas de exposição. **D)** Comparação do grupo controle com relação aos grupos tratados com 10µg, 20µg e 50µg, após 21 dias de exposição. (n=4, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001).

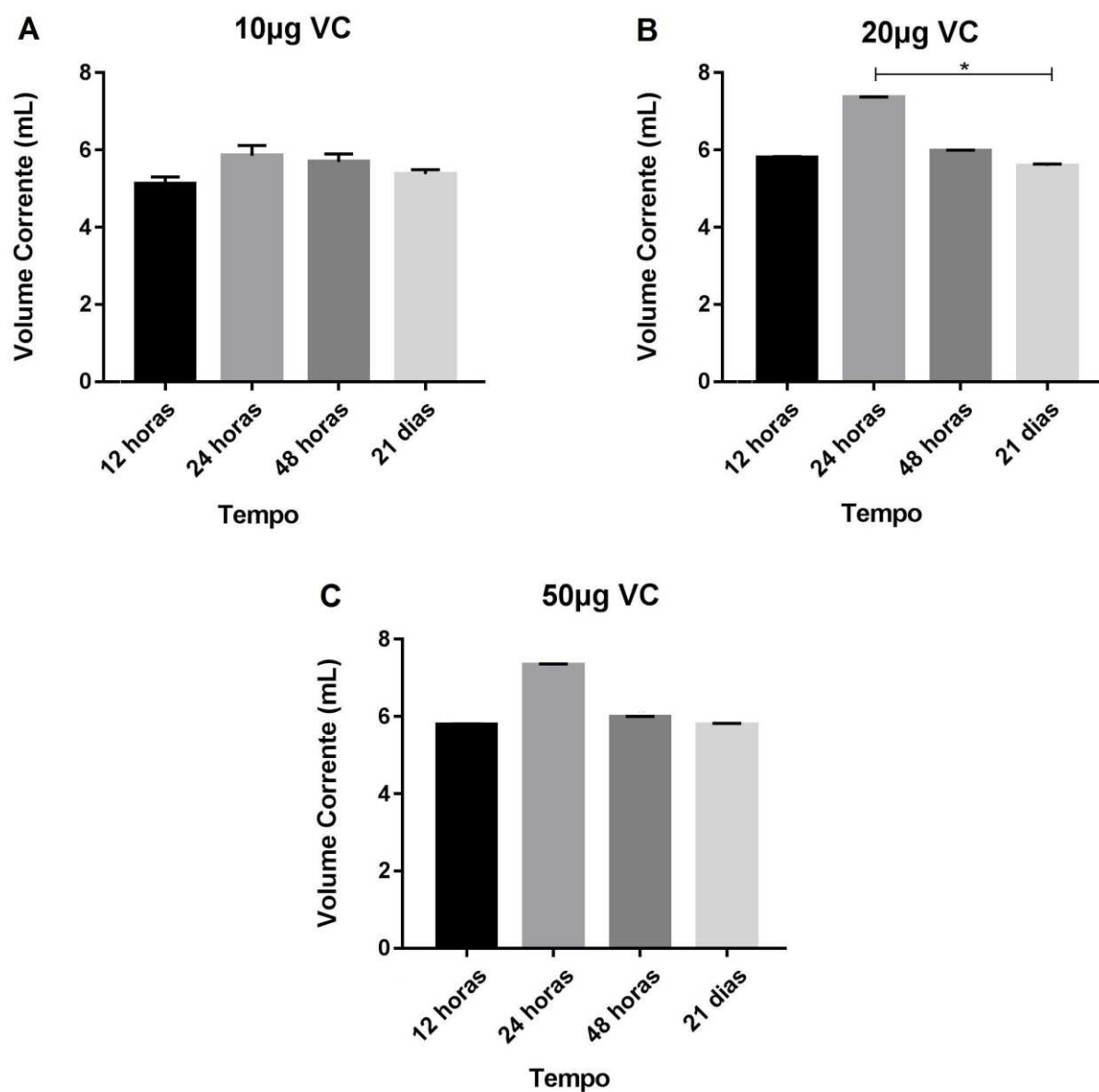


Figura 9. Representação gráfica do volume corrente (VC) de camundongos injetados com 10µg, 20µg e 50µg de solução de MWCNTs, via intraperitoneal, após 12h, 24h, 48h e 21 dias de exposição. A) Comparação entre os grupos expostos por 12h, 24h, 48h e 21 dias à solução de 10µg de MWCNTs. B) Comparação entre os grupos expostos por 12h, 24h, 48h e 21 dias à solução de 20µg de MWCNTs. C) Comparação entre os grupos expostos por 12h, 24h, 48h e 21 dias à solução de 50µg de MWCNTs. (n=4, *p<0,05, **p<0,01).

4.2.1.2. Frequência respiratória

Com relação à quantidade de respirações por minuto, apenas fêmeas injetadas com 10µg de MWCNTs apresentaram diferenças na frequência respiratória com relação ao grupo controle (PBS), após 24, 48 horas e 21 dias de tratamento (Figura 10).

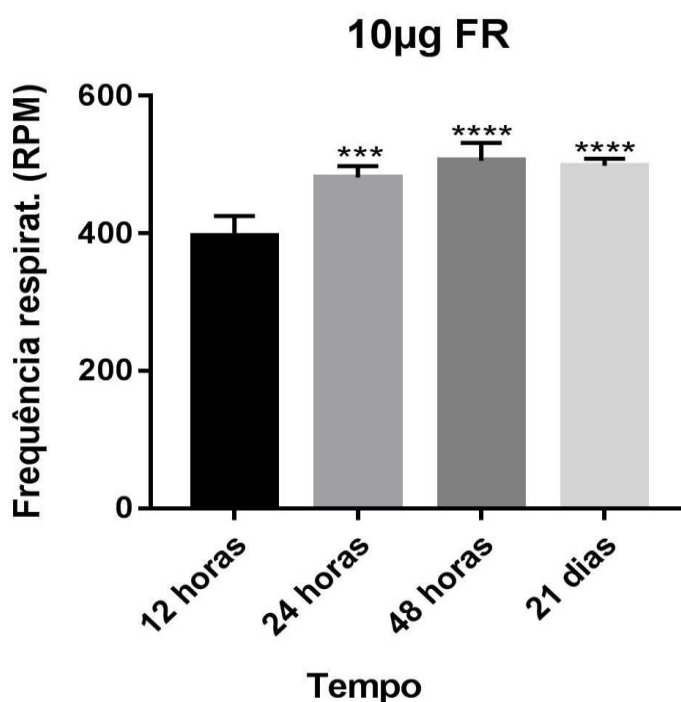


Figura 10. Representação gráfica da frequência respiratória (FR) de camundongos injetados com 10µg da solução de MWCNTs, via intraperitoneal, após 12h, 24h, 48h e 21 dias de exposição. Comparação entre os grupos expostos por 12h, 24h, 48h e 21 dias à solução de 10µg de MWCNTs (n=4, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001).

4.2.1.3. Volume minuto

Com relação ao volume respiratório por minuto ($VM = VC \times FR$), as fêmeas foram avaliadas após 12, 24, 48 horas e 21 dias de exposição à injeção de PBS ou solução de nanotubos em diferentes concentrações. Assim como o VC, foi observado um aumento geral no VM dos animais tratados com 20µg e 50µg em relação aos grupos controle em todos os períodos avaliados. Para animais tratados com 10µg de nanotubos, houve alteração nos grupos de 48 horas e 21 dias de exposição, em comparação aos grupos

controle (Figura 11). Percebe-se ainda que após o maior tempo de exposição ao nanotubo, a solução de menor concentração apresenta maior aumento no VM em relação ao controle, se comparado com os grupos de 20µg e 50µg (Figura 11D).

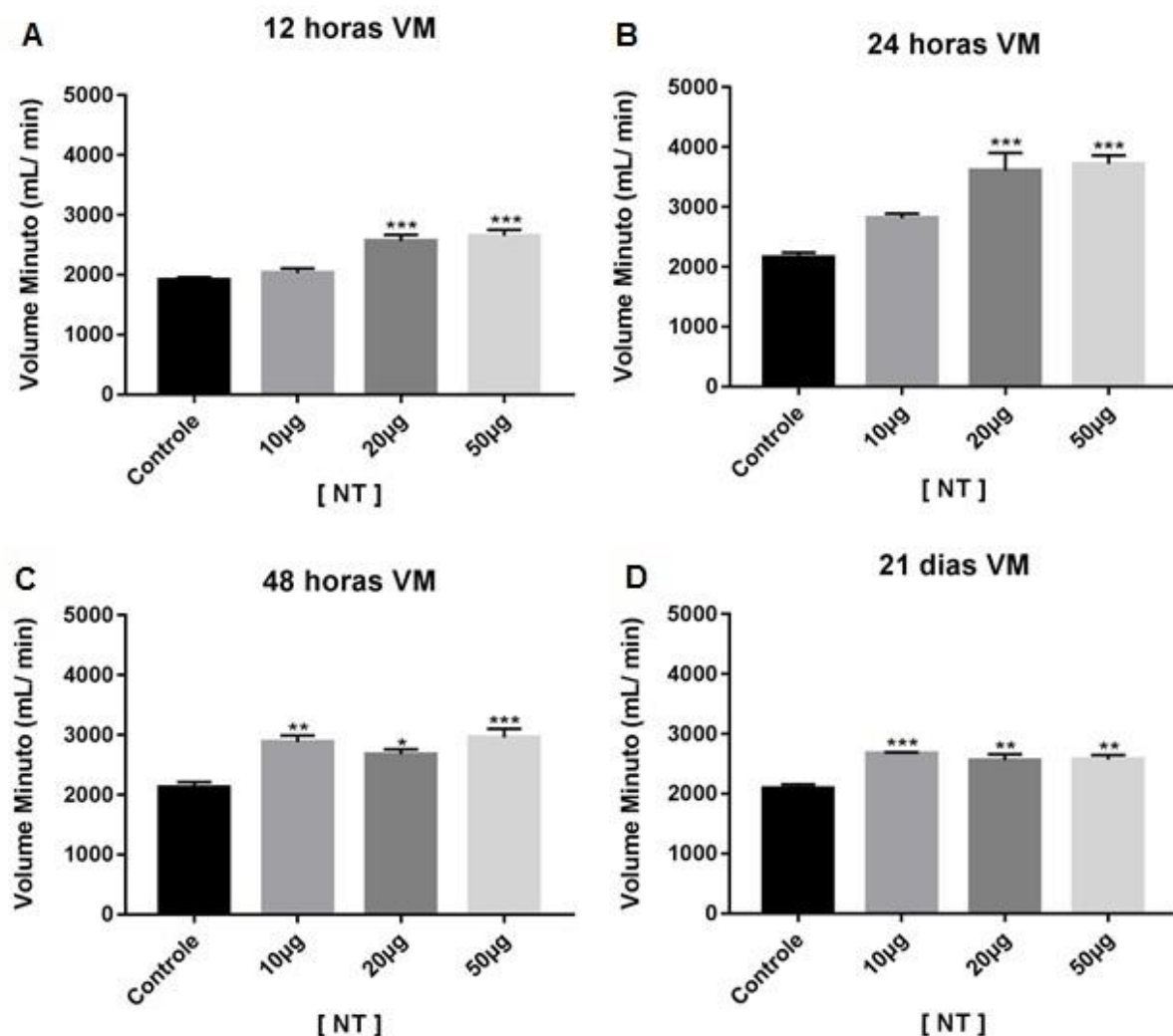


Figura 11. Representação gráfica do volume respiratório por minuto (VM) de camundongos avaliados após 12h, 24h, 48h e 21 dias da injeção intraperitoneal com soluções de 10µg, 20µg e 50µg de MWCNTs. A) Comparação do grupo controle com relação aos grupos tratados com 10µg, 20µg e 50µg, após 12 horas de exposição. B) Comparação do grupo controle com relação aos grupos tratados com 10µg, 20µg e 50µg, após 24 horas de exposição. C) Comparação do grupo controle com relação aos grupos tratados com 10µg, 20µg e 50µg, após 48 horas de exposição. D) Comparação do grupo controle com relação aos grupos tratados com 10µg, 20µg e 50µg, após 21 dias de exposição. (n=4, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001).

Novamente, ao comparar os diferentes tempos de exposição à solução de MWCNTs, de acordo com as concentrações das mesmas, registrou-se um aumento do

VM principalmente durante as primeiras 24 horas pós-injeção em todas as concentrações de MWCNTs analisadas. O mesmo padrão de restabelecimento foi observado após o período mais crônico da exposição, de 21 dias (Figura 12).

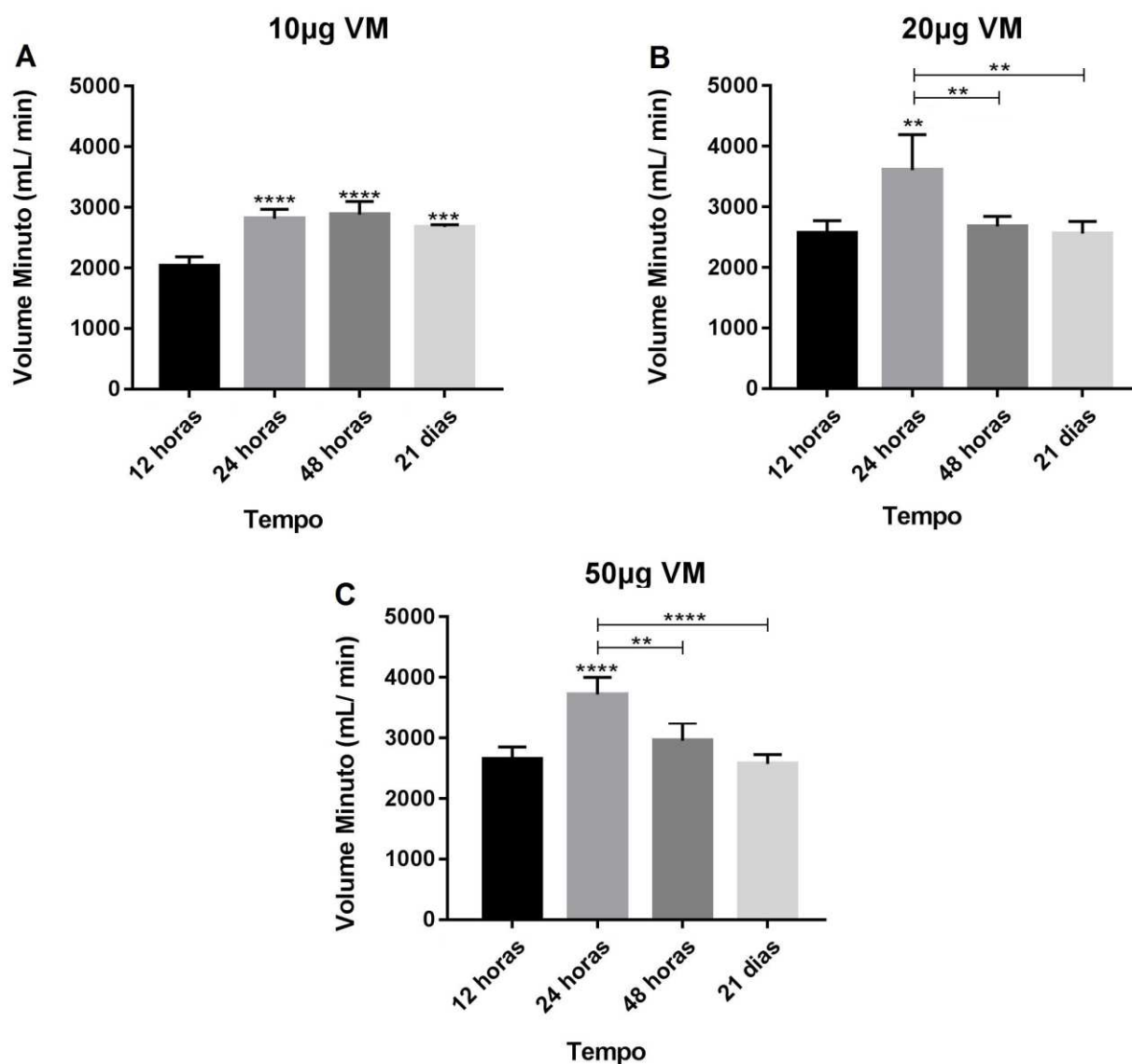


Figura 12. Representação gráfica do volume respiratório por minuto (VM) de camundongos injetados com 10µg, 20µg e 50µg de solução de MWCNTs, via intraperitoneal, após 12h, 24h, 48h e 21 dias de exposição. A) Comparação entre os grupos expostos por 12h, 24h, 48h e 21 dias à solução de 10µg de MWCNTs. B) Comparação entre os grupos expostos por 12h, 24h, 48h e 21 dias à solução de 20µg de MWCNTs. C) Comparação entre os grupos expostos por 12h, 24h, 48h e 21 dias à solução de 50µg de MWCNTs. (n=4, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001).

4.2.2. Via subcutânea

4.2.2.1. Volume corrente

As análises do volume corrente quanto ao controle de cada grupo, após 12, 24, 48 horas e 21 dias de exposição à injeção de solução de nanotubos, através da via subcutânea, mostraram que as alterações do mesmo não foram muito perceptivas nas primeiras horas de exposição. Diferentemente da via intraperitoneal, o VC dos animais expostos durante 24 horas aos nanotubos não apresentou diferença significativa em relação aos animais controle (PBS). As alterações no volume corrente se tornaram mais persistentes após 21 dias de exposição, para todas as concentrações inoculadas (Figura 13).

Ao comparar os diferentes tempos de exposição à solução de MWCNTs, de acordo com as concentrações das mesmas, registrou-se um aumento do VC após 12, 48 horas e 21 dias de exposição para os animais tratados com 10µg de MWCNTs. O aumento no VC também foi registrado apenas aos animais expostos por 48 horas a 50µg do nanomaterial. Em animais tratados com 20µg, apesar de terem sido registradas alterações no VC, nenhuma delas foi significativa (Figura 14).

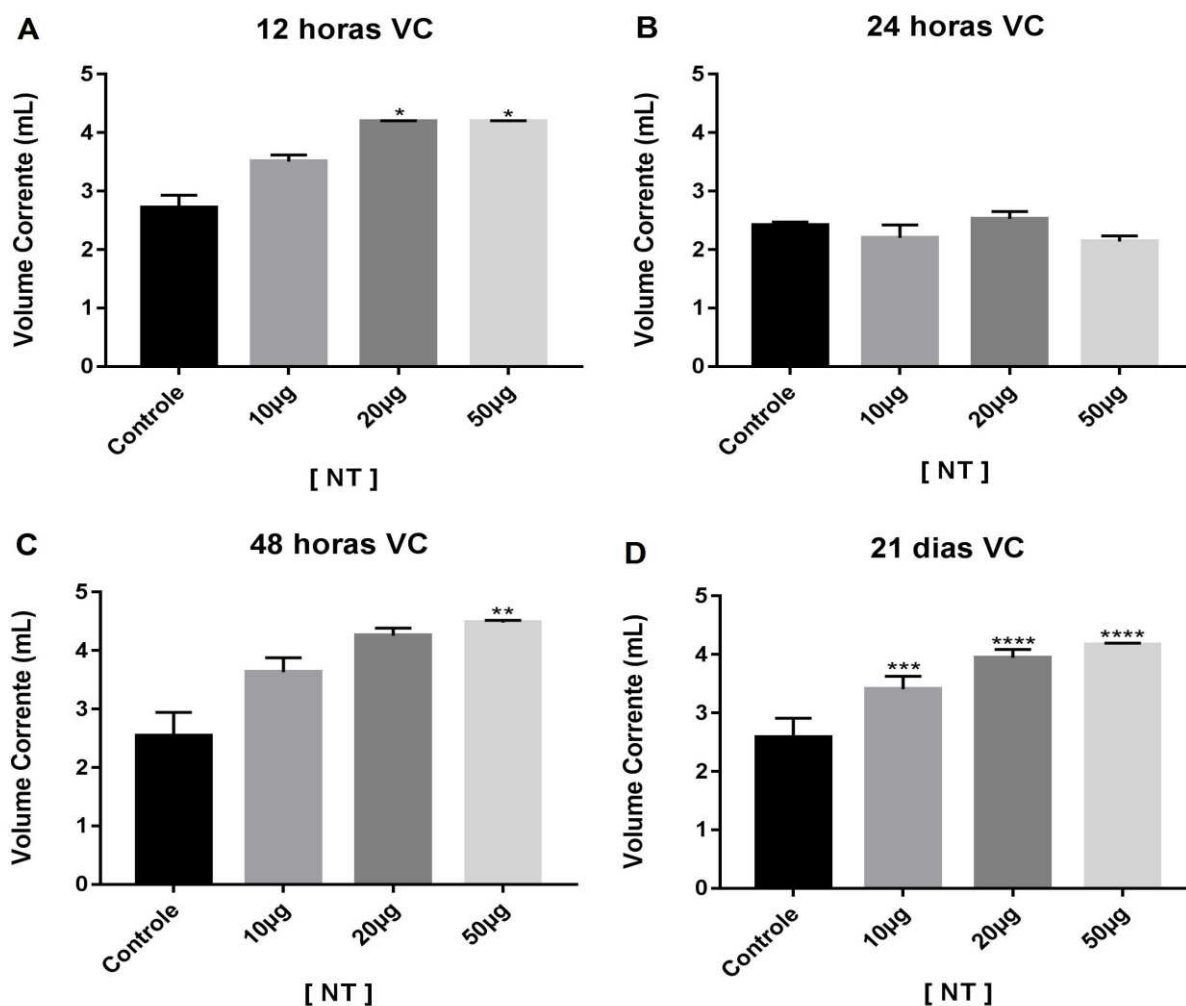


Figura 13. Representação gráfica do volume corrente (VC) de camundongos avaliados após 12h, 24h, 48h e 21 dias da injeção subcutânea com soluções de 10µg, 20µg e 50µg de MWCNTs. A) Comparação do grupo controle com relação aos grupos tratados com 10µg, 20µg e 50µg, após 12 horas de exposição. **B)** Comparação do grupo controle com relação aos grupos tratados com 10µg, 20µg e 50µg, após 24 horas de exposição. **C)** Comparação do grupo controle com relação aos grupos tratados com 10µg, 20µg e 50µg, após 48 horas de exposição. **D)** Comparação do grupo controle com relação aos grupos tratados com 10µg, 20µg e 50µg, após 21 dias de exposição. (n=4, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001).

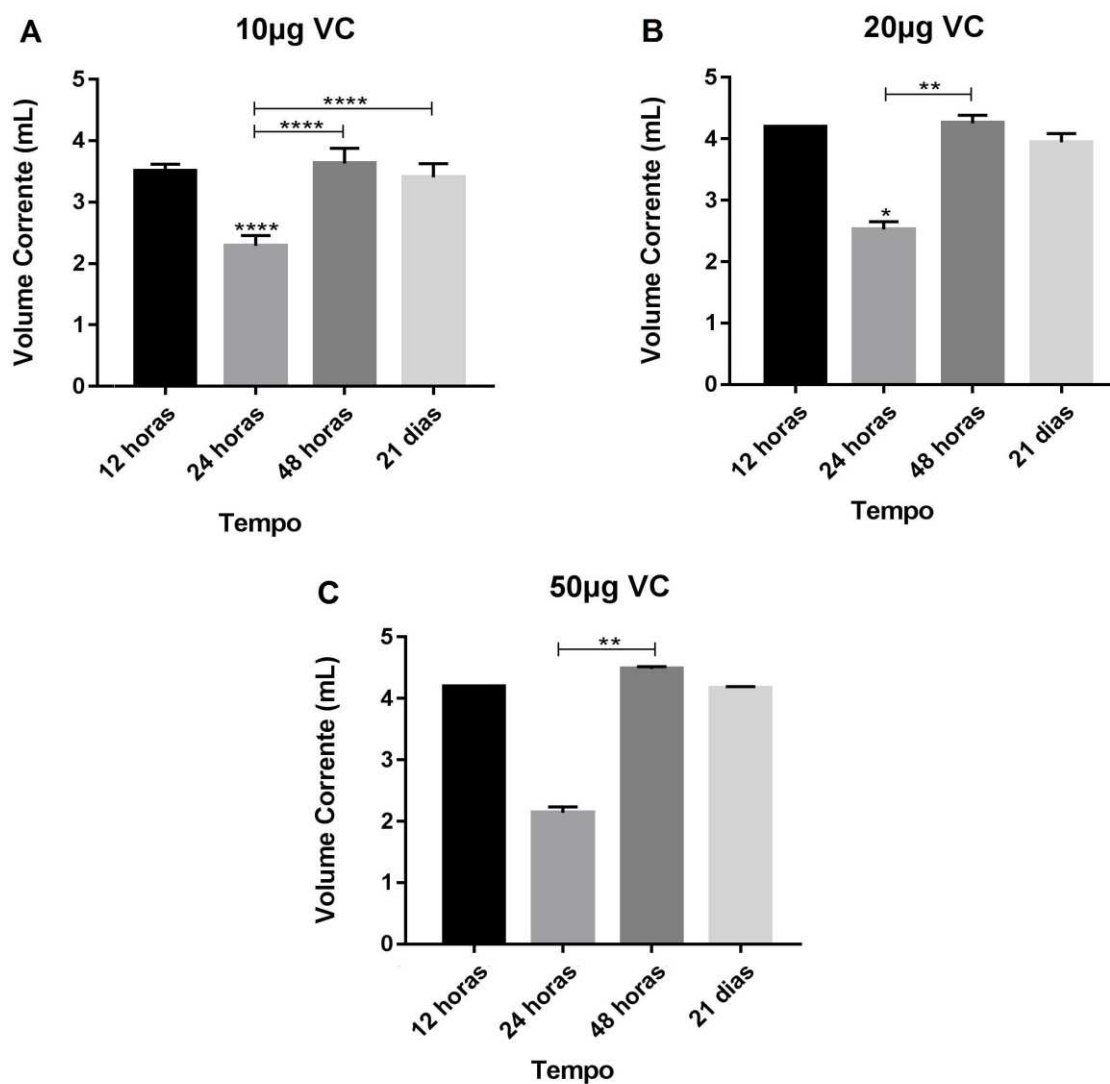


Figura 14. Representação gráfica do volume corrente (VC) de camundongos injetados com 10µg, 20µg e 50µg de solução de MWCNTs, via subcutânea, após 12h, 24h, 48h e 21 dias de exposição.
 A) Comparação entre os grupos expostos por 12h, 24h, 48h e 21 dias à solução de 10µg de MWCNTs.
 B) Comparação entre os grupos expostos por 12h, 24h, 48h e 21 dias à solução de 20µg de MWCNTs.
 C) Comparação entre os grupos expostos por 12h, 24h, 48h e 21 dias à solução de 50µg de MWCNTs.
 (n=4, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001).

4.2.2.2. Frequência respiratória

Quanto à quantidade de respirações por minuto, apenas fêmeas injetadas com 20µg de MWCNTs, avaliadas 12 horas pós-injeção, apresentaram diminuições na frequência respiratória, comparando aos animais expostos por 48 horas (Figura 15).

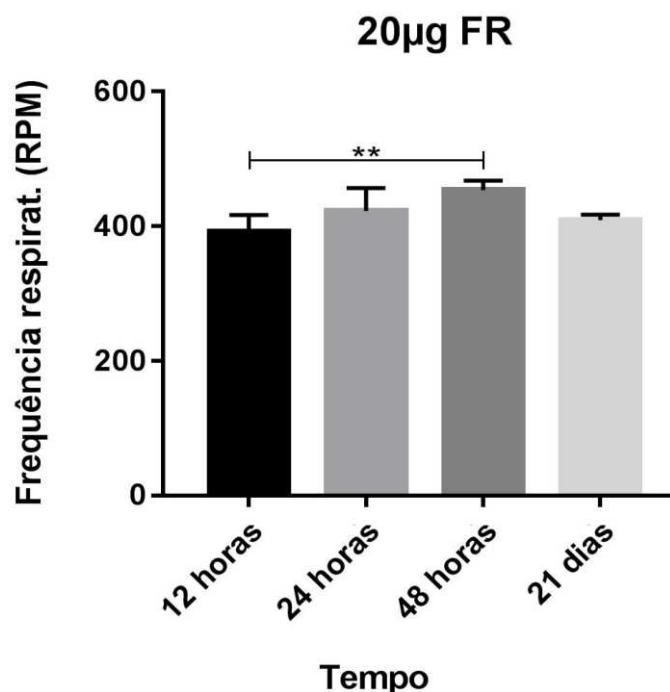


Figura 15. Representação gráfica da frequência respiratória (FR) de camundongos injetados com 20µg de solução de MWCNTs, pela via subcutânea, após 12h, 24h, 48h e 21 dias de exposição. Comparação entre os grupos expostos por 12h, 24h, 48h e 21 dias à solução de 20µg de MWCNTs (n=4, *p<0,05, **p<0,01).

4.2.2.3. Volume minuto

Com relação ao volume respiratório por minuto ($VM = VC \times FR$), as fêmeas foram avaliadas após 12, 24, 48 horas e 21 dias de exposição à injeção subcutânea de PBS ou solução de nanotubos em diferentes concentrações (Figura 16). Foi observado um aumento geral no VM dos animais tratados com 20µg e 50µg em relação aos grupos controle, exceto para os animais expostos por 24 horas, cujo VM não foi diferente significativamente do grupo controle (Figura 16B). Para animais tratados com 10µg de nanotubos, houve alteração somente nos grupos de 48 horas e 21 dias de exposição, em comparação aos grupos controle, assim como nos animais injetados via intraperitoneal (Figura 16C e 16D).

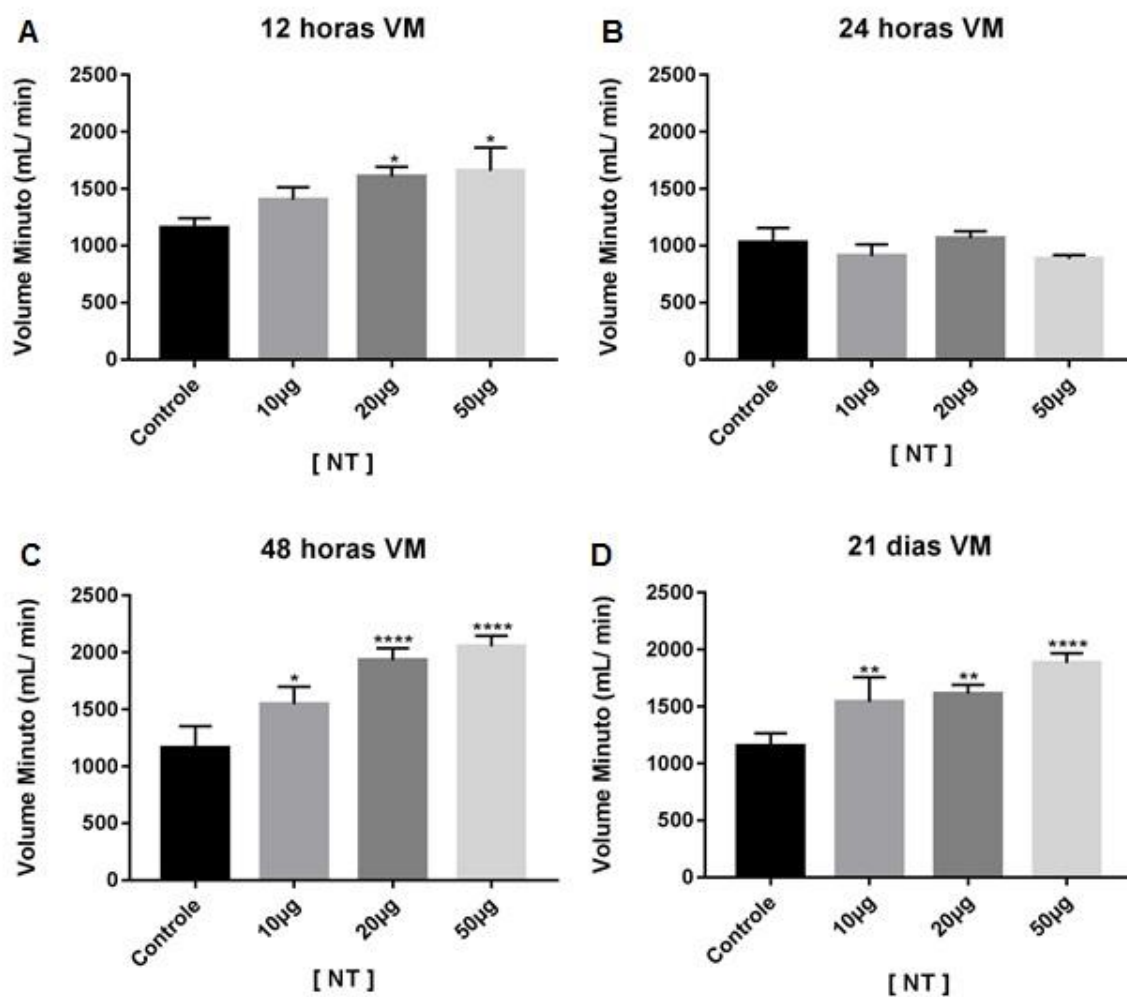


Figura 16. Representação gráfica do volume respiratório por minuto (VM) de camundongos avaliados após 12h, 24h, 48h e 21 dias da injeção subcutânea de 10µg, 20µg e 50µg de MWCNTs. A) Comparação do grupo controle com relação aos grupos tratados com 10µg, 20µg e 50µg, após 12 horas de exposição. B) Comparação do grupo controle com relação aos grupos tratados com 10µg, 20µg e 50µg, após 24 horas de exposição. C) Comparação do grupo controle com relação aos grupos tratados com 10µg, 20µg e 50µg, após 48 horas de exposição. D) Comparação do grupo controle com relação aos grupos tratados com 10µg, 20µg e 50µg, após 21 dias de exposição. (n=4, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001).

Ao comparar os diferentes tempos de exposição à solução de MWCNTs, de acordo com as concentrações das mesmas (Figura 17), registrou-se um aumento do VM, principalmente nas fêmeas com 48 horas pós-injeção, para as concentrações de 20µg e 50µg MWCNTs (Figuras 17B e 17C). Os animais expostos a 10µg das nanopartículas não apresentaram diferenças significativas no VM em comparação com os grupos controle (PBS) (Figura 17A). Diferentemente dos animais injetados intraperitonealmente, cuja elevação do VM foi mais significativa após 24 horas de

exposição, observou-se então um atraso na alteração respiratória quando a inoculação foi realizada através da via subcutânea.

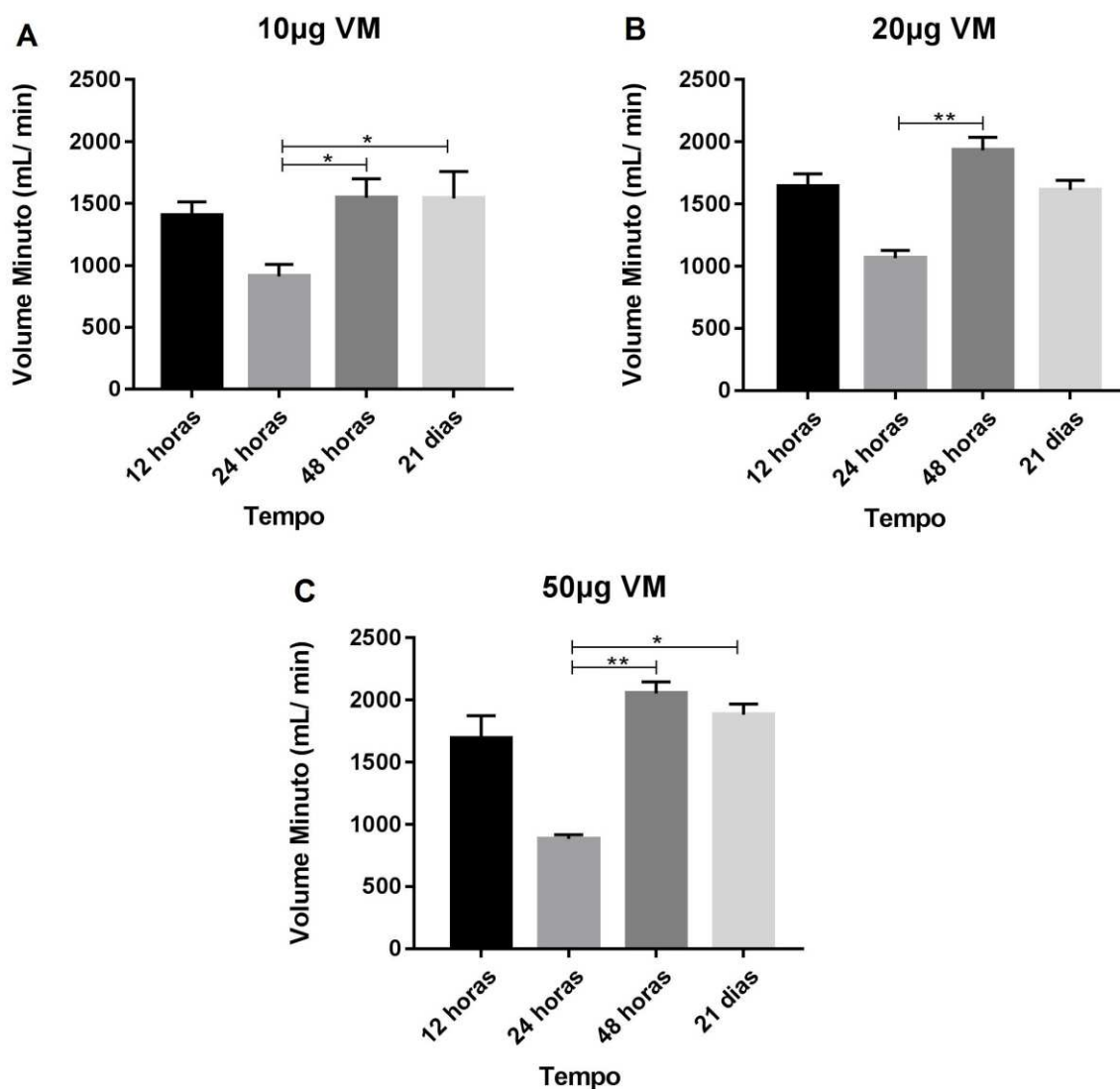


Figura 17. Representação gráfica do volume respiratório por minuto (VM) de camundongos injetados com 10µg, 20µg e 50µg de solução de MWCNTs, pela via subcutânea, após 12h, 24h, 48h e 21 dias de exposição. A) Comparação entre os grupos expostos por 12h, 24h, 48h e 21 dias à solução de 10µg de MWCNTs. B) Comparação entre os grupos expostos por 12h, 24h, 48h e 21 dias à solução de 20µg de MWCNTs. C) Comparação entre os grupos expostos por 12h, 24h, 48h e 21 dias à solução de 50µg de MWCNTs. (n=4, *p<0,05, **p<0,01).

4.3. Avaliação urinária

Para a avaliação da função renal foi realizada a dosagem do volume de urina de cada grupo após 24 horas de permanência em gaiola metabólica, com oferta controlada de comida e água. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos controle e de 10ug, 20ug e 50ug da solução de nanotubos quanto à quantidade de urina recolhida, tanto em fêmeas tratadas pela via intraperitoneal quanto pela via subcutânea. Também não foram registradas diferenças significativas entre a quantidade de urina recolhida dos animais avaliados após 12, 24 e 48 horas ou 21 dias, para ambas as vias de administração. Da mesma forma, não houveram diferenças estatísticas na quantidade de água ou comida consumidos entre nenhum dos grupos.

4.4. Avaliação bioquímica

Os animais tratados com injeções tanto através da via intraperitoneal quanto pela via subcutânea não apresentaram diferenças significativas em nenhum dos parâmetros bioquímicos considerados, mesmo quando avaliados em relação aos respectivos controles, às diferentes concentrações de solução de MWCNTs ou aos diferentes tempos de exposição pós-injeção.

4.5. Índice

4.5.1. Via intraperitoneal

Após o cálculo do índice, ou relação peso do órgão/peso corporal, foi possível observar apenas uma pequena diferença de tamanho no baço de camundongos injetados com 10µg de nanotubos, comparando os animais sacrificados 21 dias após a injeção com animais expostos por 12 horas (Figura 18).

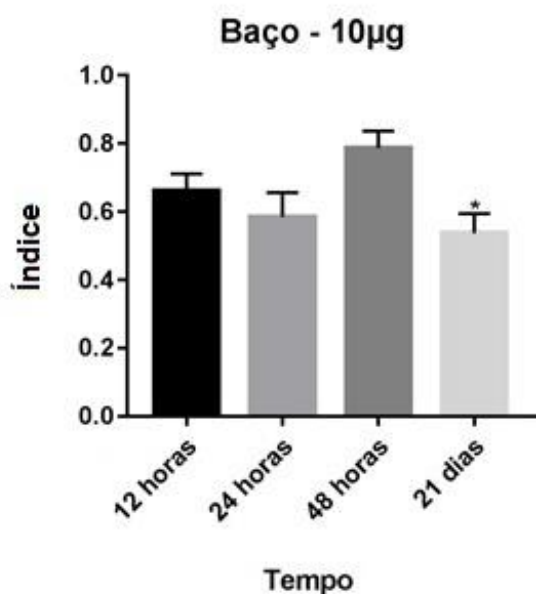


Figura 18. Representação gráfica do índice esplênico de animais injetados com 10µg de MWCNTs, através da via intraperitoneal. Relação peso do baço/ peso corporal em animais sacrificados após 12h, 24h, 48h e 21 dias da injeção de 10µg de nanotubos (n=4, *p<0,05).

4.5.2. Via subcutânea

Os animais tratados com injeções tanto através da via intraperitoneal quanto pela via subcutânea não apresentaram diferenças significativas quanto ao índice de peso órgão/peso corporal, mesmo quando avaliados em relação aos respectivos controles, às diferentes concentrações de solução de MWCNTs ou aos diferentes tempos de exposição pós-injeção.

5. DISCUSSÃO

Os benefícios da nanomedicina são bastante promissores e mundialmente reconhecidos. No entanto, os estudos de toxicidade acerca de nanopartículas, mais precisamente com relação aos nanotubos de carbono, ainda são bastante divergentes.

Quando nos referimos à toxicidade de nanotubos, um dos órgãos mais conhecidamente afetados de forma tóxica são os pulmões. O tecido pulmonar é mais susceptível às nanopartículas, que podem provocar diversos efeitos colaterais como alveolite, formação de granulomas e fibrose (POLAND et al., 2008; KAYAT et al., 2011). No presente estudo, a função respiratória de camundongos nanoinjetados com MWCNTs foi avaliada pelo método de espirometria. Observou-se um aumento geral do volume corrente (VC) e volume minuto (VM) após a injeção do nanotubo para ambas as vias de administração.

O aumento no volume pulmonar corrente pode ocorrer através, principalmente, de dois mecanismos diferentes. Os nanotubos poderiam ser internalizados no tecido pulmonar e se acumularem na região, causando danos à parede alveolar. Dessa forma, as lesões causariam o recrutamento e ativação de fagócitos, levando à inflamação. Haveria também a produção exagerada de colágeno, resultando em processo fibrótico. As células fagocíticas uma vez acionadas, atuariam com o objetivo de conter a inflamação e o acúmulo nocivo dos nanotubos, acarretando a liberação de citocinas anti-inflamatórias durante o processo de reparação. As células fagocíticas também poderiam não ser capazes de resolver a inflamação e a exposição contínua poderia resultar, eventualmente, em genotoxicidade e formação de mesotelioma (MULLER et al., 2005; JAIN et al., 2007; KAYAT et al., 2011). De qualquer forma, o aumento do volume corrente ocorreria como uma forma de compensação para a diminuição da função pulmonar.

Outro mecanismo possivelmente responsável pela alteração no VC seria o aumento do metabolismo mitocondrial. Os nanotubos injetados poderiam afetar o organismo dos animais de forma mais sistêmica, atingindo outros órgãos além dos pulmões. Ao serem internalizados nas células, atuariam nas mitocôndrias provocando uma maior produção de ROS e um desequilíbrio no sistema de defesa antioxidante.

Como resultado temos um processo de estresse oxidativo (LANONE, BOCZKOWSKI, 2006; JAIN et al., 2007; KAYAT et al., 2011; GHANBARI et al., 2017). Sendo assim, o aumento do volume corrente registrado nesse estudo pode ser resultante do aumento do metabolismo mitocondrial que ocorre durante esse processo de estresse oxidativo, ou até mesmo devido a um maior gasto energético na produção de barreiras antioxidantes como mecanismo de defesa da célula. O aumento geral do metabolismo celular corporal causaria também um aumento na respiração celular, que seria refletido na respiração pulmonar.

No entanto, como o aumento de ambos, o volume corrente e o volume minuto, ocorreu de forma mais significativa nas primeiras horas pós-exposição e mostrou um padrão de restabelecimento após o período mais crônico de exposição, de 21 dias, houve mais provavelmente uma elevação no metabolismo mitocondrial, uma vez que os efeitos dos CNTs na organela são mais rápidos que os efeitos pulmonares e também possuem resolução mais simples e acelerada (MULLER et al., 2005; LANONE, BOCZKOWSKI, 2006; JAIN et al., 2007; KAYAT et al., 2011; GHANBARI et al., 2017). No caso de haverem danos ao tecido pulmonar, a espirometria acusaria uma estabilidade do aumento no VC e VM mesmo após 21 dias de exposição às nanoinjeções, o que não foi observado. Além disso, o índice pulmonar não apresentou diferenças nos grupos tratados com o nanotubo, o que ratifica a ausência de lesões pulmonares.

Foram também observadas diferenças entre os VC e VM avaliados após administração intraperitoneal e subcutânea. A maior elevação registrada em fêmeas tratadas intraperitonealmente ocorreu após 24 horas de exposição, enquanto nos animais injetados através da via subcutânea houve um atraso nessa elevação, que ocorreu após 48 horas de exposição ao nanotubo. A administração subcutânea de substâncias possui como característica uma absorção mais lenta em contraste às vias parenterais, como a via intraperitoneal, que são mais acessíveis à circulação no organismo (TURNER et al., 2011). Dessa forma, o atraso para a alteração na espirometria é justificado pela liberação mais lenta do CNT para a circulação em camundongos injetados subcutaneamente, e percebemos uma elevação mais tardia no VC desses animais.

Analogamente, ao observarmos os tempos de exposição em relação aos animais controle na via subcutânea percebe-se que há um leve aumento no VC e VM durante as primeiras 12 horas e quase não há diferença do controle após 24 horas, ao contrário da via intraperitoneal, cujo aumento nos volumes ocorre já nas primeiras 12 horas de forma mais acentuada. Possivelmente, após uma pequena liberação do CNT na circulação, como no caso da via subcutânea, o metabolismo do animal ainda não se encontra alterado a ponto de ativar mecanismos de compensação eficientes que causariam elevação considerável no VC. Além disso, registrou-se uma leve diminuição na frequência respiratória apenas em animais tratados com 20µg de MWCNTs após 12 horas de exposição, o que pode ter colaborado para o leve aumento registrado no VC durante essas primeiras horas, apenas como um mecanismo de compensação da frequência.

A liberação prolongada do CNT através dessa via explica também o fato de o VC ainda se encontrar elevado após 21 dias, apesar de já não representar uma diferença estatisticamente significativa. Isso mostra que, para tal via, o organismo demora um pouco mais para restabelecer a respiração.

Após atingirem a circulação, os MWCNTs são direcionados principalmente para o fígado, baço e pulmões, e são excretados pelos rins. Diversos artigos demonstraram que uma vez no fígado, MWCNTs são aprisionados pelo sistema reticuloendotelial hepático, mais precisamente nas células de Kupffer (DENG et al., 2007; QU et al., 2009; LIANG et al., 2010; TANG et al., 2012; YANG et al., 2012; RAWAT et al., 2016). Essas células são macrófagos hepáticos, responsáveis pela fagocitose de patógenos ou substâncias nocivas ao organismo, formando um sistema de filtração de partículas bastante eficaz (GUYTON, HALL, 2011, p.373). Quando ocorrem danos ao tecido hepático, há o aumento de enzimas hepáticas no soro do animal, incluindo as enzimas ALT, AST e GGT (JI et al., 2009; ARAGON, YOUNOSSI, 2010; RAWAT et al., 2016). A ALT é uma enzima presente principalmente no citosol dos hepatócitos, o que a torna um indicador de dano hepático mais específico. Já a AST está presente em vários órgãos, como o fígado, músculos, cérebro, pâncreas e pulmões. No entanto, a grande maioria desta enzima está localizada nas mitocôndrias dos hepatócitos. Quando ocorrem danos dos nanotubos às mitocôndrias hepáticas, o aumento nos níveis de AST

ultrapassam os de ALT (JI et al., 2009; ARAGON, YOUNOSSI, 2010; BURTIS, BRUNS, 2016, p.322). No nosso trabalho, não foram registradas diferenças na concentração sérica dessas enzimas em nenhum dos grupos analisados em ambas as vias de administração, o que indica que, mesmo com o possível aumento do metabolismo mitocondrial, não houve dano ou toxicidade à organela dos hepatócitos ou ao tecido hepático em geral. Já a GGT é uma enzima de membranas e é um marcador de lesão no trato biliar (ARAGON, YOUNOSSI, 2010; BURTIS, BRUNS, 2016, p.324). Como também não houveram alterações nos níveis séricos da mesma, podemos concluir que os MWCNTs utilizados pelo nosso grupo não causaram obstruções nas vias biliares intra- ou extra-hepáticas. Os resultados do índice hepático do peso do órgão/peso corporal corroboram as análises bioquímicas, pois não foram encontradas diferenças significativas no tamanho do fígado dos animais nanoinjetados.

A CK é uma enzima catalisadora da fosforilação do ATP, e por isso encontra-se bastante presente no tecido muscular esquelético e no tecido cardíaco. Sua atividade sérica encontra-se elevada em casos de injúria, inflamação ou necrose dos mesmos (BURTIS, BRUNS, 2016, p.320). Os níveis de CK estudados não sofreram alterações após as nanoinjeções em ambas as vias de administração. Esse resultado mostra que o nanotubo utilizado não apresenta cardiotoxicidade, o que também é observado pelo índice cardíaco, já que não foram detectadas alterações no tamanho do coração dos camundongos tratados com os MWCNTs. Além disso, esse indicador nos mostra que não houve dano muscular causado pelo mesmo.

Com relação ao último indicador bioquímico utilizado, a ureia é o principal produto metabólico do catabolismo de proteínas do organismo e é excretada quase totalmente através dos rins. Portanto, os níveis séricos de ureia encontram-se elevados em casos de lesões renais (BURTIS, BRUNS, 2016, p.369). Em nosso estudo não foram notadas alterações nas concentrações séricas de ureia, bem como no índice renal dos animais avaliados. Também não foi observada diferença na quantidade de urina coletada entre nenhum dos grupos, após 24 horas de permanência nas gaiolas metabólicas. Os MWCNTs são excretados em sua maioria pelos rins, portanto há grande probabilidade de acumulação nesses órgãos (DENG et al., 2007; YANG et al., 2008; YANG et al.,

2012; RAWAT et al., 2016). No entanto, nossos resultados confirmam que não houveram alterações na função renal após a nanoinjeção.

Além do fígado, pulmões e rins, outro órgão geralmente bastante afetado pelos CNTs é o baço (DENG et al., 2007; YANG et al., 2008; LIANG et al., 2010; TANG et al., 2012). De todos os índices avaliados, o único grupo que apresentou diferenças com relação ao controle foi o do baço de animais injetados com 10µg de MWCNTs, após 21 dias de exposição. Alterações no índice esplênico podem significar que houveram lesões no órgão, ou a indução de resposta imunológica pelas nanopartículas.

Um fator muito importante para a indução de resposta imunológica ou toxicidade é a estabilidade da suspensão de CNT. Em menores concentrações, a amostra utilizada apresentou uma tendência à agregação, devido à seu alto peso molecular e a intensas forças intertubulares, como forças de van der Waals ou forças eletrostáticas (TAGMATARCHIS, PRATO, 2004; SMART et al., 2006). A aglomeração de partículas de MWCNT funcionalizados com COOH mostrou-se capaz de induzir inflamação anteriormente (QU et al., 2009). Portanto, acreditamos que a tendência de aglomeração dos nanotubos na menor concentração utilizada, causou uma reação imunológica de forma relativamente mais crônica que o restante dos efeitos do nanotubo nos animais. Da mesma forma, alterações na FR, VC e VM de animais das vias intraperitoneal e subcutânea apresentam um padrão mais crônico na concentração de 10µg do que nas de 20µg e 50µg. Possivelmente, houve o aprisionamento dos aglomerados de nanotubos no sistema reticuloendotelial do baço, e uma consequente inflamação, que acarretou alterações mais prolongadas nesses animais. Mesmo assim, a presença de aglomerados não causaram efeitos tóxicos em outros órgãos, de acordo com as análises bioquímicas e com os diferentes índices realizados.

Por fim, o índice cerebral obtido foi inalterado. Sendo assim, o MWCNT foi provavelmente incapaz de ultrapassar a barreira hematoencefálica e exercer efeitos nocivos ao sistema nervoso. A preocupação com a ultrapassagem da barreira é bastante importante para inalação de CNTs, mas pouco provável quando administrado pelas vias abordadas, apesar de já ter sido documentada (MADANI et al., 2013; KAFA et al., 2015).

6. CONCLUSÃO

No presente estudo, procuramos esclarecer aspectos relacionados à biodistribuição de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) funcionalizados com carboxilas (COOH) e ao seu efeito tóxico sistêmico *in vivo*.

Todos os animais sobreviveram à injeção de nanotubos e não apresentaram diferenças quanto à quantidade de comida ou água consumidos, ou perda de peso. A espirometria indicou um aumento geral agudo do volume corrente após as nanoinjeções, que se restabeleceu após 21 dias da exposição. Esse aumento ocorreu de forma mais rápida para animais injetados intraperitonealmente do que pela via subcutânea, o que mostra maior rapidez para o nanotubo alcançar a corrente sanguínea através dessa via. Não foram registradas diferenças nos indicadores bioquímicos, enquanto o índice acusou uma diminuição apenas no tamanho do baço na concentração de 10µg após 21 dias, podendo significar uma inflamação tardia devido à aglomeração das nanopartículas.

A elevação do volume corrente foi compatível com o aumento no metabolismo mitocondrial, característico para nanotubos de carbono. Ainda assim, esse aumento aparentemente não causou toxicidade no fígado, rins, pulmões, coração ou cérebro.

Tomados em conjunto, nossos resultados mostram que os nanotubos de carbono de paredes múltiplas utilizados neste estudo possuem boa biocompatibilidade e baixa toxicidade *in vivo*. Dessa forma, o uso dessas nanopartículas quando adequadamente sintetizadas, purificadas e funcionalizadas, revela-se compensador considerando-se sua importante capacidade carreadora de drogas ou antígenos, uma vez que não apresenta padrões cumulativos e não aparenta afetar funções vitais do animal em longo prazo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AILLON, K. L.; XIE, Y.; EL-GENDY, N.; BERKLAND, C. J.; FORREST, M. L. Effects of nanomaterial physicochemical properties on in vivo toxicity. **Adv Drug Deliv Rev**, 61(6): 457 - 466, 2009.

AQEL, A.; EL-NOUR, K. M. M. A.; AMMAR, R. A. A.; AL-WARTHAN, A. Carbon nanotubes, science and technology part (I) structure, synthesis and characterisation. **Arabian Journal of Chemistry**, 5(1): 1 - 23, 2012.

ARAGON, G.; YOUNOSSI, Z. M. When and how to evaluate mildly elevated liver enzymes in apparently healthy patients. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, 77(3): 195 - 204, 2010.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, 23(4): 629 - 643, 2010.

BELIN, T.; EPRON, F. Characterization methods of carbon nanotubes: a review. **Materials Science and Engineering**, 119 (B) (2): 105 - 118, 2005.

BURTIS, C. A.; BRUNS, D. E. **Tietz Fundamentos de Química Clínica e Diagnóstico Molecular**. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

DENG, X., G.; JIA, WANG, H.; SUN, H.; WANG, X.; YANG, S.; WANG, T.; LIU. Y. Translocation and fate of multi-walled carbon nanotubes in vivo. **Carbon**, 45(7): 1419 - 1424, 2007.

EATEMADI, A.; DARAEE, H.; KARIMKHANLOO, H.; KOUHI, M.; ZARGHAMI, N.; AKBARZADEH, A.; ABASI, M.; HANIFEHPOUR, Y.; JOO, S. W. Carbon nanotubes:

properties, synthesis, purification, and medical applications. **Nanosc Res Let**, 9: 393, 2014.

FIRME, C. P.; BANDARU, P. R. Toxicity issues in the application of carbon nanotubes to biological systems. **Nanomedicine**, 6(2): 245-256, 2010.

GHANBARI, F.; NASARZADEH, P.; SEYDI, E.; GHASEMI, A.; JOGHATAEI, M. T.; ASHTARI, K.; AKBARI, M. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction induced by single- and multiwall carbon nanotubes: A comparative study. **J Biomed Mater Res**, 105 (A): 2047 – 2055, 2017.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

HIRANO, S.; KANNO, S.; FURUYAMA, A. Multi-walled carbon nanotubes injure the plasma membrane of macrophages. **Toxicol. Appl. Pharm.** 232 : 244 – 251, 2008.

HUANG, X.; TENG, X.; CHEN, D.; TANG, F.; HE, J. The effect of the shape of mesoporous silica nanoparticles on cellular uptake and cell function. **Biomaterials**, 31(3): 438 - 448, 2010.

IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, 354: 6, 1991.

JAIN, K. A.; MEHRA, N. K.; LODHI, N.; DUBEY, V.; MISHRA, D. K.; JAIN, P. K.; JAIN, N. K. Carbon nanotubes and their toxicity. **Nanotoxicology**, 1(3): 167 – 197, 2007.

JI, Z.; ZHANG, D.; LI, L.; SHEN, X.; DENG, X.; DONG, L.; WU, M.; LIU, Y. The hepatotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in mice. **Nanotechnology**, 20: 445101, 2009.

KAFA, H.; WANG, J. T. W.; RUBIO, N.; VENNER, K.; ANDERSON, G.; PACH, E.; BALLESTEROS, B.; PRESTON, J. E.; ABBOTT, N. J.; JAMAL, K. T. A. The interaction of carbon nanotubes with an in vitro blood-brain barrier model and mouse brain in vivo. **Biomaterials**, 53: 437 – 452, 2015.

KAM, N. W. S.; LIU, Z.; DA, H. Carbon nanotubes as Intracellular Transporters for Proteins and DNA: An Investigation of the Uptake Mechanism and Pathway. **A new. Chem. Int. Ed.**, 45: 577 - 581, 2006.

KAYAT, J.; GAJBHIYE, V.; TEKADE, R. K.; JAIN, N. K. Pulmonary toxicity of carbon nanotubes: a systematic report. **Nanomedicine**, 7: 40 - 49, 2011.

KOSTARELOS, K.; LACERDA, L.; PASTORIN, G.; WU, W.; WIECKOWSKI, S. B.; LUANGSIVILAY, J.; GODEFROY, S.; PANTAROTTO, D.; BRIAND, J. P.; MULLER, S.; PRATO, M.; BIANCO, A. Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type. **Nat Nanotechnol**, 2(2): 108 - 13, 2007.

KUNZMANN, A.; ANDERSSON, B.; THURNHER, T.; KRUG, H.; SCHEYNIUS, A.; FADEEL, B. Toxicology of engineered nanomaterials: focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. **Biochim Biophys Acta**, 1810(3): 361 - 373, 2011.

LACERDA, L.; BIANCO, A.; PRATO, M.; KOSTARELOS, K. Carbon nanotubes as nanomedicines: From toxicology to pharmacology. **Adv Drug Deliv Rev**, 58: 1460 - 1470, 2006.

LANONE, S.; BOCZKOWSKI, J. Biomedical applications and potential health risks of nanomaterials: molecular mechanisms. **Current Mol. Med.**, 6: 651 - 663, 2006.

LEHMAN, J. H.; TERRONES, M.; MANSFIELD, E.; HURST, K. E.; MEUNIER, V. Evaluating the characteristics of multiwall carbon nanotubes. **Carbon**, 49(8): 2581 - 2602, 2011.

LIANG, G.; YIN, L.; ZHANG, J.; LIU, R.; ZHANG, T.; YE, B.; PU, Y. Effects of subchronic exposure to multi-walled carbon nanotubes on mice. **J Toxicol Env Heal**, 73 (A): 463 - 470, 2010.

MADANI, S. Y.; MANDEL, A.; SEIFALIAN, A. M. A concise review of carbon nanotube's toxicology. **Nano Reviews**, 4: 21521, 2013.

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C.; MURRAY, J. C. Nanomedicine: current status and future prospects. **FASEB J**, 19(3): 311 - 330, 2005.

MULLER, J.; HUAUX, F.; MOREAU, N.; MISSON, P.; HEILIER J. F.; DELOS, M.; ARRAS, M.; FONSECA, A.; NAGY, J. B.; LISON, D. Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 207: 221 - 231, 2005.

PIEROTTI, M. A.; LOMBARDO, C.; ROSANO, C. Nanotechnology: going small for a giant leap in cancer diagnostics and therapeutics. **Tumori**, 94(2): 191 - 196, 2008.

POLAND, C. A.; DUFFIN, R.; KINLOCH, I.; MAYNARD, A.; WALLACE, W. A. H.; SEATON, A.; STONE, V.; BROWN, S.; MACNEE, W.; DONALDSON, K. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. **Nature Nanotechnol**, 3: 423 - 8, 2008.

QU, G.; BAI, Y.; ZHANG, Y.; JIA, Q.; ZHANG, W.; YAN, B. The effect of multiwalled carbon nanotube agglomeration on their accumulation in and damage to organs in mice. **Carbon**, 47: 2060 - 2069, 2009.

RAWAT, N.; SANDHYA, K.; SUBAHARAN, M.; ESWARAMOORTHY, M.; KAUL, G. Comparative in vivo toxicity assessment places multiwalled carbon nanotubes at a higher level than mesoporous silica nanoparticles. **Toxicol Ind Health**, 33(2): 182-192, 2016.

SMART, S. K.; CASSADY, A. I.; LU, G. Q.; MARTIN, D. J. The biocompatibility of carbon nanotubes. **Carbon**, 44(6): 1034 - 1047, 2006.

TAGMATARCHIS, N.; PRATO, M. Functionalization of carbon nanotubes by 1,3-dipolar cycloadditions. **J Mater Chem**, 14(4): 437 - 9, 2004.

TANG, S.; TANG, Y.; ZHONG, L.; MURAT, K.; ASAN, G.; YU, J.; JIAN, R.; WANG, C.; ZHOU, P. Short- and long-term toxicities of multi-walled carbon nanotubes in vivo and in vitro. **J. Appl. Toxicol**, 32(11): 900 - 12, 2012.

TURNER, P. V; BRABB, T.; PEKOW, C.; VASBINDER, M. A. Administration of Substances to Laboratory Animals: Routes of Administration and Factors to Consider. **J Am Assoc Lab Anim Sci**, 50(5): 600 - 613, 2011.

VIDU, R.; RAHMAN, M.; MAHMOUDI, M.; ENACHESCU, M.; POTECA, T. D.; OPRIS, I. Nanostructures: a platform for brain repair and augmentation. **Front Syst Neurosci**, 8: 91, 2014.

WÖRLE-KNIRSCH, J. M.; PULSKAMP, K.; KRUG, H. F. Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. **Nano Lett**, 6(6): 1261 – 8, 2006.

YANG, S. T.; WANG, X.; JIA, G.; GUC, Y.; WANGD, T.; NIEA, H.; GEE, C.; WANG, H.; LIU, Y. Long-term accumulation and low toxicity of single-walled carbon nanotubes in intravenously exposed mice. **Toxicology Letters**, 181: 182 - 189, 2008.

YANG, S. T.; LUO, J.; ZHOU, Q.; WANG, H. Pharmacokinetics, Metabolism and Toxicity of Carbon Nanotubes for Bio-medical Purposes. **Theranostics**, 2(3): 271 - 282, 2012.