

Estudo *in vivo* da toxicidade e citotoxicidade de biocerâmicos de nanohidroxiapatita e nanotubos de carbonos funcionalizado com óxido de grafeno

In vivo study of the toxicity and cytotoxicity of nano-hydroxyapatite and carbon nanotubes functionalized with graphene oxide

DOI:10.34117/bjdv6n10-312

Recebimento dos originais: 10/09/2020

Aceitação para publicação: 15/10/2020

Francilio de Carvalho Oliveira

Doutorado em Engenharia Biomédica Universidade Brasil
Faculdade Estácio Teresina, Av. Dos Expedicionários 790, CEP 64,046-700, Teresina- PI, Brasil
Centro Universitário Uninovafapi. Rua Vitorino Orthiges Fernandes, 6123 CEP 64073-505, -
Uruguai, Teresina - PI, Brasil
Email. francilio.oliveira@hotmail.com

Manuel Henrique de Sousa Cunha

Graduando em Biomedicina – UNINOVAFAPI
Centro Universitário Uninovafapi. Rua Vitorino Orthiges Fernandes, 6123 - CEP 64073-
505, - Uruguai, Teresina - PI, Brasil
Email: henriquemanuel975@gmail.com

Mariana Carneiro Brito

Graduanda em Biomedicina – UNINOVAFAPI
Centro Universitário Uninovafapi. Rua Vitorino Orthiges Fernandes, 6123 - CEP 64073-
505, - Uruguai, Teresina - PI, Brasil
Email: marianacarneiro38@gmail.com

Vinicius Luis de Oliveira Cantuário

Graduando em Biomedicina – UNINOVAFAPI
Centro Universitário Uninovafapi. Rua Vitorino Orthiges Fernandes, 6123 - CEP 64073-
505, - Uruguai, Teresina - PI, Brasil
Email: viniciuscantuario08@gmail.com

Jancineide Oliveira de Carvalho

Doutorado em Engenharia Biomédica Universidade Brasil
Centro Universitário Uninovafapi. Rua Vitorino Orthiges Fernandes, 6123, CEP 64073-
505, - Uruguai, Teresina - PI, Brasil
Email: jdolicar2@hotmail.com

Anderson Oliveira Lobo

Pós-doutorado em Bioengenharia - Harvard-MIT; Doutorado em Ciências – ITA
LIMAV-Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados. Programa de Pós-Graduação
em Ciências e Engenharia de Materiais (PPGCM), Universidade Federal do Piauí (UFPI),
CEP 64049-550, Teresina, PI, Brasil.
Email. Lobo@ufpi.edu.br

RESUMO

Os biocerâmicos a base de nanohidroxiapatita e nanotubos de carbono funcionalizados com óxido de grafeno tem demonstrado ser um biomaterial com propriedades químicas, física e biológicas atraentes para o processo de regeneração óssea. Assim objetivou-se nesse estudo determinar a toxicidade e citotoxicidade destes biomateriais através do teste de *allium cepa*. Para tanto, soluções de nanohidroxiapatita (nHAp) e das dispersões de nanotubos de carbono funcionalizado com óxido de grafeno (GNR) em meio aquoso em concentrações variando de 30 a 150 µg/mL, foram colocados em contato com os meristemas de espécie de *allium cepa*(cebolas) por um período de 72h. As raízes germinadas foram extraídas, medidas e coradas para a determinação da citotoxicidade e genotoxicidade. Os resultados indicaram uma não toxicidade do nHAp em concentrações inferiores a 150 µg/mL ($6,59 \pm 3,26$); quando comparados ao controle negativo (CN = $10,77 \pm 1,89$) e controle positivo (CP = $3,77 \pm 0,79$). Enquanto que os GNRs não apresentaram toxicidade, citotoxicidade ou genotoxicidade em nenhuma das concentrações investigadas. Entretanto, o nHAp indicou uma citotoxicidade e genotoxicidade na concentração acima de 120 µg/mL. Portanto, sugere-se as concentrações entre 30 a 120 µg/mL dos GNR e nHAp como seguras, quanto as aspecto aqui investigados, para estudos que envolvam processos de regeneração de tecidos biológicos.

Palavras chaves: Biocerâmicos, Biomateriais, Toxicidade.

ABSTRACT

The nano-hydroxyapatite-based bioceramics and carbon nanotubes functionalized with graphene oxide have proven to be a biomaterial with attractive chemical, physical and biological properties for the bone regeneration process. The aim of this study was to determine the toxicity and cytotoxicity of these biomaterials through the test of *allium cepa*. For this purpose, solutions of nano-hydroxyapatite (nHAp) and the dispersions of carbon nanotubes functionalized with graphene oxide (GNR) in aqueous medium in concentrations ranging from 30 to 150 µg/mL, were placed in contact with the meristems of *allium cepa* species (onions) for a period of 72 hours. The germinated roots were extracted, measured and stained for the determination of cytotoxicity and genotoxicity. The results indicated a non toxicity of nHAp in concentrations below 150 µg/mL (6.59 ± 3.26); when compared to the negative control (CN = 10.77 ± 1.89) and positive control (CP = 3.77 ± 0.79). While the GNRs showed no toxicity, cytotoxicity or genotoxicity at any of the investigated concentrations. However, nHAp indicated cytotoxicity and genotoxicity at concentrations above 120 µg/mL. Therefore, the concentrations between 30 to 120 µg/mL of GNR and nHAp are suggested as safe, as the aspect investigated here, for studies involving processes of regeneration of biological tissues.

Keywords: Bioceramics, Biomaterials, Toxicity

1 INTRODUÇÃO

Diversos biomateriais vêm despertando o interesse da comunidade científica frente as suas propriedades de biocompatibilidade em processos de recuperação, substituição ou de reparo de órgãos ou de tecidos biológicos (Rodrigues L.B 2013). Dentre estes encontram-se os biocerâmicos os quais tem-se como exemplo, a nanohidroxiapatita e o nanotubos de carbonos (Ribeiro et al 2014; Gao et al 2017, Estambasse & Foschini 2020).

A hidroxiapatita sintética possui propriedades similares a constituição mineral do tecido ósseo, mostrando-se eficaz ao processo de regeneração desse tipo de tecido (Jr S.2014). Em sua escala nanométrica, ainda apresenta algumas lacunas quanto aos aspectos tóxico e citotóxico, ao meio celular, visto que o estudo da geração dos nanomateriais apresentam uma série de divergências quanto aos efeitos destes compostos ao sistema biológico (Calasans-Maia et al 2016).

Não distante da nanohidroxiapatita(nHAp) estão os nanotubos de carbonos (NTC) que podem ser obtidos com camadas simples (NTCSW) ou com camadas múltiplas (NTCMW) ou ainda funcionalizado, como por exemplos os nanotubos de carbono de múltiplas camadas funcionalizados com óxido de grafeno (nGNR) usados neste estudo (Santos et al 2018, Lobo et al 2012).

Diversos são os métodos de identificação da toxicidade e citotoxicidade dos biomateriais, sendo estes *in vitro* ou *in vivo*. Neste estudo optou-se pelo método do *Allium cepa*, visto ser este um ensaio *in vivo* com um procedimento metodológico fiável e eficaz em seu propósito, além de ser utilizado por diversos autores com um alto grau de confiabilidade (Arraes et al 2012; Fiskesjö G 1985)

A identificação das concentrações que possam causar a toxicidade, citotoxicidade ou genotoxicidade destes biocerâmicos é de fundamental importância para garantir a sua utilização de forma segura, individualizada ou na forma híbrida, como sugestivos em estudos que envolvam processos de reparo de tecidos, em especial do sistema ósseo. Desde modo objetivou determinar a concentração de soluções e dispersões dos biocerâmicos de nHAp e nGNR que possam vir a causar uma toxicidade ou genotoxicidade ao meio celular, utilizando ensaios *in vivo*.

2 MÉTODOS

2.1 REVISÃO SISTEMÁTICA COM ESTRATÉGIA DE PICO

Utilizou-se como estratégia de pesquisa o PICO que é uma sigla e representa-se por Paciente, Intervenção, Comparação e “Outcomes” (Desfecho). Segundo, Santos, Pimenta e Nobre (2017) a Prática Baseada em Evidências (PBE) identifica a efetividade de um certo tratamento ou diagnóstico e faz estratégias para avaliação de qualidade dos estudos. Definiu-se, então como “P” a amostra dos estudos, ou seja, os biocerâmicos (nHAp e nGNR), o “I” como os métodos utilizados em teste de toxicidade, “C” a comparação entre os teste *in vitro* e *in vivo*, e o “O” como o desfecho dos estudo.

2.2 SÍNTESE DOS CERÂMICOS

A síntese dos cerâmicos de nanohidroxiapatita (nHAp) foi realizado utilizando sais de $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ e $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. A funcionalização dos nanotubos de carbonos de múltiplas paredes (MWNTCs) para a consequente exposição das folhas de grafeno oxidadas (GO, óxido de grafeno) foi conduzida utilizando um tratamento a plasma em um reator pulsado de corrente contínua, com uma taxa de fluxo de oxigênio. O procedimento na íntegra da funcionalização dos nanotubos de carbonos verticalmente alinhado com múltiplas camadas com óxido de grafeno (GNR) encontra-se descrita em Oliveira et al 2019

2.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES E DISPERSÕES

Preparou-se soluções aquosas de nanohidroxiapatita (nHAp) nas concentrações de 30, 80, 120 e 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$, assim como as dispersões de nanotubos de carbonos (GNR) nas mesmas concentrações.

2.4 TESTE *IN VIVO*

Para a avaliação da toxicidade e citotoxicidade foi realizado o teste de *Allium cepa*. Previamente, foram selecionadas cebolas com o mesmo tamanho, e em seguida, realizou-se a retirada das raízes secas; posteriormente, foi retirado o parênquima central da coroa de brotamento (fazendo uma pequena incisão circular) para aumentar a absorção das soluções e a uniformidade de brotamento e crescimento. Para o teste, adotou-se um tempo de exposição dos meristemas das cebolas de 72 horas às substâncias teste. Para cada grupo, adotou-se uma quantidade de 5 unidades, as cebolas foram mantidas em local seco e protegidas da luz. Após o tempo de exposição, as raízes foram medidas em milímetros e aquelas com tamanhos superiores a 20,0 mm foram excluídas dos dados. As demais foram comparadas com o controle negativo (água de torneira), e solução salina de sulfato de cobre (0,006 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como controle positivo.

Para a preparação das lâminas, as raízes previamente fixadas em solução Carnoy, foram lavadas com água destilada (3 lavagens de 5 min) para remoção total da solução fixadora; em seguida, as raízes foram colocadas em uma solução de 1N HCL a 60° em banho Maria por 11 minutos sendo temperatura e tempo medidos precisamente. Após esta etapa, as mesmas foram lavadas novamente com água destilada (3 lavagens de 5 min) e transferidas para um frasco cor âmbar com reativo de Shiff por aproximadamente 2 horas seguido de lavagens para a remoção total do reativo. Elas foram colocadas sobre uma lâmina sendo destacada apenas a região meristemática da raiz. Foi adicionada uma gota de carmim acético 2%; e prosseguiu-se com a técnica de scratch

para a confecção da lâmina. O processo de fotomicrográfrica foi realizado em microscópio óptico em aumento de 400X, sendo analisadas 5000 células, sendo 1000 células por lâmina. (BAGATINI, 2007)

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada a análise de variância em uma via ANOVA seguida do pós-teste de Múltipla Comparação Tukey's com o auxílio do *software* GraphPadPrism version 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os resultados foram apresentados como a média \pm desvio padrão e considerando estatisticamente significantes se $p \leq 0.05$ com nível de confiança de 95%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentro do estudo de revisão sistemática com estratégia de pico, em que definiu-se “P”, “I”, “C” e o “O” como (Tabela 01), observou-se que embora o número de publicações envolvendo os biomateriais aqui investigado para o período destinado, utilizando os descritores, em idioma português e inglês, nanohidroapatita e nanotubos de carbonos, “*nanohydroxyapatite*” and “*carbono nanotubes*” esteja em torno de 39 publicações, quando do seu cruzamento com o descritor, toxicidade ou “*toxicity*”, esse número reduz significativamente (Tabela 1).

Tabela 01. Resultado da estratégia de PICO na base de dados Scieo, utilizando as palavras chaves: nanohydroxyapatite, nanohydroxyapatite and toxicity carbono nanotubes e o cruzamento carbono nanotubes and toxicity no período de 2019 a agosto de 2020.

Acrônimo	Descrição	Total de estudos	Autor/Ano
P	biocerâmicos nHAp	0	
	nGNR	2	
I	métodos utilizados em teste de toxicidade	MWNTC (toxicidade oral aguda)	SIАFAKA, Panoraia et al (2019)
		MWNTC (ensaio de MTT-Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)	OLIVEIRA, Thaís Larré et al (2020)
C	comparação entre os tipos de estudos (<i>in vitro</i> e/ou <i>in vivo</i> .)	MWNTC estudo <i>in vivo</i>	SIАFAKA, Panoraia et al (2019)
		MWNTC estudo <i>in vivo</i>	

			OLIVEIRA, Thaís Larré et al (2020)
O	desfecho do estudo	MWNTC não apresentou efeitos adversos a morfologia dos órgãos observados.	SIAFAKA, Panoraia et al (2019)
		MWNTC não afetaram o crescimento celular	OLIVEIRA, Thaís Larré et al (2020)

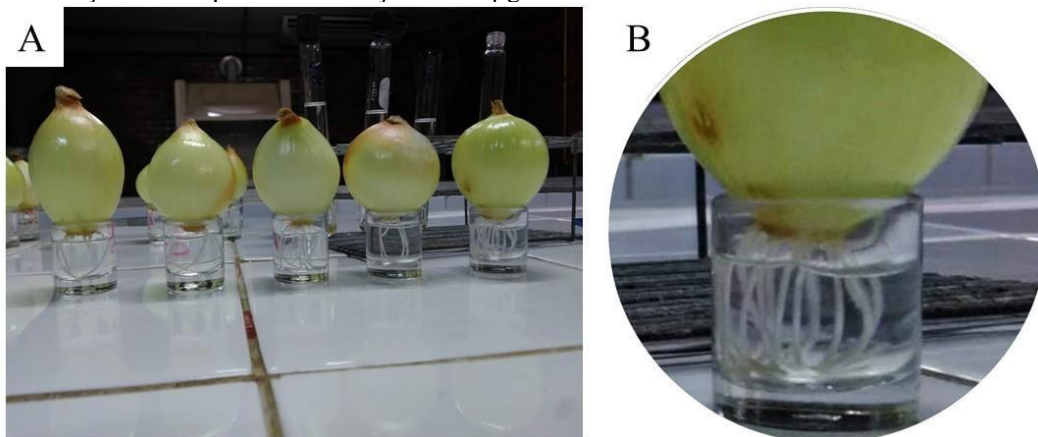
Fonte: autores 2020

Entretanto, esses dados revelam a necessidade do aumento no número de estudo que venha investigar as possíveis reações tóxicas ou citotóxicas que este tipo de material possa vir causar ao sistema biológico, visto serem estes, potenciais biomateriais utilizáveis em processos de liberação de fármacos, reparos de órgão e/ou regeneração de tecido, justificando assim a relevância deste estudo (Oliveira et al 2020; Ricci et al, 2017; Erol et 2017)

3.1 TÓXICIDADE

Os ensaios *in vivo* utilizando o método de *allium cepa* tem sido utilizado para a determinação da toxicidade através da germinação das raízes das cebolas (Figura 1), citotoxicidade e outras formas de agregação à célula como danos cromossômicos ocasionados por nanomateriais. Este além de ser um método de baixo custo apresenta uma confiabilidade estatisticamente significativa frente aos resultados obtidos (Escobedo et al. 2020; Batista et al. 2018; Souza et al. 2018).

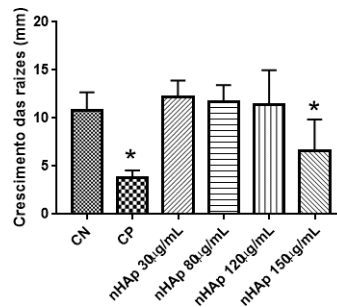
Figura 1: (A) Grupo de cebolas que desenvolveram germinação durante o período de 72h, (B) ampliação de cebola germinada na solução de nHAp em concentração de 120µg/mL.



Fonte: Autores 2020

Os resultados da toxicidade para as nanohidroxiapatita (nHAp) está representada na figura 2. Nela pode-se observa-se que de quatro concentrações, 30 $\mu\text{g/mL}$ ($12,18 \pm 1,72$) 80 $\mu\text{g/mL}$ ($11,65 \pm 1,77$); 120 $\mu\text{g/mL}$ ($11,41 \pm 3,5$); 150 $\mu\text{g/mL}$ ($6,59 \pm 3,26$); CN ($10,77 \pm 1,89$) e CP ($3,77 \pm 0,79$), apenas a de maior concentração, apresentou um comportamento toxico quando comparada ao controle positivo.

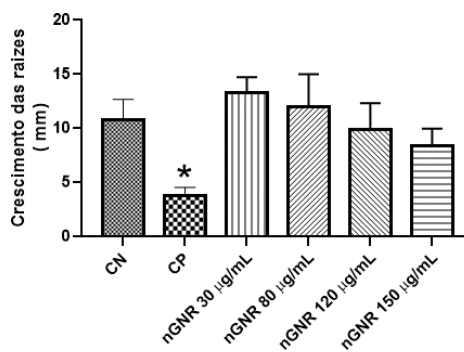
Figura 2: Avaliação da toxicidade pela evolução das raízes (em milímetros) após exposição ao compósito por 72 horas em solução de nHAp nas concentrações de 30 $\mu\text{g/mL}$, 80 $\mu\text{g/mL}$, 120 $\mu\text{g/mL}$ e 150 $\mu\text{g/mL}$. As diferenças entre os grupos foram estabelecidas por Análise de Variância (ANOVA), seguido de t-Student-Neuman-Keuls comparado com o grupo controle negativo (CN) e controle positivo (CP). * indica uma diferença estatisticamente significativas com $p \leq 0,05$ comparado ao CN.



Fonte, autores 2020

Para os nGNR (figura 3) evidenciou-se que a germinação das raízes nas quatro suspensões utilizadas 30 $\mu\text{g/mL}$ ($13,26 \pm 1,746$) 80 $\mu\text{g/mL}$ ($12,03 \pm 2,97$); 120 $\mu\text{g/mL}$ ($9,89 \pm 2,42$); 150 $\mu\text{g/mL}$ ($8,40 \pm 1,59$); CN ($10,77 \pm 1,89$) e CP ($3,77 \pm 0,79$), seguiu o comportamento de similaridade ao controle negativo(CN), tendo algumas concentrações com melhor processo de germinação que o CN.

Figura 03: Avaliação da toxicidade pela evolução das raízes (em milímetros) após exposição ao compósito por 72 horas em solução de nGNR nas concentrações de 30 $\mu\text{g/mL}$, 80 $\mu\text{g/mL}$, 120 $\mu\text{g/mL}$ e 150 $\mu\text{g/mL}$. As diferenças entre os grupos foram estabelecidas por Análise de Variância (ANOVA), seguido de t-Student-Neuman-Keuls comparado com o grupo controle negativo (CN) e controle positivo (CP). * indica uma diferença estatisticamente significativas com $p \leq 0,05$ comparado ao CN.

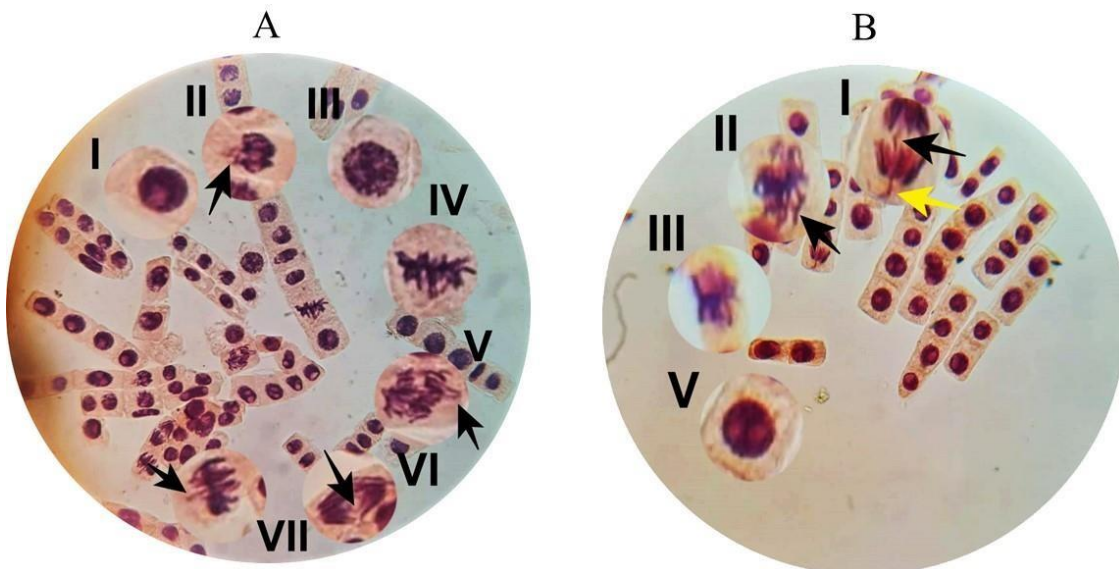


Fonte, autores 2020

Alguns fatores como a síntese envolvida no processo de obtenção dos biomateriais a sua morfologia, suas características químicas, física e biológica podem estar associados a toxicidade destes como meio biológico (Santos et al 2017). Estudos relatam que os biomateriais a base de nHAp e nanotubos de carbonos (NTC) possuem biocompatibilidade e são atóxicos em determinadas concentrações. A funcionalização dos NTCs é outro fator a ser observado em seu processo de obtenção, visto que Zhang e colaboradores (2007) relataram que os NTCs após funcionalizados, mantiveram a sua viabilidade celular em culturas de queratinócito. Assim como, Ricci e colaboradores (2017) que evidenciam a não toxicidade de MWCNT funcionalizados com óxidos de grafeno (GO) em até $100\mu\text{g mL}^{-1}$ corroborando com nossos achados.

Não foi verificado através da divisão celular uma citotoxicidade para o nHAp nas concentrações de 30, 80, 120 $\mu\text{g/mL}$ entretanto, a concentração de 150 $\mu\text{g/mL}$ demonstrou além de uma alteração significativa nesse processo, ainda efeitos genotóxicos indicando efeitos mutagênicos, com irregularidades nas divisões mitóticas e quebras cromossômicas, conforme figura 4.

Figura 4. Fotomicrográfica das radículas do *Allium cepa* em solução de nHAp a $150\mu\text{g/mL}$. (A) I. célula em interfase normal; II. célula em interfase com quebra cromossômica (seta preta); III. célula em prófase normal; IV. célula em metáfase normal; V. célula indicando metáfase com divisão desorganizada e quebra cromossômica com cromossomo perdido (seta preta); VI. célula em anáfase com ponte de cromossômica (seta preta) e VII. célula em metáfase com quebra cromossômica. (B) I. célula em anáfase com ponte de cromossômica (seta preta) e quebra cromossômica (seta amarela); II. célula em metáfase com quebra cromossômica; III. Metáfase normal e IV. célula em interfase normal. Campo de 400x Obs.: as partes circuladas estão ampliadas.

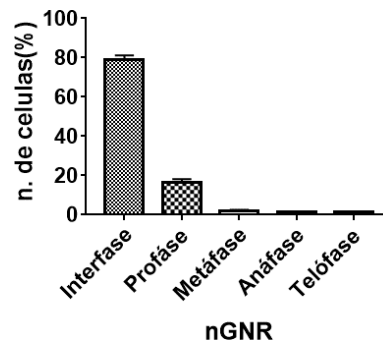


Fonte: autores 2020

Calasans-Maia e colaboradores (2015) evidenciaram a citocompatibilidade de pré-osteoblastos da linhagem murinos (MC3T3-E1) com a nHAp quando comparados ao grupo controle experimental. Assim como, Nithya & Sundaram (2015), verificaram que as células fibroblastos NIH-3T3 expostas a um compósito com nHAp/PCL propiciaram uma boa viabilidade celular e uma menor citotoxicidade em relação ao PCL puro. Entretanto nossos achados indicam que em ensaios *in vivo* o comportamento deste biocerâmico foi adverso aos relatados, em especial na maior concentração.

Os GNRs não apresentaram citotoxicidade nas concentrações investigadas (Figura 5), assim como não foram observados processos de agressões ao meio celular, os quais poderiam promover a genotoxicidade ou mutagenicidade do biomaterial.

Figura 5 : Média do número de células (%) por fase celular para o GNR nas concentrações de 30 à 150 µg/mL .



Fonte: autores 2020

Os dados existentes na literatura quanto à genotoxicidade de biomateriais à base de MWNTC-GO e nHAp, também sugerem divergências. Segundo Thurnherr e colaboradores (2011) os MWCNTs não apresentam efeitos genotóxicos . Outros autores sugerem que os MWNTCs não causam danos ao DNA e estes possuem ausência para toxicidade crônica *in vitro* e *in vivo*. Catalan e colaboradores (2016) realizaram uma bateria de testes *in vivo* e *in vitro* de genotoxicidade para esclarecer o potencial de toxicidade genética de nanotubos de carbono de parede simples (SWCNTs) , seus achados evidenciaram a não genotoxicidade às células de leucócitos e da medula óssea dos animais testado, assim como uma não toxicidade para os achados *in vitro*, corroborando com nossos achados.

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos aqui evidenciaram uma escassez de estudos, entre os anos de 2019 a 2020, a cerca da toxicidade destes biomateriais, indicando a necessidade da ampliação de teste *in vivo* que não se utilize de modelo animais, como é o caso do *Allium cepa*, afim de garantir uma seguridade quanto a concentração a ser utilizada em modelos animais. Portanto este estudo concluiu que os nHAp e nGNR podem ser utilizados para este fim em concentrações que variem de 30 a 120 µg/mL.

AGRADECIMENTOS

F.C.O, agradece ao programa de bolsa de pesquisa e produtividade da Faculdade Estácio e ao Centro Universitário Uninovafapi pelo apoio financeiro ao projeto.

REFERENCIAS

ARRAES AIOM, LONGHIN SR. **Otimização de ensaio de toxicidade utilizando o bioindicador *allium cepa* como organismo teste.** Enciclopédia Biosf. 2012; 8(14): 1958-1972

BAGATINI M. D; SILVA A. C. F; TADESCO S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.17 pgs. 444-447, 2007.

BATISTA-GALLEP, Tatiane Balbo et al. Effects of commercial nanoparticles of iron oxide (Fe₂O₃): Cytotoxicity, Genotoxicity and oxidative stress. **Química Nova**, v. 41, n. 9, p. 974-981, 2018.

CALASANS-Maia MD, MELO BR de, ALVES ATNN, RESENDE RF de B, LOURO RS, SARTORETTO SC, et al. **Cytocompatibility and biocompatibility of nanostructured carbonated hydroxyapatite spheres for bone repair.** J Appl Oral Sci. 2015;23(6):599-608

CATALÁN J, SIIVOLA KM, NYMARK P, LINDBERG H, SUHONEN S, JÄRVENTOUS H, et al. **In vitro and in vivo genotoxic effects of straight versus tangled multi-walled carbon nanotubes.** Nanotoxicology, 2016; 10(6): 794-806.

EMA M, IMAMURA T, SUZUKI H, KOBAYASHI N, NAYA M, NAKANISHI J. **Evaluation of genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in a battery of in vitro and in vivo assays.** Regul Toxicol Pharmacol, 2012; 63(2): 188-195.

EROL O, UYAN I, HATIP M, YILMAZ C, TEKINAY AB, GULER MO. **Recent advances in bioactive 1D and 2D carbon nanomaterials for biomedical applications.** Nanomedicine [Internet]. 2017 ;14(7):2433-2454

ESCOBEDO PAREDES, Cristhian Rafael Et Al. Citotoxicidad y genotoxicidad de nanopartículas de cobre sobre *Allium cepa* L.(Amaryllidaceae). **Arnaldoa**, v. 27, n. 1, p. 181-190, 2020.

- ESTAMBASSE, E.D , FOSCHINI, C.R. Development of an Automated Device for Surface Treatment in Titanium Samples with Hydroxyapatite, *Braz. J. of Develop.*, Curitiba, v. 6, n. 4, p.21472-21483, apr. 2020. ISSN 2525-8761
- FISKESJÖ G. **The Allium test as a standard in environmental monitoring.** *Hereditas.* 1985; 102: 99-112
- GAO C, FENG P, PENG S, SHUAI C. **Carbon nanotube, graphene and boron nitride nanotube reinforced bioactive ceramics for bone repair.** Vol. 61, *Acta Biomaterialia.* 2017. p. 1–20
- JUNIOR S A, ALLEGRINI M R F, YOSHIMOTO M, SALLES M B de ABAH. **Bone repair using natural and nanometric hydroxyapatite “in vivo.”** *J Bi dentistry Biomater.* 2014;4(1):24-35
- NAYA M, KOBAYASHI N, ENDOH S, MARU J, HONDA K, EMA M, et al. **In vivo genotoxicity study of single-wall carbon nanotubes using comet assay following intratracheal instillation in rats.** *Regul Toxicol Pharmacol,* 2012; 64(1): 124-129
- NITHYA R, MEENAKSHI Sundaram N. **Biodegradation and cytotoxicity of ciprofloxacin-loaded hydroxyapatite-polycaprolactone nanocomposite film for sustainable bone implants.** *Int J Nanomedicine.* 2015;10: 119-127
- LOBO AO, RAMOS SC, ANTUNES EF, MARCIANO FR, TRAVA-AIROLDI VJ, Corat EJ. **Fast functionalization of vertically aligned multiwalled carbon nanotubes using oxygen plasma.** *Mater Lett.* 2012;70: 89-93
- OLIVEIRA, Thaís Larré et al . DNA nanovaccines prepared using LemA antigen protect Golden Syrian hamsters against *Leptospira* lethal infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** Rio de Janeiro , v. 115, e190396, 2020 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762020000100311&lng=en&nrm=iso>. access on 25 Sept. 2020. Epub Apr 17, 2020. <https://doi.org/10.1590/0074-02760190396>.
- OLIVEIRA FC, CARVALHO JO, GUSMÃO SBS, et al. High loads of nano-hydroxyapatite/graphene nanoribbon composites guided bone regeneration using an osteoporotic animal model. *Int J Nanomedicine.* 2019;14:865-874. Published 2019 Jan 29. doi:10.2147/IJN.S192456
- RIBEIRO Í dos A, ALMEIDA R dos S, ROCHA DN da, SILVA MHP da, Miguel FB, Rosa FP. **Biocerâmicas e polímero para a regeneração de defeitos ósseos críticos.** *Rev Ciências Médicas e Biológicas.* 2014; 3: 298-302
- RICCI R, LEITE NCS, DA-SILVA NS, PACHECO-SOARES C, CANEVARI RA, MARCIANO FR, et al. **Graphene oxide nanoribbons as nanomaterial for bone regeneration:** Effects on cytotoxicity, gene expression and bactericidal effect. *Mater Sci Eng C [Internet].* 2017;78:341–8
- RODRIGUES LB. **Aplicações de biomateriais em ortopedia.** *Estud Tecnológicos em Eng [Internet].* 2013;9(2):63–76
- SANTOS, Cristina Mamédio da Costa; PIMENTA, Cibele Andrucio de Mattos and NOBRE, Moacyr Roberto Cuce. A estratégia PICO para a construção da pergunta de pesquisa e busca de evidências. *Rev. Latino-Am. Enfermagem [online].* 2007, vol.15, n.3 [cited 2020-09-21], pp.508-

511. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-11692007000300023&lng=en&nrm=iso>. ISSN 1518-8345. <https://doi.org/10.1590/S0104-11692007000300023>

SANTOS RJ, VIEIRA MT. **Toxicidade dos nanotubos de carbono no sistema cardiovascular**. Sociedade Portuguesa de Cardiologia 2017;out-dez (45):28-33

SIAFAKA, Panoraia et al . Design and characterization of nanocarriers loaded with Levofloxacin for enhanced antimicrobial activity; physicochemical properties, in vitro release and oral acute toxicity. **Braz. J. Pharm. Sci.**, São Paulo , v. 55, e18295, 2019 .Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-82502019000100514&lng=en&nrm=iso>. access on 25 Sept. 2020. Epub Aug 12, 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/s2175-97902019000118295>.

SOUZA, Reiane Moellmann et al. Avaliação dos efeitos das nanopartículas de prata de diferentes dimensões em células meristemáticas de *Allium cepa* e *Vicia faba*. 2018.

THURNHERR T, BRANDENBERGER C, FISCHER K, DIENER L, MANSER P, MAEDER-ALTHAUS X, et al. **A comparison of acute and long-term effects of industrial multiwalled carbon nanotubes on human lung and immune cells in vitro**. Toxicol Lett. 2011; 200 (3): 176-186.