

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**



“A arte alimenta-se de ingenuidades, de imaginações infantis que ultrapassam os limites do conhecimento; é aí que se encontra o seu reino. Toda a ciência do mundo não seria capaz de penetrá-lo.”  
*(Lionello Venturi)*



*Meus pais,  
Mário J. R. Palma e  
Ernestina B. da S. Palma.*





## **Agradecimentos**

Ao conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo auxílio financeiro.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais – INPE, pela oportunidade de estudo e utilização de suas instalações.

Ao Laboratório Associado de Sensores e Materiais – LAS, pela oportunidade de utilização de suas instalações.

Ao orientador Prof. Dr. Evaldo José Corat, pelo conhecimento passado, pela orientação e apoio na realização deste trabalho.

A Prof. Dr. Cristina Pacheco Soares, pelo conhecimento passado, pela orientação e apoio na realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Dinâmica de Compartimentos Celulares - UNIVAP, pela oportunidade de utilização de suas instalações.

Aos amigos de laboratório Erica Freire Antunes e Anderson de Oliveira Lobo, pelo conhecimento passado, paciência e ajuda na realização deste trabalho.



## **AVALIAÇÃO “IN VITRO” DA CITOTOXICIDADE DE FILMES DE NANOTUBOS DE PAREDES MÚLTIPLAS (MWNTs)**

### **RESUMO**

Atualmente materiais nanoestruturados despertam grandes interesses na área de bioengenharia. Suas configurações e propriedades físico-químicas influenciam nas interações celulares que conduzem à regeneração de tecidos, sendo vistos como um avanço em superfícies implantáveis. Dentro da classe de materiais nanoestruturados os Nanotubos de Carbono têm grande potencial para aplicações biomédicas, devido às suas propriedades únicas, tais como, alta condutividade elétrica, alta estabilidade química, e alta resistência mecânica. Para que um novo material possa ser incorporado em aplicações biomédicas, torna-se necessário que sejam pesquisadas a toxicidade e a biocompatibilidade, onde são avaliados a habilidade e o desempenho do material em meios biológicos. O objetivo deste trabalho foi a realização de testes de biocompatibilidade “*in vitro*” de superfícies de silício recobertas com nanotubos de carbono. Os filmes foram crescidos sobre superfícies de silício no Laboratório Associado de Sensores e Materiais (LAS/INPE). Os testes de biocompatibilidade (citotoxicidade direto e adesão celular) foram realizados no Laboratório de Dinâmica de Compartimentos Intracelulares da UNIVAP. Para a realização dos testes utilizou-se linhagens de fibroblastos (L-929 - tecido conjuntivo de camundongo). Os testes mostraram que os Nanotubos de Carbono apresentaram biocompatibilidade com as células.



## **EVALUATION THE CITOTOXICITY OF MULTI-WALLED CARBON NANOTUBES (MWNTS) FILMS: IN VITRO TESTS**

### **ABSTRACT**

Currently, nano-structured materials are of great interest in the bioengineering. Its physico-chemical properties influence cellular interactions that lead to tissue regeneration. It is seen as an advance for implanted surfaces. Among nano-structured materials the Carbon Nanotubes has great potential for biomedical applications, due to its singular properties, such as, high electrical conductivity, high chemical stability, and high mechanical strength. For this new material incorporation in biomedical applications, it is necessary research on its toxicity and biocompatibility, to evaluate its ability and performance in biological systems. The objective of this work was to analyze the biocompatibility “in vitro” of silicon coated with carbon nanotubes. The films of carbon nanotubes had been grown on silicon surfaces at the Associated Laboratory of Sensors and Materials (LAS/INPE). The biocompatibility tests (direct and cellular adhesion) were carried through in the Laboratory of Cell Culture of the UNIVAP. For the tests, cultures of fibroblasts (L-929 mouse cells) was used. The tests showed the biocompatibility of carbon nanotubes with the cells.



## SUMÁRIO

	<u>Pág.</u>
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	16
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO.....	17
CAPÍTULO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
2.1 PRODUÇÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDES MULTIPLAS.....	19
(MWNTS)	
2.2 LINHAGEM CELULAR.....	19
2.3 MANUTENÇÃO DA CULTURA CELULAR.....	20
2.4 TESTE DE CITOTOXIDADE PELO MÉTODO DIRETO (MTT).....	20
2.4.1 INCUBAÇÃO COM MTT DAS AMOSTRAS.....	21
2.5 TESTE DE ADESÃO CELULAR.....	22
CAPÍTULO 3 - RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	23
3.1 TESTE DE CITOTOXIDADE PELO MÉTODO DIRETO (MTT).....	23
3.2 TESTE DE ADESÃO CELULAR.....	25
CAPÍTULO 4 – CONCLUSÃO.....	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Densidade óptica de células viáveis com os respectivos tempos de exposição das amostras de MWNTs, látex tóxico (controle positivo) e papel filtro (controle negativo).....24

**Figura 2:** Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura das amostras de filmes de MWNTs. Ampliação: a) e e) 200X; b) e f) 1000X; c) e g) 3500X; d) e h) 10.000.....26

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Divisão dos grupos para os testes de citotoxicidade pelo método direto (MTT).....	21
--	----

## CAPÍTULO 1

### INTRODUÇÃO

Nanotubos de carbonos consistem em cilindros de grafeno enrolados com diâmetros nanométricos. Possuem alta condutividade elétrica, alta estabilidade química, e alta resistência mecânica (AJAYAN, 1999). Estas propriedades especiais são designadas aos nanotubos de carbono de paredes simples (SWNTs) e aos nanotubos de paredes múltiplas (MWNTs), o que tem atraído muito a atenção de pesquisadores. Estudos evidenciam e sugerem a utilização de nanotubos de carbono em vários setores de microdispositivos, eletrônica e também para aplicações biológicas. Devido às suas propriedades de dureza, físico-químicas, os NTCs vêm sendo amplamente estudados para possíveis aplicações na área de engenharia biomédica e em química médica. Os NTCs quando são funcionalizados possuem propriedades como biocompatibilidade e capacidade de reconhecimento biomolecular (BAUGHMAN et al., 2002; BIANCO and PRATO, 2003; PANTAROTTO et al., 2004). Os NTCs já foram utilizados para obtenção de imagem por AFM de moléculas de DNA e proteínas (NAGAO et al., 2000; HAFNER et al., 2001; SHIM et al., 2002). Outras pesquisas também demonstraram que os NTCs podem ser preenchidos com DNA ou moléculas de peptídeos no armazenamento e em sistemas de carregadores de moléculas, podendo atuar como terapia molecular em doenças em um futuro próximo (GAO et al., 2003; CUI and GAO, 2003; CUI et al., 2004a).

Estudos epidemiológicos mostraram os efeitos toxicológicos de fibras de grafite e de carbono, identificando o possível efeito tóxico nos pulmões. Os estudos indicaram uma incidência aumentada de pneumoconiosis no local onde foi exposto o grafite e a fibra em pó. (BARON et al; JOSEPH et al, 1999)

Em um estudo recente, a exposição de nanotubos de carbono em células humanas de queratinocitos mostrou stress oxidativo, aumento e acumulação de constituintes peroxidativos, seguida pela depleção antioxidante. Além disso, a exposição de uma linhagem de células de macrófagos aos fulerenos ou a nanoestruturas (C60 e C60-70) resultou no aumento do fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-6 (IL-6), e interleucina-8 (IL-8) em culturas suspensas na superfície. A conclusão deste trabalho mostrou o aumento na resposta inflamatória quando as células foram expostas às partículas

de nanoestruturas de carbono (ADELMANN et al, 1994). Os resultados de experimentações dermatológicas não mostraram sinais de perigo de saúde relacionados à irritação de pele e a outros riscos alérgicos (HUCZKO and LANGE, 2001)

A toxicidade de nanotubos de carbono de paredes únicas (SWNTs) foram avaliadas em células de queratinócitos humanas. Os resultados mostraram o aumento do stress oxidativo e a inibição de proliferação celular em resposta ao tratamento de células de queratinócitos expostas as partículas de SWNTs (SUNIL et al, 2005) . Em estudos mais avançados, utilizou estudos “*in vivo*” em ratos, onde induziu-se os animais a inalarem os nanotubos de carbono, onde os resultados mostraram injúria pulmonar, resultando em granulomas multifocais (LAM, 2003). A influência dos SWNTs em células queratinócitas humanas (HEK293) foram investigadas com a intenção de explorar até que ponto os SWNTs são biocompatíveis. Os resultados mostraram que SWNTs podem inibir a proliferação de HEK293 podendo induzir a apoptose e decréscimo na habilidade de adesividade celular. No retorno, as células HEK293 podem também mobilizar a atividade de resposta para a secreção de “pequenas” proteínas isoladas ( CUI et al, 2005).

Após a avaliação da potencialidade dos SWNTs quando expostos a testes biológicos, torna-se importante avaliar o estudo de eventuais problemas que os nanotubos de carbono de paredes multiplas (MWNTs) possam causar quando expostos a testes de biocompatibilidade, já que trata-se de outros métodos de obtenção e organizações estruturais diferenciadas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi o estudo “*in vitro*” de MWNTs expostos a cultura de células da linhagem L-929, explorando a potencialidade citotóxica utilizando testes de biocompatibilidade pelo método direto, indireto e adesão celular.

## **CAPÍTULO 2**

### **MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **2.1 PRODUÇÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDES MULTIPLAS (MWNTS)**

Os MWNTS foram crescidos em duas etapas, no Laboratório Associado de Sensores e Materiais (LAS/INPE), as quais denominamos Pré-Tratamento e Deposição. Utilizou-se como substrato para o crescimento, silício com SiO<sub>2</sub> (50nm) revestido por uma fina camada de níquel (5nm). Na etapa de Pré-Tratamento, o objetivo foi criar nano-ilhas de níquel, a partir das quais os nanotubos puderam ser nucleados. Antes de iniciar esse processo, misturou-se 90 sccm de H<sub>2</sub> + 10 sccm de N<sub>2</sub>, a uma pressão de 30 Torr, aquecendo o porta-amostra com uma resistência elétrica até atingir uma temperatura aproximada de 300 °C. Na fase de Pré-Tratamento, com duração de 5 minutos, a potência de Gerador de Microondas foi mantida em 800W e a temperatura atingiu cerca de 760 °C. Na etapa de Deposição, 14 sccm de CH<sub>4</sub> foi adicionado como fonte de carbono durante 2 minutos.

#### **2.2 LINHAGEM CELULAR**

A linhagem celular utilizada neste trabalho foi a CLL I NCTC (ATCC) clone 929-clone da linhagem L, tecido conjuntivo de camundongo, designado L-929. As células foram cultivadas em Meio Mínimo Essencial – MEM (Gibco) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino – SFB, 1% de antibiótico Antibiotic Antimycotic (Gibco) e incubadas em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, em garrafas plásticas Nunc de 25cm<sup>2</sup>. As células foram adquiridas do Laboratório de Cultura de Células do Instituto Adolfo Lutz.

#### **2.3 MANUTENÇÃO DA CULTURA CELULAR**

O estoque celular foi mantido em nitrogênio líquido. Partindo desta etapa, preparou-se uma garrafa de cultura de 25cm<sup>2</sup>, contendo 1 ml de cultura de células (-10<sup>6</sup> células/ml),

adicionando-se 2 ml de meio de cultura *MEM*, enriquecido com 10% SFB. Após estas etapas as células foram mantidas em estufa com controle automático de temperatura 37°C e pressão de CO<sub>2</sub>. As células foram subcultivadas após tripsinização, quando formava-se uma monocamada confluenta. Após o período de 3 minutos com 2ml de tripsina retira-se a mesma, adicionando-se 3 ml de meio de cultura MEM suplementado com 10 % de SFB. Para liberação das células da parede da garrafa, utilizou-se jatos fortes com o auxílio de pipetador automático. Deste volume foram retirados alíquotas de 1 ml e e passados para novas garrafas, adicionando-se mais 2 ml de meio MEM e incubadas em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

#### **2.4 TESTE DE CITOTOXIDADE PELO MÉTODO DIRETO (MTT)**

Dentre as possibilidades de testes, de acordo com a Norma ISO 10993-5 *tests for Cytotoxicity: in vitro Methods*, foi selecionado o teste por contato direto.

A técnica utilizada para realização deste trabalho foi a MTT. Este teste realiza ensaios quantitativos para determinar a interrupção de uma função bioquímica crítica presente no ambiente biológico estudado (MOSMANN, 1983). Este ensaio quantifica a atividade mitocondrial medindo-se a formação de cristais de formazana, produto formado pela redução de tetrazolium MTT, no nosso caso as células de fibroblastos (L-929). A redução de MTT ocorre principalmente na mitocôndria através da ação da succinato desidrogenase fornecendo então uma medida de função mitocondrial. Para a realização do ensaio utilizou-se reagentes, sendo estes:

- MTT (3-(4,5-dimethylthiazolone-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Sigma)
- Dimetil Sulfóxido DMSO – (Synth)
- Tampão Fosfato PBS – Preparado a partir de 50 ml de tampão fosfato, 950 ml de água Destilada e 99 NaCl (Merck)

#### 2.4.1 INCUBAÇÃO DAS AMOSTRAS COM MTT

Para a realização dos testes foram necessários utilizar 18 amostras de MWNTs, 18 fragmentos de amostras para controle positivo de aproximadamente 1,0 cm x 1,0 cm de latex tóxico e como controle negativo fragmentos de papel de filtro atóxico de aproximadamente 1,0 cm x 1,0 cm. As amostras foram divididas em 6 grupos, sendo que juntamente às amostras foram adicionados 33 $\mu$ L de concentrado celular ( $\sim 1 \times 10^5$  células/mL) em cada poço das placas de petri onde serão posicionadas as amostras. Abaixo segue a tabela da distribuição das amostras com seus respectivos tempos de incubação antes dos testes.

Placas	Tempos (Hrs)	MWNTs (quantidade)	Controle Positivo (quantidade)	Controle Negativo (quantidade)
1	0	3	3	3
2	2	3	3	3
3	24	3	3	3
4	48	3	3	3
5	72	3	3	3
6	96	3	3	3

**Tabela 1:** Divisão dos grupos para os testes de citotoxicidade pelo método direto (MTT).

Para o preparo do MTT (3-[(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]), 5mg da solução em pó foi diluída em 1mL de PBS para obter uma solução estoque 5mg/mL-1. O MTT foi mantido no escuro a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Após serem retiradas dos respectivos períodos de incubação, de acordo com a tabela acima, fez-se a lavagem de cada poço com PBS para desprender as células (160 $\mu$ L) e foi adicionado solvente DMSO (200 $\mu$ L) sobre os precipitados de formazana, por um período de 30 minutos. Em seguida as placas de petri, foram mantidas sob agitação para a solubilização dos cristais de formazana por 10 minutos. A leitura da absorbância dos cristais de formazana, diretamente proporcionais à quantidade de células viáveis, foi feita utilizando um leitor de ELISA Spectra Count com comprimento de onda de 570 nm. Como

os testes foram realizados em triplicata, retirou-se a média aritmética de cada placa com seus respectivos grupos e em seguida fez-se a normalização dos dados com a fórmula abaixo:

$$\% \text{ Viabilidade Celular} = \frac{\text{Absorbância das Células das amostras} - \text{Absorbância do branco}}{\text{Absorbância de Células Controle Positivo} - \text{Absorbância do Branco}} \times 100$$

Para evitar dúvidas sobre a garantia do método utilizado neste estudo, MTT, as amostras foram removidas da cultura de células antes do procedimento da técnica de MTT. Os resultados são correlacionados somente com as células aderidas às placas, e não células suspensas no meio de cultura. O mesmo procedimento é adotado com a remoção das amostras do controle positivo e negativo. A correlação direta entre as medidas de densidade óptica é assegurada porque em todos os casos, as amostras têm o mesmo tamanho e a área livre para a adesão das células em superfícies boas é sempre a mesma.

## **2.5 TESTE DE ADESÃO CELULAR**

Para a realização dos testes de adesão celular foram utilizadas 2 amostras de MWNTs. Foram adicionados sobre o material 33 $\mu$ L de concentrado de células ( $1 \times 10^5$  células/ml) sob meio nutritivo e incubados por 48 h e 7 dias. Para a fixação das células preparou-se uma solução contendo 5 ml de tampão cacodilato a 300 $\mu$ L de glutaraldeído e adicionou-se 1 mL em cada poço. Após esta etapa, desidratou-se a amostra, fazendo-se a remoção do cacodilato acrescentando-se e retirando-se soluções de etanol de 50 a 100%, com intervalos de 10 minutos por etapa. Em seguida, retirou-se a solução de etanol a 100% e adicionou-se uma solução de 50% de etanol e 50% de HMDS por 10 minutos. Após estas etapas retirou-se a solução de etanol e HMDS e adicionou-se 500 $\mu$ L de HMDS em cada poço deixando-se secar em temperatura ambiente. Para a realização da Microscopia Eletrônica de Varredura necessitou-se depositar a um filme de ouro sobre as amostras para melhor visualização das imagens.

### CAPÍTULO 3

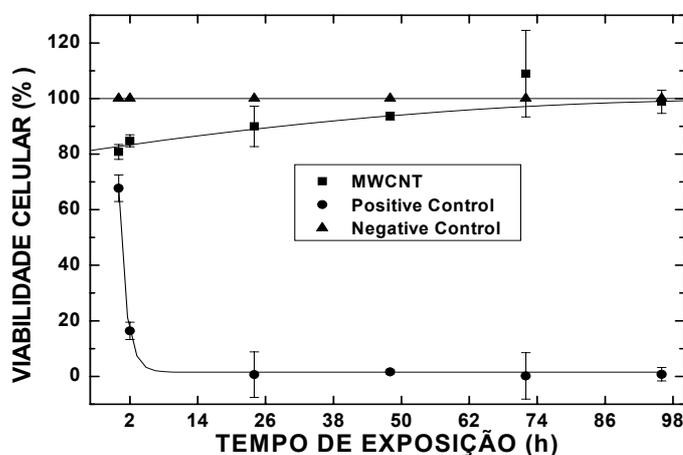
#### RESULTADOS E DISCUSSÕES

##### 3.1 TESTE DE CITOTOXIDADE PELO MÉTODO INDIRETO (MTT)

A viabilidade celular está proporcionalmente relacionada ao grau de redução do MTT. A viabilidade celular dos filmes de MWNTs foi estudado avaliando a densidade óptica das placas onde continham células viáveis (L-929).

Os testes foram feitos nos intervalos de tempos de 0 h a 96 h, entre intervalos de 48 h realizou-se a troca do meio de cultura, de acordo com normas de cultivo de células. Como controle para o cálculo em porcentagem de células viáveis, utilizou-se as placas onde foram imersos os fragmentos de papel de filtro.

A figura 1 indica o tratamento das células *L-929* com as amostras de filmes de MWNTs, luva e filtro de papel com seus respectivos tempos de interação.



**Figura 1:** Densidade óptica de células viáveis com os respectivos tempos de exposição das amostras de MWNTs, látex tóxico (controle positivo) e papel filtro (controle negativo).

Os resultados de viabilidade celular apresentam-se próximos de 100% com o aumento do tempo de exposição, sendo estes compatíveis com a literatura atual, onde

utiliza-se nanotubos de carbono aderidos em substratos. Nestes casos, há uma viabilidade relativamente elevada das células. Entretanto, o comportamento destes resultados é diferente, porque a viabilidade celular aumenta com o tempo de incubação. Na literatura, normalmente a viabilidade celular se reduz com o tempo de incubação (Chlopek, 2006).

Recentemente Worle-Knirsh observou que os cristais de formazana interagem com os nanotubos de carbono, formando algum tipo de aglomerado, influenciando negativamente na medida de densidade óptica. Assim o resultado da técnica tende a mostrar uma viabilidade celular mais baixa do que real.(Worle-Knirsh, 2006)

Em uma outra publicação recente Magrez, usou a técnica MTT em nanomateriais de carbono dispersos em culturas de células de tumor do pulmão, verificando o potencial citotóxico utilizando a técnica e microscopia óptica.

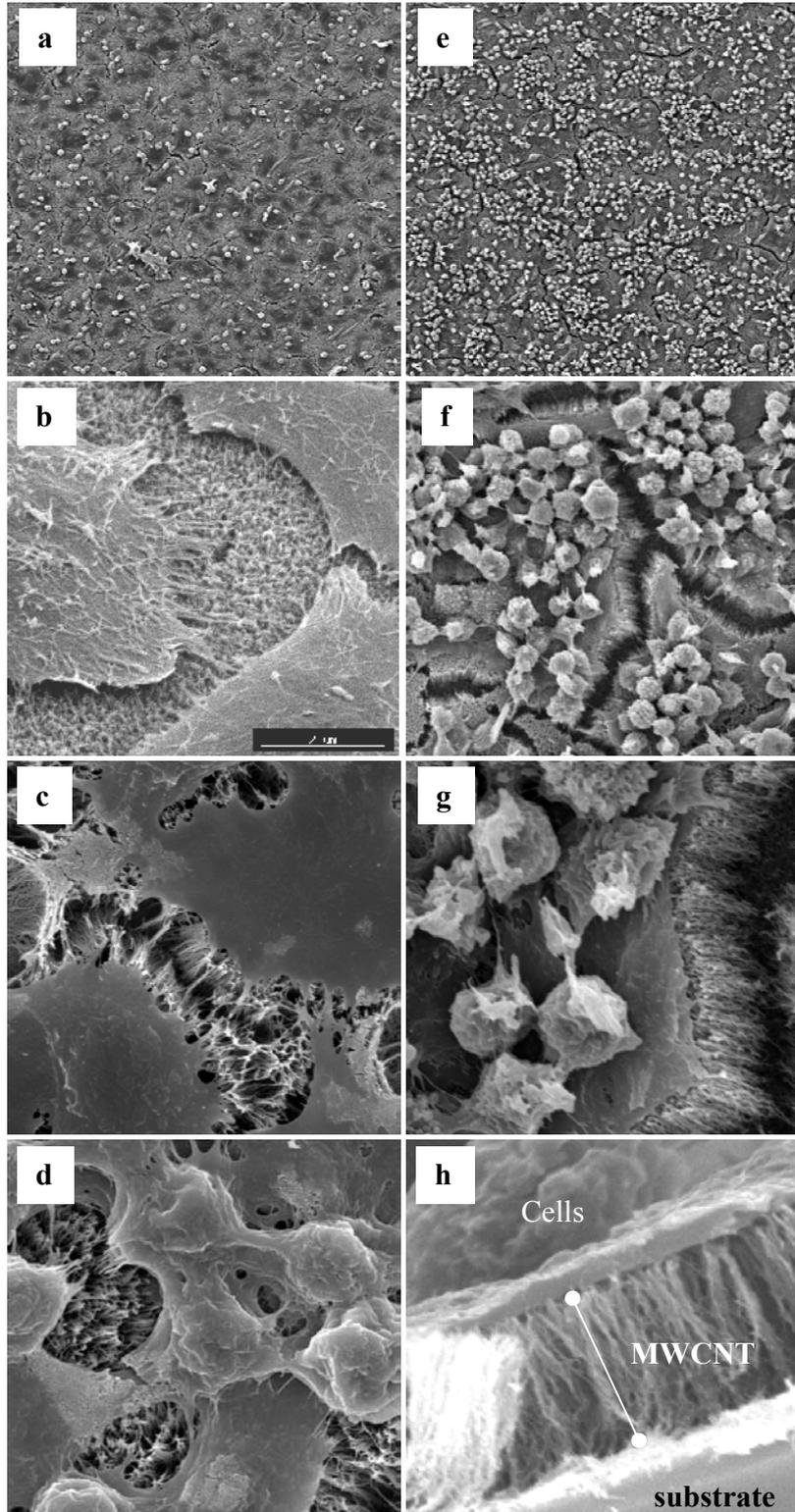
Devido a esta discordância da literatura evidencia-se que muitos estudos devem ser realizados, para que realmente possa-se evidenciar a biocompatibilidade de materiais nanoestruturados de carbono.

### **3.2 TESTE DE ADESÃO CELULAR**

A capacidade de adesão celular dos filmes de MWNTs com as células L - 929 foram testadas após um período de incubação de 48 horas, após serem preparadas, fez-se a Microscopia Eletrônica de Varredura. Na figura 2 de a-h pode-se verificar a capacidade de adesão celular dos filmes de nanotubos de carbonos obtidos. Podemos observar na figura 2 (a, e) o grande número de células aderidas ao material, ocupando praticamente toda a amostra. Na figura 2 (b, c) nota-se as projeções do citoplasma nos filmes de MWNTs, evidenciando a adesão celular. Na figura 2 (d, f) observa-se camada celular e acima células em divisão. Na figura 2 (g) observam-se os nanotubos alinhados, uma membrana celular, e células em divisão acima. Na figura 2 (h) observa-se os nanotubos alinhados e acima uma camada celular.

Em uma avaliação das imagens obtidas nota-se que somente a primeira camada de células se espalha sobre a superfície, e que as outras camadas tendem a formar células globulares ligadas à primeira camada. Isto indica que, unicamente, a primeira camada serve para isolar o MWNTs da interação com as outras células. Pode-se tirar conclusões que as

células de fibroblastos tendem a se espalhar pela área total que possuem os MWNTs. Após um intervalo de 7 dias claramente comprova-se a não citotoxicidade dos MWNTs, onde podemos observar um grande número de projeções de membrana fixadas aos mesmos.



**Figura 2:** Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura das amostras de filmes de NTC+SiO<sub>2</sub>+Ni+Si. Ampliação: a) e e) 200X; b) e f) 1000X; c) e g) 3500X; d) e h) 10.000

## **CAPÍTULO 4**

### **CONCLUSÃO**

Com os resultados obtidos podemos concluir que os MWNTs, produzidos no Laboratório Associado de Sensores e Materiais do INPE, não necessitam de tratamentos para remoção de impurezas, ou mesmo serem funcionalizados para possíveis aplicações biológicas. De acordo com a norma ISO adotada pode-se considerar que os MWNTs obtidos apresentam alto índice de biocompatibilidade, pelo fato de apresentar valores próximos de 100% de viabilidade celular durante o período dos testes. Quanto à adesão celular evidencia-se a preferência das células em se aderir ao material, principalmente quando se comparou os intervalos de tempos estudados. Como trabalho futuro pretende-se utilizar materiais biologicamente inertes em todas as etapas, como por exemplo, o ferro como precursor e superfícies de titânio e fibras de carbono para nucleação dos filmes MWNTs.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELMANN, P.; BAIRERL, T.; DROSSELMAYER, E.; POLITIS, C.; POLZER, G.; SEIDEL, A.; SCHWEGLER-BERRY, D, STEINLEITNER, C. **Effects of fullerenes on alveolar macrophages in vitro**. In *Toxic and Carcinogenic Effects of Solid Particles in the Respiratory Tract*; Mohr, U., Dungworth, D. L., Mauderly, J., Oberddoerster, G., Ed.; ILSI Press: Washington, DC, **1994**; pp 405-407.

AJAYAN, P.M. *Chem.Rev.*99 (**1999**)1787.

BARON, P. A.; MAYNARD, A. D.; FOLEY, M. *NIOSH Rep.* **2002**, *NIOSH DART-02-191*.

BAUGHMAN, R.H., ZAKHIDOV, A.A., HEER, D.A. **Carbon nanotubes—the route toward applications**. *Science* 297, 787–792, 2002.

BIANCO, A., PRATO, M. Can carbon nanotubes be considered useful tools for biological applications? *Adv. Mater.* 15, 1765–1766, 2003.

CHLOPEK, J.; CZAJKOWSKA, B.; SZARANIEC, B.; FRACKOWIAK, E.; SZOSTAK, K.; BEGUIN, F. **In vitro studies of carbon nanotubes biocompatibility**. *Carbon* **2006**, 44, 1106-1111.

CUI, D., TIAN, F., KONG, Y., IGOR, T., GAO, H., 2004B. **Effect of single wall carbon nanotubes on polymerase chain reaction**. *Nanotechnology* 15, 154–158.

CUI, D., OZKAN, C.S., RAVINDRAN, S., KONG, Y., GAO, H., 2004a. **Encapsulation of Pt-labelled DNA molecules inside carbon nanotubes**. *Mech. Chem. Biosystems* 1, 113–121.

CUI, D.; TIAN, F.; OZKAN, C.S.; WANG, M.; GAO, H.. **Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells**. Toxicology Letters, 155 (2005) 73–85.

HAFNER, J.H., CHEUNG, C.L., WOOLLEY, A.T., LIEBER, C.M. **Structural and functional imaging with carbon nanotube AFM probes**. Prog. Biophys. Mol. Biol. 77, 73–110, 2001.

HUANG, J. H.; CHUANG, C. C.; TSAI, C. H. **Effect of nickel thickness and microwave power on the growth of carbon nanotubes by microwave-heated chemical vapor deposition**. MICROELECTRONIC ENGINEERING 66 (1-4): 10-16 APR 2003.

HUCZKO, A.; LANGE, H. Fullerene Sci. Technol. **2001**, 9, 247-250.

GAO, H., KONG, Y., CUI, D., OZKAN, C.S., 2003. **Spontaneous insertion of DNA oligonucleotides into carbon nanotubes**. Nano. Lett. 3, 471–473.

JOSEPH, G. DuPont Co. Internal Report, **2002**.

LAM, C.; JAMES, J. T.; MCCLUSKEY, R.; HUNTER, R. L. **Toxicologist 2003**, 72 (S-1), 44.

MAGREZ, A.; KASAS, S.; SALICIO, V.; PASQUIER, N.; SEO, J.W.; CELIO, M.; CATSICAS, S.; SCHWALLER, B.; FORRO, L. **Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials**. Nano Lett. **2006**, 6, 1121 – 1125.

MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays**. Journal of immunological methods 65 (1-2): 55-63, 1983.

NAGAO, E., NISHIJIMA, H., AKITA, S., NAKAYAMA, Y., DVORAK, J.A. **The cell biological application of carbon nanotube probes for atomic force microscopy: comparative studies of malaria-infected erythrocytes**. J. Electron Microsc. (Tokyo) 49, 453– 458, 2000.

PANTAROTTO, D., BRIAND, J.P., PRATO, M., BIANCO, A. Translocation of **bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubes**. Chem. Commun., 16–17, 2004.

SHIM, M., KAM, N.W.S., CHEN, R.J., LI, Y., DAI, H., 2002. **Functionalization of carbon nanotubes for biocompatibility and biomolecular recognition**. Nano Lett. 2, 285–288.

SUNIL K. MANNA, SHUBHASHISH SARKAR, JOHNNY BARR, KIMBERLY WISE, ENRIQUE V. BARRERA, § OLUFISAYO JEJELWO, ‡ ALLISON C. RICE-FICHT, | AND GOVINDARAJAN T. RAMESH. **Single-Walled Carbon Nanotube Induces Oxidative Stress and Activates Nuclear**. NANO LETTERS, Vol. 5, No. 9, p. 1676-1684, 2005

WORLE-KNIRSCH, J.M.; PULSKAMP, K.; AND KRUG, H.F. **Oops They Did It Again! Carbon Nanotubes Hoax Scientists in Viability Assays**. Nano Lett. 2006, 6, 1261 – 1268.