

Faculdade de Tecnologia de Sorocaba
Tecnologia em Sistemas Biomédicos

Relatório de Iniciação Científica
Avaliação da Geno/ Mutagenicidade
de Nanotubos de Carbono em
Allium cepa

Orientadora: Silvia Pierre Irazusta

Autora: Laís Rocha Camargo

Avaliação da Geno/ Mutagenicidade de Nanotubos de Carbono em *Allium cepa*.

Resumo

Os nanotubos de carbono representam uma nova classe de materiais descoberta em 1991, por Sumio Ijima, que apresentou um novo tipo de estrutura finita de carbono, a qual chamou de nanotubos de carbono, devido à sua morfologia tubular com dimensões nanométricas. Os NTCs são materiais estratégicos com grande interesse tecnológico, principalmente por sua estrutura singular, a qual lhe confere um conjunto peculiar de propriedades. A versatilidade desse material permite que ele seja explorado em diferentes áreas de pesquisas e aplicações. O grau de toxicidade dos NTCs depende do tipo de célula analisado, podendo ser influenciado pelo teste de toxicidade empregado, pela estrutura, estado de agregação e grau de pureza dos NTCs e, principalmente, pela funcionalização aplicada. Os ensaios de toxicidade constituem uma forma de biomonitoração ativa, pois neles são utilizados organismo-teste, definidos como indivíduos padronizados e cultivados em laboratório, que podem fornecer indicações sobre as condições de um ecossistema frente à presença de um impacto ambiental. Técnicas de citogenética, anormalidades do núcleo celular como binúcleo e micronúcleo são considerados bons indicadores de citotoxicidade e mutagenicidade, respectivamente. Por esta razão, o uso de organismos sentinela para monitoramento biológico poderia providenciar uma estimativa dos efeitos potenciais de poluentes. Biomonitoradores como a espécie *Allium cepa*, têm sido usados para alertar a população sobre contaminação ambiental e emissões químicas genotóxicas. Este trabalho tem a finalidade de avaliar a potencial atividade geno/mutagenicidade de nanotubos de carbono (NTC) em *Allium cepa*.

Abstrat

Carbon nanotubes represent a new class of materials discovered in 1991 by Sumio Ijima, who presented a new type of finite carbon structure, which he called

carbon nanotubes, due to its tubular morphology with nanometer dimensions. The CNTs are strategic materials with great technological interest, mainly for its unique structure, which gives it a unique set of properties. The versatility of this material allows it to be exploited in different areas of research and applications. The degree of toxicity of CNTs depends on the cell type examined, and may be influenced by the toxicity test employed, the structure and state of aggregation of CNTs purity, and especially by functionalization applied. The toxicity tests are a form of active biomonitoring, for in them are used test organism, defined as individuals standardized and grown in the laboratory, which can provide information on the conditions of an ecosystem forward to the presence of an environmental impact. Cytogenetic techniques, such as abnormalities of the cell nucleus and micronucleus binúcleo are considered good indicators of cytotoxicity and mutagenicity, respectively. For this reason, the use of sentinel to monitor biological organisms could provide an estimate of the potential effects of pollutants. Biomonitoring as the species *Allium cepa*, have been used to alert the public about environmental contamination and genotoxic chemical emissions. This work aims to evaluate the potential activity geno / mutagenicity of carbon nanotubes (NTC) in *Allium cepa*.

Introdução

O carbono é um elemento impressionante, sobretudo em relação às suas ligações químicas. Quando átomos de carbono se ligam entre si, compostos com estruturas e propriedades inteiramente distintas podem ser gerados, tal como o grafite e o diamante. Tudo depende da natureza da ligação entre dois carbonos adjacentes, tal elemento pode ainda, formar estruturas fechadas contendo dezenas de átomos, como é o caso dos nanotubos de carbono (NTCs). [1]

Os nanotubos de carbono representam uma nova classe de materiais descoberta em 1991, por Sumio Iijima, que apresentou um novo tipo de estrutura finita de carbono, a qual chamou de nanotubos de carbono, devido à sua morfologia tubular com dimensões nanométricas. Os NTCs são nanoestruturas cilíndricas com diâmetro da ordem de poucos nanômetros e comprimentos na ordem de microns, com grandes razões comprimento/diâmetro. [2]

Os NTCs são materiais estratégicos com grande interesse tecnológico, principalmente por sua estrutura singular, a qual lhe confere um conjunto peculiar de

propriedades. A versatilidade desse material permite que ele seja explorado em diferentes áreas de pesquisas e aplicações. [5]. O grande diferencial dos materiais nanoestruturados é a potencialização de suas propriedades mecânicas, ópticas, magnéticas e químicas. [3] Isso ocorre na escala nanométrica e as suas estruturas de características peculiares viabilizam produtos finais mais eficientes, resistentes e principalmente de baixo custo. [4]. Os NTCs possuem a maior resistência à ruptura sob tração conhecida na ordem de 200 GPa, 100 vezes superior ao mais resistente aço com apenas 1/6 de sua densidade.

Indubitavelmente, essa é uma das áreas do conhecimento humano que mais se desenvolve, beneficiando os mais distintos dos segmentos, tais como alimentício, eletrônico, farmacêutico, biotecnológico, cosmético, médico-hospitalar e agrícola. [2]

Os NTCs são uma forma alotrópica do carbono caracterizada pelo enrolamento de uma ou várias folhas de grafeno, forma concêntrica e cilíndrica e com cavidade interna oca. [23] Podem ser classificados, quanto ao número de camadas: NTCs de camada única (SWCNTs – "*single-walled carbon nanotubes*") ou de camadas múltiplas (MWCNTs – "*multi-walled carbon nanotubes*"). [24] O tamanho, geralmente, varia de 0,4-2 nm de diâmetro para os SWCNTs e de 2-100 nm para MWCNTs, enquanto seu comprimento pode ser de 1-100 nm. [25]

Na nanomedicina, a busca pelo diagnóstico mais preciso, a regeneração de tecidos e a administração controlada de fármacos configuram-se como objetivos principais nas pesquisas e aplicações dos NTCs [8, 9, 10]. Nessa área, eles atuam como carreadores de fármacos [11,13], próteses neurais [14,15], marcadores biológicos, bem como vetores de DNA na terapia gênica. [16] Os NTCs têm sido ainda amplamente estudados para a terapêutica de neoplasias e doenças neurodegenerativas. [17, 18].

Funcionalidade e biocompatibilidade

Os NTCs podem ser manipulados por meio da funcionalização, ou seja, adsorção ou ligação de átomos ou molécula as suas paredes ou pontas. A funcionalização torna os NTCs mais biocompatíveis e, portanto, facilita a sua interação com moléculas orgânicas, biológicas ou com outros grupos químicos.

A funcionalização com a absorção de grupos químicos como a hidroxila torna os nanotubos solúveis em meio aquoso e facilita a interação com macromoléculas celulares. [19,20] Além disso, demonstrou-se que a funcionalização de NTCs resulta em

menor toxicidade para células em culturas [21], aumentando assim o seu potencial de aplicação nas áreas biológicas e médicas. [22]

Embora a aplicabilidade desses materiais esteja em franco processo de exploração, estudos relativos à sua biocompatibilidade ainda são escassos e, por vezes, controversos. [23] Pouco se conhece acerca dos efeitos dos NTCs sobre a saúde humana e o meio ambiente, apesar da sua crescente disponibilidade comercial [24].

A biocompatibilidade poderia ser definida como a capacidade de um material gerar, em uma situação específica, uma resposta do hospedeiro [33]. Outra propriedade que definiu a aplicação dos NTCs foi à biofuncionalidade, ou seja, a capacidade do material assumir certas funções de um tecido através de uma adaptação mútua das características deste tecido [34].

Pesquisadores como Shvedova *et al.* 2003 [26] relataram alterações estruturais e morfológicas em cultura de queratinócitos humanos expostos a SWCNTs, além da formação de espécies reativas, o acúmulo de produtos de peroxidação lipídica e redução da viabilidade, indicando toxicidade dérmica desses materiais. Entretanto, Yehia *et al.* 2007 [27] demonstraram que SWCNTs não apresentam efeitos tóxicos *in vitro* para células epiteliais humanas, confirmando resultados anteriores, nos quais não foram observados riscos alérgicos e irritação cutânea a partir de exposição dérmica a essas estruturas [28].

A funcionalização mostra-se determinante para a biocompatibilidade dessas estruturas [29], mostra que SWCNTs funcionalizados mantêm a viabilidade celular em cultura de queratinócitos humanos, enquanto outros grupos demonstraram que a funcionalização facilita a solubilização e a intracelularização dos NTCs [30,31]. Kagan *et al.* 2005 [32] observaram, ainda, que alguns tipos de funcionalização podem potencializar o reconhecimento, favorecendo sua eliminação.

Toxicidade

O grau de toxicidade dos NTCs depende do tipo de célula analisado, podendo ser influenciado pelo teste de toxicidade empregado, pela estrutura, estado de agregação e grau de pureza dos NTCs e, principalmente, pela funcionalização aplicada. [42]. A toxicidade dos NTCs pode estar relacionada com a presença de resíduos do metal de transição utilizado como catalisador no processo de síntese, principalmente ferro e níquel. Esses metais são promotores efetivos do estresse oxidativo das células, tecidos e

biofluidos. Fenoglio et al. Fenoglio sugeriram que o estresse oxidativo gerado pelos NTCs em culturas celulares está associado às impurezas de catalisadores metálicos em sua superfície. Pulskamp et al. ratificaram essa teoria ao demonstrarem ausência de espécies reativas em culturas com NTCs purificados.

Os ensaios de toxicidade constituem uma forma de biomonitoração ativa, pois neles são utilizados organismo-teste, definidos como indivíduos padronizados e cultivados em laboratório, que podem fornecer indicações sobre as condições de um ecossistema frente à presença de um impacto ambiental [35]. Sua utilização fundamenta-se na exposição dos organismos-teste a várias concentrações de uma ou mais substâncias e aos fatores ambientais, durante um determinado período de tempo. [36]

Quanto aos protocolos de ensaios biológicos (testes de toxicidade aguda e de genotoxicidade/mutagenicidade), os mesmos são obrigatórios para descargas de efluentes em alguns países, enquanto que em outros, somente as características físicas e químicas são necessárias. Baixos níveis de toxicidade aguda são detectados em efluentes que são descartados, mesmo após um eficiente tratamento secundário. Por os agentes tóxicos estarem quase sempre em concentrações muito reduzidas ou serem de caráter químico desconhecido, os biotestes para monitoração poderiam ser bastante úteis. [12]

Geno/Mutagênicidade

Os estudos de genotoxicidade são realizados por meio de testes *in vitro* e *in vivo* para detectar o potencial das substâncias sob investigação, de causar mutações genéticas e cromossômicas. Genotoxicidade é expressa em vários tipos de danos ao DNA (DNA adultos, sítios álcali-lábeis, as quebras da cadeia) e mutações, que vão desde alterações cromossômicas estruturais (perdas e quebras) ou numéricas (aneuploidia e poliploidia). [43]

A sobrevivência da célula danificada dependerá do equilíbrio entre a eficácia da proteção e a reparação celular (sistemas de defesas antioxidantes, base / reparo por excisão de nucleotídeos, incompatibilidade ou reparação) e os processos que conduzem a célula à morte (apoptose ou necrose).

Estudos são utilizados para auxiliar na detecção de compostos que podem causar danos genéticos e posteriormente, câncer [37]. Uma proporção significativa de agentes

químicos cancerígenos foi detectada como causadores de danos no DNA. No entanto, outras substâncias que podem levar ao câncer tais como hormônios, alguns metais, agentes físicos inertes e alguns outros produtos químicos, podem causar câncer através de outros mecanismos que não interagem com o DNA. Essas substâncias não são normalmente detectadas por meio dos testes de genotoxicidade[38].

A mutagenicidade, que equivale à capacidade de uma substância química reagir com o DNA podendo causar uma mutação, foi o ponto de partida de dois estudos: Santos et al. (2004), que utilizou o formaldeído como controle-positivo em bioensaios que comprovaram o aparecimento de micronúcleos também em plantas expostas ao toxicante e Ladeira et al. (2009), que avaliou a exposição ocupacional ao formaldeído constatando a presença de alterações nucleares em linfócitos do sangue periférico (micronúcleos, pontes nucleoplásmicas e protusões nucleares) em trabalhadores expostos ao composto, confirmando a genotoxicidade do mesmo.

Allium cepa

Técnicas de citogenética, anormalidades do núcleo celular como binúcleo e micronúcleo são considerados bons indicadores de citotoxicidade e mutagenicidade, respectivamente. Por esta razão, o uso de organismos sentinela para monitoramento biológico poderia providenciar uma estimativa dos efeitos potenciais de poluentes. Biomonitoradores como a espécie *Allium cepa*, têm sido usados para alertar a população sobre contaminação ambiental e emissões químicas genotóxicas.

Os impactos causados por agentes tóxicos no meio ambiente e no homem, geralmente não podem ser observados ou medidos diretamente e, informações obtidas por biomonitoradores permitem estimar e comparar estes impactos. [7]

O teste de toxicidade aguda e mutagenicidade com *Allium cepa* é bastante antigo, foi introduzido por Levan, em 1938 e foi proposto como método padrão em monitoração ambiental e de triagem para efluentes e rios. Trata-se de um teste de baixo custo, simples, e fornece boa correlação com ensaios em mamíferos. [26]

Testes com vegetais como o de *Vicia faba* e principalmente, o de *Allium cepa*, tem sido utilizados para o estudo dos efeitos de extratos vegetais, visando à detecção de genotoxicidade. Esse sistema também tem importância no monitoramento da poluição ambiental e na avaliação do potencial mutagênico de muitos compostos químicos. [41]

Fiskejo et al., (1993) ressaltou a importância e a utilidade de sistemas teste com vegetais na avaliação de riscos de genotoxicidade e enfatizou que apesar das diferenças entre metabolismo de plantas e animais há também similaridades em mecanismo enzimático, e que a ativação de pro-mutagênicos em plantas possui alta relevância, pois seres humanos consomem plantas tratadas com agentes químicos. [41]

A planta *Allium cepa* é indicada como um eficiente organismo-teste de citotoxicidade e genotoxicidade devido a determinadas características, como sua cinética de proliferação, crescimento rápido de suas raízes, grande número de células em divisão, sua alta tolerância a diferentes condições de cultivo, sua disponibilidade durante todo o ano, seu fácil manuseio e por possuir cromossomos em número reduzido e de grande tamanho, além de seu baixo custo.

Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar a potencial atividade geno/mutagenicidade de nanotubos de carbono (NTC) em *Allium cepa*

Objetivo específico

- Avaliar a taxa de germinação de sementes de *A. cepa* (cebola) expostas aos NTC.
- Avaliar o Índice de Micronúcleos em sementes de *A. cepa* (cebola) expostas aos NTC.

Materiais e metodologia

1. Nanotubo de Carbono

O nanotubo (NT) de carbono em estudo MWCNT Helix, de origem norte-americana foi adquirido comercialmente.

Teste de genotoxicidade/mutagenicidade em *Allium cepa*

Os dois testes utilizando *Allium cepa*, de aberrações cromossômicas (AC) e micronúcleos (MN) foram executados de acordo com uma versão modificada do protocolo de Caritá e Marin-Morales (Caritá e Marin-Morales, 2008). Uma centena de sementes de cebola foi germinada em temperatura de sala ($20\pm 5^\circ\text{C}$) em placas de Petri. Cada placa foi coberta com filtro de papel, individualmente regadas com amostras de

NT a 20, 50 e 500 µg/mL em tampão fosfato-salino (PBS). Água ultra pura foi usada como controle negativo e 1.68 ppm de trifluralin (herbicida) foi usada como controle positivo. Quando as raízes atingiram 2 cm de comprimento (aproximadamente 5 dias após o início do ensaio), elas foram expostas ao NT ou TRIF ppor 24hs, retiradas e recolocadas em água por 25hs para recuperação. Após este tempo, foram coletadas e fixadas em álcool acético ácido (3:1) por 24 horas. Depois disso, as raízes foram lavadas com água destilada, em três banhos de 5 minutos cada. O material foi então hidrolizado em HCl 1 N a 60°C por 11 minutos, seguido de três banhos de 5 minutos em água destilada. O excesso de água foi removido das sementes com filtro de papel e o material foi transferido para uma área escura em contêineres com reagente Schiff como descrito por Feulgen e Rossenbeck (Lyon et al., 2002) por aproximadamente 1 hora. Para preparar os slides, a região F1 e a meristemática foram cobertas com lâminas e cuidadosamente espremidas em uma gota de 2% de solução de carmin acético.

1.1. Análise estatística

A Análise estatística será realizada utilizando o teste de Estudante t com um nível de significância de $p \leq 0.05$.

Resultados Esperados

O MWCNT Helix, de origem norteamericana, nas concentrações de 0,1-1,0-10 e 100ppm, produziu uma resposta que foi dose dependente em *Allium cepa*, a qual, no entanto, não foi significativamente diferente do controle, exposto à água destilada. Considerando-se a crescente utilização destes nanomateriais nas mais diversas atividades industriais e sua conseqüente entrada no ambiente, quer através da emissão de poeiras, quer via contaminação de efluentes, faz-se necessário a avaliação da potencial toxicidade ambiental destas nanopartículas, por meio de sistemas indicadores amplamente validados. O presente trabalho, mostrou que o MWCNT Helix, pelo menos até a concentração de 100ppm no ambiente, não é capaz de provocar danos ao DNA, isto é, não possui atividade mutagênica significante. Entretanto, sua resposta é dose dependente e portanto, requer vigilância quanto às suas emissões cumulativas no ambiente. *Objetivos:* Avaliar a potencial atividade geno/mutagenicidade de nanotubos de carbono (NTC) em *Allium cepa*.

Dados anteriores de nosso laboratório, empregando o método de *Allium cepa* para avaliação de geno/mutagenicidade, além do teste “SMART”, com *Drosophyllas* (parceria com Dra. Kenya Cunha Silva-UFG), apresentaram resultados negativos para ambos os testes, quando os organismos foram expostos ao NT1, nanotubo de carbono de múltiplas camadas, desenvolvido no Lab. de Nanoengenharia da Faculdade de Engenharia Elétrica da Unicamp. Estes resultados estão compilados num manuscrito a ser submetido “**Absence of Mutagenic and Recombinagenic Activity of Multi-Walled Carbon Nanotubes in the *drosophila* wing-spot test and *allium cepa* Micronucleus test**”.

Referências

- 1-MONOGRAFIA, *Nanotubos de carbono preparação e caracterização Ferreira*. Disponível em:
<www.qes.iqm.unicamp.br/images/vivencia_lqes_monografias_odair_nanotubos_carbono.pdf>. Acesso em: 22 set 2012.
- 2-CHEN X, SCHLUESENER HJ. *Nanosilver: a nanoproduct in medical application*. Toxicol. Lett. 2008; 176(1):1-12
- 3-MOORE MN. *Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment?* Environ Int. 2006;32(8):967-76.
- 4-PASCHOALINO MP, MARCONE GPS, JAEDIM WF. *Os nanomateriais e a questão ambiental*. Quím Nova. 2010;33(2):421-30.
- 5-LIMA MD, BONANDIMANR. De ANDRADE MJ, TONIOLO J, BERGMANN CP. *Synthesis of multi-walled carbon nanotubes by catalytic chemical vapor deposition using Cr₂FexO₃ as catalyst. Diam Relat Mater*. 2006;15(10):1708-13
- 6-UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, *Nanotubos de carbono*. Disponível em:< www.ufrgs.br/lacer/gmn/nanotubosbr>. Acesso em: 22 set 2012.
- 7- BAGATINI, M. D.; VASCONCELOS, T. G.; LAUGHINGHOUSE, H. D.; MARTINS, A. F. & TEDESCO, S. B., 2009, *Biomonitoring Hospital Effluents by the Allium cepa L. Test. Bull Environ. Contam. Toxicol.*, 82: 590-592.
- 8-PASCHOALINO MP, MARCONE GPS, JARDIM WF. *Os nanomateriais e a questão ambiental*. Quím Nova. 2010;33(2):421-30.

- 9-LIU JM, RAO Y, CHEN L, WANG XX, LIN LP CQ et al. *A new phosphorimetry for the determination of trace alkaline phosphatase using multi-wall carbon nanotubes and its diagnosis of human diseases. J Fluoresc.* 2010;20(4):933-41.
- 10-WAN AC, YING JY. *Nanomaterials for in situ cell delivery and tissue regeneration.* Adv Drug Deliv Rev. 2010;62(7-8):731-40.
- 11-BIANCO A, KOSTARELOS K, PRATOM. *Applications of carbon nanotubes in drug delivery. Curr Opin Chem Biol.* 2005;9(6):674-9.
- 12- BERTOLETTI, E., 1990, *Toxicidade e concentração de agentes tóxicos em efluentes industriais.* Ciência. Cultura., 42: 271-277.
- 13-BERNABID AL, WALLACE B, MITROFANISJ, XIA C, PIALLAT B, FRAIX V, et al. *Therapeutic electrical stimulation of the central nervous system.* C R Biol. 2005;328(2):177-86
- 14-LEBEDEV MA, NICOLELIS MA. *Brain-machine interfaces: past, present future.* Trends Neurosci. 2006;29(9):536-46.
- 15-CHEUNGW, PONTORIEROF, TARATULA O, CHEN AM, HEH. *DNA and carbon nanotubes as medicine.* Adv Drug Deliv Rev. 2010;62(6):633-49.
- 16- LU Q, MOORE JM, HUANG G, MOUNT AS, RAIIO AM LARCOM, et al. *RNA polymer translocation with single-walled carbon nanotubes.* Nano Lett. 2004;4(12):2473-7.
- 17-WEI W, SETHURAMAN A., JIN C, MONTEIRO-RIVIERE NA, NARAYAN RJ. *Biological properties of carbon nanotubes. J Nanosci Nanotechnol.* 2007;7(4):1284-97.
- 18-PATLOLLA A, PATLOLLA B, TCHOUNWOUP. *Evaluation of cell viability, DNA damage, and cell death in normal human dermal fibroblast cells induced by functionalized multiwalled carbon nanotube.* Mol Cell Biochem. 2009;338(1-2):225-32.
- 19-SAYES CM, LIANG F, HUDSON JL, MENDEZ, GUO W, BEACHJM, et al. *Functionalization density dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity in vitro.* Toxicol Lett. 2006;161(2):135-42.
- 20-BOTTINI M, BRUCKNER S, NIKA K, BOTTININ, BELLUCCI S, MAGRINI A, et al. *Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis. Toxicol Lett.* 2006;160(2):121-6.

- 21-HUSSAIN MA, KABIR MA, SOODAK. *On the cytotoxicity of carbon nanotubes*. *Curr Sci*. 2009;96(5):664-73
- 22-BELYANSKAYA L, WEIGEL S, HISCH C, TOBLER U HF, WICK P. *Effects of carbon nanotubes on primary neurons and glial cells*. *Neurotoxicology*. 2009;30(4):702-11.
- 23-BARDIG, TOGNINI P, CIOFANI G, RAFFA V, COSTA M, PIZZOURUSSO T. *Pluronic-coated carbon nanotubes do not induce degeneration of cortical neurons in vivo and in vitro*. *Nanomedicine*. 2009; 5(1):96-104.
- 24-BAUGHMAM RH, ZAKHIDOV AA, De HEER WA. *Carbon nanotubes the route toward applications*. *Science*. 2002;297(5582):787-92.
- 25-MALARKEY EB, PARPURA V. *Carbon nanotubes in neuroscience*. *Acta Neurochir Suppl*. 2010;106:337-41
- 26- FISKESJÖ, G., 1985, *The Allium test as a standard in the environmental monitoring*. *Hereditas*, 102: 99-112. FISKESJÖ, G., 1993, *The Allium test in Wastewater monitoring*. *Environ. Toxicol. Water Qual*, 8: 291-298.
- 27-YEHIA HN, DRAPER RK, MIKORYAK C, WALKER EK, BAJ AP, MUSSELMAN IH et al. *Single-walled carbon nanotube interactions with HeLa cells*. *J Nanobiotechnology*. 2007;5(8):1-17.
- 28-HUCZKO A, LANGEH. *Fullerene*. *Sci Technol*. 2001;9:247-50.
- 29-PANTAROTTO D, SINGH R, MCCARTHY D, ERHARDT M BRIAND JP, PRATO M, et al. *Functionalized carbon nanotubes for plasmid DNA gene delivery*. *Angew Chem Int Ed*. 2004;43(39):5242-6.
- 30-WANG Y, IQBAL Z, MITRA S. *Rapidly functionalized, water dispersed carbon nanotubes at high concentration*. *J Am Chem Soc*. 2006;128(1):95-9.
- 31-HUANG W, FERNANDO S, LIN Y, ZHOU B, ALLARD LF, SUN YA-PING. *Preferential solubilization of smaller single-walled carbon nanotubes in sequential functionalization reactions*. *Langmuir*. 2003;19(17):7084-8.
- 32-KAGAN VE, BAYIR HB, SHVEDOVA AA. *Nanomedicine and nanotoxicology: two sides of the same coin*. *Nanomedicine*. 2005;1(4):313
- 33-HUSSAIN MA, KABIR MA, SOOD AK. *On the cytotoxicity of carbon nanotubes*. *Curr Sci*. 2009;96(5):664-73

34-BELYANSKAYA L, WEIGAL S, HIRSCH C, TOBLER U, KRUG HF, WICK P. *Effects of carbon nanotubes on primary neurons and glial cells. Neurotoxicology.* 2009;30(4):702-11.

35-RAYA-RODRIGUEZ, M. T., 2000, *O uso de bioindicadores para avaliação da qualidade do ar em Porto Alegre.* In: M. L. L. ZURITA & TOLFO, A.M. (Org.) *A Qualidade do Ar em Porto Alegre. Secretaria Municipal do Meio Ambiente, Porto Alegre.*

36-GHERARDI-GOLDSTEIN, E.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P. A.; ARAÚJO, R. P. A. & RAMOS, M. L. L. C., 1990, *Procedimentos para Utilização de Testes de Toxicidade no Controle de Efluentes Líquidos.* CETESB, São Paulo

37- ANVISA. Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos: Gerência de avaliação de segurança e eficácia – GESEF. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária,* Brasília, 01 mar. 2010. Disponível em: <

<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/30dd7a0047457fa68b53df3fbc4c6735/GUIA+PARA+A+CONDU%C3%87%C3%83O+DE+ESTUDOS+N%C3%83O+CL%C3%8DNICOS+DE+SEGURAN%C3%87A+NECESS%C3%81RIOS+AO+DESENVOLVIMENTO+DE+MEDICAMENTOS.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 22 Set 2012

38- MULLER, J.; HUAUX, F.; FONSECA, A.; NAGY, J.B.; MOREAU, N.; DELOS, M.; RAYMUNDO-PIÑERO, E.; BÉGUIN, F.; KIRSCH-VOLDERS, M.; FENOGLIO, I.; FUBINI, B.; LISON, D. Structural Defects Play A Major Role In The Acute Lung Toxicity Of Multiwall Carbon Nanotubes: *Toxicological Aspects. Chem Res Toxicol.* 21: 1698-705. Epub, 2008.

39- SILVA, K. E. da; GOMES R.J.; HERMANI, H.A.; AZEVEDO, J.R.M.; CARNEIRO, E.M.; LUCIANO, E. *Perfil metabólico de ratos diabéticos submetidos ao exercício físico.* Motriz, Rio Claro, v.10, n.3, p.189-193, set./dez. 2004.

40- DIZER, H.; WITTEKIND, E.; FISCHER, B. & HANSEN, P. D., 2002, *The cytotoxic and genotoxic potential of surface water and wastewater effluents determined by bioluminescence, umu-assays and selected biomarkers.* Chemosphere, 46: 225-233.

41- SCIELO, *Uso do sistema teste de Allium cepa como bioindicador de*

- genotoxicidade de infusões de plantas medicinais.** Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v17n3/18.pdf>>. Acesso em 22 Set 2012.
- 42- RAYA-RODRIGUEZ, M. T., 2000, *O uso de bioindicadores para avaliação da qualidade do ar em Porto Alegre*. In: M. L. L. ZURITA & TOLFO, A.M. (Org.) *A Qualidade do Ar em Porto Alegre. Secretaria Municipal do Meio Ambiente*, Porto Alegre.
- 43-MAUTUCA, R.; LOMBAERT, N.; AKA, P.V.; DECORDER, I.; KIRSCH-VOLDERS, M. *Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring Biochimie* 88:1515-1531, 2006.
- 44-LEME DM, ANGELIS DF, MARIN-MORALES MA (2008). *Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of Allium cepa root cells. Aquat Toxicol* 88:214–219.