

# **RELATÓRIO DO PIBITI**

## **ATIVIDADE GENOTÓXICA/ MUTAGÊNICA DE NANOTUBOS DE CARBONO FUNCIONALIZADOS EM *Tradescantia pallida***

**ORIENTADOR: Prof<sup>a</sup>. Dra. Silvia Pierre Irazusta.**

**ALUNO: Thayana Nascimento da Silva.**

# **ATIVIDADE GENOTÓXICA/MUTAGÊNICA DE NANOTUBOS DE CARBONO FUNCIONALIZADOS EM *Tradescantia pallida***

## **INTRODUÇÃO**

### **NANOTUBOS DE CARBONO**

Os materiais gráfiticos têm sido amplamente estudados desde o século passado, em virtude de suas propriedades e aplicabilidade industrial. Os NTCs foram sintetizados pela primeira vez em 1991 por Sumio Iijima, e sua descoberta representou grande evolução científica, sugerindo aplicações tecnológicas e especulações teóricas excepcionais, devidas, principalmente, ao seu comportamento eletrônico singular (FAGAN et. al, 2003).

Os NTCs são uma forma alotrópica do carbono caracterizada pelo enrolamento de uma ou várias folhas de grafeno de forma concêntrica e cilíndrica e com cavidade interna oca (BARDI et. al, 2009). Podem ser classificados, quanto ao número de camadas, em NTCs de camada única (SWCNTs – "single-walled carbon nanotubes") ou de camadas múltiplas (MWCNTs – "multi-walled carbon nanotubes") (BAUGHMAN et. al, 2002). 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 mmm (MALARKEY e PARPURA, 2010).

Os NTCs são materiais estratégicos com grande interesse tecnológico, por causa principalmente de sua estrutura singular, a qual lhe confere um conjunto peculiar de propriedades mecânicas, ópticas, térmicas, químicas e eletrônicas (LIMA et. al, 2006). A versatilidade desses materiais permite que sejam explorados em diferentes áreas de pesquisa e aplicação (BELYANSKAYA et. al, 2009).

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 (PASCHOALINO et. al, 2010). Nessa área, eles atuam como carreadores de fármacos (BIANCO et. al, 2005), próteses neurais (BENABID et. al, 2005), marcadores biológicos e vetores de DNA na terapia gênica (CHEUNG et. al, 2010). Os NTCs têm sido, ainda, amplamente estudados para a terapêutica de neoplasias e doenças neurodegenerativas (WEI et. al, 2007).

## **FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO**

A funcionalização de nanotubos de carbono através de suas paredes, pontas ou por encapsulamento (os tubos de pontas abertas possuem capilaridade) tem sido vista como uma forma de explorar o potencial dos nanotubos de carbono na nanotecnologia. Os nanotubos funcionalizados podem ter propriedades eletrônicas e mecânicas que são substancialmente diferentes dos nanotubos não funcionalizados e este fenômeno é explorado para uso em sensores, dispositivos eletrônicos e eletro-mecânicos em escala nanométrica devido a sua grande resistência e flexibilidade mecânica. Essas estruturas quimicamente modificadas podem ser usadas de forma a facilitar a interação dos nanotubos com moléculas orgânicas e biológicas, com outros grupos químicos como fármacos ou moléculas tóxicas e, até mesmo, com vírus e bactérias, tornando os sensores capazes de detectar pequenos traços da espécie alvo e com alta seletividade. Certamente, o desenvolvimento de sensores utilizando nanotubos de carbono funcionalizados como bloco de construção é uma das áreas mais promissoras para uso desses materiais em nanotecnologia. O desafio é encontrar rotas quimicamente seguras, limpas e factíveis para alterar os nanotubos de carbono que em seu estado natural apresentam reatividade química muito baixa (SOUZA FILHO e FAGAN, 2007).

A funcionalização com a adsorção de grupos químicos como a hidroxila torna os nanotubos solúveis em meio aquoso e facilita a interação com macromoléculas celulares. Além disso, a funcionalização de NTCs resulta em menor toxicidade a células em culturas, aumentando, assim, o seu potencial de aplicação nas áreas biológicas e médicas (OLIVEIRA, 2011).

Foi evidenciada em vários estudos a capacidade dos nanotubos de atuarem como transportadores biocompatíveis de várias moléculas para o interior das células, incluindo pequenos peptídeos, diferentes tipos de proteínas e ácidos nucleicos (PANTAROTTO et al, 2004; KAM et al., 2004; DAI, 2005). Por exemplo, Kam e colaboradores (2004) relataram a captação, via endocitose, de estreptavina (uma proteína utilizada em terapias anticâncer) complexada a nanotubos funcionalizados com biotina em linhagens celulares humanas de leucemia promielocítica (HL60). Isoladamente, os SWCNT ou SWCNT-biotina não causaram toxicidade às células, enquanto que o complexo SWCNT-biotina-estreptavidina causou extensa morte celular 48 horas após a primeira hora de incubação com células HL60, demonstrando, portanto,

que os NTC não apenas internalizam a proteína, como também o conjugado internalizado provoca uma resposta funcional.

## **TOXICIDADE DOS NANOTUBOS DE CARBONO**

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, o que explica a controvérsia dos estudos descritos e impede a comparação dos resultados encontrados (MANNA, 2005; MAGREZ, 2006; WICK, 2007). 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 (PULSKAMP et. al, 2007). Fenoglio et al. (2006) sugeriram que o estresse oxidativo gerado pelos NTCs em culturas celulares está associado às impurezas de catalisadores metálicos em sua superfície. Pulskamp et al. (2007) ratificaram essa teoria ao demonstrarem ausência de espécies reativas em culturas com NTCs purificados.

Os nanotubos de carbono, que configuram os nanomateriais com a mais alta resistência mecânica já observada, bem como alta capilaridade, possuindo estrutura eletrônica única. Desde o seu surgimento, em 1991, têm sido realizados estudos de viabilidade das condições de purificação e isolamento, caracterização e manipulação. Sua rota de síntese encontra-se em fase de consolidação e potenciais aplicações dos nanotubos são extensas, incluindo dispositivos para armazenamento e conversão de energia, semicondutores, sensores, armazenamento de hidrogênio, aditivos para materiais poliméricos e suporte em processos catalíticos (PASCHOALINO et. al, 2010).

Vários estudos apontam para a aplicação de nanotubos tanto na área ambiental quanto na biotecnologia, como exemplificado por Long et al., que usaram nanomateriais adsorventes para remoção de NOx sob baixa pressão. Li et al. observaram alta eficiência de adsorção na remoção de chumbo em meio aquoso. Em função da sua estrutura, também estão sendo testados em aplicações medicinais como transportadores de fármacos, já sendo utilizados em telas planas, pneus, tecidos, entre outros (PASCHOALINO et. al, 2010).

Uma preocupação adicional com estes materiais deve-se a sua similaridade estrutural com os asbestos, os quais podem causar câncer no pulmão. Aparentemente, a toxicidade dos nanomateriais de carbono está também relacionada com a presença de alguns grupos químicos em sua superfície, como carbonilas e carboxilas, além da morfologia das partículas (PASCHOALINO et. al, 2010).

## **GENOTOXICIDADE**

A genotoxicidade é expressa por vários tipos de danos ao DNA (aductos ao DNA, sítios lábeis a alcáeis, quebras de fitas) e mutações variando de alterações cromossômicas estruturais ou numéricas (aneoploidia e poliploidia). A permanência do dano celular dependerá do balanço entre a eficiência dos sistemas de proteção e reparo celular (defesas anti-oxidantes, reparo de base/nucleotídeo, reparo de quebra de fita dupla) e os processos que levam à morte celular (apoptose e necrose). (MATEUCA et. al, 2006; KIRSCH-VOLDERS et. al, 2002).

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. (ANVISA, 2010). 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). A sobrevivência da célula danificada dependerá do equilíbrio entre a eficácia da proteção e reparação celular (sistemas de defesas antioxidantes, base / reparo por excisão de nucleotídeos, incompatibilidade ou reparação) e os processos que conduzem à célula morte (apoptose ou necrose). (MULLER, et al., 2008)

Estudos de genotoxicidade são utilizados para auxiliar na detecção de compostos que podem causar danos genéticos e posteriormente, câncer. Uma proporção significativa de agentes químicos cancerígenos foi detectada como causadores de danos no DNA. Existem, no entanto, outras substâncias cancerígenas, tais como hormônios, alguns metais, agentes físicos inertes e alguns outros produtos químicos, que podem causar câncer através de outros mecanismos que não interação com o DNA. Essas substâncias cancerígenas não são normalmente detectadas por meio dos testes de genotoxicidade (GUY, 2005).

Para tanto, o mais recomendado é a combinação de testes dependendo das

características do agente tóxico, bem como devem ser usados vários sistemas biológicos, assim como variados tipos de danos ao DNA (mutações gênicas, aberrações cromossômicas, etc.) para melhor avaliar a genotoxicidade (SILVA et al, 2004).

## **MUTAGENICIDADE**

A mutagenicidade, que equivale a capacidade de uma substância química reagir com o DNA podendo causar uma mutação, foi o ponto de partida de dois estudos: Santos (2004), que utilizou o formaldeído como controle-positivo em bioensaios que comprovaram o aparecimento de micronúcleos também em plantas expostas ao toxicante e Ladeira (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 formaldeído confirmando a genotoxicidade do mesmo.

Bioindicadores genotóxicos podem ser organismos ou um conjunto de organismos que reagem a uma determinada perturbação através de alterações biológicas ou químicas. A presença dos bioindicadores, neste caso, é um importante meio de avaliação do quão prejudicial pode ser o formaldeído para o organismo.

Os micronúcleos são uma grande prova disso, eles são gerados a partir de quebras ou perda de cromossomo. Na fase de divisão celular, onde o material genético dentro do núcleo replica-se, podem ocorrer erros (potencializados por agentes genotóxicos, como por exemplo, o formaldeído ou metais pesados) que levam a danos ao DNA. Assim, a separação desigual do material genético, gera núcleos menores que podem ser constituídos de fragmentos de cromossomo, cromossomos inteiros ou de fragmentos da célula-mãe que se perdem durante a anáfase e não são incluídos no material genético da célula-filha durante a telófase sendo chamados micronúcleos.

Para avaliar a ocorrência de mutações em uma célula, é preciso utilizar algumas técnicas, como o Teste de Micronúcleos, pois é simples, prático e de baixo custo. O micronúcleo (MN) é um núcleo adicional e separado do núcleo principal de uma célula, formado durante a divisão celular por cromossomos ou fragmentos de cromossomos que se atrasam em relação aos demais. Resulta de alterações estruturais cromossômicas espontâneas ou experimentalmente induzidas, ou ainda, de falhas no fuso celular, sendo portanto, excluído do novo núcleo, formado na telófase. A técnica de micronúcleos

consiste na identificação do aumento na frequência de mutação em células, que são expostas a uma gama variada de agentes genotóxicos.

### ***Tradescantia pallida***

A *Tradescantia pallida* é uma planta que apresenta fácil adaptação em qualquer ambiente podendo se desenvolver durante todo o ano, tanto ao ar livre como nas regiões subtropicais, quanto em estufas, em qualquer parte do mundo. Seu tamanho relativamente pequeno e o código genético compostos por seis pares de cromossomos relativamente grandes tornaram essa planta um instrumento favorável para estudos citogenéticos (CARVALHO, 2005), por isso ela vem sendo utilizada desde os primeiros estudos nos quais relacionavam atividade genética com a ação de compostos e agentes químicos (MA, 1981, 1983; GRANT et al., 1992). Basicamente todas as partes da *T. pallida* podem ser utilizadas para a detecção e monitoramento de poluentes: flores, pétalas, raiz, pêlos estaminais, micrósporos, tubo polínico e material genético (GRANT et al., 1992).

Os dois ensaios mais utilizados para identificar a poluição atmosférica são o bioensaio nos pêlos estaminais (Trad-SH) e o bioensaio de micronúcleos (Trad-MCN), descritos por Grant et al. (1992) e Ma (1981, 1983), respectivamente. Micronúcleos (MCN) são estruturas resultantes de cromossomos inteiros ou de fragmentos cromossômicos que se perdem durante a divisão celular e, por isso, não são incluídos nos núcleos das células filhas, permanecendo no citoplasma das células interfásicas. Durante a telófase, os micronúcleos são incluídos nas células filhas podendo fundir-se com o núcleo principal ou formar um ou mais núcleos secundários menores no citoplasma, refletindo, a ocorrência tanto de danos estruturais quanto de aneuploidias, indicando a presença de substâncias clastogênicas e/ou aneugênicas resultantes da ação de agentes físicos ou químicos presentes no ambiente (JUNIOR et al., 2008).

No bioensaio Trad-MCN, os micronúcleos podem ser visualizados na fase de tétrades, podendo existir mais de um micronúcleo em uma mesma tétrade (LUIZ et al., 2005; ANDRÉ, 2007).

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GERAL:**

- Avaliação da toxicidade potencial de Nanotubo de Carbono funcionalizado com polietilenoglicol (PEG).

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Utilizar o ensaio de mutagenicidade com *Tradescantia pallida* para avaliação da toxicidade potencial do NTC funcionalizado com PEG.

### **METODOLOGIA:**

#### **Materiais utilizados:**

- Água destilada.
- Álcool.
- Becker.
- Corante aceto-carmin.
- Herbicida Trifluralina
- Lâmina e lamínula.
- Microscópio Óptico Comum.
- Mistura de terras (Compostado PLANTAX, terra vegetal especial para hortaliças, vermiculita expandida e húmus de minhoca).
- Nanotubos de carbono Hélix
- Papel alumínio
- Polietilenoglicol 6000
- Solução de aceto-etanol (1:3).
- Tampão PBS
- *Tradescantia pallida*.
- Vasos

### **MÉTODOS**

#### **1. Montagem dos vasos:**



Os vasos foram montados utilizando os clones de *Tradescantia pallida* já existentes, no Laboratório de Ecotoxicologia do NEPA – FATEC – Sorocaba. O substrato normalmente utilizado para o cultivo dessas plantas, no vaso, foi preparado a partir da mistura de terra compostado PLANTAX, terra vegetal especial para hortaliças, vermiculita expandida e húmus de minhoca, como mostra na figura 1 e figura 2 abaixo.



**Figura 1:** Montagem dos vasos de *Tradescantia pallida*



**Figura 2:** Vasos de *Tradescantia pallida*

## **2. Ensaio de Mutagenicidade com *Tradescantia pallida*.**

O ensaio de genotoxicidade foi realizado no Laboratório de Ecotoxicologia do NEPA – FATEC – Sorocaba e na empresa Contemar, segundo protocolo, segundo MA (1982), com modificações:

### **Exposição:**

Foram utilizadas somente inflorescências jovens para o tratamento (inflorescências abertas são velhas e não podem ser usadas).

Para fins de padronização da metodologia, coletamos ao todo 34 inflorescências intactas, sendo elas 9 para o controle negativo, 7 para o controle positivo, 5 para solução de NTC 0,01 ppm, 5 para solução de NTC 0,1 ppm, 4 para solução de NTC 1,0 ppm e 4 para solução de NTC 10 ppm.

O caule foi cortado com 10-15 cm de comprimento e em seguida colocada em becker com 200 mL de água destilada coberto por papel alumínio.

O tempo de exposição da inflorescência foi de 24 horas. Depois da exposição, a inflorescência foram removidas e fixadas em solução de aceto-etanol (1:3), que foi preparada imediatamente antes do uso.

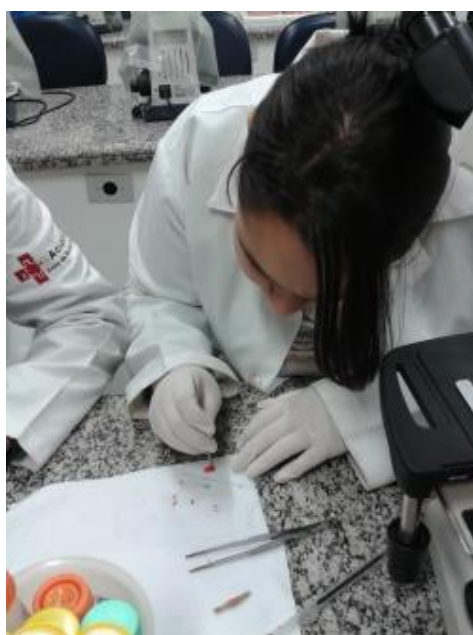
Após 24 horas de fixação, as inflorescências foram estocadas em etanol 70%.

### **Preparação da lâmina:**

Depois de aberta a inflorescência o botão correto, que na maioria das vezes são os menores, foi dissecado, por meio de agulhas finas e, um pequeno número de células é transferido para a lâmina. Após este passo, uma gota de corante aceto-carmin é adicionada sobre as células, e os restos celulares são removidos cuidadosamente, como demonstra as figuras 3 e 4 abaixo.



**Figura 3:** Selecionando o botão da inflorescência



**Figura 4:** Remoção de restos celulares

As lâminas foram cobertas com lamínula e delicadamente aquecidas a  $\pm 60^{\circ}\text{C}$ , por meio de uma lamparina. Pressiona-se cuidadosamente a lamínula sobre a lâmina, observando-se esta preparação ao microscópio.

**Contagem dos micronúcleos (MCN):**

A contagem dos MCN foi realizada no aumento de 400 X. Para cada grupo experimental, foram feitas em média de 5 lâminas, e leitura de 300 tétrades de cada uma das lâminas.

A frequência de MCN foi calculada dividindo-se o número total de MCN pelo número total de tétrades contadas.

O valor é dado em nº de MCN /300 tétrades. A média e desvio padrão são calculados para cada grupo e a análise de variância é feita pelo teste de DUNNETT. A enumeração é feita conforme a tabela abaixo.

Grupos Experimentais	N	I	II	III	IV	V	Soma	MCN/300 tétrades	%MCN

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Análise:

Como citado na metodologia as tabelas mostram os resultados do ensaio de geno/mutagenicidade da inflorescência da *Tradescantia pallida*.

Na tabela 1 as inflorescências foram expostas em água destilada, para controle negativo.

**Tabela 1:** Dados dos micronúcleos (MCN) da inflorescência da *Tradescantia pallida* – Controle Negativo

Número da Lâmina	Números de Micronúcleos						nº de MC	nº de MC/300	% de Micronúcleo
	0	1	2	3	4	5			
1	287	11	2	0	0	0	15	0,0500	5,00
2	283	13	4	0	0	0	21	0,0700	7,00
3	291	9	0	0	0	0	9	0,0300	3,00
4	281	18	1	0	0	0	20	0,0667	6,67
5	283	16	1	0	0	0	18	0,0600	6,00
6	280	17	3	0	0	0	23	0,0767	7,67
7	272	24	4	0	0	0	32	0,1067	10,67
8	279	18	3	0	0	0	24	0,0800	8,00
9	281	17	2	0	0	0	21	0,0700	7,00
10	280	18	2	0	0	0	22	0,0733	7,33

Total de inflorescências:	9
---------------------------	---

Na tabela 2 as inflorescências foram expostas em herbicida Trifluralina, para controle positivo.

**Tabela 2:** Dados dos micronúcleos (MCN) da inflorescência da *Tradescantia pallida* – Controle Positivo

Número da Lâmina	Números de Micronúcleos						nº de MC	nº de MC/300	% de Micronúcleo
	0	1	2	3	4	5			
1	211	65	20	4	0	0	117	0,3900	39,00
2	246	44	9	1	0	0	65	0,2167	21,67
3	74	226	0	0	0	0	226	0,7533	75,33
4	249	39	10	2	0	0	65	0,2167	21,67
5	233	52	14	1	0	0	83	0,2767	27,67
Total de inflorescências:	7								

Na tabela 3 as inflorescências foram expostas em Solução de 0,01 ppm de NTC funcionalizado com PEG 6000.

**Tabela 3:** Dados dos micronúcleos (MCN) da inflorescência da *Tradescantia pallida* – NTC 0,01 ppm

Número da Lâmina	Números de Micronúcleos						nº de MC	nº de MC/300	% de Micronúcleo
	0	1	2	3	4	5			
1	285	14	1	0	0	0	16	0,0533	5,33
2	287	12	1	0	0	0	14	0,0467	4,67
3	282	14	4	0	0	0	22	0,0733	7,33
4	289	7	4	0	0	0	15	0,0500	5,00
Total de inflorescências:	5								

Na tabela 4 as inflorescências foram expostas em Solução de 0,1 ppm de NTC funcionalizado com PEG 6000.

**Tabela 4:** Dados dos micronúcleos (MCN) da inflorescência da *Tradescantia pallida* – NTC 0,1 ppm

Número da Lâmina	Números de Micronúcleos						nº de MC	nº de MC/300	% de Micronúcleo
	0	1	2	3	4	5			
1	272	27	1	0	0	0	29	0,0967	9,67

2	267	27	4	2	0	0	41	0,1367	13,67
3	265	30	5	0	0	0	40	0,1333	13,33
4	266	32	3	0	0	0	38	0,1267	12,67
Total de inflorescências:		5							

Na tabela 5 as inflorescências foram expostas em Solução de 1,0 ppm de NTC funcionalizado com PEG 6000.

**Tabela 5:** Dados dos micronúcleos (MCN) da inflorescência da *Tradescantia pallida* – NTC 1,0 ppm

Número da Lâmina	Números de Micronúcleos						nº de MC	nº de MC/300	% de Micronúcleo
	0	1	2	3	4	5			
1	260	33	7	0	0	0	47	0,1567	15,67
2	264	29	7	0	0	0	43	0,1433	14,33
3	265	28	6	1	0	0	43	0,1433	14,33
4	270	28	2	0	0	0	32	0,1067	10,67
Total de inflorescências:		4							

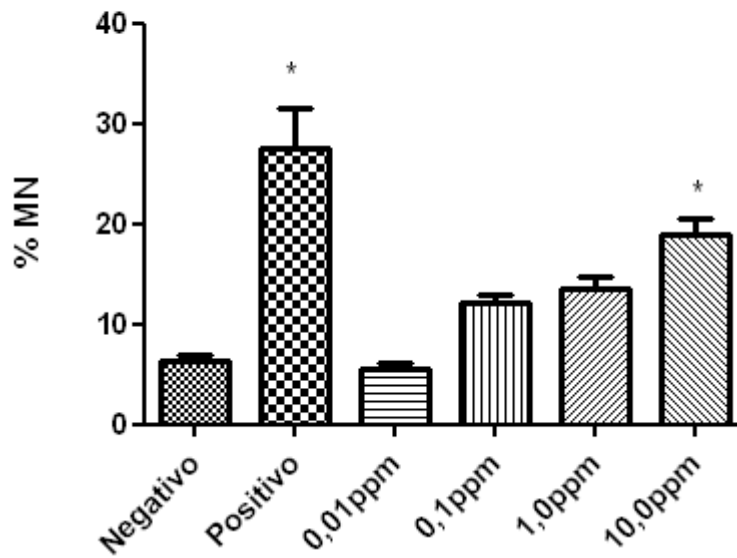
Na tabela 6 as inflorescências foram expostas em Solução de 10 ppm de NTC funcionalizado com PEG 6000.

**Tabela 6:** Dados dos micronúcleos (MCN) da inflorescência da *Tradescantia pallida* – NTC 10 ppm

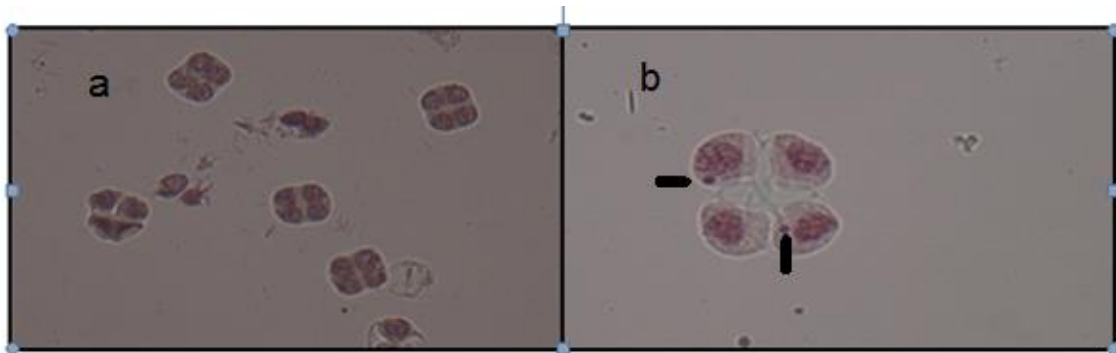
Número da Lâmina	Números de Micronúcleos						nº de MC	nº de MC/300	% de Micronúcleo
	0	1	2	3	4	5			
1	240	55	4	1	0	0	66	0,2200	22,00
2	230	70	0	0	0	0	70	0,2333	23,33
3	260	35	5	0	0	0	45	0,1500	15,00
4	255	32	8	0	0	0	48	0,1600	16,00
5	252	42	5	1	0	0	55	0,1833	18,33
Total de inflorescências:		4							

A figura 5 mostra o resultado da análise estatística dos dados acima, mostrando que apenas a concentração de 10 ppm testada, houve efeito mutagênico que foi estatisticamente diferente do controle negativo. A figura 6 mostra as imagens vistas ao microscópio das tétrades de *T. pallida*. Em a. as tétrades são normais; em b. apresentam MNs, conforme apontam as setas.

### Mutagenicidade de MWCNT in *Tradescantia pallida*



**Figura 5.** Comparação das médias de MN entre os tratamentos. Os valores sob as colunas se referem as concentrações em ppm; \*  $p < 0,05$ .



**Figura 6.** Tétrades da *Tradescantia pallida*. Em a. tétrades normais; em b. tétrades com MN (setas). 400X.

### CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou que a partir da concentração de 10 ppm observa-se efeito mutagênico. Embora esta concentração exceda as concentrações matematicamente projetadas para os resíduos ambientais, há necessidade de cautela na utilização e disposição ambiental dessas nanopartículas (MUELLER e NOWACK, 2008; GOTTSCHALK et al., 2009).

Não é possível, no entanto, fazer uma afirmação definitiva, pois não se pode excluir um efeito do PEG, uma vez que estes testes não foram ainda realizados.

É importante ressaltar, no entanto, que este continua sendo um projeto original, pois ainda não há nenhum dado na literatura até o momento desta pesquisa utilizando o bioindicador *Tradescantia pallida* para avaliar a toxicidade dos nanotubos de carbono.

### **DIFICULDADES ENCONTRADAS:**

A principal dificuldade encontrada durante o primeiro período, foi que houve poucas inflorescências da planta *Tradescantia pallida*, na Fatec – Sorocaba, pois em alguns períodos o calor e sol excessivo prejudicaram as plantas e os meses excessivamente chuvosos da mesma forma, prejudicaram o trabalho.

### **ATIVIDADES EXTRAS**

- CURSO DE MUTAGÊNESE AMBIENTAL- Mini-Curso Satélite pelo XII Congresso de Ecotoxicologia 2012 (certificado em anexo).
- Participação no 2º Simpósio de Iniciação Científica da Fatec José Crespo Gonzales (certificado em anexo).
- Trabalho submetido ao 15º SICT – ATIVIDADE GENOTÓXICA/ MUTAGÊNICA DE NANOTUBOS DE CARBONO FUNCIONALIZADOS EM *Tradescantia pallida* – em análise.

### **REFERÊNCIAS:**

ANDRÉ, P. A. **Câmara de Topo Aberto, CTA: construção e uso para observação de potencial tóxico da poluição atmosférica urbana com bioensaios em plantas.** São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2007, 118 p. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo: 2007.

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: 23 ago. 2013.

BARDI G, TOGNINI P, CIOFANI G , RAFFA V, COSTA M, PIZZORUSSO T. **Pluronic-coated carbon nanotubes do not induce degeneration of cortical neurons in vivo and in vitro.** *Nanomedicine.* 2009;5(1):96-104.

BAUGHMAN RH, ZAKHIDOV AA, DE HEER WA. **Carbon nanotubes – the route toward applications.** *Science.* 2002;297(5582):787-92.

BELYANSKAYA L, WEIGEL 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.

BENABID AL, WALLACE B, MITROFANIS J, XIA C, PIALLAT B, FRAIX V, et al. **Therapeutic electrical stimulation of the central nervous system.** *C R Biol.* 2005;328(2):177-86.

BIANCO A, KOSTARELOS K, PRATO M. **Applications of carbon nanotubes in drug delivery.** *Curr Opin Chem Biol.* 2005;9(6):674-9.

CARVALHO, H. A. **A Tradescantia como bioindicador vegetal na monitoração dos efeitos clastogênicos das radiações ionizantes.** *Radiologia Brasileira, Rio de Janeiro,* v. 38, n. 6, p. 459-462, 2005.

CHEUNG W, PONTORIERO F, TARATULA O, CHEN AM, HE H. **DNA and carbon nanotubes as medicine.** *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62(6):633-49.

FAGAN SB, SILVA AJR, MOTA R, BAIERLE RJ, FAZZIO A. **Functionalization of carbon nanotubes through the chemical binding of atoms and molecules.** *Phys Rev B.* 2003;67(3):033405-8.

FENOGLIO I, TOMATIS M, LISON D, MULLER J, FONSECA A, NAGY JB, et al. **Reactivity of carbon nanotubes: free radical generation or scavenging activity.** Free Radic Biol Med. 2006;40(7):1227-33.

FISKESJÖ, G. The Allium test in wastewater monitoring. **Environmental Toxicology and Water Quality: An international journal**, v. 8, p. 291-298, 1993.

FISKESJÖ, G. *Allium* test II: Assessment of a chemical's genotoxic potential by recording aberration in chromosomes and cell divisions in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Toxicology and Water Quality: An international journal**, v. 9, p. 235-241, 1994.

GOTTSCHALK, F.; SONDERER, T.; SCHOLZ, R. W.; NOWACK, B. **Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO<sub>2</sub>, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions.** Environ. Sci. Technol. 2009, 43, 9216–9222.

GRANT, W. F.; LEE, H. G.; LOGAN, D. M.; SALAMONE, M. F. **The use of Tradescantia and Vicia faba bioassays for the in situ detection of mutagens in an aquatic environment.** Mutation Research, Amsterdam, v. 270, n. 1, p. 53-64, 1992.

JÚNIOR, J. A. S.; JÚNIOR, J. C. S. S.; OLIVEIRA, J. L.; CERQUEIRA, E. M. M.; MEIRELES, J. R. C. **Micronúcleos em tétrades de Tradescantia pallida (Rose) Hunt.** Cv. Purpurea Boom; alterações genéticas decorrentes de poluição atmosférica urbana. Acta Scientiarum Biological Sciences, Maringá, v. 30, n. 3, p. 295-301, 2008.

KIRSCH-VOLDERS M, VANHAUWAERT A, DE BOECK M and DECORDIER L (2002) **Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations.** Mutat Res 504:137-148.

LIMA MD, BONADIMAN R, DE ANDRADE MJ, TONIOLO J, BERGMANN CP. **Synthesis of multi-walled carbon nanotubes by catalytic chemical vapor deposition using Cr<sub>2</sub>xFe<sub>x</sub>O<sub>3</sub> as catalyst.** Diam Relat Mater. 2006;15(10):1708-13.

LUIZ, J. E.; LAVENDOWSKI, I. M. F.; OLIVEIRA, G. O.; GUIMARÃES, E. T.; DOMINGOS, M.; SALDIVA, P. H. N. **Sentido a cidade: Biomonitoramento da qualidade do ar de Santo André com plantas da espécie Tradescantia pallida e a educação ambiental.** Serviço Municipal de saneamento ambiental de Santo André, 2005.

MA, T. H. **Tradescantia cytogenetic tests (root-tip mitosis, pollen mitosis, pollen mother-cell meiosis).** A report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Research. v. 99, p. 293-302, 1982.

MA, T. H. **Tradescantia micronucleus bioassay and pollen tube chromatid aberration test for in situ monitoring and mutagen screening.** Environmental Health Perspectives, United States, v. 37, p. 85-90, 1981.

MA, T. H. **Tradescantia micronucleus (Trad-MCN) test for environmental clastogens.** In: Kolber, A.R.; Wong, T.K.; Grant, Lester D.; De Woskin, Robert S. & Hughes, J. T. In vitro toxicity testing of environmental agents. Ed. Plenum Publishing corporation, p. 1191-1214, 1983.

MAGREZ A, KASAS S, SALICIO V, PASQUIER N, SEO JW, CELIO M, et al. **Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials.** Nano Lett. 2006;6(6):1121-5.

MALARKEY EB, PARPURA V. **Carbon nanotubes in neuroscience.** Acta Neurochir Suppl. 2010;106:337-41.

MANNA SK, SARKAR S, BARR J, WISE K, BARRERA EV, JEJELOWO O, ET AL. SINGLEWALLED. **Carbon nanotube induces oxidative stress and activates nuclear transcription factor- $\kappa$ B in human keratinocytes.** Nano Lett. 2005;5(9):1676-84.

MAUTECA, 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.

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.

OLIVEIRA, V. et al. **Nanotubos de carbono aplicados às neurociências : perspectivas e desafios.** Revista de psiquiatria clínica, São Paulo, v.38, n. 5, p. 201-206, 2011.

PANTAROTTO, D.; BRIAND, J.P.; PRATO, M.; BIANCO, A. Translocation of bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubes. **Chemical Communications**, v.1, p. 16-17 (2004).

PASCHOALINO MP, MARCONE GPS, JARDIM WF. **Os nanomateriais e a questão ambiental.** *Quím Nova.* 2010;33(2):421-30.

PULSKAMP K, DIABATÉ S, KRUG HF. **Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants.** *Toxicol Lett.* 2007;168(1):58-74.

SILVA, J.; FONSECA, M. B. **Estudos Toxicológicos no Ambiente e na Saúde Humana.** In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. (org.). *Genética Toxicológica.* Porto Alegre: Alcance, 2003. p. 70-84.

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.

SOUZA FILHO, A. G. de; FAGAN, S. B. **Funcionalização de nanotubos de carbono.** *Santa Maria,* v.30, n.7, p.1695-1703, 2007.

WEI W, SETHURAMAN A, JIN C, MONTEIRO-RIVIERE NA, NARAYAN RJ.  
**Biological properties of carbon nanotubes.** J Nanosci Nanotechnol. 2007;7(4):1284-97.

WICK P, MANSER P, LIMBACH LK, DETTLAFF-WEGLIKOWSKA U, KRUMEICH F, ROTH S, et al. The **degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity.** Toxicol Lett. 2007;168(2):121-31.