



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA**  
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**Estudo da toxicidade e genotoxicidade induzidas por  
diferentes nanopartículas *in vivo***

**LAISE RODRIGUES DE ANDRADE**

**Goiânia**

**2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**

**Estudo da toxicidade e genotoxicidade induzidas por  
diferentes nanopartículas *in vivo***

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**       **Dissertação**       **Tese**

**2. Identificação da Tese ou Dissertação**

Autor (a):	Laise Rodrigues de Andrade		
E-mail:	laisedeandrade@hotmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Vínculo empregatício do autor:			
Agência de fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior	Sigla: CAPES		
País:	Brasil	UF: GO	CNPJ:
Título:	Estudo da toxicidade e genotoxicidade induzidas por diferentes nanopartículas <i>in vivo</i> .		
Palavras-chave:	Genotoxicidade, nanopartículas, <i>Drosophila</i>		
Título em outra língua:	Study of toxicity and genotoxicity induced by different nanoparticles <i>in vivo</i> .		
Palavras-chave em outra língua:	Genotoxicity, nanoparticles, <i>Drosophila</i>		
Área de concentração:	Mutagênese		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	27/02/2012		
Programa de Pós-Graduação:	Programa de Pós-Graduação em Biologia		
Orientador (a):	Profa. Dra. Kênya Silva Cunha		
E-mail:	kenya.cunha@gmail.com		
Co-orientador (a):*			
E-mail:			

\*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento  SIM       NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Laise Rodrigues de Andrade  
Assinatura do (a) autor (a)

Data: 08 / 05 / 2012

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

**LAISE RODRIGUES DE ANDRADE**

**Estudo da toxicidade e genotoxicidade induzidas por  
diferentes nanopartículas *in vivo***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia, da Universidade Federal de Goiás, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Biologia.

Área de concentração: Biologia Celular e Molecular

Orientadora: Profa. Dra. Kênya Silva Cunha

**Goiânia**

**2012**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
GPT/BC/UFG**

A553e Andrade, Laise Rodrigues.  
Estudo da toxicidade e genotoxicidade induzidas por diferentes nanopartículas *in vivo* [manuscrito] / Laise Rodrigues de Andrade. - 2012.  
81 f. : il., figs, tabs.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Kênya Silva Cunha.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, 2012.  
Bibliografia.  
Inclui listas de ilustrações, abreviaturas, siglas e tabelas.

1. Nanotecnologia – Toxidade genética. 2.  
Nanopartículas – Genotoxicidade. 3. Nanopartículas - Carbono  
I. Título.

CDU: 620.3:543.632.42

**LAISE RODRIGUES DE ANDRADE**

**Estudo da toxicidade e genotoxicidade induzidas por  
diferentes nanopartículas *in vivo***

Dissertação de mestrado defendida por Laise Rodrigues de Andrade e  
aprovada pela comissão examinadora no dia 27/02/2012 no Instituto de  
Ciências Biológicas II – UFG

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Kênya Silva Cunha  
(Universidade Federal de Goiás)

---

Profa. Dra. Lee Chen Chen  
(Universidade Federal de Goiás)

---

Profa. Dra. Silvia Pierre Irazusta  
(Faculdade de Tecnologia de Sorocaba/Centro Estadual Tecnológica Paula  
Souza)

**Goiânia/2012**

## AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar sempre meu caminho e colocar nele pessoas muito especiais, responsáveis pelo meu crescimento pessoal e profissional.

À Profa. Dra. Kênya Silva Cunha, um exemplo de vida e profissionalismo. Obrigada pela oportunidade, confiança, amizade, pelos ensinamentos e atenção à execução deste trabalho.

À Profa. Dra. Lee Chen Chen e à Profa. Dra. Silvia Pierre Irazusta por aceitarem participar da banca examinadora, oferecendo suas valiosas sugestões e proporcionando discussões enriquecedoras ao meu aprendizado.

Às equipes que, tão gentilmente, nos forneceram as amostras aqui avaliadas: Prof. Dr. Vitor Baranauskas e Prof. Dr. Helder José Ceragioli (FEEC/UNICAMP); Prof. Dr. José Maurício Rosolen, Elaine Y. Matsubara e Juliana C. de Lima (FFCLRP/USP); e, em especial, ao Leonardo P. Franchi (FMRP/USP) pela amizade e prestatividade. Obrigada a todos vocês pela cooperação!

Ao Prof. Dr. Elson Alves Costa, à Profa. Dra. Kátia Flávia Fernandes e à equipe do Laboratório de Comportamento Celular coordenado pela Profa. Dra. Simone Maria Teixeira de Sabóia-Morais, que me ajudaram prontamente nos momentos em que os procurei.

A todos os professores que contribuíram para minha formação e aos colegas do curso pelas horas de estudo compartilhadas.

Agradeço também aos companheiros de trabalho, Nilza, Igor, Aroldo, Cláudia e Ana Clara pela agradabilíssima convivência, colaboração e, principalmente, pela amizade. Gosto muito de vocês!

Ao meu namorado, Guth Berger, que me acompanhou com carinho e paciência durante todo esse período, sempre me dando força e apoio.

A minha família, meus irmãos Vanessa e Elson Júnior, e em especial a minha mãe, Elenice pelo incentivo e cuidados dedicados a mim, pelos quais eu devo minha eterna gratidão.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

*“E o fim é belo incerto... depende de como você vê  
O novo, o credo, a fé que você deposita em você e só  
Só enquanto eu respirar  
Vou me lembrar de vocês!”*

(Fernando Anitelli)

## SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES DA INTRODUÇÃO .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	x
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....	xi
RESUMO .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. Nanociência e Nanotecnologia .....	1
1.2. Nanotoxicologia e Nanogenotoxicologia .....	3
1.3. Nanotubos de Carbono .....	5
1.3.1. Aplicações dos Nanotubos de Carbono .....	7
1.3.2. Toxicidade dos Nanotubos de Carbono .....	10
1.4. Nanopartículas de Prata .....	15
1.4.1. Aplicações das Nanopartículas de Prata .....	16
1.4.2. Toxicidade das Nanopartículas de Prata .....	17
1.5. Nanopartículas de Dióxido de Cério .....	20
1.5.1. Aplicações das Nanopartículas de Dióxido de Cério .....	22
1.5.2. Toxicidade das Nanopartículas de Dióxido de Cério .....	23
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	27
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	29
3.1. Agentes Químicos .....	29
3.1.1. Nanotubos de Carbono .....	29
3.1.2. Nanopartículas de Prata (AgNP) .....	32
3.1.3. Nanopartículas de Dióxido de Cério (CeO <sub>2</sub> -NP) .....	33
3.1.4. Doxorrubicina (DXR) .....	33
3.2. Dispersão das Nanopartículas .....	34
3.3. Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) .....	34
3.3.1. Linhagens de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	35
3.3.2. Procedimento Experimental .....	35
3.3.3. Genótipos dos Indivíduos F1 Testados .....	36
3.3.4. Montagem e Análise Microscópica das Lâminas .....	37
3.3.5. Classificação dos Clones .....	37

3.3.6. Bases Genéticas .....	38
3.3.7. Análise Estatística .....	39
<b>4. RESULTADOS</b> .....	41
4.1. Efeitos Tóxicos .....	41
4.2. Toxicidade Genética .....	41
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	46
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	55
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	56

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES DA INTRODUÇÃO**

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática da estrutura de SWCNT, MWCNT e de CSCNT ..	6
<b>Figura 2.</b> Estrutura cristalina da rede fluorita cúbica de CeO <sub>2</sub> .....	21
<b>Figura 3.</b> Esquema de preparação do CeO <sub>2</sub> -NP pelo método de precipitação .....	22
<b>Figura 4.</b> Curva típica da análise EDS do NTC .....	29
<b>Figura 5.</b> Espectro Raman da partícula NT .....	30
<b>Figura 6.</b> Curva típica da análise EDS do NT .....	31
<b>Figura 7.</b> Imagens do NT obtidas por FESEM e HRTEM em diferentes ampliações .....	31
<b>Figura 8.</b> Visualização em microscopia eletrônica de pelos múltiplos, pelo normal e pelo <i>flare</i> .....	35
<b>Figura 9.</b> Classificação das manchas de acordo com o fenótipo e o tamanho das manchas com pelos mutantes .....	38

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Características físicoquímicas de AgNP .....	32
<b>Tabela 2.</b> Características físicoquímicas de CeO <sub>2</sub> -NP .....	33
<b>Tabela 3.</b> Avaliação dos efeitos mutagênicos e/ou recombinogênicos do NTC, NT e CS em células somáticas de larvas obtidas do cruzamento ST .....	42
<b>Tabela 4.</b> Avaliação dos efeitos mutagênicos e/ou recombinogênicos do MW em células somáticas de larvas obtidas do cruzamento ST .....	43
<b>Tabela 5.</b> Avaliação dos efeitos mutagênicos e/ou recombinogênicos da AgNP em células somáticas de larvas obtidas do cruzamento ST .....	44
<b>Tabela 6.</b> Avaliação dos efeitos mutagênicos e/ou recombinogênicos do CeO <sub>2</sub> -NP em células somáticas de larvas obtidas do cruzamento ST .....	45

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

8-oxodG	8-oxo-7,8-diidro-2'-deoxiguanosina
A549	Linhagem celular de carcinoma pulmonar humano
AgNP	Nanopartículas de prata
BEAS-2B	Linhagem de células epiteliais brônquicas humanas
BH	Heterozigotos para o cromossomo balanceador TM3
BRL 3A	Linhagem celular de fígado de rato
CAT	Catalase
CeO <sub>2</sub> -NP	Nanopartículas de dióxido de cério ou nanocéria
CSCNT	Nanotubos do tipo “ <i>cup-stacked</i> ”
CVD	Deposição química de vapor
DCL	<i>Diamond Like Carbon</i>
DXR	Doxorrubicina
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X
Endo-III	Endonuclease-III
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FESEM	Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo
<i>flr</i> <sup>3</sup>	<i>Flare</i>
FPG	Formamidopirimidina-DNA glicosilase
GSH	Glutathiona
H9c2	Miócitos cardíacos
HaCaT	Linhagem de células queratinócitas humanas
HEK	Linhagem celular de queratinócitos epidérmicos humanos
HEK-293	Linhagem celular de rim embrionário humano
HFCVD	Deposição química a vapor auxiliado por filamento quente
HL60	Linhagem celular humana de leucemia promielocítica
HRTEM	Microscopia eletrônica de alta resolução
HSP70	Proteína de choque térmico 70
HT22	Células neuronais de camundongos
ICM	Massa celular interna
IMR-90	Células de fibroblasto humano
J774A.1	Macrófagos murinos

L929	Fibroblastos
LDH	Lactato desidrogenase
LeAqp2	Gene para proteínas formadoras dos canais de água
LOH	Perda de heterozigose
m	Metro
MCF-7	Linhagem celular de carcinoma de mama
MDA	Malondialdeído
MH	Trans-heterozigotos
MI	Índice mitótico
mM	Milimolar
MWCNT	Nanotubos de paredes múltiplas
<i>mwh</i>	<i>Multiple wing hair</i>
NAC	N-acetilcisteína
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear kappa B
NIR	Radiação infravermelho próxima
nm	Nanômetro
NPs	Nanopartículas
NTC	Nanotubos de carbono
OGG1	8-oxoguanina-DNA-glicosilase
RAW 264.7	Macrófagos
RH	Recombinação homóloga
SCE	Técnica de troca de cromátides irmãs
SMART	Teste para Detecção de Mutação e Recombinação em Células Somáticas
SOD	Superóxido dismutase
ST	Cruzamento padrão
SWCNT	Nanotubos de parede única ou simples
TE	Trofectoderma
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral - $\alpha$
U251	Células cancerígenas
V79	Linhagem celular de fibroblastos de pulmão de hamster chinês
$\mu$ m	Micrômetro

## RESUMO

O rápido avanço da nanotecnologia permitiu a criação de uma grande variedade de nanopartículas promissoras para os setores industrial, energético e ambiental. Além disso, muitas aplicações biológicas têm sido propostas para as nanopartículas, como o transporte de genes e fármacos para o tratamento de doenças, incluindo o câncer e infecções. Portanto, é importante esclarecer se as nanopartículas podem representar um perigo ao ambiente e à saúde humana. Neste estudo, nós investigamos a toxicidade potencial e a capacidade de induzir danos ao DNA de diferentes nanopartículas: quatro espécies de nanotubos de carbono (NTC, NT, CS e MW), nanopartículas de prata (AgNP) e nanocéria (CeO<sub>2</sub>-NP). Foi utilizado o teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster* que detecta a perda de heterozigose de dois marcadores genéticos envolvidos nas vias metabólicas de formação de pelos da asa – pelos múltiplos (*mwh*) e *flare*<sup>3</sup> (*flr*<sup>3</sup>). Nas larvas, a proliferação das células dos discos imaginais das asas pode produzir pelos com fenótipos mutantes expressos nas asas dos indivíduos adultos. Usando o cruzamento padrão, larvas de terceiro estágio foram tratadas com diferentes concentrações das nanopartículas até atingir o estágio de pupa. As asas das moscas adultas foram examinadas microscopicamente para identificação de alterações fenotípicas. Em todas as concentrações as taxas de sobrevivência foram superiores a 90%, indicando ausência de toxicidade crônica das nanopartículas avaliadas. Usando o teste binomial condicional, os resultados dos diferentes tratamentos com NTC, NT e CS foram comparados com o respectivo controle negativo (água destilada), demonstrando que não houve aumento estatisticamente significativo ( $p > 0,05$ ) nas frequências de mutação e recombinação no genótipo *mwh/flr*<sup>3</sup>. De todos os nanotubos de carbono avaliados, apenas as duas maiores concentrações do nanotubo MW (0,4 e 1 mg/mL) foram capazes de induzir alterações genéticas, principalmente via recombinação mitótica. A concentração de 10 mg/mL de AgNP também promoveu alterações no DNA e 61% das anormalidades fenotípicas foram causadas por recombinação. A nanocéria foi capaz de produzir efeitos genotóxicos em todas as concentrações testadas (0,64-10 mg/mL). Destes efeitos, os eventos mutacionais foram predominantes, variando de 46 a 72% do efeito genotóxico total induzido pela nanocéria, sem demonstrar efeito dose resposta. Em conclusão, nossos resultados demonstraram que nanopartículas constituídas de carbono, prata e dióxido de cério têm potenciais genotóxicos distintos em *D. melanogaster*, portanto, outros estudos devem ser realizados antes de qualquer aplicação clínica e/ou industrial das nanopartículas.

## ABSTRACT

The rapid advancement of nanotechnology has created a vast array of nanoparticles promising for industrial, energy and environmental sectors. Furthermore, many biological applications have been proposed for the nanoparticles, such as transport of genes and drugs for disease treatments, including cancer and infections. So, it is important to clarify if nanoparticles may represent a hazard to the environment and human health. In this study, we investigated the toxic potential and ability to induce DNA damage of different nanoparticles: four species of carbon nanotubes (NTC, NT, CS e MW), silver (AgNP) and nanoceria (CeO<sub>2</sub>-NP) nanoparticles. It was employed the somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster* that detects the loss of heterozygosity of two genetic markers involved in the metabolic pathways of wing hairs formation - multiple wing hairs (mwh) and flare<sup>3</sup> (flr<sup>3</sup>). In larvae, the proliferating of wings imaginal disc cells can produce hairs with mutant phenotypes expressed on the adult wings. Using the standard cross, third-stage larvae were treated with different concentrations of the nanoparticles until pupal stage. The wings of adult flies were examined microscopically for the identification of phenotypic abnormalities. In all concentrations the survival rates were higher than 90%, indicating the absence of chronic toxicity for nanoparticles evaluated. Using the conditional binomial test, the results of different treatments were compared with the respective negative control (distilled water), demonstrating no significantly increase in the NTC, NT and CS mutation and recombination frequencies ( $p > 0.05$ ) in *mwh/flr<sup>3</sup>* genotype. In all carbon nanotubes tested, only the two higher concentrations of nanotubes MW (0.4 and 1 mg/mL) were able to induce genetic changes, mainly by mitotic recombination. The concentration of 10 mg/mL AgNP also promoted changes in the DNA and 61% of the phenotypic abnormalities were caused by recombination. The nanoceria was able to produce genotoxic effects at all concentrations tested (0.64-10 mg/mL). Overall, the mutational events were predominant, ranging from 46 to 72% of the total genotoxic effect induced by nanoceria, showing no dose-response relationship. In conclusion, our results demonstrated that carbon, silver and cerium dioxide nanoparticles have different genotoxic potential in *D. melanogaster*, so, another studies should be performed before any clinical and/or industrial application of nanoparticles.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Nanociência e Nanotecnologia

A tecnologia atual, que avança para a escala nanométrica, está inovando o mercado do século XXI e promete exceder os impactos da Revolução Industrial (NEL et al., 2006). A multiplicidade de aplicações da chamada Nanotecnologia nos mais variados setores industriais atrai investimentos que ultrapassam milhões de dólares por ano em todo mundo, bem como o interesse de inúmeros grupos de pesquisa (NANOSAFE, 2010).

O prefixo nano tem origem grega e significa “anão”. Na acepção moderna da palavra, nano é um termo técnico usado como unidade de medida equivalente a um bilionésimo do metro (1 nanômetro =  $10^{-9}$  m). Assim sendo, o termo nanotecnologia frequentemente é empregado para descrever a habilidade de manipular a matéria, átomo por átomo, em uma escala compreendida entre 0,1 e 100 nm, com objetivo de criar novos materiais e dispositivos com propriedades únicas. Ao ramo da ciência que estuda o comportamento desses novos materiais, foi atribuído o nome de nanociência, uma ciência interdisciplinar – envolvendo a biologia, a física, a química e a engenharia - voltada para o avanço da nanotecnologia (NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE, 2011).

Embora a concepção de manipulação da matéria em nível de átomos e moléculas tenha surgido no final da década de 1950 em uma palestra ministrada pelo físico Richard Feynman, o termo “nanotecnologia” foi mencionado pela primeira vez apenas em 1974 pelo pesquisador Norio Taniguchi para descrever as tecnologias de manufatura de materiais em escala nanométrica. Apesar disso, avanços significativos em nanotecnologia não foram notados até a década de 1980 devido à ausência de instrumentos que permitissem a visualização e manipulação de átomos em uma superfície. Somente após a criação dos microscópios de força atômica e tunelamento e a popularização do termo por Eric Drexler no livro “*Engines of Creation*”, a previsão inicial de Feynman deixou de ser vista como ficção científica e assumiu seu papel na história (NANOTECHNOLOGIA, 2005).

Por definição, nanopartículas (NPs) são substâncias que possuem pelo menos uma de suas dimensões menor que 100 nm. Tais partículas podem ser projetadas e sintetizadas em uma variedade de tamanhos, formas (tubos, esferas, hastes e prismas) e composição (materiais baseados em metais, em óxidos metálicos, pontos quânticos e nanomateriais baseados em

carbono) (DOAK et al., 2009). Juntas, essas características vão determinar as propriedades eletrônicas, ópticas, mecânicas e magnéticas (relação estrutura-propriedade). Por exemplo, a redução do tamanho das partículas aumenta a área superficial e, portanto, aumenta o número de grupos reativos sobre a superfície da partícula (NEL et al., 2006). Além disso, o pequeno tamanho e a grande área superficial podem induzir mudanças na permeabilidade ou condutividade de membranas biológicas (DI SOTTO et al., 2009).

Em 2005, foi publicado o primeiro ranking mundial das mais promissoras aplicações das nanotecnologias (BBC NEWS, 2005). De acordo com o estudo, uma das áreas que poderão sofrer um grande impacto da nanotecnologia é a medicina. A nova tecnologia poderá revolucionar os sistemas de diagnóstico e triagem de doenças, os sistemas de “entrega de drogas” (*drug delivery*), bem como o monitoramento da saúde. Além disso, as nanotecnologias também poderão ser usadas para beneficiar vários outros setores, como a informática, as telecomunicações, o transporte, o setor energético, a agricultura, a construção civil, a indústria alimentícia e o setor dos recursos naturais (NANOWERK, 2011).

Atualmente, os investimentos mundiais em nanotecnologia somam cerca de US\$ 2 bilhões por ano. Estima-se que em 2015, o mercado para o segmento movimentará um trilhão de dólares. No Brasil, mais especificamente, o apoio a projetos na área de nanociência e nanotecnologia, iniciou-se em 2001, com a criação das Redes Nacionais de Nanotecnologia. A partir de então, o Ministério da Ciência e Tecnologia tem aumentado ano após ano os investimentos em pesquisa no setor, e já no período de 2004 a 2008 cerca de R\$ 28 milhões haviam sido investidos pelo Programa de Nanotecnologia (BRASIL, [2009?]).

Até a presente data, o número de produtos comerciais que contêm NPs já ultrapassa 1300 (PROJECT ON EMERGING NANOTECHNOLOGIES, 2011a), incluindo filtros solares e cosméticos, materiais esportivos, pneus, revestimentos autolimpantes e antibacterianos, ferramentas mais duras e resistentes, roupas resistentes a manchas e eletrônicos (KAHRU e DUBOURGUIER, 2010; NANOWERK, 2011). A crescente produção e aplicação de nanomateriais engenheirados, embora excitantes do ponto de vista econômico, têm provocado ampla discussão em relação aos efeitos adversos e imprevistos destes materiais sobre o meio ambiente e à saúde humana.

## 1.2. Nanotoxicologia e Nanogenotoxicologia

Alguns estudos sugerem que as mesmas propriedades que tornam os nanomateriais tão atrativos do ponto de vista físico-químico, podem também ser responsáveis por efeitos nocivos aos organismos (LANDSIEDEL et al., 2009; PASCHOALINO et al., 2010). Por exemplo, a capacidade de aglomeração/dispersão pode facilitar a translocação das NPs pelos compartimentos ambientais e ocasionar, de forma cumulativa, danos à cadeia alimentar. Devido a sua pequena dimensão, as NPs podem ter uma permeabilidade maior através da pele, mucosas e membranas celulares, além de ter seu efeito tóxico aumentado, já que o grande número de átomos na área superficial da partícula promove uma reatividade superior (NEL et al., 2006). Diante desse cenário e frente à necessidade de esclarecimentos sobre os possíveis efeitos adversos e imprevistos das NPs, nasce um novo campo de pesquisa voltado para a elucidação dos possíveis efeitos tóxicos de nanodispositivos e nanoestruturas em organismos vivos, a chamada Nanotoxicologia (PASCHOALINO et al., 2010).

Embora a inalação seja a via mais provável para exposição dos trabalhadores às NPs durante os processos de manipulação e síntese, as nanopartículas também podem ser incorporadas no organismo através da pele ou ainda por ingestão (NEL et al., 2006; KISIN et al., 2007; DOAK et al., 2009). A exposição dérmica pode ocorrer, por exemplo, durante o uso de cremes epidermais que contêm NPs, como filtros solares. Na pele saudável, a epiderme oferece uma excelente proteção contra a entrada dessas nanopartículas na derme, no entanto, a pele danificada permite que partículas diminutas acessem a derme, bem como os linfonodos da região (NEL et al., 2006). Já a ingestão de NPs pode ocorrer principalmente pelo consumo de água e alimentos contaminados (PASCHOALINO et al., 2010). É importante ressaltar que a projeção de NPs para fins terapêuticos (como carreadoras de fármacos, por exemplo) pode resultar em uma nova via de exposição, a injeção intravenosa, na qual as NPs são designadas para atingir órgãos ou tecidos específicos, escapar dos processos fagocitários e atravessar a barreira hematoencefálica (DONALDSON et al., 2004).

Quando as NPs alcançam as células, podem ser internalizadas por dois principais processos: difusão pela membrana plasmática (diretamente ou através de canais de membrana) (PANTAROTTO et al., 2004) ou por endocitose, um mecanismo dependente de energia que envolve diferentes rotas (KAM et al., 2004; KAM e DAI, 2005, KAM et al., 2005; KAM et al., 2006, SINGH et al., 2009). Se as NPs tiverem tamanho e forma

adequados, podem então se encaixar nos receptores de membrana facilitando a endocitose mediada por receptor (KAM et al., 2005; SINGH et al., 2009). Entretanto, os mecanismos mais prováveis consistem na entrada destas partículas através de estruturas especializadas da membrana plasmática denominadas cavéolas (endocitose dependente de cavéolas) e/ou clatrininas (endocitose dependente de clatrininas) que formam invaginações vesiculares de até 80 ou 120 nm, respectivamente, permitindo a internalização de moléculas presentes no ambiente extracelular (KAM et al., 2006; SINGH et al., 2009). Embora existam relatos do recrutamento das NPs internalizadas para os lisossomos para posterior excreção das células, sabe-se as NPs podem aumentar a permeabilidade da membrana lisossomal escapando para o citoplasma. Livres no citoplasma, as NPs também podem penetrar em outras organelas, como nas mitocôndrias e no núcleo (ASHARANI et al., 2009; MU et al., 2009).

Uma vez dentro da célula, as NPs podem gerar espécies reativas de oxigênio (EROs), provocando o chamado estresse oxidativo, um desequilíbrio entre a geração de EROs nocivas e a capacidade das células para neutralizar esses oxidantes que suscita em uma grave disfunção celular (XIA et al., 2006; KARLSSON et al., 2008). Essa tendência de gerar compostos oxidantes pode estar relacionada a três principais fatores: (i) às propriedades físicoquímicas da partícula, como a presença de resíduos metálicos que têm o potencial de converter os produtos metabólicos do oxigênio celular, como  $H_2O_2$ , em radicais hidroxil altamente reativos, via reações tipo Fenton, (ii) à capacidade das NPs de estimular as células alvo a produzirem compostos oxidantes, seja pelo comprometimento do transporte de elétrons mitocondrial, seja pela indução de transtornos enzimáticos, e (iii) à habilidade de NPs para desencadear uma cascata de sinalização que culmina em respostas inflamatórias, uma reação defensiva, mas que também leva a formação secundária de compostos oxidantes pelas células inflamatórias resultando, portanto, em um ciclo vicioso de eventos danosos ao organismo (NEL et al., 2006; SINGH, et al., 2009; KARLSSON, 2010).

Além de causar danos às membranas e organelas, as EROs podem também induzir lesões no material genético, como quebra de uma única fita ou da dupla fita de DNA, formação de adutos e ligações cruzadas. Estes danos, por sua vez, podem acionar várias respostas celulares, incluindo o bloqueio do ciclo celular, apoptose ou ainda ativar diferentes mecanismos de reparo, essenciais para manter a integridade genética e a sobrevivência celular. Se não reparados, tais danos gerados pela interação indireta das NPs com DNA têm o potencial de iniciar e promover a carcinogênese (SINGH et al., 2009).

Atividades genotóxicas também podem ser produzidas pela interação direta das NPs com DNA (KISIN et al., 2007). Se forem suficientemente pequenas, as NPs podem ser transportadas através do complexo poro nuclear (<8 nm em diâmetro) ou podem se difundir através da membrana nuclear, se acumulando no núcleo das células. É possível também que as NPs interajam com DNA durante a mitose no momento em que a membrana nuclear se desfaz. Durante o processo de divisão celular, interferências mecânicas das NPs com os microtúbulos poderiam, por exemplo, dar origem a células aneuplóides, caracterizadas pelo ganho ou perda de um ou mais cromossomos (SINGH et al., 2009; KARLSSON, 2010). Alguns estudos demonstraram a presença de nanopartículas no núcleo celular, como nanotubos de carbono (20-30 nm) (MU et al., 2009), nanopartículas de prata (6-20 nm) (ASHARANI et al., 2009) e nanopartículas de óxido de cério (3-5 nm) (SINGH et al., 2010), embora se desconheça o exato mecanismo de penetração.

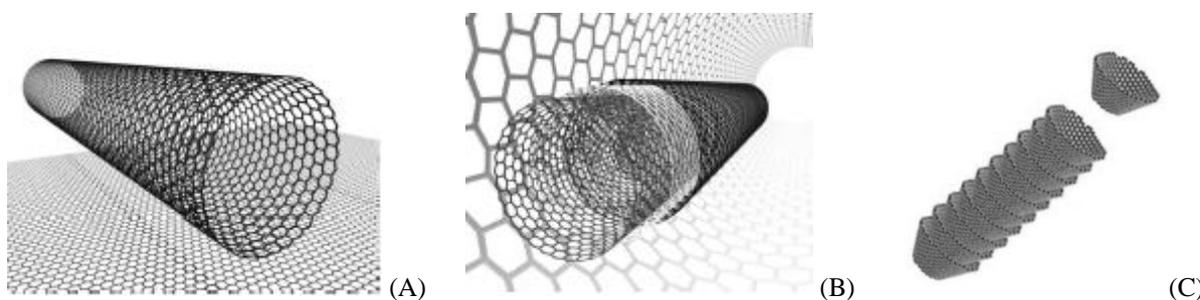
Diante da crescente evidência de interação nanopartículas-DNA, surge a Nanogenotoxicologia, voltada para o estudo dos efeitos tóxicos das NPs sobre a estabilidade e integridade genômica. Entretanto, segundo um levantamento recente feito por Landsiedel e colaboradores (2009), somente cerca de 40 estudos sobre a genotoxicidade de nanomateriais haviam sido publicados na literatura científica e estavam disponíveis abertamente até a data, revelando uma escassez de informações relativa ao potencial genotóxico, mutagênico e/ou carcinogênico de diferentes nanopartículas engenheiradas. Esses dados reforçam a necessidade de estudos que englobem esses parâmetros genéticos garantindo, assim, a biossegurança das NPs.

### **1.3. Nanotubos de Carbono**

Nanotubos de carbono (NTC) são um dos mais promissores materiais da nanotecnologia. Suas extraordinárias propriedades físicoquímicas - como pequena dimensão, peso ultraleve, flexibilidade, estabilidade mecânica e térmica, alta resistência a tensão, inércia química, condutividade elétrica e alta capacidade de associação com compostos biológicos (HUSSAIN et al., 2009) - permitiram supor uma série de aplicações, que variam desde o armazenamento de energia até metodologias para o tratamento de câncer, bioengenharia e terapia gênica (FIRME III e BANDARU, 2010).

Descritas pela primeira vez por Iijima em 1991, as nanopartículas de carbono são formadas pelo enrolamento de folhas de grafeno formando pequenos cilindros ocos com diâmetros na faixa de 0,4 a 2,5 nm e comprimento de 10 a 100  $\mu\text{m}$ . Devido a sua morfologia tubular com dimensões nanométricas foram chamadas “nanotubos de carbono”.

Com base nas suas estruturas, os NTC podem ser divididos em diferentes categorias (Figura 1): (i) nanotubos de parede única ou simples (SWCNT, do inglês *single-wall carbon nanotubes*) que são constituídos apenas por uma camada cilíndrica de grafeno formada exclusivamente por átomos de carbono arranjados em estrutura de anéis hexagonais fundidos, (ii) nanotubos de paredes múltiplas (MWCNT, do inglês *multi-walls carbon nanotubes*), constituídos de vários cilindros concêntricos de grafeno - em um arranjo que lembra as tradicionais *matrioshkas*, bonecas russas ocas que trazem dentro outras bonecas ocas idênticas -, onde um cilindro de menor diâmetro é envolvido por outro cilindro de maior diâmetro e permanecem espaçados 0,34-0,36 nm um do outro e unidos por interação de van der Waals (HERBST, 2004), e (iii) nanotubos do tipo “*cup-stacked*” (CSCNT), ainda pouco estudados, formados por múltiplas camadas de grafeno arranjados em forma de cone, as quais exibem pontas abertas em sua superfície externa e um canal central vazio (CHOI et al., 2005).



**Figura 1.** Representação esquemática da estrutura de (A) SWCNT, (B) MWCNT (FERREIRA e RANGEL, 2009) e de (C) CSCNT (adaptado de CHOI et al., 2005).

Embora as expectativas quanto à utilização dos NTC sejam altas em muitos campos da ciência, vários desafios devem ser vencidos para que haja aplicação em escala industrial, sendo a síntese e a purificação de NTC um dos maiores obstáculos para os cientistas. Várias técnicas já foram descritas para obtenção de NTC, porém as mais utilizadas são: descarga por arco elétrico, ablação por laser e deposição química de vapor (CVD). Todas estas técnicas consistem basicamente na decomposição de compostos de carbono em carbono atômico, seguido pelo crescimento de nanoestruturas de carbono sobre partículas catalisadoras, tais como Co, Mo, Ni e Fe. Os métodos de descarga por arco e ablação por laser utilizam descargas elétricas e irradiação de laser, respectivamente, para causar a vaporização do

precursor sólido - geralmente grafite de alta pureza (GUO et al., 1995; JOURNET e BERNIER, 1998). O método CVD, por sua vez, baseia-se na decomposição de gases precursores contendo átomos de carbono, geralmente um hidrocarboneto, na presença de um catalisador metálico. CVD produz nanotubos de tamanhos mais homogêneos e relativamente mais puros que os produzidos pelas demais técnicas, minimizando as subsequentes etapas de purificação necessárias para eliminar impurezas geradas durante o processo de síntese - tais como nanopartículas de grafite, carbono amorfo, fuligem, fulerenos e resíduos de catalisadores metálicos - que podem alterar o comportamento físico-químico e biológico dos nanomateriais (ANDREWS et al., 1999).

### **1.3.1. Aplicações dos Nanotubos de Carbono**

Desde a sua descoberta, diversas aplicações potenciais para os NTC têm sido propostas, incluindo dispositivos para armazenamento e conversão de energia, sensores, aditivos para materiais poliméricos, entre outros (HERBST, 2004). Embora várias aplicações ainda estejam em fase de teste, algumas já se encontram em fase comercial.

A primeira grande aplicação comercial de MWCNT foi a adição de pequenas porcentagens dos nanotubos a compósitos poliméricos melhorando o desempenho de materiais (BAUGHMAN et al., 2002), que variam desde artigos esportivos, como raquete de tênis a pneus de veículos. Há relatos de que a dispersão uniforme dos NTC ao longo da matriz polimérica e a otimização da solubilidade e adesão nanotubo/matriz, aumentam a resistência à tração, bem como a tensão elástica em até 25 e 40%, respectivamente (HERBST, 2004).

A equipe de Livermore, do Instituto de Tecnologia de Massachusetts (MIT), nos Estados Unidos, construiu “super molas” de NTC capazes de armazenar elevadas densidades de energia. Semelhante aos capacitores, as super molas podem liberar energia rapidamente, o que as tornam adequadas para alimentar sistemas de alarme e de iluminação, e suprir energia em situações de emergência. Por outro lado, foi demonstrado que, se devidamente controladas, a liberação da energia pode ser tão lenta quanto nas baterias tradicionais, nesse caso poderiam ser empregadas para a geração de eletricidade e alimentação de circuitos elétricos ou eletrônicos, com a vantagem de não haver necessidade de recargas em intervalos de tempo (HILL et al., 2009).

Tendo em vista as propriedades eletrônicas e a grande área superficial dos nanotubos, pesquisadores desenvolveram uma nanoantena construída com fibras de NTC. Ao contrário das antenas convencionais feitas de cobre maciço, nas nanoantenas os elétrons podem transitar com maior eficiência pela superfície dos diversos nanotubos individuais que compõem a fibra, não necessitando vencer a resistência para caminhar no interior de materiais maciços. Segundo os autores, essas nanoantenas têm inúmeras possibilidades de uso, como na transmissão de dados em equipamentos superminiaturizados, em telefones celulares, em implantes médicos e em roupas inteligentes, que poderão ter equipamentos eletrônicos incorporados no interior das fibras do tecido (MAST et al., 2009).

A mistura de NTC à matéria prima do cimento – o clínquer - promete revolucionar a construção civil, como mostra uma pesquisa desenvolvida na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). O acréscimo de pouca quantidade de nanotubos (0,3%) pode aumentar em até 25% a resistência à tração do novo cimento, ou seja, a capacidade de o produto ser esticado sem se quebrar. Em relação à resistência à compressão, o ganho pode ser de até 80%. Além disso, o “superconcreto” apresenta uma porosidade muito menor, o que aumenta a resistência do material ao desgaste causado pela ação ambiental (LADEIRA, 2009).

O desenvolvimento de sistemas para remoção de gases provenientes da queima de combustíveis fósseis é um tema bastante discutido, principalmente devido à questão ambiental. Long e Yang (2001) demonstraram que NTC possuem propriedades superiores na adsorção de  $\text{NO}_x$ , especialmente em condições de baixas pressões parciais, onde materiais convencionais apresentam desempenho pouco satisfatório. Assim, grandes quantidades de  $\text{NO}_x$  poderiam ser liberados da superfície dos NTC para posterior conversão em  $\text{N}_2$ . Além disso, os NTC são materiais promissores para remoção de poluentes aquáticos, como exemplificado por Umbuzeiro et al. (2011), que usaram NTC tratados com ácido nítrico para remoção de 1-nitropireno, um poluente com efeitos mutagênicos e carcinogênicos relatados, gerados da queima de combustíveis fósseis ou de materiais orgânicos.

Algumas evidências apontam o uso de nanotubos na agricultura como uma possível alternativa para as técnicas da engenharia genética clássica para geração de plantas mais produtivas e tolerantes ao estresse. Khodakovskaya e colaboradores (2009) demonstraram que sementes e mudas de tomateiro cultivadas em meio suplementado com NTC, em concentrações relativamente baixas (10-40  $\mu\text{g/mL}$ ), permitem maior captação de água e apresentam taxas de germinação e crescimento mais elevadas do que grupos não tratados.

Segundo os autores, tal fenômeno está relacionado com mudanças significativas na expressão gênica total, principalmente em genes relacionados ao estresse, como o gene que codifica proteínas formadoras dos canais de água (LeAqp2) (KHODAKOVSKAYA et al., 2011).

Várias outras possibilidades de aplicações dos nanotubos surgem quando se torna possível funcionalizá-los, ou seja, inserir uma molécula ou elemento químico compatível na superfície desses materiais para que eles possam executar alguma função bem definida, como (i) aumentar a solubilidade em solventes orgânicos e a dispersão nos fluidos biológicos, (ii) facilitar a interação com outros grupos químicos, como fármacos, e (iii) promover o direcionamento do nanotubo e/ou do nanotubo complexado a outro grupo químico às células alvo (MENEZES, 2008). Assim, os NTC funcionalizados são considerados mais adequados para as aplicações biológicas e médicas (DI SOTTO et al., 2009).

Foi publicada recentemente uma nova técnica de imageamento que usa NTC fluorescentes funcionalizados com fosfolipídios polietilenoglicolados (DSPE-mPEG) para visualizar até vários centímetros dentro do corpo de um animal vivo, o que, conseqüentemente, promove um impacto direto na indústria farmacêutica, especialmente no desenvolvimento de novos medicamentos. De acordo com o estudo, é possível despachar os medicamentos agregados aos nanotubos fluorescentes e gerar imagens simultaneamente, em tempo real, para avaliar a precisão da droga em atingir seu alvo. Para isso, o complexo nanotubo/medicamento seria injetado na corrente sanguínea e, sob a ação da luz de um laser de baixa potência, emitiriam fluorescência capturada por um sensor especial. Como os nanotubos fluorescem em um comprimento de onda diferente dos tecidos biológicos é possível gerar imagens de alta precisão, o que torna também essa técnica bastante útil para o diagnóstico precoce de tumores e outras doenças que afetam o tamanho e a forma dos órgãos (WELSHER et al., 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; KAM e DAI, 2005; KAM et al., 2006). Por exemplo, Kam e colaboradores (2004) relataram a captação, via endocitose, de estreptavidina (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 as células HL60, demonstrando, portanto, que os NTC não apenas internalizam a proteína, como também o conjugado internalizado provoca uma resposta funcional.

Kam e colaboradores (2005) demonstraram que nanotubos funcionalizados para o reconhecimento de células tumorais podem ser seletivamente internalizados por endocitose mediada por receptores. Após submetê-los à radiação infravermelho próxima (NIR), que promove o aquecimento pela luz incidente, os nanotubos ativaram ou desencadearam morte celular das células tumorais, evidenciada pelas drásticas alterações morfológicas, sem prejudicar as células saudáveis que exibiram proliferação normal durante o longo período de monitoramento. Assim, a capacidade de transporte biocompatível, combinada com a funcionalização química adequada e as propriedades intrínsecas dos nanotubos, abre novas perspectivas não só para os sistemas de entrega de drogas (*drug delivery*) e genes (terapia gênica), mas também em metodologias para o tratamento de câncer.

Outros grandes interesses são o emprego de NTC na produção ou aprimoramento de biomateriais, como próteses, placas ou parafusos para fixação da fratura, conferindo a eles elevada resistência mecânica (OSORIO, 2008), e também como biosensores *in vivo*, uma vez que proteínas e enzimas podem ser imobilizadas nesses nanomateriais (JIANG et al., 2004).

### **1.3.2. Toxicidade dos Nanotubos de Carbono**

Considerando alguns aspectos semelhantes aos das fibras de amianto, tais como características estruturais, baixa densidade específica e baixa solubilidade, além da biopersistência, a toxicidade dos NTC tem sido um dos principais tópicos de discussão no que diz respeito à biossegurança dessas nanopartículas (PATLOLLA et al., 2010).

Estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que a absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade dos NTC estão estreitamente relacionados às características químicas e físicas inerentes aos NTC tais como estrutura, comprimento, diâmetro, funcionalização, grau de pureza e estado de aglomeração. Deve-se considerar ainda que os efeitos biológicos gerados pelos nanotubos podem ser influenciados pelas condições experimentais, como a via e a duração da exposição, a concentração e até mesmo o dispersante utilizado para solubilizar

os nanotubos (HELLAND et al., 2007). Por exemplo, o impacto de diferentes vias de exposição sobre o efeito tóxico dos nanotubos de carbono pôde ser evidenciado por Shvedova e colaboradores (2008). Em camundongos C57BL/6, a inalação de aerossóis secos de SWCNT não purificados (17,7% de ferro) foi mais eficiente em gerar resposta inflamatória, estresse oxidativo, deposição de colágeno, fibrose, bem como mutação do gene *K-ras* - um oncogene frequentemente envolvido na tumorigênese pulmonar - do que a aspiração faringeal que, embora seja equivalente em massa de SWCNT, forma aglomerados de tamanhos micrométricos diminuindo o número de grupos reativos na superfície das nanopartículas.

Embora a diversidade de espécies de NTC e de protocolos experimentais utilizados, associados à deficiência na descrição das metodologias exatas e na caracterização dos NTC, dificultem a comparação dos resultados apresentados na literatura, vários estudos corroboraram com a habilidade dos nanotubos para causar estresse oxidativo como um dos principais mecanismos que governam seus efeitos (geno)tóxicos.

Manna e colaboradores (2005) elucidaram o mecanismo de toxicidade induzida por SWCNT em células queratinócitas humanas (HaCaT). A exposição a diferentes concentrações de SWCNT (0,1-10 µg/mL) levou a um significativo aumento, dose dependente, na produção de EROs que, por sua vez, levou a uma redução da proliferação celular, mesmo em baixas concentrações de SWCNT. Além disso, observaram que o acúmulo de EROs pode ativar o fator nuclear kappa B (NF-κB), um importante fator de transcrição que participa das respostas inflamatórias e da morte celular.

O estudo realizado por Sarkar e colaboradores (2007) apresentou um perfil de genes ativado pelo estresse oxidativo induzido por SWCNT em linhagem celular humana (BJ Foreskin cells). Dos 96 genes avaliados, 28 tiveram a expressão significativamente aumentada e representavam, de uma forma geral, a família de genes envolvidos na apoptose, no metabolismo de xenobióticos, no reparo do DNA, genes responsivos ao estresse e genes que codificam quimiocinas. Dentre os genes que responderam com maior intensidade ao tratamento com SWCNT, destacou-se o gene HMOX2, implicado na proteção contra o estresse oxidativo, isquemia e traumatismo cranioencefálico.

Estudos demonstraram que a capacidade dos NTC de induzir estresse oxidativo está relacionada principalmente com a presença de impurezas, tais como catalisadores metálicos incluídos na preparação comercial como resultado do processo de síntese. Shvedova e

colaboradores (2003) relataram alterações morfológicas, disfunção mitocondrial, formação de radicais livres, acumulação de produtos da peroxidação lipídica, redução dos níveis de antioxidantes (glutathiona e vitamina E), estresse oxidativo e perda da viabilidade celular em queratinócitos imortalizados (HaCaT) expostos a SWCNT não purificados (30% de ferro), enquanto que o tratamento dos SWCNT com quelante de ferro para remover os contaminantes reduziu significativamente tanto a geração de oxidantes quanto a citotoxicidade. Kagan e colaboradores (2006) demonstraram que SWCNT não purificados (26% de ferro) são mais efetivos em promover o estresse oxidativo em macrófagos RAW264.7 do que SWCNT purificados (0,23% de ferro). Resultados semelhantes foram obtidos por Murray e colaboradores (2009). Camundongos expostos, via tópica, a SWCNT não purificados (30% de ferro) em doses de até 160 µg/g apresentaram estresse oxidativo, redução de glutathiona, danos oxidativos a proteínas, atividade mieloperoxidase aumentada (enzima derivada de células mielóides que catalisa a formação de EROs), bem como aumento do número de células dérmicas e espessamento da pele resultante do acúmulo de leucócitos polimorfonucleares e mastócitos, indicativos de inflamação.

Crouzier e colaboradores (2010) observaram que nanotubos de dupla parede purificados induzem resposta inflamatória em pulmões de camundongos tratados com 1,5 mg/kg via instilação intranasal. No entanto, não foi observada uma produção aumentada de EROs. Os pesquisadores sugerem que a alta afinidade eletrônica dos nanotubos permite que os radicais livres formados pelos macrófagos, por exemplo, se liguem a superfície dessas partículas resultando na diminuição do estresse oxidativo local.

Curiosamente, alguns estudos concluíram que, mesmo purificados, os nanotubos podem gerar efeitos biológicos nocivos. Tamura e colaboradores (2004) relataram que nanotubos purificados foram capazes de induzir um aumento significativo de ânions superóxidos e produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ ) em neutrófilos isolados de sangue humano, além de reduzir a viabilidade celular. Segundo Monteiro-Riviere e colaboradores (2005), MWCNT purificados também promoveram a produção de citocinas pró-inflamatórias e a redução da viabilidade em queratinócitos epidérmicos humanos (HEK) após 48 horas de incubação. Tian e colaboradores (2006) constataram que SWCNT altamente purificados induziram apoptose/necrose em fibroblastos humanos, além de serem mais tóxicos do que sua versão não purificada. Portanto, a influência do grau de pureza dos nanotubos sobre a toxicidade potencial ainda permanece um dilema.

Estudos têm sido realizados no intuito de esclarecer os efeitos dos nanotubos de carbono sobre a estabilidade e integridade genética. O primeiro estudo que abordou a genotoxicidade de nanotubos de carbono foi realizado por Zhu e colaboradores (2007). Foi demonstrado que MWCNT podem se acumular em células tronco embrionárias de ratos e causar danos ao DNA por meio da produção de EROs. Análises por *western blot* indicaram aumento da expressão da 8-oxoguanina-DNA-glicosilase (OGG1), uma enzima que repara bases guaninas que sofreram lesões produzidas por EROs, além de duas outras proteínas chave envolvidas no reparo de quebras bifilamentares de DNA, a Rad51 e XRCC4, após o tratamento com MWCNT. Adicionalmente, observou-se que, dentro de 2 horas de exposição aos nanotubos, os níveis de expressão da proteína p53 foram proporcionalmente aumentados com a quantidade de MWCNT utilizada no tratamento.

Kisin e colaboradores (2007) relataram que SWCNT de pureza elevada (0,23% de contaminação com ferro) na dose de 96  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  induziram significativas quebras de DNA (detectadas por ensaio Cometa) em fibroblastos de pulmão (V79) após 3 horas de incubação. No entanto, resposta negativa foi obtida no teste de Micronúcleo, sugerindo que o material avaliado pode causar danos, mas que eles são reparados durante o ciclo de divisão celular. O teste de Ames realizado no estudo também apontou ausência de efeitos mutagênicos em duas diferentes linhagens de *Salmonella typhimurium*. Os autores sugerem que a internalização dos SWCNT pode ser dificultada pela parede bacteriana. Outros estudos indicaram efeito semelhante para o teste de Ames (DI SOTTO et al., 2009; KIM et al., 2010).

MWCNT contendo traços de cobalto e ferro induziram significativo aumento dose dependente de pneumócitos tipo II micronucleados. Foi observado também um aumento da frequência de micronúcleos em células epiteliais pulmonares de ratos expostas por 24 horas a 10-50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e em células epiteliais humanas (MCF-7) após 48 horas de exposição a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (MULLER et al., 2008).

Lindberg e colaboradores (2009) mostraram que uma mistura de nanotubos contendo mais de 50% de SWCNT com resíduos de cobalto e molibdênio (<5%) induziram aumento na frequência de micronúcleos após 48 horas de tratamento com 10, 60 e 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  em células epiteliais pulmonares (BEAS-2B). Resultados similares (efeitos positivos no teste de Micronúcleo) foram relatados por Asakura e colaboradores (2010) e por Cveticanin e colaboradores (2010) em células pulmonares de hamster chinês e em linfócitos humanos, respectivamente.

A capacidade dos nanotubos de promover genotoxicidade/mutagenicidade também foi avaliada por Jacobsen e colaboradores (2008) em células epiteliais de pulmão de camundongos por meio do ensaio Cometa modificado que faz uso de enzimas de reparo específicas que reconhecem e cortam bases oxidadas de DNA. SWCNT (2% de ferro e traços de cobalto, níquel e manganês), em concentrações de até 200 µg/mL, não causaram quebras das fitas de DNA, mas induziram oxidação de purinas, detectada pela geração de sítios sensíveis a enzima formamidopirimidina-DNA glicosilase (FPG). Interessantemente, foi relatada uma diminuição na produção de EROs nas maiores concentrações. De acordo com os autores, a formação de aglomerados pode aumentar a tendência das EROs produzidas na superfície reagir com outra parte da partícula e não com a sonda que as detectam.

Os resultados apresentados por Folkmann e colaboradores (2009) apontam que fígado e pulmão de ratos expostos, via oral, a pequenas doses de SWCNT (0,064 e 0,64 mg/kg) apresentam níveis aumentados de 8-oxo-7,8-diidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodG), um importante biomarcador de danos oxidativos ao DNA encontrado em processos de carcinogênese. Danos oxidativos ao material genético também foram relatados pelo ensaio Cometa modificado em macrófagos RAW 264.7, utilizando as enzimas endonuclease-III (Endo-III) e FPG. Danos oxidativos a pirimidinas foram detectados somente na maior concentração testada (100 µg/mL), enquanto que danos oxidativos a purinas foram observados em todas as concentrações (MIGLIORE et al., 2010).

No estudo realizado por Karlsson e colaboradores (2008), MWCNT causaram um aumento significativo de quebras no DNA de células epiteliais pulmonares (A549), inclusive na menor dose testada (1µg/cm<sup>2</sup>). Entretanto, não foram detectadas lesões oxidativas no DNA, com o uso do ensaio Cometa FPG. Yang e colaboradores (2009) ao compararem duas espécies de NPs (SWCNT com alto grau de pureza e nanopartículas de ZnO), observaram que a partícula que provocou mais estresse oxidativo (ZnO) não equivale a partícula que exibiu maior genotoxicidade (SWCNT). Estes resultados sugerem, portanto, que os efeitos genotóxicos desencadeados por SWCNT podem estar mais relacionados com interações mecânicas partícula-DNA do que com o efeito oxidativo propriamente dito.

#### 1.4. Nanopartículas de Prata

Segundo estimativas recentes (PROJECT ON EMERGING NANOTECHNOLOGIES, 2011a), cerca de 24% de todos os produtos da nanotecnologia catalogados até a data contém nanopartículas de prata (AgNP) em sua composição. Devido a suas notáveis propriedades antibacteriana e antifúngica, as AgNP vem sendo incorporadas principalmente em produtos de consumo - como soluções de limpeza, produtos de higiene, tecidos, embalagens de alimentos - e produtos médicos, farmacêuticos e hospitalares.

Embora existam inúmeros procedimentos descritos na literatura para síntese de AgNP com diferentes tamanhos, formas (esféricas, elípticas, cúbicas, cilíndricas) e propriedades superficiais, os métodos citrato e boroidreto têm sido usados com frequência. Tais métodos consistem na redução de íons de prata ( $\text{Ag}^+$ ) para prata metálica ( $\text{Ag}^0$ ) em solução aquosa, utilizando um sal de prata como fonte de  $\text{Ag}^+$  (geralmente nitrato de prata -  $\text{AgNO}_3$ ) e citrato de sódio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) e boroidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) como agentes redutores, respectivamente. Variáveis como a temperatura, velocidade de agitação, velocidade de gotejamento de  $\text{AgNO}_3$  e concentração dos reagentes determinam a probabilidade de colisão e agregação dos átomos de prata metálica formados. Estas colisões levam à nucleação ou formação de *clusters* de partículas cujo tamanho é limitado, *a priori*, por estas mesmas variáveis. Normalmente, as AgNP produzidas pelo método citrato são relativamente maiores e mais estáveis do que as produzidas pelo método boroidreto devido a presença de uma camada de citrato revestindo a superfície das nanopartículas (ANDRADE, 2008). AgNP na forma de pó também estão disponíveis comercialmente. Após a obtenção de suspensões de AgNP, as nanopartículas podem, por exemplo, ser precipitadas por centrifugação, lavadas e secas em câmaras à vácuo (DAI et al., 2009).

Ao final dos processos de síntese, as AgNP geralmente contém resíduos químicos e subprodutos de reação indesejáveis. Por isso, um dos maiores desafios para os cientistas é garantir a eficiência da conversão da prata iônica para a forma metálica, reduzindo assim a presença de íons  $\text{Ag}^+$  no produto final. Além de afetar as propriedades fisicoquímicas das AgNP, os íons  $\text{Ag}^+$  podem ser tóxicos nos sistemas biológicos (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2010).

### 1.4.1. Aplicações das Nanopartículas de Prata

Nanopartículas de prata têm sido descritas como eficientes agentes contra um amplo espectro de bactérias gram-positivas (como bactérias do gênero *Bacillus*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*) e gram-negativas (como as do gênero *Escherichia*, *Salmonella* e *Vibrio*) incluindo cepas resistentes a antibióticos. Além disso, AgNP apresentam uma rápida ação fungicida, especialmente sobre fungos do gênero *Aspergillus*, *Candida* e *Saccharomyces* (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2010).

Com o propósito de prevenir a proliferação de microrganismos, as AgNP têm sido incorporadas em vários produtos comerciais, incluindo *sprays* para desinfetar e desodorizar ambientes, detergentes, sabonetes, shampoos, pastas de dente, lenços umedecidos, palmilhas de calçados, purificadores de ar, filtros para tratamento de água, revestimentos de refrigeradores, aspiradores, máquinas de lavar roupa, recipientes para armazenamento de alimentos, tintas, produtos têxteis como meias, roupas esportivas, roupas íntimas, roupas de bebê, meias e materiais de cama, como edredons, lençóis, almofadas e colchões. Informações mais detalhadas sobre produtos de consumo contendo AgNP estão disponíveis no banco de dados do *Project on Emerging Nanotechnologies* (2011b).

Os efeitos antibacteriano e antifúngico das AgNP também têm sido explorados na medicina. Tais nanopartículas são usadas para revestir materiais e dispositivos médicos como curativos, cateteres venosos e urinários, fios de sutura, adesivos ortodônticos, máscaras cirúrgicas e tubos endotraqueais, evitando assim infecções pós cirúrgicas (CHEN e SCHLUESENER, 2008). Recentemente, foi proposta a incorporação de AgNP ao cimento ortopédico – um biomaterial empregado em cirurgias, principalmente na fixação de próteses – com o objetivo de reduzir os riscos de infecções em regiões onde o cimento é utilizado, geralmente joelhos e quadris (LIMA, 2011).

Foi relatado que curativos contendo AgNP em sua composição inibem o crescimento de bactérias e promovem uma rápida cicatrização das feridas (DIRIENZO, 2006). Curiosamente, Elechiguerra e colaboradores (2005) mostraram que AgNP com diâmetro na faixa de 1-10 nm são capazes de interagir com o vírus HIV-1 através da ligação preferencial com o receptor glicoprotéico gp120, impedindo o vírus de se ligar às células hospedeiras.

As AgNP poderiam ainda ser incorporadas em filmes de DCL (*Diamond Like Carbon*) – utilizados como lubrificantes sólidos, como revestimentos protetores de superfícies expostas ao ambiente espacial e como revestimento de próteses ortopédicas e cateteres - visando a redução da taxa de corrosão do DLC pelo oxigênio atômico em ambiente espacial, e na área biomédica, a criação de revestimento biocompatível com propriedades bactericidas (MARCIANO, 2008).

Além das aplicações biológicas, as AgNP também podem ser incorporadas nos dispositivos de nanoeletrônica, como nanoconectores e nanoeletrodos, devido a alta condutividade elétrica e térmica que as nanopartículas proporcionam. Tais NPs podem ainda ser usadas nos processos de catálise industrial e como substrato para o espalhamento Raman amplificado em superfície (SERS, do inglês, *surface enhanced Raman scattering*) (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2010).

#### **1.4.2. Toxicidade das Nanopartículas de Prata**

Enquanto cresce o número de produtos que contém AgNP, as informações sobre o potencial toxicológico associado ao uso indiscriminado dessas nanopartículas pelo homem continuam limitadas.

Hussain e colaboradores (2005) avaliaram a toxicidade de AgNP de diferentes tamanhos (15 e 100 nm) em células de fígado de ratos (BRL 3A). A citotoxicidade observada após 24 horas de exposição as concentrações de 5-50 µg/mL foi atribuída ao estresse oxidativo, indicado pela detecção da redução de GSH, redução do potencial mitocondrial e aumento dos níveis EROs. Carlson e colaboradores (2008) obtiveram resultados semelhantes para macrófagos alveolares tratados com AgNP de 15 e 30 nm. A viabilidade celular foi significativamente reduzida com aumento das doses (10-75 µg/mL). O nível de EROs em células expostas a 50 µg/mL de AgNP (15 nm) foi cerca de 10 vezes maior do que em células não tratadas, sugerindo que o estresse oxidativo pode ser o responsável pela citotoxicidade.

A deposição de AgNP (6-20 nm de tamanho) no interior do citoplasma, lisossomos, mitocôndrias e no núcleo de células de fibroblasto humano (IMR-90) e de células cancerígenas (U251) tratadas com diferentes concentrações de AgNP (25-400 µg/mL) foi reportada por AshaRani e colaboradores (2009). Os autores sugerem que a deposição de

AgNP nas mitocôndrias pode alterar o funcionamento regular da organela pelo comprometimento da cadeia transportadora de elétrons, resultando na produção de EROs e redução da síntese de ATP. As EROs altamente reativas podem, por sua vez, causar danos ao DNA (detectados por ensaio Cometa e Micronúcleo com bloqueio da citocinese). Além disso, danos diretos ao DNA podem ser causados pela deposição de AgNP no núcleo celular.

Agregados de AgNP envolvidos com vesículas endocíticas também foram detectados no interior do citoplasma e do núcleo de células epiteliais brônquicas humanas (BEAS-2B) tratadas com 10 µg/mL de AgNP por 24 horas. Células tratadas com AgNP (0,01-10 µg/mL) exibiram um aumento dose dependente de quebras no DNA e na formação de micronúcleos, indicados pelo ensaio Cometa e pelo teste de Micronúcleo, respectivamente. Danos oxidativos ao DNA também foram detectados pelo ensaio Cometa modificado (FPG e Endo III), apontando a participação do estresse oxidativo na genotoxicidade induzida pelas AgNP avaliadas (KIM et al., 2011).

Park e colaboradores (2011), por sua vez, demonstraram que o potencial das AgNP para induzir danos celulares é dependente do tamanho. AgNP de 20 nm foram mais tóxicas que AgNP maiores (80 e 113 nm) tanto em fibroblastos (L929) quanto em macrófagos (RAW 264.7). Toxicidade dependente de tamanho também foi relatada por Gorth e colaboradores (2011), mas ao contrário dos resultados relatados anteriormente, observou-se que AgNP menores (20-30 nm e 100 nm) são significativamente menos tóxicas às larvas de *Drosophila melanogaster* do que partículas maiores (> 100 nm).

Além de afetar o desenvolvimento de *D. melanogaster*, AgNP podem afetar as características físicas das moscas sobreviventes, especialmente a pigmentação e tamanho corporal, como apontam os resultados apresentados por Panacek e colaboradores (2011). Com o aumento da exposição às AgNP (> 5 mg/L), maior a redução da pigmentação e tamanho corporal.

Outros estudos *in vivo* sobre a toxicidade de AgNP foram realizados utilizando a *D. melanogaster* como organismo experimental. Larvas de terceiro estágio alimentadas com diferentes concentrações de AgNP misturadas ao meio de cultura (50 e 100 µg/mL) por 24 e 48 horas apresentaram um aumento na geração de EROs evidenciada pelo aumento dos níveis de malondialdeído (MDA) - produto final da peroxidação lipídica -, redução dos níveis de glutathione e aumento das atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e

catalase (CAT). Além disso, os níveis dos marcadores de danos ao DNA (proteína p53) e de apoptose (caspase-3 e caspase-9) foram maiores nos organismos tratados quando comparados com os grupos não tratados. Os autores sugerem que o estresse oxidativo resulta em danos ao material genético e, por fim, em apoptose (AHAMED et al., 2010). Como evidência de estresse celular, Posgai e colaboradores (2009) verificam um aumento na expressão de genes codificadores da proteína de choque térmico 70 (HSP70) em *D. melanogaster* adultas expostas a 50 µg/mL de AgNP.

*Allium cepa* tem sido empregada com sucesso como bioindicador do impacto toxicológico das AgNP sobre o meio ambiente. Kumari e colaboradores (2009) demonstraram que AgNP (<100 nm) podem penetrar em células de raiz de *A. cepa* e bloquear a divisão celular, induzindo a formação de pontes de cromatina, múltiplas quebras cromossômicas e desintegração celular. Indução de EROs e danos ao DNA (detectados por ensaio Cometa) de células de raiz de *A. cepa* também foram relatados por Panda e colaboradores (2011).

A prata na forma iônica ( $\text{Ag}^+$ ) é conhecida há décadas por exibir alta toxicidade a uma série de microrganismos. Um dos principais mecanismos de ação da prata iônica consiste na morte celular causada pelo desacoplamento da fosforilação oxidativa ou pela geração excessiva de radicais livres. A interação dos íons de prata com grupos específicos de proteínas e enzimas pode também resultar em mudanças estruturais na parede celular e membranas, comprometendo a permeabilidade da membrana e a integridade da parede celular de bactérias. Além disso, os íons podem se ligar ao DNA, causando quebras e bloqueio da replicação (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2010). Considerando esses aspectos, alguns pesquisadores sugerem que os efeitos tóxicos das AgNP podem estar relacionados com a liberação de íons prata. Nesse caso, as nanopartículas atuariam como “cavalos de Tróia”, ultrapassando as barreiras biológicas e, em seguida, liberando íons  $\text{Ag}^+$  que danificam a maquinaria celular (LUBICK, 2008; PARK et al., 2010).

Kim e colaboradores (2009), no entanto, demonstraram que a quantidade de íons  $\text{Ag}^+$  livres em soluções de AgNP é desprezível. Além disso, a expressão de RNAm responsivos a metais não foi induzida em células de hepatoma humano tratadas com AgNP, mas sim em células tratadas com  $\text{AgNO}_3$  como fonte de íons  $\text{Ag}^+$ , indicando que as nanopartículas também não promovem a liberação de íons no meio intracelular e, portanto, a toxicidade induzida por AgNP é independente da toxicidade dos íons  $\text{Ag}^+$ .

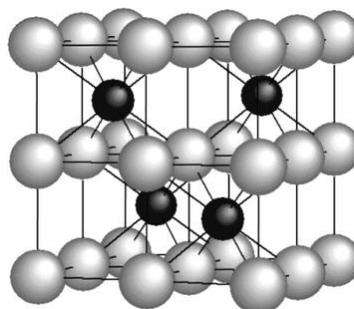
Pequena quantidade de íons  $\text{Ag}^+$  livres em soluções de AgNP ( $8 \times 10^{-5}$  mg de  $\text{Ag}^+$  em soluções de 1mM de AgNP) também foi reportada por Li e colaboradores (2010). Apesar disso, AgNP (50  $\mu\text{M}$ ) foram capazes de suprimir a proliferação de células embrionárias de camundongos no estágio de blastocistos por meio da indução de apoptose na massa celular interna (ICM) e na trofotoderma (TE).

A prata nanoparticulada com baixo nível de contaminantes metálicos demonstrou ser mais eficiente em induzir a formação de EROs em linhagem celular de carcinoma pulmonar humano (A549) do que sua forma iônica, sugerindo que o estresse oxidativo provocado por AgNP não é apenas devido a liberação de  $\text{Ag}^+$ , mas sim devido a um efeito partícula-específico (FOLDBJERG et al., 2011). Resultados similares foram apresentados por Piao e colaboradores (2011).

Demir e colaboradores (2010) compararam as formas iônica versus nanoparticulada da prata em relação a capacidade de causar danos no DNA de *D. melanogaster*. Apenas as AgNP (1-10 mM) induziram um aumento significativo na frequência de pelos mutantes presentes nas asas das moscas adultas – indicativos da ocorrência de mutação e/ou recombinação somática. Tal resultado reforça a visão de que o potencial genotóxico da prata depende de sua forma nanoparticulada, somente a liberação de íons  $\text{Ag}^+$  pelas AgNP não poderia justificar os danos genéticos observados.

### 1.5. Nanopartículas de Dióxido de Cério

Cério é o membro mais abundante da série dos elementos químicos conhecidos como lantanídeos ou terras raras. Ele é caracterizado quimicamente como tendo dois estados de valência:  $\text{Ce}^{4+}$ , denominado cérico, e  $\text{Ce}^{3+}$ , denominado ceroso. Entre os compostos de cério, o mais estável é o dióxido de cério ( $\text{CeO}_2$ ) em virtude de sua estrutura cristalina cúbica tipo fluorita (FERNANDES, 2007; MARTINS et al., 2007), na qual o cátion metálico  $\text{Ce}^{4+}$  está cercado por oito ânions  $\text{O}^{2-}$  formando os vértices do cubo (Figura 2) (DOMINGUES et al., 2007).

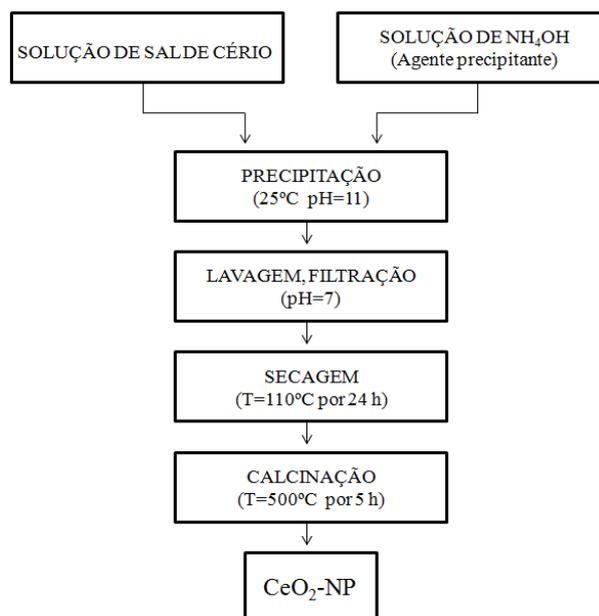


**Figura 2.** Estrutura cristalina da rede fluorita cúbica de  $\text{CeO}_2$ . Átomos Ce e O são representados como bolas pretas e cinzas, respectivamente (DOMINGUES et al., 2007).

O  $\text{CeO}_2$ , especialmente na forma nanoparticulada ( $\text{CeO}_2$ -NP), também chamada de nanocéria, tem atraído a atenção dos pesquisadores por apresentar propriedades redox únicas que podem ser exploradas nas mais variadas vertentes tecnológicas, como na área de catálise, nos processos metalúrgicos, na produção de células a combustível (MARTINS et al., 2007) e até mesmo na área biomédica, como possíveis sequestradores (*scavengers*) de radicais livres nocivos à saúde (HIRST et al., 2009).

Nas partículas, o cério pode estar presente em ambos estados de oxidação,  $\text{Ce}^{4+}$  e  $\text{Ce}^{3+}$ , sendo que a concentração de cada estado depende da temperatura e da pressão parcial de oxigênio no ambiente. Quando tratadas em condições redutoras e elevadas temperaturas, as  $\text{CeO}_2$ -NP liberam oxigênio de sua rede cristalina induzindo, assim, a redução do  $\text{Ce}^{4+}$  a  $\text{Ce}^{3+}$  e formação de um grande número de vacâncias de oxigênio. No entanto, mesmo perdendo quantidades consideráveis de oxigênio da matriz, a estrutura tipo fluorita se mantém e, quando expostas a condições oxidantes, as partículas voltam a se reoxidar (MOGENSEN et al., 2000; DOMINGUES et al., 2007; NIU et al., 2007).

Segundo Muccillo e colaboradores (2005), o método mais comum para obtenção de  $\text{CeO}_2$ -NP consiste na precipitação de um sal precursor (geralmente  $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) e subsequente lavagem, filtração, secagem e calcinação do precipitado formado (Figura 3). Além de garantir boa reprodutibilidade e alto rendimento, a técnica permite a obtenção de  $\text{CeO}_2$ -NP em grande escala.



**Figura 3.** Esquema de preparação do CeO<sub>2</sub>-NP pelo método de precipitação (adaptado de CHAGAS JÚNIOR, 2008).

### 1.5.1. Aplicações das Nanopartículas de Dióxido de Cério

A nanocéria (CeO<sub>2</sub>-NP) tem um enorme potencial para aplicação em diversas vertentes tecnológicas, principalmente devido ao seu comportamento redox, a alta mobilidade de oxigênio na rede cristalina e a alta afinidade por compostos contendo oxigênio, nitrogênio e enxofre (MARTINS et al., 2007).

Uma das principais aplicações de compostos a base de CeO<sub>2</sub>-NP é em processos metalúrgicos, onde são adicionados ao aço para eliminar impurezas, principalmente oxigênio e enxofre, contribuindo, assim, para melhorar significativamente a qualidade do material, como a resistência a corrosão e ductibilidade. Com esta mesma finalidade, estes compostos também podem ser adicionados a outras ligas metálicas, como aquelas à base de cobalto ou níquel utilizadas em turbinas de motores de aviões (MARTINS et al., 2007).

As CeO<sub>2</sub>-NP também têm sido empregadas como agentes catalíticos para o tratamento de gases de exaustão de automóveis, como o monóxido de carbono (CO), óxidos de nitrogênio (NO<sub>x</sub>) e hidrocarbonetos (HC's). Quando a mistura ar/combustível está deficiente em oxigênio, as CeO<sub>2</sub>-NP têm a capacidade de liberar oxigênio de sua própria rede cristalina e oxidar, por exemplo, o CO a CO<sub>2</sub>. Além disso, a presença de CeO<sub>2</sub>-NP estabiliza termicamente a alumina, usada como suporte catalítico, evitando que os catalisadores automotivos percam a eficiência em altas temperaturas (RAO e MISHRA, 2003).

Células a combustíveis de óxido sólido têm emergido como uma nova opção para geração de energia elétrica de forma limpa e eficiente. Estas células são formadas por três elementos básicos: dois eletrodos (ânodo e cátodo) e um eletrólito situado entre eles. Eletrólitos de óxidos sólidos conduzem íons  $O^{2-}$  gerados no cátodo até o ânodo, onde reagem com um combustível na forma de gás ( $H_2$ , CO) liberando elétrons que percorrem o circuito externo. O fluxo de elétrons pelo circuito externo gera uma corrente e, conseqüentemente, produz eletricidade (de FLORIO et al., 2004). Devido a sua alta condutividade iônica, boa compatibilidade com os demais constituintes das células e capacidade de operar em uma faixa de temperatura menor (500 - 700 °C) que os eletrólitos tradicionais (1000 °C), os eletrólitos à base de  $CeO_2$ -NP têm sido preferidos (MARTINS et al., 2007).

Além das aplicações tecnológicas, tem sido investigada também a utilização das  $CeO_2$ -NP para fins terapêuticos (PATIL et al., 2007). Estudos recentes sugerem que o comportamento redox das  $CeO_2$ -NP as tornam capazes de atuarem como sequestradores de radicais livres em ambientes fisiológicos, prevenindo, assim, possíveis desordens celulares (HIRST et al., 2009; HIRST et al., 2011).

A habilidade das nanopartículas de  $CeO_2$  de conferir cardioproteção foi evidenciada por Niu e colaboradores (2007), utilizando camundongos transgênicos com insuficiência cardíaca como modelo. Foi observado que a administração intravenosa de  $CeO_2$ -NP inibe a infiltração de monócitos/macrófagos para o espaço intersticial do miocárdio, suprime a produção de citocinas pró-inflamatórias, atenuando assim o estresse oxidativo do miocárdio e a progressão da disfunção ventricular. Proteção ocular (CHEN et al., 2006) e hepática (AMIN et al., 2011) também têm sido relatadas, embora os mecanismos subjacentes a ação destas nanopartículas não estejam completamente esclarecidos.

### **1.5.2. Toxicidade das Nanopartículas de Dióxido de Cério**

Vários estudos têm sido realizados no intuito de explorar as propriedades das nanopartículas de  $CeO_2$  para fins comerciais. No entanto, as informações sobre a interação dessas partículas com os sistemas biológicos são escassas. Além disso, os trabalhos publicados têm apresentado resultados controversos, especialmente em relação ao efeito oxidante/antioxidante das  $CeO_2$ -NP (PARK et al., 2008).

Hirst e colaboradores (2009) avaliaram o mecanismo de captação das CeO<sub>2</sub>-NP, bem como a toxicidade potencial e a capacidade das nanopartículas de suprimir a produção de mediadores inflamatórios. Através de microscopia eletrônica de alta resolução (HRTEM), foram detectadas partículas individualizadas e aglomerados de nanocéria nos fagossomos e no citosol de macrófagos de roedores (J774A.1) tratados com 10 µM de nanocéria por 24 horas. Além disso, foram encontrados aglomerados de nanocéria, com tamanhos variando entre 5 e 50 nm, ancorados na membrana externa dos macrófagos, sugerindo, portanto, que as NPs podem ser captadas tanto por fagocitose quanto por difusão direta através da membrana. As NPs internalizadas não causaram toxicidade (avaliada pelos níveis de apoptose e necrose) e promoveram uma redução significativa dos níveis de EROs produzidos pelos macrófagos estimulados, evidenciando a capacidade das CeO<sub>2</sub>-NP de remover os radicais livres. Interessantemente, o pré-tratamento com CeO<sub>2</sub>-NP reduziu a produção de enzimas indutoras de óxido nítrico sintase (iNOS), responsáveis pela conversão de arginina em citrulina e óxido nítrico (NO), um importante mediador inflamatório.

A capacidade antioxidante das CeO<sub>2</sub>-NP também foi avaliada *in vivo*. Camundongos foram tratados previamente com 0,5 mg/kg de nanocéria e, após uma semana, receberam, via intraperitoneal, 1 g/kg de tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>), um indutor de estresse oxidativo. Em três semanas, foi detectada uma redução significativa dos níveis de MDA, produto final da peroxidação lipídica. O tratamento com nanocéria pareceu, inclusive, ser mais eficiente que o tratamento com N-acetilcisteína (NAC), usada terapeuticamente como antioxidante em indivíduos que sofrem de toxicidade hepática aguda (HIRST et al., 2011).

Contrariamente, Lin e colaboradores (2006) demonstraram que CeO<sub>2</sub>-NP podem ser indutoras de estresse oxidativo. O tratamento com CeO<sub>2</sub>-NP nas concentrações de 3,5, 10,5 e 23,3 µg/mL reduziu em 12, 22 e 46% a viabilidade de células de carcinoma pulmonar (A549). A atividade lactato desidrogenase (LDH) aumentou em até 71% após 72 horas de exposição a 23,3 µg/mL de nanocéria, indicando danos na membrana celular. Os níveis de MDA também foram aumentados apontando a ocorrência de peroxidação lipídica. Por outro lado, os níveis dos antioxidantes (glutathiona e  $\alpha$ -tocoferol) foram significativamente reduzidos.

Park e colaboradores (2008) obtiveram resultados semelhantes em relação à capacidade das CeO<sub>2</sub>-NP de induzir danos celulares via estresse oxidativo. A viabilidade de células pulmonares (BEAS-2B) foi reduzida de maneira tempo dependente (24, 48, 72 e 96 horas) e dose dependente (10, 20 e 40 µg/mL) após o tratamento com CeO<sub>2</sub>-NP. Os

resultados indicaram um aumento significativo na produção de EROs, redução dos níveis de glutathiona e indução de genes responsivos ao estresse oxidativo (heme oxigenase-1, catalase, glutathiona-S-transferase e tioredoxina redutase). Além disso, a produção aumentada de EROs desencadeou a ativação da caspase-3 e induziu a condensação da cromatina, sugerindo o envolvimento do processo apoptótico.

Toxicidade dependente de concentração foi relatada por Singh e colaboradores (2010). Dentro de um curto período de exposição (3 horas), as CeO<sub>2</sub>-NP (0,001 e 0,01 mg/mL) foram internalizadas por queratinócitos humanos (HaCaT) e distribuídas em vários compartimentos celulares (mitocôndrias, lisossomos, retículo endoplasmático e no núcleo) sem comprometer as atividades metabólicas. No entanto, observou-se que o tratamento com uma concentração 10x mais elevada (0,1 mg/mL) afeta o metabolismo celular reduzindo a viabilidade em 50%.

Asati e colaboradores (2010) demonstraram, por sua vez, que CeO<sub>2</sub>-NP (1 mM) podem apresentar perfis de toxicidade diferentes dependendo da carga superficial, do tipo celular e da localização subcelular das NPs após a internalização. CeO<sub>2</sub>-NP carregadas positivamente foram tóxicas a quase todas as linhagens celulares avaliadas (miócitos cardíacos – H9c2; células de rim embrionário humano – HEK-293 e células de carcinoma pulmonar - A549), exceto à linhagem celular de carcinoma de mama (MCF-7) que não permitiu a internalização das nanopartículas. Já as CeO<sub>2</sub>-NP com carga negativa causaram toxicidade somente à linhagem A549, nos demais tipos celulares as NPs não foram internalizadas. Quando internalizadas, as CeO<sub>2</sub>-NP com carga positiva e negativa se localizavam principalmente nos lisossomos, diferentemente das CeO<sub>2</sub>-NP com carga neutra que foram internalizadas por todos os tipos celulares e estavam presentes principalmente no citoplasma. Curiosamente, as NPs de carga neutra não foram tóxicas às células. Segundo os autores, o microambiente ácido dos lisossomos pode desempenhar um papel fundamental no potencial tóxico das CeO<sub>2</sub>-NP, ativando a atividade oxidase das nanopartículas, tornando-as citotóxicas.

Estudo recente avaliou o perfil expressão gênica de células neuronais de camundongos (HT22) expostas às CeO<sub>2</sub>-NP. Um grande número de genes foram diferencialmente expressos após o tratamento com 20 µg/mL de nanocéria, principalmente os genes relacionados a doenças neurológicas e controle do ciclo celular (LEE et al., 2011).

A interferência das CeO<sub>2</sub>-NP sobre o material genético também tem sido reportada. Lee e colaboradores (2009) compararam o potencial genotóxico de diferentes nanopartículas, SiO<sub>2</sub> (7 e 10 nm), TiO<sub>2</sub> (7 e 20 nm) e CeO<sub>2</sub>-NP (15 e 30 nm), utilizando duas espécies aquáticas amplamente utilizadas na biomonitorização, o crustáceo de água doce *Daphnia magna* e a larva do mosquito aquático *Chironomus riparius*. O número de quebras no DNA (detectados pelo ensaio Cometa) aumentou significativamente em ambas espécies somente após o tratamento com 1mg/L de CeO<sub>2</sub>-NP (15 e 30 nm), as demais NPs não causaram toxicidade genética. Adicionalmente, observou-se que as CeO<sub>2</sub>-NP menores (15 nm) foram mais eficientes em causar os danos genéticos.

Em contraste ao estudo citado anteriormente, Pierscionek e colaboradores (2010) demonstraram, por meio da técnica de troca de cromátides irmãs (SCE) e pelo ensaio Cometa, que a exposição a 5 e 10 µg/mL de nanocéria por 24 horas não resulta em instabilidade genética ou danos no DNA de células epiteliais do cristalino humano.

Posteriormente, foi avaliada a influência do tempo de exposição e das concentrações sobre potencial genotóxico das CeO<sub>2</sub>-NP. Células epiteliais do cristalino humano foram tratadas com 10, 20 e 100 µg/mL de nanocéria por 48 e 72 horas. Os resultados obtidos pelo ensaio Cometa demonstraram que nenhuma das concentrações testadas induz quebras no DNA após 48 horas de exposição. Entretanto, após 72 horas, as concentrações de 20 e 100 µg/mL de nanocéria induziram um pequeno, mas significativo aumento no número de quebras no DNA quando comparados com os grupos não tratados, sugerindo, portanto, que o tempo de exposição pode ter um efeito maior que a concentração sobre o potencial genotóxico da nanocéria (PIERSCIONEK et al., 2011).

## 2. OBJETIVOS

Os testes empregados com maior frequência para investigar a toxicidade genética de diferentes nanopartículas são (i) o ensaio Cometa que detecta quebras uni ou bifilamentar de DNA, sítios álcali-lábeis, bem como bases oxidadas, e (ii) o teste de micronúcleo (MN) que quantifica eventos clastogênicos e aneugênicos resultantes da fragmentação cromossômica e perda de cromossomos inteiros, respectivamente (LANDSIEDEL et al., 2009). Portanto, a maioria das informações existentes na literatura acerca da interferência de nanopartículas sobre a estabilidade e integridade genética está baseada, fundamentalmente, nos seus efeitos sobre mutações pontuais e aberrações cromossômicas, havendo ainda uma lacuna no que se refere ao monitoramento de eventos relacionados com a recombinação mitótica, um importante mecanismo que pode estar associado ao desenvolvimento de câncer.

Um ponto crítico do processo carcinogênico em que a recombinação homóloga (RH) pode estar envolvida é a perda de heterozigose (LOH), seja pela deleção de um gene contendo o alelo funcional ou ainda pela conversão gênica do alelo funcional para um alelo mutante (BISHOP e SCHIESTL, 2001). Adicionalmente, outros parâmetros associados à recombinação, tais como a amplificação de genes e translocações, também podem desempenhar um papel crucial nas alterações genéticas que desencadeiam o câncer (RAMEL et al., 1996). Por exemplo, na formação dos cânceres de mama, hepático e pulmonar, o oncogene *c-myc* se encontra comumente amplificado e, conseqüentemente, expressando níveis anormais da proteína *c-myc* (BIZARI et al., 2006; FARIA e RABENHORST, 2006). Um último argumento, não menos importante, que reforça as evidências de que a RH, assim como as mutações, está estreitamente relacionada com a carcinogênese, é o fato de que a RH atua como um mecanismo alternativo para a manutenção dos telômeros, independente de telomerase (BISHOP e SCHIESTL, 2001).

Diante do contexto apresentado e no intuito de oferecer uma base confiável de informação a respeito da segurança das nanopartículas para a saúde humana, o presente trabalho apresenta os seguintes objetivos:

- I) avaliar o potencial genotóxico de seis amostras diferentes de nanopartículas, incluindo a detecção de mutações pontuais, aberrações cromossômicas e eventos recombinacionais por meio do Teste para Detecção de Mutação e Recombinação

em Células Somáticas de *Drosophila melanogaster* (SMART). As nanopartículas avaliadas foram:

- i. quatro espécies de nanotubos de carbono, denominadas NTC, NT, MW e CS;
- ii. nanopartículas de prata (AgNP);
- iii. nanopartículas de dióxido de cério (CeO<sub>2</sub>-NP).

II) estimar, em termos de seus efeitos isolados, a contribuição dos eventos mutacionais e recombinacionais para a genotoxicidade total das nanopartículas avaliadas, através da comparação dos resultados obtidos entre dois diferentes genótipos:

- i. trans-heterozigoto – que evidencia a ocorrência de eventos mutagênicos e/ou recombinogênicos;
- ii. heterozigoto para o cromossomo balanceador TM3 – que expressa, exclusivamente, eventos do tipo mutação gênica e aberração cromossômica.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

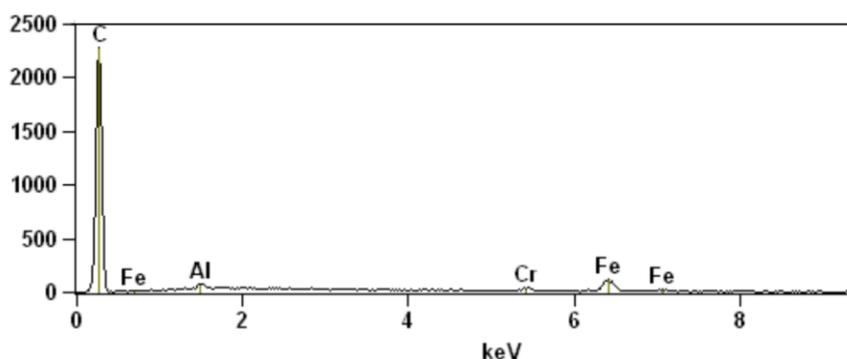
#### 3.1. Agentes Químicos

Para a realização dos experimentos, foram utilizadas seis amostras diferentes de nanopartículas: quatro espécies de nanotubos de carbono, três do tipo paredes múltiplas (NTC, NT e MW) e uma do tipo “*cup-stacked*” (CS), uma nanopartícula metálica (AgNP) e uma nanopartícula de óxido metálico (CeO<sub>2</sub>-NP).

##### 3.1.1. Nanotubos de Carbono

- NTC

O NTC é um nanotubo de carbono comercial de origem coreana (Korea Co). A Figura 4 mostra os resultados da análise por espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS) utilizada para caracterização química elementar. Nesta análise foram observados nanotubos com pureza elementar de carbono correspondente a 97,75% com contaminações de ferro (1,73%), cromo (0,31%) e alumínio (0,22%). Os contaminantes provavelmente são resultantes do processo de síntese dessas nanopartículas.



**Figura 4.** Curva típica da análise EDS do NTC.

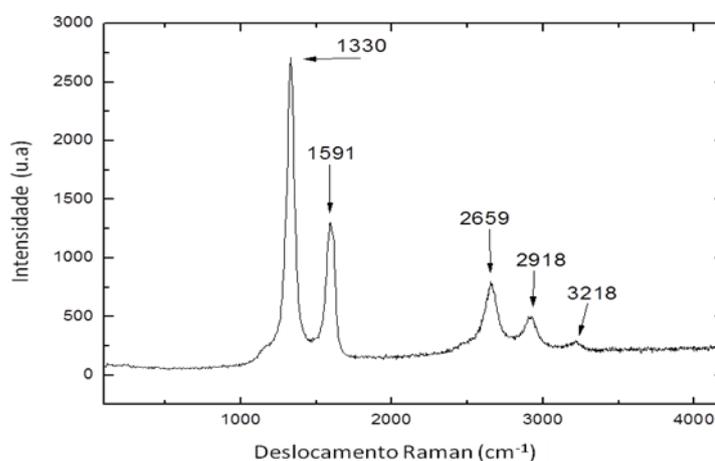
- NT

O nanotubo de carbono NT foi sintetizado no Laboratório de Nanoengenharia e Diamante (NanoEng), do Departamento de Semicondutores, Instrumentos e Fotônica (DSIF) da Faculdade de Engenharia Elétrica e Computação (FEEC), Universidade Estadual de

Campinas (UNICAMP). As amostras de NT foram produzidas pelo método de deposição química a vapor auxiliado por filamento quente (HFCVD), crescidas em substrato de cobre, recoberta previamente com filme de polianilina e catalisada com níquel. Cânfora e acetona foram utilizadas como fontes de carbono.

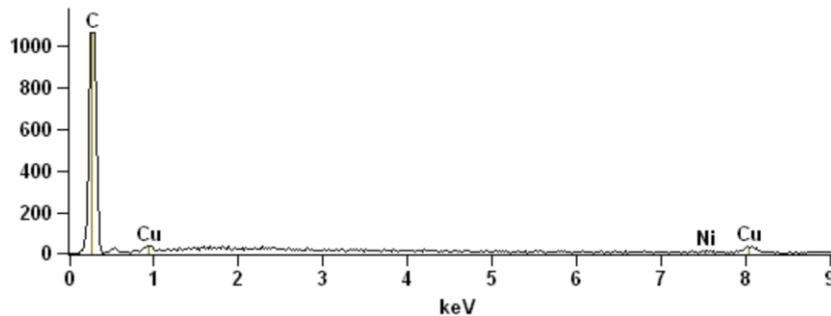
O NT foi caracterizado por espectroscopia Raman por meio do sistema de microscopia Renishaw Invia que utilizou um laser He-Ne para excitação ( $\lambda=633$  nm) com uma potência de, aproximadamente, 10 mW. EDS foi utilizada para caracterização química elementar. Análises morfológicas da amostra foram feitas por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FESEM) e por microscopia eletrônica de alta resolução (HRTEM), empregando os aparelhos JEOL JSM-6330F operado a 5KV/8 $\mu$ A e JEOL 3010 operado a 300KV/120 $\mu$ A, respectivamente.

A Figura 5 mostra um espectro Raman típico da partícula NT. O espectro pode ser dividido em regiões de frequências de primeira e segunda ordem. Na região de primeira ordem há dois picos intensos em 1591  $\text{cm}^{-1}$  e 1330  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente ao pico desordenado  $\text{sp}^3$  (linha D), e ao pico de grafite  $\text{sp}^2$  E2g altamente ordenado (linha G). Na região de segunda ordem há um intenso pico em 2659  $\text{cm}^{-1}$  correspondente ao segundo harmônico da linha D (2 x D), um pequeno pico em torno de 2918  $\text{cm}^{-1}$ , o qual corresponde à soma das frequências das linhas D e G (D + G) e um pequeno pico de, aproximadamente, 3218  $\text{cm}^{-1}$  referente ao segundo harmônico da linha G (2 x G). A intensidade do pico D é maior quando comparada a intensidade do pico G, o que não indica um alto grau de ordem  $\text{sp}^2$  C-C, sugestivo de espectro Raman característico de nanotubos de carbono de múltiplas paredes desordenadas.



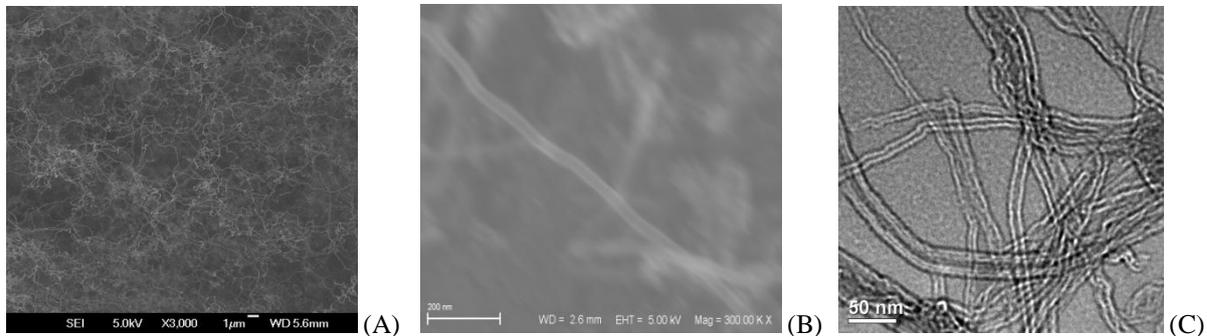
**Figura 5.** Espectro Raman da partícula NT.

A Figura 6 mostra os resultados da análise EDS. Foram observados nanotubos com pureza elementar de carbono correspondente a 98,95% com contaminações de níquel (0,11%) e cobre (0,94%). Os contaminantes provavelmente são resultantes do processo de síntese dessas nanopartículas.



**Figura 6.** Curva típica da análise EDS do NT.

Na Figura 7 as imagens do NT, obtidas por FESEM e HRTEM em diferentes ampliações, mostram que a amostra consiste de estruturas tubulares não alinhadas formando aglomerados que cobrem a superfície do substrato.



**Figura 7.** (A) Imagem FESEM de aglomerados de nanotubos recém depositados em uma escala de 1µm; (B) imagem FESEM de nanotubos na escala de 200 nm; (C) imagem HRTEM de nanotubos na escala de 50 nm. Pode-se observar as paredes múltiplas do NT.

- **CS**

O nanotubo de carbono CS foi sintetizado pelos seguintes membros da equipe orientada pelo Professor Doutor José Maurício Rosolen do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP: Elaine Yoshiko Matsubara (pós-doutoranda), Leonardo Pereira Franchi (doutorando) e Juliana C. da Silva (iniciação científica). As amostras de CS foram produzidas pela decomposição de alcoóis, sobre os catalisadores metálicos cobalto e manganês incorporados ao substrato de MgO a 650°C (método de deposição química a vapor - CVD). Após a síntese, o produto da síntese de CVD

foi imerso em ácido clorídrico (HCl) concentrado por 20 min em temperatura ambiente e então lavado, exaustivamente, com água MiliQ para atingir a neutralidade e, posteriormente, as amostras foram secas à temperatura de 100°C. Esta etapa foi aplicada para remover as partículas catalisadoras e o substrato usado no crescimento dos nanotubos. Os nanotubos usados têm diâmetro entre 25 a 60 nm.

- **MW**

Assim como o CS, o nanotubo de carbono MW também foi sintetizado pela equipe do Prof. Dr. José Maurício Rosolen, USP, pelo método de deposição química a vapor usando alcoóis como fonte de carbono em proporções estequiométricas diferentes do CS.

### 3.1.2. Nanopartículas de Prata (AgNP)

As nanopartículas de prata (Produto # 576832) foram adquiridas da Sigma-Aldrich Brazil Ltda, na forma de pó. As principais características, conforme o fabricante, estão apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Características físicoquímicas de AgNP

<b>Parâmetros</b>	<b>Características</b>
<b>Registro CAS</b>	7440-22-4
<b>Massa molecular</b>	107.87
<b>Características gerais</b>	Grande área de superfície, organicamente coberta para dispersão em solventes polares, contendo outros traços metálicos
<b>Forma</b>	pó
<b>Tamanho da partícula</b>	<100 nm
<b>Área de superfície</b>	5.0 m <sup>2</sup> /g
<b>Densidade</b>	10.49 g/cm <sup>3</sup> (lit.)

### 3.1.3. Nanopartículas de Dióxido de Cério (CeO<sub>2</sub>-NP)

As nanopartículas de CeO<sub>2</sub> (Produto # 544841) foram adquiridas da Sigma-Aldrich Brazil Ltda. As principais características, conforme o fabricante, estão apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Características físicoquímicas de CeO<sub>2</sub>-NP

Parâmetros	Características
Registro CAS	1306-38-3
Massa molecular	172.11
Forma	pó
Tamanho da partícula	<25 nm (BET)
Densidade	7,13 g/cm <sup>3</sup> à 25 °C

### 3.1.4. Doxorrubicina (DXR)

O agente mutagênico cloridrato de doxorrubicina (Glenmark Farmaceutic Ltda) foi utilizado como controle positivo, na concentração de 0,2 mM, para demonstrar a eficiência de indução de genotoxicidade nos experimentos.

A doxorrubicina é um medicamento da família das antraciclinas utilizado para o tratamento de câncer de mama, tumores sólidos na infância, sarcomas de tecidos moles e linfomas agressivos. O mecanismo de ação antitumoral da DXR envolve a inibição da enzima topoisomerase II e RNA polimerases, relacionadas com a síntese de DNA e proliferação celular. A DXR se liga aos ácidos nucléicos gerando quebras uni ou bifilamentares, bem como trocas entre cromátides irmãs. Além disso, promove a geração de radicais livres, que induzem danos oxidativos às células, levando-as à morte por apoptose (MINOTTI et al., 2004). Portanto, devido à capacidade de provocar danos ao DNA, a DXR é usada com frequência como controle positivo nos ensaios de mutagênese.

### 3.2. Dispersão das Nanopartículas

Para preparação das suspensões concentradas de nanopartículas, cada amostra foi dispersa – à hora do tratamento - em água destilada pelo processo de sonicação, durante um curto período (15 minutos), minimizando os possíveis riscos de quebra e consequente inserção de defeitos nas partículas.

A suspensão mãe de cada nanotubo de carbono (NTC, NT, CS e MW) foi preparada a uma concentração de 1 mg/mL. A partir dessa suspensão foram feitas diluições seriadas para obtenção das demais suspensões nas concentrações de 0,4, 0,16 e 0,064 mg/mL.

Para AgNP e CeO<sub>2</sub>-NP foram preparadas suspensões 10x mais concentradas do que as de nanotubos de carbono (0,64, 1,6, 4 e 10 mg/mL), pois as nanopartículas metálicas e de óxidos metálicos permitiram uma melhor dispersão em água destilada.

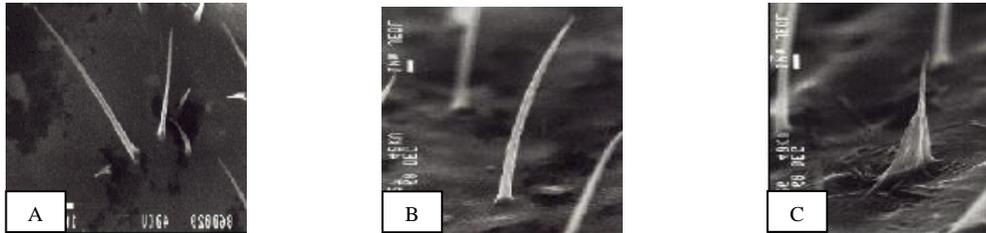
O solvente (água destilada) foi usado como controle negativo dos experimentos para determinar a frequência de mutações espontâneas.

### 3.3. Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART)

O teste SMART baseia-se na identificação e quantificação de pelos mutantes que representam a expressão fenotípica da ocorrência de lesões no DNA. Tais lesões são induzidas nas células dos discos imaginais - que se diferenciam e dão origem às asas dos adultos de *Drosophila melanogaster* - e causam a perda de heterozigose de dois marcadores genéticos envolvidos nas vias metabólicas de formação de pelos ou tricomas presentes nas superfícies dorsal e ventral das asas: os genes *mwh* e *flr<sup>3</sup>* (GRAF et al., 1984; ANDRADE e LEHMANN, 2003; ANDRADE et al., 2004).

Ambos genes são recessivos e se localizam no braço esquerdo do cromossomo 3. No entanto, o gene *mwh* se localiza em uma região mais distal (3-3,0) e tem sua manifestação fenotípica caracterizada por pelos múltiplos (Figura 8A), ou seja, três ou mais pelos por célula da asa - ao contrário do gene selvagem que origina um único pelo por célula (Figura 8B). Já o gene *flr<sup>3</sup>* está em uma região mais proximal (3-38,8) e afeta a forma dos pelos dando-lhes uma aparência de “chama de vela” (Figura 8C). Os pelos mutantes são classificados em manchas

ou clones, que apresentam fenótipos característicos, indicativos da ocorrência de mutação e/ou recombinação mitótica. Além disso, o número total de clones induzidos em um grupo tratado fornece dados quantitativos sobre a atividade genotóxica (GRAF et al., 1984; ANDRADE e LEHMANN, 2003; ANDRADE et al., 2004).



**Figura 8.** Visualização em microscopia eletrônica dos fenótipos de: (A) pelos múltiplos, (B) pelo normal e (C) pelo *flare*.

### 3.3.1. Linhagens de *Drosophila melanogaster*

Duas linhagens de *D. melanogaster* foram usadas, *flr*<sup>3</sup> e *mwh*, cujas constituições genéticas são:

- *flr*<sup>3</sup>: *flr*<sup>3</sup>/*In(3LR)TM3,rip<sup>p</sup> sep l(3)89Aa bx<sup>34e</sup> e Bd<sup>S</sup>*

- *mwh*: *mwh/mwh*

Tais linhagens são portadoras de uma série de genes marcadores específicos que permitem monitorar eventos relacionados com mutação gênica, aberrações cromossômicas e recombinação mitótica (GRAF et al., 1984).

### 3.3.2. Procedimento Experimental

Foi utilizado o cruzamento padrão (ST- standard cross), seguindo os métodos descritos por Graf et al. (1984): 80 fêmeas virgens da linhagem *flr*<sup>3</sup> e 40 machos *mwh*, foram cruzadas durante três dias, em meios de cultura padrão modificado (100 g de farinha de milho, 1000 mL de água destilada, 70 g de açúcar cristal, 50 g de fermento biológico, 7 g de ágar-ágar e 0,005 g de nipagin).

Após este período, os casais foram transferidos e permaneceram por oito horas em tubos contendo meio de ovoposição constituído por uma base sólida de ágar-ágar a 2,5%, coberta por uma camada de, aproximadamente, 3 cm de fermento biológico pastoso previamente aquecido em banho maria e fermentado com sacarose. Em seguida, os casais foram descartados. Aproximadamente 72 horas do início do período de ovoposição, larvas de terceiro estágio foram coletadas por flotação em água corrente. Grupos de 100 larvas foram distribuídas em frascos contendo 0,9 g de meio de purê de batata instantâneo e 3 mL das soluções de tratamento, e permaneceram em tratamento por 48 horas até atingirem o estágio de pupa (tratamento crônico). Assim, as células dos discos imaginais ficaram expostas às diferentes soluções de tratamento por 5 a 6 ciclos de divisão mitótica - o que corresponde a 95% de todas as divisões celulares que ocorrem desde o desenvolvimento do embrião até o início da pupação (FREI et al., 1992).

### 3.3.3. Genótipos dos Indivíduos F1 Testados

Após a eclosão das pupas (6 a 7 dias depois do tratamento), foram originados adultos F1 com duas constituições genotípicas:

(i) MH - trans-heterozigotos ( $mwh +/+ flr^3$ ) para os marcadores recessivos  $mwh$  e  $flr^3$ , e (ii) BH - heterozigotos para o cromossomo balanceador TM3 ( $mwh +/TM3, Bd^S$ ). Além do cromossomo TM3 ser indispensável para manter a heterozigose do gene marcador *flare* ( $flr^3$ ) na linhagem parental, ele contém múltiplas inversões, tornando inviáveis os produtos de recombinação. Dessa forma, os indivíduos irão expressar somente mutações gênicas e aberrações cromossômicas. O gene marcador  $Bd^S$  determina uma forma recortada das asas, permitindo facilmente a sua diferenciação em relação ao genótipo trans-heterozigoto que determina forma normal, arredondada (GRAF et al., 1984; ANDRADE e LEHMANN, 2003; ANDRADE et al., 2004).

### 3.3.4. Montagem e Análise Microscópica das Lâminas

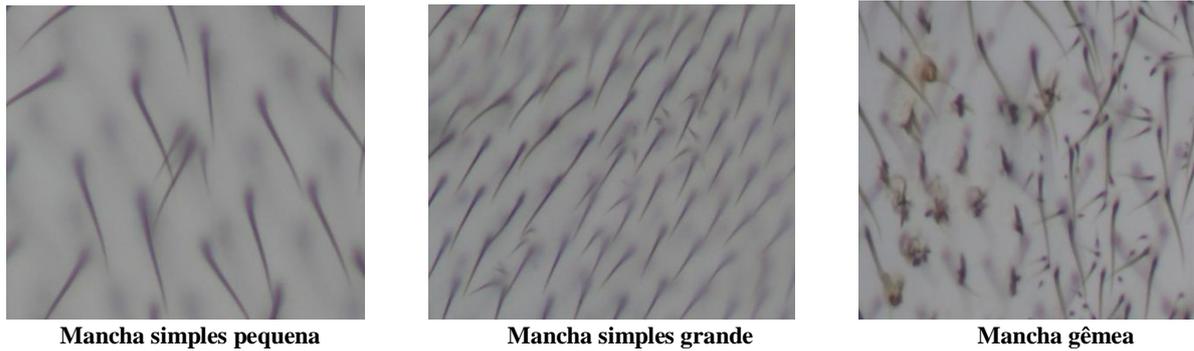
Após a eclosão das pupas, foi determinada a taxa de sobrevivência dos grupos controle e tratados e, em seguida, os adultos foram conservados em etanol 70% para posterior montagem das lâminas e análise dos tricomas presentes.

Para confecção das lâminas, as asas foram extraídas do corpo das moscas, embebidas em solução de Faure (30 g de goma arábica, 20 mL de glicerol, 50 mL de água e 50 mL de hidrato de cloral) e distendidas sobre a superfície de lâminas de vidro. As lâminas contendo 10 pares de asas - 5 pares de fêmeas e 5 pares de machos - foram mantidas à temperatura ambiente por um período mínimo de 24 horas para a secagem. Posteriormente, foram colocadas lamínulas (24 x 32 mm), contendo uma gota de solução de Faure, permanecendo por mais 24 horas à temperatura ambiente. Durante esse procedimento as lâminas foram pressionadas com cubos de metal – com peso total de aproximadamente 400 g – visando a perfeita aderência das asas às lâminas (ANDRADE et al., 2004).

As superfícies dorsal e ventral das asas dos adultos contendo, aproximadamente 24.400 pelos, foram analisadas em microscópio óptico de luz com aumento de 400x para verificar a ocorrência de clones mutantes (ANDRADE e LEHMANN, 2003).

### 3.3.5. Classificação dos Clones

Foram considerados como manchas independentes aquelas separadas por três ou mais fileiras de pelos normais (GRAF et al., 1984). As manchas foram classificadas como simples, quando somente um dos marcadores (*mwh* ou *flr<sup>3</sup>*) se expressou, ou manchas gêmeas, quando ambos fenótipos mutantes – pelos *mwh* e *flr<sup>3</sup>* – estavam presentes. Adicionalmente, as manchas foram divididas em classes de diferentes tamanhos: 1, 2, 3-4, 5-8, 9-16, 17-32, 33-64, 65-128, 129-256, >256. As duas primeiras classes representam manchas pequenas e são formadas durante o último e/ou penúltimo ciclos de divisão mitótica que ocorrem no estágio de pupa, e as demais são manchas grandes produzidas mais cedo, durante as primeiras divisões do desenvolvimento larval. Portanto, a perda de heterozigose induzida no genótipo *mwh/flr<sup>3</sup>* produz três diferentes categorias de manchas mutantes (Figura 9): (i) manchas simples pequena, (ii) manchas simples grande e (iii) manchas gêmeas (GRAF et al., 1984; ANDRADE e LEHMANN, 2003; ANDRADE et al., 2004).



**Figura 9.** Classificação das manchas de acordo com o fenótipo e o tamanho das manchas com pelos mutantes.

### 3.3.6. Bases Genéticas

O tipo de mancha mutante observado nas asas dos adultos  $mwh/flr^3$  permite a distinção das lesões genéticas que ocorreram no cromossomo 3:

- manchas simples com fenótipo pelos múltiplos ( $mwh$ ):
  - recombinação simples entre os loci  $mwh$  e  $flr^3$ ;
- manchas simples expressando o fenótipo pelos com a base alargada ( $flr^3$ ):
  - recombinação simples entre  $flr^3$  e o centrômero, seguida de uma segunda recombinação simples entre  $mwh$  e  $flr^3$ ;
- manchas simples,  $mwh$  ou  $flr^3$ :
  - conversão gênica em um dos marcadores selvagens ( $mwh^+$  ou  $flr^3^+$ );
  - deleção de um fragmento cromossômico contendo um dos marcadores selvagens;
  - não disjunção, com consequente perda de um dos cromossomos contendo um dos marcadores selvagens;
  - mutações gênicas representadas por trocas, adição ou deleção de bases em um dos genes selvagens marcadores;

- manchas gêmeas:
  - devem-se exclusivamente à recombinação simples entre *flr*<sup>3</sup> e o centrômero, com posterior segregação de um cromossomo parental e um recombinado.

Em resumo, as manchas simples podem ser originadas tanto por eventos mutacionais, que incluem mutações pontuais e cromossômicas, bem como por recombinação mitótica. Já as manchas gêmeas representam a ocorrência exclusiva de recombinação mitótica (GRAF et al., 1984; ANDRADE e LEHMANN, 2003; ANDRADE et al., 2004).

### 3.3.7. Análise Estatística

Para avaliação dos efeitos genotóxicos, a frequência de cada tipo de mancha (simples pequena, simples grande e gêmeas) e a frequência total de manchas por indivíduo foram comparadas com controle negativo correspondente. Estas comparações foram realizadas utilizando-se o teste binomial condicional de Kastenbaum e Bowman (1970), com nível de significância  $\alpha = 0,05$ , seguindo um procedimento de múltiplas escolhas proposto por Frei e Würzler (1988), que é baseado testando as seguintes hipóteses:

Hipótese  $H_0$ : não há diferença significativa entre as frequências de alterações do grupo controle e dos grupos tratados.

Hipótese  $H_A$ : as frequências de alterações induzidas nos grupos tratados são “ $m$ ” vezes maiores que a frequência de alteração espontânea obtida no grupo controle negativo, onde “ $m$ ” é um fator de multiplicação inserido para minimizar os riscos do falso-positivo:  $m = 2$  para manchas simples pequenas e total de manchas, pois elas apresentam altas frequências espontâneas e  $m = 5$  para manchas simples grandes e gêmeas, porque elas raramente surgem de forma espontânea (FREI e WÜRGLER, 1988; FREI et al., 1992; GRAF et al., 1984).

Quatro diferentes diagnósticos são possíveis: (i) inconclusivo, se ambas as hipóteses são aceitas, (ii) negativo, se  $H_0$  é aceita e  $H_A$  é rejeitada, (iii) positivo, se  $H_0$  é rejeitada e  $H_A$  é aceita e (iv) fraco positivo, se ambas hipóteses são rejeitadas.

Baseado no número de clones mwh, no número de asas analisadas e no número de células contabilizadas em cada asa (aproximadamente, 24.400), a frequência de formação de

clones por  $10^5$  células foi calculada (FREI et al., 1992). Estes valores foram utilizados, em seguida, para estimar a contribuição da recombinação (R) e mutação (M) para a incidência do total de manchas mutantes induzidas em indivíduos do genótipo trans-heterozigoto de acordo com as fórmulas:  $R = 1 - [(n/NC \text{ em indivíduos } mwh/TM3)/(n/NC \text{ em indivíduos } mwh/flr^3)] * 100$ ;  $M = 100 - R$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Efeitos Tóxicos

A toxicidade crônica de todos os compostos testados (NTC, NT, CS, MW, AgNP e CeO<sub>2</sub>-NP) foi avaliada previamente para estabelecer a faixa de concentração utilizada nas análises de toxicidade genética. Para isso, grupos de 100 larvas foram distribuídos em tubos de tratamento com diferentes concentrações de cada composto e permaneceram em tratamento por 48 horas. As concentrações finais foram selecionadas seguindo os seguintes critérios: (i) o número de adultos sobreviventes foi alto o suficiente (superior a 90% em todos os casos) para indicar que as nanopartículas não comprometem o desenvolvimento das larvas e, portanto, não são tóxicas (ii) o uso de concentrações mais elevadas poderia gerar um falso cenário de exposição, pois as nanopartículas não estariam presentes em quantidades tão grandes na maioria das situações associadas à exposição humana e/ou ambiental.

### 4.2. Toxicidade Genética

As frequências de manchas espontâneas e induzidas nos grupos controle negativo e positivo, respectivamente, foram compatíveis com resultados apresentados na literatura (GRAF et al., 1984), confirmando que o sistema respondeu adequadamente aos parâmetros necessários para que as análises fossem realizadas.

Para a avaliação dos resultados, comparou-se a frequência de manchas mutantes de cada grupo tratado com respectivo controle negativo (água destilada). Indivíduos trans-heterozigotos tratados com 0,064, 0,16, 0,4 e 1 mg/mL de diferentes espécies de nanotubos de carbono (NTC, NT e CS) não apresentaram aumento estatisticamente significativo ( $p > 0,05$ ) nas frequências do total de manchas mutantes, indicando a ausência de efeitos genotóxicos (Tabela 3). Assim sendo, não foram necessárias as análises dos indivíduos do genótipo *mwh/TM3*.

**Tabela 3.** Avaliação dos efeitos mutagênicos e/ou recombinogênicos do NTC, NT e CS em células somáticas de larvas obtidas do cruzamento ST

Genótipos e Compostos (mg/mL)	N. de indivíduos (N)	Manchas por indivíduo (nº de manchas) diagnóstico estatístico <sup>a</sup>										
		Manchas simples pequenas (1-2 cél.)		Manchas simples grandes (> 2 cél.)			Manchas gêmeas			Total de manchas		
		m = 2		m = 5			m = 5			m = 2		
<b>NTC</b>												
<i>mwh/flr</i> <sup>3</sup>												
Contr. Neg.	80	0,58	(46)		0,08	(06)		0,03	(02)		0,68	(54)
0,064	80	0,64	(51)	-	0,10	(08)	i	0,01	(01)	-	0,75	(60)
0,16	80	0,68	(54)	-	0,10	(08)	i	0,05	(04)	i	0,83	(66)
0,4	80	0,73	(58)	-	0,13	(10)	i	0,04	(03)	i	0,89	(71)
1	80	0,55	(44)	-	0,10	(08)	i	0,05	(04)	i	0,70	(56)
Contr. Pos.	40	1,05	(42)	i	1,63	(65)	+	1,30	(52)	+	3,98	(159)
<b>NT</b>												
<i>mwh/flr</i> <sup>3</sup>												
Contr. Neg.	80	0,51	(41)		0,08	(06)		0,04	(03)		0,63	(50)
0,064	80	0,63	(50)	-	0,11	(09)	i	0,03	(02)	-	0,76	(61)
0,16	80	0,54	(43)	-	0,10	(08)	i	0,03	(02)	-	0,66	(53)
0,4	80	0,69	(55)	-	0,09	(07)	i	0,03	(02)	-	0,80	(64)
1	80	0,59	(47)	-	0,10	(08)	i	0,03	(02)	-	0,71	(57)
Contr. Pos.	40	1,05	(42)	i	1,63	(65)	+	1,30	(52)	+	3,98	(159)
<b>CS</b>												
<i>mwh/flr</i> <sup>3</sup>												
Contr. Neg.	60	0,68	(41)		0,08	(05)		0,03	(02)		0,80	(48)
0,064	60	0,70	(42)	-	0,08	(05)	-	0,07	(04)	i	0,85	(51)
0,16	60	0,62	(37)	-	0,12	(07)	i	0,05	(03)	i	0,78	(47)
0,4	60	0,78	(47)	-	0,10	(06)	i	0,05	(03)	i	0,93	(56)
1	60	0,73	(44)	-	0,23	(14)	+	0,02	(01)	-	0,98	(59)
Contr. Pos.	60	4,63	(278)	+	8,08	(485)	+	8,95	(537)	+	21,67	(1300)

<sup>a</sup>Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação. Nível de significância  $\alpha=0,05$ .

Como pode ser observado na Tabela 4, as duas maiores concentrações do nanotubo MW (0,4 e 1 mg/mL) induziram aumentos significativos nas frequências totais de manchas mutantes. É importante ressaltar que a maior frequência de manchas simples pequenas produzida em relação aos demais tipos de manchas é indicativa de que o composto tenha, possivelmente, efeitos tardios, gerando danos genéticos somente nos últimos estágios do desenvolvimento larval (ANDRADE et al., 2004). Além disso, os resultados negativos obtidos nas moscas heterozigotas balanceadas indicam que o MW exerce sua atividade genotóxica principalmente através da indução de recombinação somática. A porcentagem de recombinação nas duas concentrações mais elevadas é de 73 e 64%, respectivamente.

**Tabela 4.** Avaliação dos efeitos mutagênicos e/ou recombinogênicos do MW em células somáticas de larvas obtidas do cruzamento ST

Genótipos e Compostos (mg/mL)	N. de ind. (N)	Manchas por indivíduo (n° de manchas) diagnóstico estatístico <sup>a</sup>					Manchas com clone mwh (n)	Frequência de formação de clones por 10 <sup>5</sup> cél. (n/NC)	Recombinação <sup>d</sup> (%)
		Manchas simples pequenas (1-2 cél.) <sup>b</sup> m = 2	Manchas simples grandes (> 2 cél.) <sup>b</sup> m = 5	Manchas gêmeas m = 5	Total de manchas m = 2				
<b>MW</b>									
<i>mwh/flr<sup>3</sup></i>									
Contr. Neg.	60	0,65 (39)	0,05 (03)	0,02 (01)		0,72 (43)	42	1,43	
0,064	60	0,70 (42) -	0,10 (06) i	0,05 (03) i		0,85 (51) -	51	1,74	
0,16	60	0,70 (42) -	0,08 (05) i	0,03 (02) i		0,82 (49) -	48	1,64	
0,4	60	1,12 (67) f+	0,13 (08) i	0,03 (02) i		1,28 (77) +	77	2,63	73
1	60	1,12 (67) f+	0,13 (08) i	0,05 (03) i		1,30 (78) +	77	2,63	64
<i>mwh/TM3</i>									
Contr. Neg.	60	0,55 (33)	0,02 (01)			0,57 (34)	34	1,16	
0,064	60	0,57 (34) -	0,07 (04) i			0,63 (38) -	38	1,30	
0,16	60	0,40 (24) -	0,05 (03) i			0,45 (27) -	27	0,92	
0,4	60	0,28 (17) -	0,07 (04) i		<sup>c</sup>	0,35 (21) -	21	0,72	
1	60	0,45 (27) -	0,02 (01) i			0,47 (28) -	28	0,96	

<sup>a</sup>Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação. Nível de significância  $\alpha=0,05$ .

<sup>b</sup>Incluindo manchas simples *flr<sup>3</sup>* raras.

<sup>c</sup>Somente manchas *mwh* podem ser observadas em indivíduos *mwh/TM3*, uma vez que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr<sup>3</sup>*.

<sup>d</sup>Porcentagem de recombinação calculada de acordo com a fórmula  $R = 1 - [(n/NC \text{ em indivíduos } mwh/TM3) / (n/NC \text{ em indivíduos } mwh/flr^3)] * 100$ . C = n° de células contabilizadas por indivíduo (48,800).

Tabela 5 resume os dados obtidos pela análise dos indivíduos tratados com nanopartículas de prata (AgNP). Somente a maior concentração (10 mg/mL) foi capaz de promover danos no DNA, indicados pelo aumento na frequência total de manchas mutantes, principalmente de manchas simples pequenas. Nesta concentração a contribuição da recombinação no total de eventos genotóxicos induzidos foi de 61%.

**Tabela 5.** Avaliação dos efeitos mutagênicos e/ou recombinogênicos da AgNP em células somáticas de larvas obtidas do cruzamento ST

Genótipos e Compostos (mg/mL)	N. de ind (N)	Manchas por indivíduo (nº de manchas) diagnóstico estatístico <sup>a</sup>				Manchas com clone mwh (n)	Frequência de formação de clones por 10 <sup>5</sup> cél. (n/NC)	Recombinação <sup>d</sup> (%)
		Manchas simples pequenas (1-2 cél.) <sup>b</sup> m = 2	Manchas simples grandes (> 2 cél.) <sup>b</sup> m = 5	Manchas gêmeas m = 5	Total de manchas m = 2			
<b>AgNP</b>								
<i>mwh/flr<sup>3</sup></i>								
Contr. Neg.	60	0,62 (37)	0,10 (06)	0,03 (02)	0,75 (45)	45	1,54	
0,64	60	0,47 (28) -	0,05 (03) -	0,02 (01) -	0,53 (32) -	32	1,09	
1,6	60	0,65 (39) -	0,07 (04) -	0,07 (04) i	0,78 (47) -	46	1,57	
4	60	0,58 (35) -	0,13 (08) i	0,03 (02) -	0,75 (45) -	45	1,54	
10	60	0,87 (52) i	0,15 (09) i	0,05 (03) i	1,07 (64) +	64	2,19	61
<i>mwh/TM3</i>								
Contr. Neg.	60	0,52 (31)	0,02 (01)		0,53 (32)	32	1,09	
0,64	60	0,47 (28) -	0,05 (03) i		0,52 (31) -	31	1,06	
1,6	60	0,47 (28) -	0,03 (02) i		0,50 (30) -	30	0,99	
4	60	0,37 (22) -	0,02 (01) i	c	0,38 (23) -	23	0,75	
10	60	0,42 (25) -	0,00 (00) i		0,42 (25) -	25	0,85	

<sup>a</sup>Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação. Nível de significância  $\alpha=0,05$ .

<sup>b</sup>Incluindo manchas simples *flr<sup>3</sup>* raras.

<sup>c</sup>Somente manchas *mwh* podem ser observadas em indivíduos *mwh/TM3*, uma vez que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr<sup>3</sup>*.

<sup>d</sup>Porcentagem de recombinação calculada de acordo com a fórmula  $R = 1 - [(n/NC \text{ em indivíduos } mwh/TM3) / (n/NC \text{ em indivíduos } mwh/flr^3)] * 100$ . C = nº de células contabilizadas por indivíduo (48.800).

Os resultados da nanocéria (CeO<sub>2</sub>-NP) estão apresentados na Tabela 6. Indivíduos trans-heterozigotos tratados com concentrações de até 10 mg/mL de CeO<sub>2</sub>-NP apresentaram aumentos significativos nas frequências totais de manchas mutantes, indicando que tais nanopartículas são capazes de produzir efeitos genotóxicos, mesmo na menor concentração testada (0,64 mg/mL). De forma semelhante ao MW e as AgNP, a nanocéria produziu um maior número de manchas simples pequenas, sugerindo a ação tardia da nanopartícula sobre o DNA. Entretanto, não houve diferença significativa entre as séries tratadas e o grupo controle negativo nos indivíduos heterozigotos balanceados. A comparação dos dados entre as duas progênes demonstrou que, de uma forma geral, os eventos mutacionais foram predominantes, variando de 46 a 72% do efeito genotóxico total, sem demonstrar relação dose efeito.

**Tabela 6.** Avaliação dos efeitos mutagênicos e/ou recombinogênicos do CeO<sub>2</sub>-NP em células somáticas de larvas obtidas do cruzamento ST

Genótipos e Compostos (mg/mL)	N. de ind (N)	Manchas por indivíduo (nº de manchas) diagnóstico estatístico <sup>a</sup>				Manchas com clone mwh (n)	Frequência de formação de clones por 10 <sup>5</sup> cél. (n/NC)	Recombinação <sup>d</sup> (%)
		Manchas simples pequenas (1-2 cél.) <sup>b</sup> m = 2	Manchas simples grandes (> 2 cél.) <sup>b</sup> m = 5	Manchas gêmeas m = 5	Total de manchas m = 2			
<b>CeO<sub>2</sub>-NP</b>								
<i>mwh/flr<sup>3</sup></i>								
Contr. Neg.	60	0,65 (39)	0,05 (03)	0,02 (01)	0,72 (43)	42	1,43	
0.64	60	1,22 (73) +	0,02 (01) -	0,02 (01) -	1,25 (75) +	75	2,56	53
1.6	60	0,87 (52) -	0,10 (06) i	0,05 (03) i	1,02 (61) +	60	2,05	28
4	60	1,00 (60) +	0,10 (06) i	0,03 (02) i	1,13 (68) +	68	2,32	41
10	60	0,83 (50) -	0,15 (09) i	0,03 (02) i	1,02 (61) +	61	2,08	54
<i>mwh/TM3</i>								
Contr. Neg.	60	0,55 (33)	0,02 (01)		0,57 (34)	34	1,16	
0.64	60	0,55 (33) -	0,03 (02) i		0,58 (35) -	35	1,20	
1.6	60	0,63 (38) -	0,08 (05) i		0,72 (43) -	43	1,47	
4	60	0,58 (35) -	0,08 (05) i	c	0,67 (40) -	40	1,37	
10	60	0,45 (27) -	0,02 (01) i		0,47 (28) -	28	0,96	

<sup>a</sup>Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação. Nível de significância  $\alpha=0,05$ .

<sup>b</sup>Incluindo manchas simples *flr<sup>3</sup>* raras.

<sup>c</sup>Somente manchas *mwh* podem ser observadas em indivíduos *mwh/TM3*, uma vez que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr<sup>3</sup>*.

<sup>d</sup>Porcentagem de recombinação calculada de acordo com a fórmula  $R = 1 - [(n/NC \text{ em indivíduos } mwh/TM3) / (n/NC \text{ em indivíduos } mwh/flr^3)] * 100$ . C = nº de células contabilizadas por indivíduo (48.800).

## 5. DISCUSSÃO

Nanotecnologia é um campo de pesquisa em rápida expansão que já produziu uma variedade de produtos disponíveis comercialmente, incluindo cosméticos, bronzeadores, tintas, vestimentas resistentes a manchas e aparelhos eletrônicos (KAHRU e DUBOUGUIER, 2010). Além disso, devido a suas extraordinárias propriedades fisicoquímicas, as nanopartículas têm emergido como uma nova opção em metodologias para o tratamento de câncer, na bioengenharia e na terapia gênica (FIRME III e BANDARU, 2010). A crescente produção e aplicação de nanomateriais engenheirados, embora excitantes do ponto de vista econômico, têm provocado ampla discussão em relação aos efeitos adversos e imprevistos destes materiais sobre o meio ambiente e à saúde humana.

Uma vez que existe uma estreita ligação entre alterações no DNA e câncer, as nanopartículas que são potentes causadoras de danos no material genético podem ser consideradas mais propensas em promover o processo carcinogênico (KARLSSON et al., 2008). Assim, diferentes ensaios de genotoxicidade, tanto em sistemas *in vitro* quanto *in vivo*, têm sido realizados a fim de assegurar a biossegurança dos novos produtos da nanotecnologia. No entanto, os testes empregados com maior frequência nessas análises permitem a detecção de mutações pontuais e aberrações cromossômicas (LANDSIEDEL et al., 2009), havendo ainda uma escassez de informações referentes à avaliação do potencial recombinogênico das NPs, um importante fator que pode estar associado ao desenvolvimento de câncer.

Este trabalho é um dos primeiros a investigar diferentes espécies de nanopartículas em relação à toxicidade potencial e capacidade para induzir alterações genéticas por meio do teste SMART. O teste SMART, desenvolvido por Graf e colaboradores (1984), é considerado um teste rápido, de baixo custo e de fácil execução, capaz de produzir resultados altamente reprodutíveis e confiáveis. A mosca da fruta, *Drosophila melanogaster*, utilizada como organismo experimental, é um modelo excelente para os estudos de toxicologia e genotoxicologia, pois apresenta um ciclo de vida curto, um pequeno número de cromossomos ( $2n = 8$ ) e linhagens geneticamente bem caracterizadas. Além disso, a *D. melanogaster* apresenta genes com cerca de 80% de homologia aos genes humanos e o sistema enzimático relacionado ao citocromo P450 semelhante ao dos mamíferos, permitindo o metabolismo de agentes xenobióticos. Além de todas essas vantagens, o teste SMART tem como trunfo a

capacidade de detectar danos genéticos gerados tanto por mutação gênica ou cromossômica, quanto por recombinação mitótica.

### **Nanotubos de carbono**

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que concentrações de até 1 mg/mL de NTC, NT, CS e MW não comprometem o desenvolvimento de larvas de *D. melanogaster* e, portanto, não são tóxicas. Resultados similares de baixo risco de toxicidade têm sido reportados na literatura, corroborando com os resultados aqui apresentados (LEEuw et al., 2007; LIU et al., 2009).

Leeuw e colaboradores (2007) demonstraram que a ingestão de SWCNT dispersos em meio de cultura (9 µg/g) pelas larvas de *D. melanogaster* leva a uma captação sistêmica e a uma distribuição distinta em vários tecidos e órgãos internos - incluindo o vaso dorsal, a glândula salivar, os túbulos de Malpighi, os lobos cerebrais, os discos imaginais, a traquéia e os tecidos gordurosos - sem provocar efeitos adversos sobre o desenvolvimento larval e fertilidade das moscas adultas. Os autores estimaram que a quantidade de nanotubos incorporados nestes tecidos representa apenas uma pequena fração ( $10^{-8}$ ) de nanotubos ingeridos que atravessam a parede do intestino, a maioria é excretado.

Liu e colaboradores (2009) mostraram, por sua vez, que os efeitos dos nanotubos em *D. melanogaster* pode depender, principalmente, da rota de exposição. Nenhum efeito foi detectado sobre os estágios de desenvolvimento de larvas de *Drosophila* alimentadas com diferentes concentrações de SWCNT e de MWCNT (100 e 1000 µg/g de meio de cultura). No entanto, as mesmas NPs quando expostas a seco aderiram na superfície corporal das moscas adultas levando ao comprometimento do sistema locomotor e mortalidade.

Considerando essas evidências, sugerimos que a ausência de toxicidade observada neste estudo pode ser reflexo da via de exposição. Embora a quantidade de nanotubos ingeridos não tenha sido mensurada, massas pretas indicando a presença dos nanotubos no intestino das larvas tratadas podiam ser visualizadas em lupas estereoscópicas dentro de poucas horas de exposição, após o passar do tempo, podia-se observar uma clara redução desses pontos pretos (dados não mostrados), sugerindo que os nanotubos de fato são ingeridos, mas, possivelmente, grande parte deles é excretada, resultando em baixa

biodisponibilidade dos nanotubos nos tecidos das larvas. Apesar disso, sabe-se que efeitos nocivos podem surgir mesmo em baixas concentrações, sem necessariamente causar morte celular, portanto, devem ser avaliados. Um dos efeitos mais importantes é o dano ao DNA (KARLSSON, 2010).

Os resultados obtidos pelo teste SMART indicam que os nanotubos NTC, NT e CS não induzem alterações no DNA de células somáticas de *D. melanogaster* relacionadas com mutação e/ou recombinação. No entanto, o tratamento com 0,4 e 1 mg/mL de MW resultou em efeitos genotóxicos, principalmente via indução de recombinação somática que contribuiu com até 73% no total de eventos genotóxicos observados. Uma vez que foi feita a padronização das condições experimentais (concentrações, via e duração da exposição) para todos os NTC aqui avaliados, podemos inferir que as diferenças entre os resultados do MW e dos demais nanotubos se devem, sobretudo, às características partículas-específicas, tais como comprimento, estado de aglomeração e grau de pureza. É importante ressaltar que a estrutura tipo “paredes múltiplas”, por si só, parece não influenciar o potencial genotóxico dos nanotubos avaliados, considerando que o MW possui paredes múltiplas e gerou resposta positiva para toxicidade genética, enquanto que o NTC e o CS, também de paredes múltiplas, não foram genotóxicos.

Foi demonstrado previamente por meio do ensaio Cometa que os nanotubos MW, nas concentrações de 1,5625 a 12,5 µg/mL, não induzem quebras no DNA de células V79 (fibroblastos de pulmão de hamster chinês) após 24 horas de exposição. No entanto, um aumento significativo de danos oxidativos ao DNA foi detectado em todas as concentrações avaliadas pelo ensaio Cometa com a utilização das enzimas hOGG1 e Endo III. Além disso, o MW induziu um aumento significativo na frequência de células micronucleadas nas concentrações de 6,25 e 12,5 µg/mL (detectado pelo teste de Micronúcleo) após 48 horas de exposição, sugerindo que o MW atua como um agente clastogênico/aneugênico (FRANCHI, 2010).

Estudos sugerem que recombinação muito próxima ou muito longe do centrômero pode aumentar o risco de não-disjunção cromossômica (LAMB et al., 2005), e consequentemente, formação de células aneuplóides. Uma vez que a maioria dos eventos induzidos pelo MW em *D. melanogaster* foi de natureza recombinogênica, pode-se especular que existe um risco aumentado de ocorrência de não-disjunção cromossômica após a

exposição aos nanotubos MW. Inclusive, o aumento significativo de células V79 micronucleadas relatado no estudo realizado por Franchi (2010) reforça essa suposição.

O potencial genotóxico do CS também foi previamente avaliado em linhagem celular V79 por meio do teste de Micronúcleo. Após 24 horas de tratamento com 3,125 µg/mL de CS observou-se um aumento significativo na frequência de pontes nucleoplasmáticas – ligações contínuas entre os núcleos das células binucleadas indicativas da ocorrência de quebras e rearranjos cromossômicos. Curiosamente, nas concentrações mais elevadas (6,25 e 12,5 µg/mL) nenhum efeito foi detectado (FRANCHI, 2010). De forma semelhante, concentrações elevadas de CS também não produziram efeitos genotóxicos em *D. melanogaster*. Em relação aos nanotubos NTC e NT, este é o primeiro trabalho a abordar a genotoxicidade potencial dos mesmos. Por isso, não é possível fazer uma comparação direta de resultados.

Uma propriedade inerente de muitos nanomateriais é a sua hidrofobicidade, ou seja, uma tendência para se aglomerar em meio aquoso. Muller e colaboradores (2008) realizaram dois experimentos independentes para avaliar o potencial genotóxico de MWCNT em células epiteliais humanas (MCF-7) por meio do teste de Micronúcleo e, em um primeiro momento, foi observado um aumento significativo na frequência de células micronucleadas após 48 horas de exposição a concentrações de 10, 25 e 50 µg/mL de MWCNT. No entanto, no segundo experimento, somente a menor concentração de nanotubos (10 µg/mL) foi capaz de induzir aumento significativo na frequência de micronúcleos. Os autores sugerem que a ausência de efeito dose resposta pode estar relacionada à distribuição heterogênea de aglomerados de nanotubos no meio de cultura, o que afetaria a dose de material entregue às células alvo.

Mouchet e colaboradores (2008) observaram que elevadas concentrações de nanotubos de parede dupla (10, 100 e 500 mg/mL) não induzem aumento na frequência de eritrócitos micronucleados em larvas de *Xenopus laevis*. Segundo os autores, grandes aglomerados podem ser formados, especialmente em elevadas concentrações, o que dificulta a captação das partículas pelas células e afeta, conseqüentemente, a resposta celular.

Embora concentrações de 10, 60 e 100 µg/cm<sup>2</sup> de uma mistura de nanotubos contendo >50% de SWCNT tenham induzido um aumento na frequência de micronúcleos em células epiteliais pulmonares (BEAS-2B), não foi observado um efeito dose dependente. Os autores também discutem que o aumento do tamanho dos aglomerados em doses maiores pode

comprometer a captação pelas células e que, grandes aglomerados podem ter menor efeito sobre as células do que pequenos aglomerados (LINDBERG et al., 2009).

Considerando as evidências dispostas na literatura, podemos levantar as seguintes hipóteses para explicar os resultados negativos obtidos no teste SMART: (i) sob condições fisiológicas, os nanotubos NTC, NT e CS formam aglomerados maiores que os nanotubos MW, portanto, são internalizados menos eficientemente pelas células ou não são internalizados, (ii) caso sejam internalizados, os grandes aglomerados de NTC, NT e CS são menos reativos, pois a porcentagem de átomos na área superficial das partículas reduz com o aumento do tamanho dos aglomerados, (iii) os nanotubos NTC, NT e CS podem ter causado pequenas alterações no DNA, mas que não permaneceram após as divisões celulares (danos reparados), dessa forma, não podem ser detectadas pelo SMART, (iv) os nanotubos NTC, NT e CS não induzem alterações genéticas do tipo mutação e/ou recombinação devido as suas propriedades fisicoquímicas.

### **Nanopartículas de prata**

A exposição crônica de larvas de *D. melanogaster* à diferentes concentrações de nanopartículas de prata não resultou em toxicidade, como apontam os resultados obtidos pelo teste SMART, somente uma redução da pigmentação corporal foi observada em indivíduos expostos a 10 mg/mL de AgNP (dados não mostrados).

Gorth e colaboradores (2011) demonstraram que AgNP de 20-30 e 100 nm de tamanho em concentrações de até 100 ppm não comprometem a capacidade das larvas de *D. melanogaster* se desenvolverem em pupa e moscas adultas. Nós estendemos a concentração para 10 mg/mL de AgNP (10000 ppm) e obtivemos resultados semelhantes. Como discutido anteriormente, embora uma fração das nanopartículas ingeridas seja internalizada pelas células, provavelmente, a maioria é excretada, resultando em baixa biodisponibilidade de AgNP nos tecidos, o que poderia explicar a ausência de toxicidade crônica neste estudo.

Panacek e colaboradores (2011) conduziram testes de toxicidade aguda e crônica de AgNP em *D. melanogaster* utilizando AgNP na forma de dispersão sólida (microencapsulação em manitol). A concentração de 10 mg/mL não apresentou efeito tóxico agudo em nenhum dos estágios de desenvolvimento, nem prolongou o tempo de

desenvolvimento da *Drosophila*. Os números de larvas, pupas e moscas eclodidas foram comparáveis com aqueles obtidos nos grupos não tratados, corroborando os resultados obtidos no presente estudo. O efeito tóxico agudo só foi observado nas concentrações de 20-100 mg/mL. Já o ensaio de toxicidade crônica, avaliada por oito gerações de *Drosophila* (F1-F8), indica que a exposição às AgNP (5 mg/mL) não afeta o número de moscas eclodidas na geração F1, mas compromete a fertilidade das gerações F2 e F3. Curiosamente, a capacidade de reprodução foi restabelecida nas gerações subsequentes (F4-F8), sugerindo uma possível adaptação das moscas a exposição às AgNP. Em todas as situações, tanto na exposição crônica quanto na aguda, notou-se uma redução da pigmentação corporal de moscas adultas, assim como foi observado em nosso estudo.

Key e colaboradores (2011) demonstraram que o tratamento de moscas adultas com AgNP (~90 a 9000 ppm) não afeta a sua fertilidade (avaliada pela contagem de ovos postos). No entanto, quando as larvas F1 foram expostas às concentrações maiores que 1800 ppm de AgNP, somente uma pequena porcentagem (13-40%) progrediu para fase de pupa. Além disso, notou-se uma redução da longevidade das moscas sobreviventes, comprometimento da habilidade locomotora e pigmentação corporal reduzida. Os autores sugerem que a despigmentação corporal pode ser resultado da interferência direta das AgNP nos níveis de dopamina (envolvidos na via de melanização) e dos níveis elevados de estresse oxidativo. Posgai e colaboradores (2011) também verificaram uma redução significativa na pigmentação corporal de moscas adultas após o tratamento de larvas com 30 µg/mL de AgNP.

O potencial genotóxico de AgNP foi avaliado em alguns trabalhos e, na maioria deles, verificou-se a participação do estresse oxidativo na toxicidade genética induzida pelas AgNP (ASHARANI et al., 2009; KIM et al., 2011; PANDA et al., 2011). Em *D. melanogaster*, mais especificamente, observou-se que concentrações equivalentes a 50 e 100 µg/mL de AgNP induzem estresse oxidativo, aumento dos níveis da proteína p53 (marcador de danos ao DNA) e de proteínas envolvidas na via apoptótica. Os autores sugerem que o estresse oxidativo induzido pelas nanopartículas pode resultar em danos ao material genético e, por fim, em apoptose (AHAMED et al., 2010).

Embora as AgNP possam causar danos ao DNA indiretamente, via estresse oxidativo, interação direta AgNP-DNA também pode ocorrer. Neste estudo, observou-se que 10 mg/mL de AgNP (<100 nm) gera alterações genéticas em células de *D. melanogaster*, principalmente via indução de recombinação somática. Demir e colaboradores (2010) apresentaram

resultados semelhantes por meio do teste SMART - concentrações de 1-10 mM de AgNP (<60 nm) promoveram genotoxicidade, sendo que a recombinação mitótica foi o mecanismo preponderante – o que apóia nossos resultados.

Estudo anterior avaliou o potencial genotóxico do mesmo tipo de AgNP analisado no presente trabalho. Utilizando o ensaio *Allium cepa* os autores demonstraram que o aumento das concentrações de AgNP (50, 75 e 100 ppm) promovem uma redução significativa do índice mitótico (MI). Além disso, as nanopartículas causaram distúrbios na metáfase, viscosidade cromossômica (indicando degradação ou despolimerização de DNA), induziram a formação de pontes de cromatina, quebras cromossômicas e, em 100 ppm, causaram a desintegração completa da parede celular (KUMARI et al., 2009). Juntos, os resultados corroboram a capacidade das AgNP de afetar a estabilidade e a integridade genética

AshaRani e colaboradores (2009) sugerem que a deposição de AgNP nas mitocôndrias pode comprometer a cadeia transportadora de elétrons, resultando na produção de EROs e baixa síntese de ATP. Como o ATP é requerido por uma cascata de eventos que envolvem a fosforilação de proteínas reparadoras de DNA danificado, presume-se que a redução no conteúdo de ATP pode comprometer o reparo dos danos genéticos gerados pela exposição às nanopartículas.

Partindo desse pressuposto, acredita-se que a quantidade de AgNP que penetrou nas células dos discos imaginiais das asas após o tratamento com concentrações inferiores a 10 mg/mL não foi suficiente para afetar o funcionamento normal das mitocôndrias, causar estresse oxidativo e/ou causar danos no DNA. A pigmentação corporal não foi reduzida nesses indivíduos, o que reforça a idéia de que não houve indução significativa de estresse oxidativo. Caso pequenas alterações genéticas tenham ocorrido, a maquinaria celular foi eficiente em repará-las. Contrariamente, na concentração de 10 mg/mL a despigmentação das moscas adultas foi evidente, sugerindo níveis elevados de estresse oxidativo que, por sua vez, pode estar associado ao mau funcionamento mitocondrial. As alterações no DNA induzidas pelas AgNP não puderam ser reparadas e foram expressas na forma de pêlos mutantes sobre as asas da *D. melanogaster*.

## Nanopartículas de Dióxido de Cério

Assim como os nanotubos de carbono (NTC, NT, CS e MW) e as nanopartículas de prata (AgNP), o tratamento das larvas de *D. melanogaster* com CeO<sub>2</sub>-NP (0,64-10 mg/mL) não comprometeu o desenvolvimento para o estágio adulto, indicando ausência de toxicidade. Possivelmente, este resultado também é reflexo da pequena quantidade de nanopartículas incorporadas aos tecidos das larvas após a ingestão. No entanto, entre todas as nanopartículas analisadas, a nanocéria foi a mais eficiente em causar alterações genéticas do tipo mutação e recombinação mitótica. Mesmo na menor concentração, observou-se um aumento significativo de manchas mutantes quando comparado com o grupo controle negativo.

Comparando os dados entre as duas progênies, *mwh/flr*<sup>3</sup> e *mwh/TM3*, notou-se que a indução de recombinação mitótica variou de 28 a 54% do efeito genotóxico total sem demonstrar relação dose efeito, o que significa que a indução dos eventos mutacionais variou de 46 a 72%, contribuindo mais significativamente para o efeito genotóxico da nanocéria. Levando em consideração que existe uma ingestão desigual de CeO<sub>2</sub>-NP dispersas no meio de cultura pelas larvas de *D. melanogaster*, podemos supor que a quantidade de nanopartículas que chega às células dos discos imaginais das asas também é desigual, o que poderia explicar a ausência de dose efeito.

Huang e colaboradores (2010) demonstraram que *D. melanogaster* adultas alimentadas com diferentes concentrações de sulfato cérico (4, 16, 64, 256, 1024 mg/mL) correspondentes as concentrações de 1,65, 6,91, 26,3, 104 e 429 µg/g de cério no meio de cultura apresentaram redução da expectativa de vida, bem como redução da fertilidade, especialmente nas concentrações maiores que 6,91 µg/g. Adicionalmente, foi relatado um aumento dos níveis de MDA e redução das atividades dos antioxidantes superóxido desmutase e catalase, sugerindo que a exposição ao cério pode resultar em toxicidade oxidativa. Trabalhos *in vitro* mostraram resultados semelhantes em relação a capacidade das nanopartículas de CeO<sub>2</sub> de induzir danos celulares via estresse oxidativo (LIN et al., 2006; PARK et al., 2008).

Poucos trabalhos sobre o potencial genotóxico das nanopartículas de CeO<sub>2</sub> estão disponíveis na literatura, o que dificulta a comparação dos resultados. Demonstrou-se que 1 µg/mL de CeO<sub>2</sub>-NP de diferentes tamanhos (15 e 30 nm) induzem quebras no DNA do crustáceo de água doce *Daphnia magna* e da larva do mosquito aquático *Chironomus riparius* (LEE et al., 2009). Pierscionek e colaboradores (2011) sugerem que tempo de exposição pode

ter um efeito maior que a concentração sobre o potencial genotóxico da nanocéria, pois os resultados obtidos pelo ensaio Cometa demonstraram que concentrações de 20 e 100 µg/mL de CeO<sub>2</sub>-NP induziram um aumento no número de quebras no DNA de células epiteliais do cristalino humano somente após 72 horas de exposição, mas não em 48 horas.

A capacidade do cério de alternar entre os estados de oxidação Ce<sup>+4</sup> e Ce<sup>+3</sup>, aumenta o potencial das nanopartículas de CeO<sub>2</sub> de converter os produtos metabólicos do oxigênio molecular, como o peróxido de hidrogênio, em radicais hidroxil segundo a reação tipo Fenton:  $Ce^{+3} + H_2O_2 + H^+ \rightarrow Ce^{+4} + OH\cdot + H_2O$  (HECKERT et al., 2008). Os radicais hidroxil altamente reativos podem, por sua vez, induzir danos no DNA do tipo quebras uni ou bifilamentar, formação de adutos e ligações cruzadas (SINGH et al., 2009).

Considerando que no teste SMART somente dois *loci* gênicos podem expressar mutações pontuais (FRANCHI et al., 2009), é possível inferir que a mutagenicidade relatada está, provavelmente, mais relacionada com as aberrações cromossômicas. O aumento da produção de radicais hidroxil pelas CeO<sub>2</sub>-NP poderia induzir múltiplas quebras nas fitas de DNA, resultando na perda de fragmentos cromossômicos contendo um dos marcadores selvagens, *mwh*<sup>+</sup> ou *flr*<sup>3+</sup>, o que explicaria, pelo menos em parte, a elevada frequência de manchas mutantes simples oriundas por eventos mutacionais após o tratamento das larvas de *D. melanogaster* com a nanocéria.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi proposta deste trabalho a investigação do potencial tóxico e genotóxico de diferentes espécies de nanopartículas utilizando o sistema teste SMART que avaliou, simultaneamente, dois parâmetros genéticos estreitamente relacionados com o processo carcinogênico: a mutação e a recombinação. Demonstrou-se que:

- I) nenhuma das nanopartículas nas concentrações utilizadas foram tóxicas a *Drosophila melanogaster*, possivelmente devido a baixa biodisponibilidade dos materiais nos tecidos e órgãos internos da mosca da fruta após a ingestão;
- II) os nanotubos de carbono NTC, NT e CS não induziram efeito genotóxico – do tipo mutação pontual, aberrações cromossômicas ou recombinação mitótica – em *Drosophila melanogaster* após o tratamento das larvas com 0,064, 0,16, 0,4 e 1 mg/mL de nanopartículas;
- III) as duas maiores concentrações do nanotubo MW (0,4 e 1 mg/mL) foram capazes de induzir alterações genéticas, principalmente por recombinação mitótica;
- IV) somente a concentração mais elevada de AgNP (10 mg/mL) promoveu alterações no DNA. A contribuição da recombinação no total de eventos genotóxicos induzidos foi de 61%;
- V) CeO<sub>2</sub>-NP são capazes de produzir efeitos genotóxicos em todas as concentrações testadas (0,64 – 10 mg/mL). De uma forma geral, os eventos mutacionais foram predominantes, variando de 46 a 72% do efeito genotóxico total, sem demonstrar relação dose efeito.

Apesar das nanopartículas serem semelhantes em relação ao tamanho em nanoescala e grande área superficial, isso não significa que são similares em relação a outras propriedades importantes. A constituição química, forma, carga superficial, funcionalização, estado de aglomeração e grau de pureza, tornam cada nanopartícula única e, provavelmente, com efeitos biológicos únicos, o que justifica as pesquisas na área de nanotoxicologia.

Foi demonstrado que nanopartículas constituídas de carbono, prata e dióxido de cério apresentam potenciais genotóxicos distintos em um sistema biológico *in vivo*. Este trabalho, enquanto pesquisa básica, espera contribuir como alicerce para outras descobertas que ofereçam formas para minimizar os efeitos indesejáveis das nanopartículas e tornar o uso mais seguro.

## 7. REFERÊNCIAS

- AHAMED, M., POSGAI, R., GOREY, T.J., NIELSEN, M., HUSSAIN, S.M., ROWE, J.J. Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in *Drosophila melanogaster*. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.242, p.263–269 (2010).
- AMIN, K.A., HASSAN, M.S., AWAD, E.S.T., HASHEM, K.S. The protective effects of cerium oxide nanoparticles against hepatic oxidative damage induced by monocrotaline. **International Journal of Nanomedicine**, v.06, p.143–149 (2011).
- ANDRADE, H.H.R. e LEHMANN, M. Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. In RIBEIRO, L. R., SALVADORI, D. M. F., MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**, Canoas: Editora ULBRA, Edição Única, p.281-307 (2003).
- ANDRADE, H.H.R.; REGULY, M.L.; LEHMANN, M. *Drosophila* Cytogenetics Protocols. Edited by: D. S. Henderson. **Methods in Molecular Biology**, v.247, p.389-409 (2004).
- ANDRADE, J.L. **Síntese, caracterização e modificação de nanopartículas de prata com 5-fluorouracil sob a influência do pH**. Dissertação (Mestrado) Núcleo de Pós-Graduação em Física. São Cristóvão: Universidade Federal de Sergipe, 2008.
- ANDREWS R.; JACQUES, D.; RAO, A.M.; DERBYSHIRE, F.; QIAN, D.; FAN, X.; DICKEY, E.C.; CHEN, J. Continuous production of aligned carbon nanotubes: a step closer to commercial realization. **Chemical Physics Letters**, v.303, p.467–474 (1999).
- ASAKURA, M.; SASAKI, T.; SUGIYAMA, T.; TAKAYA, M.; KODA, S.; NAGANO, K.; ARITO, H.; FUKUSHIMA, S. Genotoxicity and cytotoxicity of multi-wall carbon nanotubes in cultured chinese hamster lung cells in comparison with chrysotile A fibers. **Journal of Occupational Health**, v.52, p.155-166 (2010).
- ASATI, A.; SANTRA, S.; KAITTANIS, C.; PEREZ, J.M. Surface-charge-dependent cell localization and cytotoxicity of cerium oxide nanoparticles. **ACS Nano**, v.04, n.09, p.5321–5331 (2010).
- ASHARANI, P.V.; MUM, G.L.K.; HANDE, M.P.; VALIYAVEETIL, S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. **ACS Nano**, v.03, n.02, p.279-290 (2009).
- BAUGHMAN, R.H.; ZAKHIDOV, A.A.; DE HEER, W.A. Review: carbon nanotubes - the route toward applications. **Science**, v.297, p.787-792 (2002).
- BBC NEWS: Nanotech promise for global poor. Notícias, 2005. Disponível em: <<http://news.bbc.co.uk/2/hi/science/nature/4421867.sts>> [Acessado 26/09/2011].
- BISHOP, A.J.R. e SCHIESTL, R.H. Homologous recombination as a mechanism of carcinogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1471, p.109-121 (2001).
- BIZARI, L.; SILVA, A.E.; TAJARA, E.H. Gene amplification in carcinogenesis. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, n.01, p.1-7 (2006).

BRASIL. MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA. Relatório analítico. Programa de C,T&I para Nanotecnologia. Brasília, DF [2009?]. Disponível em: <<http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/27107.html>> [Acessado 15/09/2011].

CARLSON, C.; HUSSAIN, S.M.; SCHRAND, A.M.; BRAYDICH-STOLLE, L.K.; HESS, K.L.; JONES, R.L., SCHLAGER, J.J. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size dependent generation of reactive oxygen species. **Journal of Physical Chemistry B**, v.112, n.43, p.13608–13619 (2008).

CHAGAS JÚNIOR, C.A. **Oxidação parcial do propano com catalisadores óxidos de vanádio e cério**. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação de Engenharia. Rio de Janeiro: UFRJ, 2008.

CHEN, J.P.; PATIL, S.; SEAL, S.; MCGINNIS, J.F. Rare earth nanoparticles prevent retinal degeneration induced by intracellular peroxides. **Nature Nanotechnology** (2006).

CHEN, X. e SCHLUESENER, H. J. Nanosilver: a nanoproduct in medical application. **Toxicology Letters**, n.176, p.1-12 (2008).

CHOI, Y.K.; GOTOH, Y.; SUGIMOTO, K.; SONG, S.M.; YANAGISAWA, T.; ENDO, M. Processing and characterization of epoxy nanocomposites reinforced by cup-stacked carbon nanotubes. **Polymer**, v.46, p.11489–11498 (2005).

CROUZIER, D.; FOLLOT, S.; GENTILHOMME, E.; FLAHAUT, E.; ARNAUD, R.; DABOUI, V.; CASTELLARIN, C.; DEBOUZY, J.C. Carbon nanotubes induce inflammation but decrease the production of reactive oxygen species in lung. **Toxicology**, v.272, p.39–45 (2010).

CVETICANIN, J.; JOKSIC, G.; LESKOVAC, A.; PETROVIC, S.; SOBOT, A.V.; NESKOVIC, O. Using carbon nanotubes to induce micronuclei and double strand breaks of the DNA in human cells. **Nanotechnology**, v.21, p.1-7 (2010).

DAI, D.; FENG, J.; ZHANG, H.; LI, R. Preparation of nano-silver powder with self-similar structure. **Materials China** (2009).

DE FLORIO, D.Z.; FONSECA, F.C.; MUCCILLO, E.N.S.; MUCCILLO, R. Ceramic materials for fuel cells. **Cerâmica**, v.50, p.275-290 (2004).

DEMIR, E.; VALES, G.; KAYA, B.; CREUS, A.; MARCOS, R. Genotoxic analysis of silver nanoparticles in *Drosophila*. **Nanotoxicology**, Early Online, 1–8 (2010).

DI SOTTO, A.; CHIARETTI, M.; CARRU, G.A.; BELLUCCI, S.; MAZZANTI, G. Multi-walled carbon nanotubes: lack of mutagenic activity in the bacterial reverse mutation assay. **Toxicology Letters**, v.184, p.192–197 (2009).

DiRIENZO, M. New applications for silver. **The LBMA Precious Metals Conference**, Montreux (2006).

DOAK, S.H.; GRIFFITHS, S.M.; MANSIHAN, B.; SINGH, N.; WILLIAMS, P.M.; BROWN, A.P.; JENKINS, G.J.S. Review: confounding experimental considerations in Nanogenotoxicology. **Mutagenesis**, v.24, n.4, p.285–293 (2009).

DOMINGUES, S.; PEREIRA, T.J.; FLORENTINO, A.O.; CAVALHEIRO, A.A.; SAEKI, M.J. Structural study of  $Ti_x(Sm_{0.2}Ce_{0.8})_{1-x}O_{2-\delta}$  ceramic by the Rietveld method. **Cerâmica**, v.53, p.205-211 (2007).

DONALDSON, K.; STONE, V.; TRAN, L.; KREYLING, W.; BORM, P. Nanotoxicology. **Occupational and Environmental Medicine**, v.61, p.727-728 (2004).

ELECHIGUERRA, J.L.; BURT, J.L.; MORONES, J.R.; CAMACHO-BRAGADO, A.; GAO, X.; LARA, H.H.; YACAMAN, M.J. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. **Journal of Nanobiotechnology**, v.3, n.6 (2005).

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. State of the science literature review: everything nanosilver and more. Scientific, Technical, Research, Engineering and Modeling Support Final Report (2010).

FARIA, M.H.G. e RABENHORST, S.H.B. Impact of the C-MYC oncogene on cancer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.52, n.02, p.165-171 (2006).

FERNANDES, V. **Ferromagnetismo robusto em filmes fotoeletrodepositados de  $CeO_2$  e  $CeO_2$  dopados com Co sobre Si (001)**. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Engenharia (PIPE). Curitiba: UFPR, 2007.

FERREIRA, H.S e RANGEL, M.C. Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. **Química Nova**, v.32, n.07, p.1860-1870 (2009).

FIRME III, C.P. e BANDARU, P.R. Toxicity issues in the application of carbon nanotubes to biological systems. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.6, p.245–256 (2010).

FOLDBJERG, R.; DANG, D.A.; AUTRUP, H. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. **Archives of Toxicology**, v.85, p.743–750 (2011).

FOLKMANN, J.K.; RISOM, L.; JACOBSEN, N.R.; WALLIN, H.; LOFT, S.; MØLLER P. Oxidatively damaged DNA in rats exposed by oral gavage to  $C_{60}$  fullerenes and single-walled carbon nanotubes. **Environmental Health Perspectives**, v.117, p.703-708 (2009).

FRANCHI, L.P. **Citotoxicidade e genotoxicidade de nanotubos de carbono purificados e não purificados, sintetizados por deposição química de vapor, em linhagem de fibroblastos de pulmão de hamster Chinês (V79)**. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto: USP, 2010.

FRANCHI, L.P.; PENTIADO, N.H.G.R.; SILVA, R.N.; GUIMARÃES, N.N.; JESUINO, R.S.A.; ANDRADE, H.H.R.; LEHMANN, M.; CUNHA, K.S. Mutagenic and recombinogenic effects of lamivudine and stavudine antiretrovirals in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, p. 578–582 (2009).

FREI, H. & WÜRGLER, F. E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assay indicate a positive, negative, or inconclusive result. **Mutation Research**, v.203, p.297-308 (1988).

FREI, H.; CLEMENTS, J.; HOWE, D.; WÜRGLER, F.E. The genotoxicity of the anti-cancer drug mitoxantrone in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v.279, p.21-33 (1992).

GORTH, D.J.; RAND, D.M.; WEBSTER, T.J. Silver nanoparticle toxicity in *Drosophila*: size does matter. **International Journal of Nanomedicine**, v.6, p.343–350 (2011).

GRAF, U.; WÜRGLER, F.E.; KATZ, A.J.; FREI, H.J.; JUON, H.; HALL, C.B.; KALE, P.G. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental Mutagenesis**, v.6, p.153-188 (1984).

GUO, T.; NIKOLAEV, P.; THESS, A.; COLBERT, D.T.; SMALLEY, R.E. Catalytic growth of single-walled nanotubes by laser vaporization. **Chemical Physics Letters**, v.243 p.49-54 (1995).

HECKERT, E.G.; SEAL, S.; SELF, W.T. Fenton-like reaction catalyzed by the rare earth inner transition metal cerium. **Environmental Science and Technology**, v.42, p.5014–5019 (2008).

HELLAND, A.; WICK, P.; KOEHLER, A.; SCHMID, K.; SOM, C. Reviewing the environmental and human health knowledge base of carbon nanotubes. **Environmental Health Perspectives**, v.115, p.1125–1131 (2007).

HERBST, M.H. Technology of carbon nanotubes: trends and perspectives of a multidisciplinary area. **Quimica Nova**, v.27, n.6, p.986-992 (2004).

HILL, F.A.; HAVEL, T.F.; HART, A.J.; LIVERMORE, C. Storing elastic energy in carbon nanotubes. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, v.19, p.01-05 (2009).

HIRST, S.M.; KARAKOTI, A.; SINGH, S.; SELF, W.; TYLER, R.; SEAL, S.; REILLY, C.M. Bio-distribution and *in vivo* antioxidant effects of cerium oxide nanoparticles in mice. **Environmental Toxicology** (2011).

HIRST, S.M.; KARAKOTI, A.S.; TYLER, R.D.; SRIRANGANATHAN, N.; SEAL, S.; REILLY, C.M. Anti-inflammatory properties of cerium oxide nanoparticles. **Small**, v.5, n.24, p.2848–2856 (2009).

HUANG, S.F.; LI, Z.Y.; WANG, X.Q.; WANG, Q.X.; HU, F.F. Cerium caused life span shortening and oxidative stress resistance in *Drosophila melanogaster*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.73, p.89–93 (2010).

HUSSAIN, M.A.; KABIR, M.A.; SOOD, A.K. On the cytotoxicity of carbon nanotubes. **Current Science**, v.96, n.5, p.664-673 (2009).

HUSSAIN, S.M.; HESS, K.L.; GEARHART, J.M.; GEISS, K.T.; SCHLAGER, J.J. *In vitro* toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. **Toxicology In Vitro**, v.19, p.975– 983 (2005).

IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, v.354, p.56-58 (1991).

JACOBSEN, N.R.; POJANA, G.; WHITE, P.; MØLLER, P.; COHN, C.A.; KORSHOLM, K.S.; VOGEL, U.; MARCOMINI, A.; LOFT, S.; WALLIN, H. Genotoxicity, cytotoxicity, and reactive oxygen species induced by single-walled carbon nanotubes and C60 fullerenes in the FE1-Muta TM mouse lung epithelial cells. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.49, p.476-487 (2008).

JIANG, K.; SCHADLER, L.S.; SIEGEL, R.W.; ZHANG, X.; ZHANG, H.; TERRONES, M. Protein immobilization on carbon nanotubes via a two-step process of diimide-activated amidation. **Journal of Materials Chemistry**, v.14, p.37-39 (2004).

JOURNET, C. e BERNIER, P. Production of carbon nanotubes. **Applied Physics A**, v.67, p.1–9 (1998).

KAGAN, V.E.; TYURINA, Y.Y.; TYURIN, V.A.; KONDURU, N.V.; POTAPOVICH, A.I.; OSIPOV, A.N.; KISIN, E.R.; SCHWEGLER-BERRY, D.; MERCER, R.; CASTRANOVA, V.; SHVEDOVA, A.A. Direct and indirect effects of single walled carbon nanotubes on RAW 264.7 macrophages: role of iron. **Toxicology Letters**, v.165, p.88–100 (2006).

KAHRU, A. e DUBOURGUIER, H.C. Review: from ecotoxicology to nanoecotoxicology. **Toxicology**, v.269, p.105–119 (2010).

KAM, N.W.S. e DAI, H. Carbon nanotubes as intracellular protein transporters: generality and biological functionality. **Journal of the American Chemical Society**, v.127, p.6021-6026 (2005).

KAM, N.W.S.; JESSOP, T.C.; WENDER, P.A.; DAI, H. Nanotube molecular transporters: internalization of carbon nanotubes – protein conjugates into mammalian cells. **Journal of the American Chemical Society**, v.126, p.6850-6851 (2004).

KAM, N.W.S.; LIU, Z.; DAI, H. Carbon nanotubes as intracellular transporters for proteins and DNA: an investigation of the uptake mechanism and pathway. **Angewandte Chemie**, v.45, p.577-581 (2006).

KAM, N.W.S.; O'CONNELL, M.J.; WISDOM, J.A.; DAI, H. Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.102, p.11600-11605 (2005).

KARLSSON, H.L. The comet assay in nanotoxicology research. **Analytical and Bioanalytical Chemistry** (2010).

KARLSSON, H.L.; CRONHOLM, P.; GUSTAFSSON, J.; MÖLLER, L. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. **Chemical Research in Toxicology**, v.21, p.1726–1732 (2008).

KASTENBAUM, M.A. e BOWMAN, K.O. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. **Mutation Research**, v.9, p.527–549 (1970).

KEY, S.C.S.; REAVES, D.; TURNER, F.; BANG, J.J. Impacts of silver nanoparticle ingestion on pigmentation and developmental progression in *Drosophila*. **Atlas Journal of Biology**, v.1, n.3, p.52-61 (2011).

KHODAKOVSKAYA, M.; DERVISHI, E.; MAHMOOD, M.; XU, Y.; LI, Z.; WATANABE, F.; BIRIS, A.S. Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. **ACS Nano**, v.03, n.10, p.3221–3227 (2009).

KHODAKOVSKAYA, M.V.; de SILVA, K.; NEDOSEKIN, D.A.; DERVISHI, E.; BIRIS, A.S.; SHASHKOV, E.V.; GALANZHA, E.I.; ZHAROV, V.P. Complex genetic, photothermal, and photoacoustic analysis of nanoparticle-plant interactions. **Applied Physical Sciences**, v.108, n.03, p.1028-1033 (2011).

KIM, H.R.; KIM, M.J.; LEE, S.Y.; OH, S.M.; CHUNG, K.H. Genotoxic effects of silver nanoparticles stimulated by oxidative stress in human normal bronchial epithelial (BEAS-2B) cells. **Mutation Research**, v.726, p.129–135 (2011).

KIM, J.S.; LEE, K.; LEE, Y.H.; CHO, H.S.; KIM, K.H.; CHOI, K.H.; LEE, S.H.; SONG, K.S.; KANG, C.S.; YU, I.J. Aspect ratio has no effect on genotoxicity of multi-wall carbon nanotubes. **Archives of Toxicology**, v.85, p.775-786 (2010).

KIM, S.; CHOI, J.E.; CHOI, J.; CHUNG, K.H.; PARK, K.; YI, J.; RYU, D.Y. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. **Toxicology in Vitro**, v.23, p.1076-1084 (2009).

KISIN, E.R.; MURRAY, A.R.; KEANE, M.J.; SHI, X.C.; SCHWEGLER-BERRY, D.; GORELIK, O.; AREPALLI, S.; CASTRANOVA, V.; WALLACE, W.E.; KAGAN, V.E.; SHVEDOVA, A.A. Single-walled carbon nanotubes: geno- and cytotoxic effects in lung fibroblast V79 cells. **Journal of Toxicology and Environmental Health, A**, v.70, p.2071–2079 (2007).

KUMARI, M.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. **Science of the Total Environment**, v.407, p.5243–5246 (2009).

LADEIRA, L.O. Supercimento nacional: adição de nanotubos de carbono aumenta resistência e durabilidade do produto. Instituto Ciência Hoje. Notícias, 2009. Disponível em: <<http://cienciahoje.uol.com.br/noticias/nanociencia/supercimento-nacional>> [Acessado 17/08/2011].

LAMB, N.E.; SHERMAN, S.L.; HASSOLD, T.J. Effect of meiotic recombination on the production of aneuploid gametes in humans. **Cytogenetic and Genome Research**, v.111, p.250–255 (2005).

LANDSIEDEL, R.; KAPP, M.D.; SCHULZ, M.; WIENCH, K.; OESCH, F. Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material,

potential artifacts and limitations - Many questions, some answers. **Mutation Research**, v.681, p.241–258 (2009).

LEE, S.W.; KIM, S.M.; CHOI, J. Genotoxicity and ecotoxicity assays using the freshwater crustacean *Daphnia magna* and the larva of the aquatic midge *Chironomus riparius* to screen the ecological risks of nanoparticle exposure. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.28, p.86–91 (2009).

LEE, T.L.; RAITANO, J.M.; RENNERT, O.M.; CHAN, S.W.; CHAN, W.Y. Accessing the genomic effects of naked nanoceria in murine neuronal cells. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, p.1-10 (2011).

LEEuw, T.K.; REITH, R.M.; SIMONETTE, R.A.; HARDEN, M.E.; CHERUKURI, P.; TSYBOULSKI, D.A.; BECKINGHAM, K.M.; WEISMAN, R.B. Single-walled carbon nanotubes in the intact organism: near-IR imaging and biocompatibility studies in *Drosophila*. **Nano Letters**, v.7, p.2650-2654 (2007).

LI, P.W.; KUO, T.H.; CHANG, J.H.; YEH, J.M.; CHAN, W.H. Induction of cytotoxicity and apoptosis in mouse blastocysts by silver nanoparticles. **Toxicology Letters**, v.197, p.82–87 (2010).

LIMA, T.H. **Modificação do cimento ortopédico com nanopartículas de prata**. Dissertação (Mestrado) Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas. Belo Horizonte: UFMG, 2011.

LIN, W.; HUANG, Y.W.; ZHOU, X.D.; MA, Y. Toxicity of cerium oxide nanoparticles in human lung cancer cells. **The International Journal of Toxicology**, v.25, p.451-457 (2006).

LINDBERG, H.K.; FALCK, G.C.; SUHONEN, S.; VIPPOLA, M.; VANHALA, E.; CATALÁN, J.; SAVOLAINEN, K.; NORPPA, H. Genotoxicity of nanomaterials: DNA damage and micronuclei induced by carbon nanotubes and graphite nanofibres in human bronchial epithelial cells *in vitro*. **Toxicology Letters**, p.186, p.166–173 (2009).

LIU, X.; VINSON, D.; ABT, D.; HURT, R.H.; RAND, D.M. Differential toxicity of carbon nanomaterials in *Drosophila*: larval dietary uptake is benign, but adult exposure causes locomotor impairment and mortality. **Environmental Science & Technology**, v.43, p.6357–6363 (2009).

LONG, R.Q e YANG, R.T. Carbon nanotubes as a superior sorbent for nitrogen oxides. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.40, n.20, p.4288-4291 (2001).

LUBICK, N. Nanosilver toxicity: ions, nanoparticles-or both? **Environmental Science & Technology**, v.42, p.8617 (2008).

MANNA, S.K.; SARKAR, S.; BARR, J.; WISE, K.; BARRERA, E.V.; JEJELOWO, O.; RICE-FICHT, A.C.; RAMESH, G.T. Single-walled carbon nanotube induces oxidative stress and activates nuclear transcription factor- $\kappa$ B in human keratinocytes. **Nano Letters**, v.5, p.1676-1684 (2005).

MARCIANO, F.R. **Estudo de crescimentos de filmes de DLC com nanopartículas de prata para aplicações espaciais e biomédicas.** Dissertação (Mestrado) Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia Espaciais/Ciência e Tecnologia de Materiais e Sensores. São José dos Campos: Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, 2008.

MARTINS, T.S.; HEWER, T.L.R.; FREIRE, R.S. Cério: propriedades catalíticas, aplicações tecnológicas e ambientais. **Química Nova**, v.30, n.08, p.2001-2006 (2007).

MAST, D.; SHANOV, V.; SCHULZ, M. Nanoantenas de carbono superam antenas tradicionais em aplicações sem fio: Notícias, 2009. Disponível em: <<http://www.inovacaotecnologica.com.br>> [Acessado 27/09/2011].

MENEZES, V.M. **Nanotubos de carbono interagindo com vitaminas B3 e C: um estudo de primeiros princípios.** Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Física. Rio Grande do Sul: Universidade Federal de Santa Maria, 2008.

MIGLIORE, L.; SARACINO, D.; BONELLI, A.; COLOGNATO, R.; D'ERRICO, M.R.; MAGRINI, A.; BERGAMASCHI, A.; BERGAMASCHI, E. Carbon nanotubes induce oxidative DNA damage in RAW264.7 cells. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.51, p.294-303 (2010).

MINOTTI, G.; MENNA, P.; SALVATORELLI, E.; CAIRO, G.; GIANNI, L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacological Reviews**, v.56, n.2, p.185-229 (2004).

MOGENSEN, M.; SAMMES, N.M.; TOMPSETT, G.A. Physical, chemical and electrochemical properties of pure and doped ceria. **Solid State Ionics**, v.129, p.63-94 (2000).

MONTEIRO-RIVIERE, N.A.; NEMANICH, R.J.; INMAN, A.O.; WANG, Y.Y.; RIVIERE, J.E. Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes. **Toxicology Letters**, v.155, p.377-84 (2005).

MOUCHET, F.; LANDOIS, P.; SARREMEJEAN, E.; BERNARD, G.; PUECH, P.; PINELLI, E.; FLAHAUT, E.; GAUTHIER, L. Characterisation and *in vivo* ecotoxicity evaluation of double-wall carbon nanotubes in larvae of the amphibian *Xenopus laevis*. **Aquatic Toxicology**, v.87, p.127-137 (2008).

MU, Q.; BROUGHTON, D.L.; YAN, B. Endosomal leakage and nuclear translocation of multiwalled carbon nanotubes: developing a model for cell uptake. **Nano Letters**, v.9, n.12, p.4370-4375 (2009).

MUCCILLO, E.N.S.; PORFÍRIO, T.C.; TADOKORO, S.K.; REY, J.F.Q.; ROCHA, R.A.; STEIL, M.C.; MUCCILLO, R. Physical properties of cerium oxide prepared by solution technique and the electrical conductivity dependence on the oxygen partial pressure of sintered ceramics. **Cerâmica**, v.51, p.157-162 (2005).

MULLER, J.; DECORDER, I.; HOET, P.H.; LOMBAERT, N.; THOMASSEN, L.; HUAUX, F.; LISON, D.; KIRSCH-VOLDERS, M. Clastogenic and aneugenic effects of

multi-wall carbon nanotubes in epithelial cells. **Carcinogenesis**, v.29, n.02, p.427–433 (2008).

MURRAY, A.R.; KISIN, E.; LEONARD, S.S.; YOUNG, S.H.; KOMMINENI, C.; KAGAN, V.E.; CASTRANOVA, V.; SHVEDOVA, A.A. Oxidative stress and inflammatory response in dermal toxicity of single-walled carbon nanotubes. **Toxicology**, v.257, p.161–171 (2009).

NANOSAFE. Safe production and use of nanomaterials. Disponível em: <<http://www.nanosafe.org>> [Acessado 23/08/2010].

NANOTECNOLOGIA. **Instituto Inovação** (2005).

NANOWERK. Databases: Nanotechnology products. Disponível em: <<http://www.nanowerk.com/products/products.php>> [Acessado 26/09/2011].

NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE. Disponível em: <<http://www.nano.gov/nanotech-101>> [Acessado 26/09/2011].

NEL, A.; XIA, T.; MÄDLER, L.; LI, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science**, v.311, p.622-627 (2006).

NIU, J.; AZFER, A.; ROGERS, L.M.; WANG, X.; KOLATTUKUDY, P.E. Cardioprotective effects of cerium oxide nanoparticles in a transgenic murine model of cardiomyopathy. **Cardiovascular Research**, v.73, n.03, p.549–559 (2007).

OSORIO, A.G. **Funcionalização de nanotubos de carbono e sua utilização como reforço em matriz de hidroxiapatita**. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais. Porto Alegre: UFRS, 2008.

PANACEK, A.; PRUCEK, R.; SAFAROVA, D.; DITTRICH, M.; RICHTROVA, J.; BENICKOVA, K.; ZBORIL, R.; KVITEK, L. Acute and chronic toxicity effects of silver nanoparticles (NPs) on *Drosophila melanogaster*. **Environmental Science Technology**, v.45, p.4974–4979 (2011).

PANDA, K.K.; ACHARY, V.M.; KRISHNAVENI, R.; PADHI, B.K.; SARANGI, S.N.; SAHU, S.N.; PANDA, B.B. *In vitro* biosynthesis and genotoxicity bioassay of silver nanoparticles using plants. **Toxicology in Vitro**, v.25, p.1097–1105 (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).

PARK, E.J.; CHOI, J.; PARK, Y.K.; PARK, K. Oxidative stress induced by cerium oxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. **Toxicology**, v.245, p.90–100 (2008).

PARK, E.J.; YI, J.; KIM, Y.; CHOI, K.; PARK, K. Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. **Toxicology in Vitro**, v.24, p.872–878 (2010).

PARK, M.V.D.Z.; NEIGH, A.M.; VERMEULEN, J.P.; de la FONTEYNE, L.J.J.; VERHAREN, H.W.; BRIEDÉ, J.J.; van LOVEREN, H.; de JONG, W.H. The effect of

particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. **Biomaterials**, v.32, p.9810-9817 (2011).

PASCHOALINO, M.P.; MARCONE, G.P.S.; JARDIM, W.F. Nanomaterials and the environment. **Quimica Nova**, v.33, n.2, p.421-430 (2010).

PATIL, S.; SANDBERG, A.; HECKERT, E.; SELF, W.; SEAL, S. Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. **Biomaterials**, v.28, p.4600–4607 (2007).

PATLOLLA, A.; PATLOLLA, B.; TCHOUNWOU, P. Evaluation of cell viability, DNA damage, and cell death in normal human dermal fibroblast cells induced by functionalized multiwalled carbon nanotube. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.338, p.225–232 (2010).

PIAO, M.J.; KANG, K.A.; LEE, I.K.; KIM, H.S.; KIM, S.; CHOI, J.Y.; CHOI, J.; HYUN, J.W. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. **Toxicology Letters**, v.201, p.92–100 (2011).

PIERSCIONEK, B.K.; LI, Y.; YASSEEN, A.A.; COLHOUN, L.M.; SCHACHAR, R.A.; CHEN, W. Nanoceria have no genotoxic effect on human lens epithelial cells. **Nanotechnology**, v.21, p.1-8 (2010).

PIERSCIONEK, B.K.; LI, Y.; YASSEEN, A.A.; COLHOUN, L.M.; SCHACHAR, R.A.; CHEN, W. The effect of high concentration and exposure duration of nanoceria on human lens epithelial cells. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, p.1-8 (2011).

POSGAI, R.; AHAMED, M.; HUSSAIN, S.M.; ROWE, J.J.; NIELSEN, M.G. Inhalation method for delivery of nanoparticles to the *Drosophila* respiratory system for toxicity testing. **Science of the Total Environment**, v.408, p.439–443 (2009).

POSGAI, R.; CIPOLLA-McCULLOCH, C.B.; MURPHY, K.R.; HUSSAIN, S.M.; ROWE, J.J.; NIELSEN, M.G. Differential toxicity of silver and titanium dioxide nanoparticles on *Drosophila melanogaster* development, reproductive effort, and viability: size, coatings and antioxidants matter. **Chemosphere** (2011).

PROJECT ON EMERGING NANOTECHNOLOGIES. A database of silver nanotechnology in commercial products. Disponível em: <[http://www.nanotechproject.org/process/assets/files/7039/silver\\_database\\_fauss\\_sept2\\_final.pdf](http://www.nanotechproject.org/process/assets/files/7039/silver_database_fauss_sept2_final.pdf)> [Acessado 28/11/11b].

PROJECT ON EMERGING NANOTECHNOLOGIES. Nanotech-enabled consumer products continue to rise. Disponível em: <<http://www.nanotechproject.org/news/archive/9231/>> [Acessado 17/04/2011a].

RAMEL, C.; CEDERBERG, H.; MAGNUSSON, J.; VOGEL, E.; NATARAJAN, A.T.; MULLENDER, L.H.; NIVARD, J.M.; PARRY, J.M.; LEYSON, A.; COMENDADOR, M.A.; SIERRA, L.M.; FERREIRO, J.A.; CONSUEGRA, S. Somatic recombination, gene amplification and cancer. **Mutation Research**, v.353, p.85-107 (1996).

RAO, G.R. e MISHRA, B.G. Structural, redox and catalytic chemistry of ceria based materials. **Bulletin of the Catalysis Society of India**, v.02, p.122-134 (2003).

SARKAR, S.; SHARMA, C.; YOG, R.; PERIAKARUPPAN, A.; JEJELOWO, O.; THOMAS, R.; BARRERA, E.V.; RICE-FICHT, A.C.; WILSON, B.L.; RAMESH, G.T. Analysis of stress responsive genes induced by single-walled carbon nanotubes in BJ Foreskin cells. **Journal for Nanoscience and Nanotechnology**, v.7, p.584–592 (2007).

SHVEDOVA, A.A.; CASTRANOVA, V.; KISIN, E.R.; SCHWEGLER-BERRY, D.; MURRAY, A.R.; GANDELSMAN, V.Z.; MAYNARD, A.; BARON, P. Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v.66, p.1909–1926 (2003).

SHVEDOVA, A.A.; KISIN, E.; MURRAY, A.R.; JOHNSON, V.J.; GORELIK, O.; AREPALLI, S.; HUBBS, A.F.; MERCER, R.R.; KEOHAVONG, P.; SUSSMAN, N.; JIN, J.; YIN, J.; STONE, S.; CHEN, B.T.; DEYE, G.; MAYNARD, A.; CASTRANOVA, V.; BARON, P.A.; KAGAN, V.E. Inhalation vs. aspiration of single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagenesis. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v.295, p.L552–L565 (2008).

SINGH, N.; MANSHIAN, B.; JENKINS, G.J.; GRIFFITHS, S.M.; WILLIAMS, P.M.; MAFFEIS, T.G.; WRIGHT, C.J.; DOAK, S.H. NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. **Biomaterials**, v.30, p.3891–3914, (2009).

SINGH, S.; KUMAR, A.; KARAKOTI, A.; SEAL, S.; SELF, W.T. Unveiling the mechanism of uptake and sub-cellular distribution of cerium oxide nanoparticles. **Molecular BioSystems**, v.06, p.1813–1820 (2010).

TAMURA, K.; TAKASHI, N.; AKASAKA, T.; ROSKA, I.D.; UO, M.; TOTSUKA, Y.; WATARI, F. Effects of micro/nano particle size on cell function and morphology. **Key Engineering Materials**, v.254-6, p.919-922. (2004).

TIAN, F.; CUI, D.; SCHWARD, H.; ESTRADA, G.G.; KOBAYASHI, H. Cytotoxicity of single-wall carbon nanotubes on human fibroblasts. **Toxicology in Vitro**, v.20, p.1202–1212 (2006).

UMBUZEIRO, G.A.; COLUBI, V.R.; HONÓRIO, J.G.; GIRO, R.; MORALES, D.A.; LAGE, A.S.G.; MAZZEI, J.L.; FELZENSZWALB, I.; SOUZA FILHO, A.G.; STÉFANI, D.; ALVES, O.L. Understanding the interaction of multi-walled carbon nanotubes with mutagenic organic pollutants using computational modeling and biological experiments. **Trends in Analytical Chemistry**, v.30, n.03, p.437-446 (2011).

WELSHER, K.; SHERLOCK, S.P.; DAI, H. Deep-tissue anatomical imaging of mice using carbon nanotube fluorophores in the second near-infrared window. **Applied Physical Sciences**. Ed.01, p.1-6 (2011).

XIA, T.; KOVOCHICH, M.; BRANT, J.; HOTZE, M.; SEMPFF, J.; OBERLEY, T.; SIOUTAS, C.; YEH, J.I.; WIESNER, M.R.; NEL, A.E. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. **Nano Letters**, v.06, p.1794–1807 (2006).

YANG, H.; YANG, H.; LIU, C.; YANG, D.; ZHANG, H.; XI, Z. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. **Journal of Applied Toxicology**, v.29, p.69–78 (2009).

ZHU, L.; CHANG, D.W.; DAI, L.; HONG, Y. DNA damage induced by multiwalled carbon nanotubes in mouse embryonic stem cells. **Nano Letters**, v.7, p.3592-3597 (2007).