



UNICAMP

Jaqueline Gonçalves Honorio

Modulação da genotoxicidade do 1-Nitropireno por nanotubos de carbono de paredes múltiplas

Limeira

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE TECNOLOGIA - FT

Jaqueline Gonçalves Honorio **

Modulação da genotoxicidade do 1-Nitropireno por nanotubos de carbono de paredes múltiplas

Orientador: Dr^a Gisela de Aragão Umbuzeiro

Co-orientador: Dr. Vitor Rafael Coluci

Dissertação apresentada a Faculdade de Tecnologia da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Tecnologia.

Área de Concentração: Tecnologia e Inovação

Limeira

2012

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação/Tese defendida por Jaqueline Gonçalves Honorio e aprovada através da Comissão Julgadora. Data: 27/06/12 Orientador: G. Aragão.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SILVANA MOREIRA DA SILVA SOARES –
CRB-8/3965
BIBLIOTECA UNIFICADA FT/CTL
UNICAMP

Honorio, Jaqueline Gonçalves, 1988-
H759m Modulação da genotoxicidade do 1-Nitropireno por
nanotubos de carbono de paredes múltiplas / Jaqueline
Gonçalves Honorio. – Limeira, SP : [s.n.],
2012.

Orientador: Gisela de Aragão Umbuzeiro.
Coorientador: Vitor Rafael Coluci.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Tecnologia.

1. Nanotubos de carbono de paredes múltiplas.
2. Testes de mutagenicidade. I. Umbuzeiro, Gisela de
Aragão. II. Coluci, Vitor Rafael. III. Universidade Estadual
de Campinas. Faculdade de Tecnologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Genotoxicity modulation of 1-Nitropyrene by multiwalled carbon
nanotubes

Palavras-chave em inglês (Keywords):

1- Multiwalled carbon nanotubes

2- Mutagenicity testing

Área de concentração: Tecnologia e Inovação

Titulação: Mestre em Tecnologia

Banca examinadora: Silvia Regina Batistuzzo de Medeiros, Diego Stefani Teodoro
Martinez, Gisela de Aragão Umbuzeiro

Data da Defesa: 27-04-2012

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia

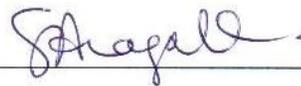
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM TECNOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: TECNOLOGIA E INOVAÇÃO

Modulação da genotoxicidade do 1-Nitropireno por nanotubos de carbono de paredes múltiplas

Autor: Jaqueline Gonçalves Honório

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Dissertação:

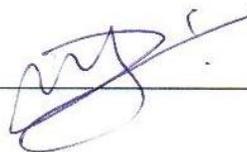
Prof. Dr. Gisela de Aragão Umbuzeiro
Presidente
FT/UNICAMP



Prof. Dr. Silvia Regina Batistuzzo de Medeiros
UFRN



Dr. Diego Stefani Teodoro Martinez
IQ/UNICAMP



Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com ajuda direta ou indireta de várias pessoas as quais presto minha homenagem:

Aos órgãos de apoio FAPESP, CNPq, INOMAT, FAEPEX.

Aos orientadores Prof^a Dr^a Gisela de Aragão Umbuzeiro e Prof. Dr. Vitor Rafael Coluci pelos conselhos.

À equipe do LEAL (Laboratório de Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental Prof^o Dr. Abílio Lopes) e principalmente ao aluno Daniel Alexandre Morales pela ajuda na realização dos ensaios.

À equipe do LQES (Laboratório de Química do Estado Sólido) pelas instruções dadas e fornecimento das amostras de nanotubos de carbono.

À minha família.

A Deus.

Resumo

Nanomateriais, tais como nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) têm apresentado potencial para remediação de águas e solos poluídos por compostos orgânicos devido a sua área superficial elevada, que pode melhorar a capacidade dos NTC em adsorver compostos orgânicos. Embora o tratamento de MWCNT com ácido nítrico possa aumentar a capacidade de dispersão do material em água através da introdução de grupos oxigenados sobre a superfície dos NTC, como ácidos carboxílicos, a diminuição da capacidade de MWCNT de interagir com moléculas orgânicas pode ocorrer como consequência não intencional. Para investigar esta possibilidade, foi avaliada a capacidade de MWCNT tratados com ácido de adsorver um poluente ambiental comum, 1-Nitropireno (1-NP), que é um nitro-hidrocarboneto policíclico aromático altamente mutagênico e carcinogênico. Diferentes doses de MWCNTs caracterizados foram testadas com diferentes doses de 1-NP, e a detecção do 1-NP não adsorvido foi avaliada pelo ensaio de mutagenicidade *Salmonella*/microsoma, usando a linhagem TA98 que é altamente sensível a 1-NP. Assim, apenas 1-NP não adsorvido aos MWCNT são absorvidos pelas bactérias e causam mutagenicidade. Encontramos uma relação inversa entre a oxidação por tratamento ácido dos MWCNT e a mutagenicidade da mistura. Os dados obtidos sugerem que o tratamento ácido de MWCNT pode, de fato, reduzir a capacidade de poluentes orgânicos se ligarem a MWCNT, reduzindo a eficácia na remediação.

Palavras Chave: Nanotubos de carbono de paredes múltiplas; 1-Nitropireno, modulação da mutagenicidade, remediação.

Abstract

Nanomaterials, such as multi-wall carbon nanotubes (MWCNT) have been shown potential to remediate soil or water polluted with organic compounds because of their high specific-surface area, which can enhance the ability of the CNT to adsorb organics. Although treatment of MWCNT with nitric acid can increase the water solubility of MWCNT by introducing oxygenated groups such as carboxylic acids onto the surface, it may have the unintended consequence of decreasing the ability of MWCNT to interact with organic molecules. To investigate this possibility, we evaluated the ability of acid-treated MWCNT to absorb a common environmental pollutant, 1- nitropyrene (1-NP), which is a highly mutagenic and carcinogenic nitro-polycyclic aromatic hydrocarbon. Different doses of well-characterized MWCNTs were tested with different doses of 1-NP, and the detection of the non-adsorbed 1-NP was assessed by the *Salmonella* mutagenicity assay in strain TA98, which is highly sensitive to 1-NP. Thus, only free 1-NP not bound to the MWCNT was able to enter the bacteria and induce mutagenesis. We found an inverse association between the amount of oxidation by nitric-acid treatment of the MWCNT and the amount of mutagenicity of the reaction mixture. Our data suggest that acid treatment of MWCNT may, in fact, reduce the ability of MWCNT to bind organic pollutants, reducing their effectiveness for remediation.

Key Words:, Multi-walled carbon Nanotubes, 1-Nitropyrene, Mutagenicity Modulation, Remediation.

Lista de Ilustrações

Figura 1 - Sítios de adsorção em NTC	20
Figura 2 - Estrutura química do 1-Nitropireno.....	24
Figura 3 - À direita: Refluxo ácido de NTC. À esquerda: lavagem e filtração da amostra	25
Figura 4 - Fluxograma do procedimento de teste de Ames.....	29
Figura 5 - Taxas de mutagenicidade do 1-NP na ausência e presença de 10, 50 e 100 µg de NTC-LQES.....	34
Figura 6 - Células bacterianas (Salmonella TA98) exposta a NTC-LQES encubadas com 1-NP (microscopia eletrônica de transmissão).	35
Figura 7 - Adsorção de 1-Nitropireno em nanotubos de carbono	35
Figura 8 - Número de colônias revertentes em relação a proporção em massa NTC- LQES/1-NP.....	36
Figura 9 - Influência do tempo de ultrassonicação na dispersão dos NTC1h, NTC12h e NTC24h.....	39
Figura 10 - Porcentagem de inibição da mutagenicidade do 1-NP por NTC1h, NTC12h e NTC24h.....	40
Figura 11 - Número de revertentes em relação a proporção em massa NTC/1-NP para as amostras NTC1h, NTC12h e NTC24h.....	43

Lista de Quadros

Quadro 1 - Ausência de mutagenicidade de nanotubos de carbono de paredes múltiplas em Teste de Ames.....	18
Quadro 2 – Tratamentos e destinação dos resíduos.	31
Quadro 3 - Potências mutagenicas do 1-NP na presença de NTC1h, NTC12h e NTC24h e comparação estatística entre as amostras.....	41

Lista de Tabelas

Tabela 1- Propriedades físico-químicas da amostra de nanotubos de carbono NTC-LQES	32
Tabela 2 - Número de colônias revertentes de 1-NP em ausência e presença de 10 µg de NTC-LQES.....	33
Tabela 3 - Influência do período de contato entre 1-NP e NTC-LQES na mutagenicidade de 1-nitropireno	37
Tabela 4 – Propriedades físico-químicas das amostras NTC1h , NTC12h e NTC24h ...	38
Tabela 5 - Expressões das curvas de calibração das amostras NTC1h, NTC12h e NTC24h	39

Lista de Abreviaturas e Siglas

DP: Desvio padrão

HPA: hidrocarboneto policíclico aromático

LEAL: Laboratório de Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental Prof^o Dr. Abílio Lopes.

LQES: Laboratório de Química do Estado Sólido.

MWCNTs: Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (do inglês *multi-walled carbon nanotubes*)

Nitro-HPA: composto que possui um ou mais grupamentos nitro (NO₂) ligado a um hidrocarboneto policíclico aromático.

1-NP: 1-Nitropireno.

NTC : Nanotubos de carbono.

NTC-LQES: amostra de nanotubos de carbono fornecida pelo laboratório LQES.

NTC1h: amostra de nanotubos de carbono submetida a tratamento ácido por 1 hora.

NTC12h: amostra de nanotubos de carbono submetida a tratamento ácido por 12 horas.

NTC24h: amostra de nanotubos de carbono submetida a tratamento ácido por 24 horas.

TM: Taxa de mutagenicidade (número de colônias revertentes induzidas e espontâneas/revertentes espontâneas).

SUMÁRIO

1	Introdução	13
1.1	Poluente estudado: 1-Nitropireno	15
1.2	Nanotubos de Carbono	16
1.2.1	Genotoxicidade de Nanotubos de Carbono de Parede Múltipla	17
1.2.2	Adsorção de compostos orgânicos em nanotubos de carbono	20
2	Objetivos	23
3	Métodos	24
3.1	Amostras	24
3.1.1	1-Nitropireno	24
3.1.2	Preparo da amostra de nanotubos de carbono NTC-LQES	24
3.1.3	Preparo das amostras NTC1h, NTC12h e NTC24h	25
3.2	Caracterização das amostras NTC-LQES, NTC1h, NTC12h e NTC24h	26
3.3	Determinação do tempo de ultrassonicação das amostras NTC1h, NTC12h e NTC24h	27
3.3.1	Curvas de calibração	27
3.3.2	Curvas comparativas	28
3.4	Testes de mutagenicidade	28
3.4.1	Procedimento para amostra NTC-LQES	28
3.4.2	Procedimento para amostras NTC1h, NTC12h e NTC24h	29
3.5	Tratamento e destinação dos resíduos	30
4	Resultados	32
4.1	Modulação da genotoxicidade do 1-Nitropireno por nanotubos de carbono NTC-LQES	32
4.1.1	Características da amostra NTC-LQES	32
4.1.2	Modulação da genotoxicidade de 1-NP pela amostra NTC-LQES	33
4.2	Influência do tratamento ácido dos NTC na capacidade de modulação da genotoxicidade do 1-Nitropireno	37
4.2.1	Características das amostras NTC1h, NTC12h e NTC24h	37
4.2.2	Análises espectrofotométricas	38

4.2.3 Comparação da capacidade de modulação da genotoxicidade do 1-NP entre as amostras NTC1h, NTC12h e NTC24h.....	40
5 Conclusões	44
Produções Bibliográficas.....	45
Referências	46
Apêndice	54
Apêndice 1 – Dados brutos: Testes iniciais com a amostra NTC-LQES.....	54
Apêndice 2 – Dados brutos: Variação da concentração de NTC-LQES	55
Apêndice 3 – Dados brutos: Variação do período de pré-incubação.....	56
Apêndice 4 – Dados brutos: Testes iniciais de comparação entre as amostras NTC1h e NTC12h	57
Apêndice 5 – Dados brutos: Comparação das amostras NTC1h, NTC12h, NTC24h.....	59
Apêndice 6 – Resultados estatísticos.....	71
Anexo	74
Anexo 1 – Ausência de mutagenicidade da amostra NTC-LQES.....	74

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, os nanomateriais vêm sendo designados como materiais que possuem ao menos uma dimensão na faixa de tamanho nanométrica (1nm a 100nm) abaixo do tamanho crítico capaz de alterar alguma de suas propriedades óticas, elétricas, magnéticas, de transporte, catalíticas etc (ZARBIN, 2007).

Estes materiais são princípios ativos de mais de 1300 produtos registrados até 2010, (PROJECT ON EMERGING NANOTECHNOLOGIES, 2010) apontando o desenvolvimento da nanotecnologia como uma nova revolução tecnológica, que ultrapassa os limites dos laboratórios e movimentada cadeias produtivas inteiras. Os investimentos superam 2 bilhões de dólares por ano, estabelecendo-se assim como uma área estratégica para economias consolidadas e emergentes (ZANETTI-RAMOS e CRECZYNSKI-PASA, 2008; CORONATO, 2009)

Dentre os nanomateriais mais estudados, estão os nanotubos de carbono (NTC ou CNT do inglês *carbon nanotubes*), os quais foram primeiramente observados por microscopia de transmissão por Sumio Iijima (IIJIMA, 1991). São tubos formados por folhas de grafeno, dividindo-se principalmente em dois tipos: nanotubos de parede simples (SWCNTs do inglês *single-walled carbon nanotubes*) e de paredes múltiplas (MWCNTs do inglês *multi-walled carbon nanotubes*), sendo este formado por uma série de 2 a 30 tubos concêntricos (TANAKA, YAMABE e FUKUI, 1999).

A produção anual de NTC já alcançou centenas de toneladas por ano (SMAJDA et al, 2010) e no Brasil, uma parceria entre a Petrobras e Universidade Federal de Minas Gerais anunciou a implantação de uma fábrica em Minas Gerais chamada CTNanotubos (SANTOS, 2010). Este destaque é gerado pelas intrigantes propriedades físico-químicas destes materiais que são tão resistentes mecanicamente como o diamante, flexíveis sobre seu eixo, e condutores de eletricidade (ROYAL SOCIETY AND ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING, 2004) além de possuírem alto potencial como adsorventes de compostos metálicos e orgânicos (DIAZ-FLORES et al, 2007).

Os NTC apresentam diversas aplicações em eletrônica e na indústria de materiais além de biotecnologias voltadas para saúde, agricultura e meio ambiente (MARTINEZ, 2011). Segundo o banco de patentes americano *Uspto.gov*, até maio de 2012, há mais de 8300

processos de pedidos de patente com o verbete *carbon nanotubes* no título. Segundo o *European Patent Office* que busca patentes em 90 países, o número ultrapassa 10 mil. Infelizmente no Brasil, segundo o INPI – Instituto Nacional da Propriedade Industrial, foram encontrados apenas 27 processos com a expressão “nanotubos de carbono” no título, sendo 15 deles relacionados a fabricação, purificação e funcionalização de NTC, 3 deles para aplicações médicas, 6 para incorporações em outros materiais ou compósitos, 1 em desenvolvimento de produtos eletrônicos e apenas 2 para tratamento de efluentes ou desenvolvimento de sensores.

As propriedades físico-químicas dos NTC permitem inúmeras aplicações, mas deve-se considerar que propriedades singulares introduzem um grau adicional de complexidade, impedindo de tratá-los como compostos químicos comuns (DOAK et al, 2009). Logo surge a necessidade de observar e avaliar precocemente aspectos voltado a segurança e usá-los para identificar e gerenciar efetivamente o potencial de impacto da exposição à nanomateriais sobre a saúde e o meio ambiente (BAUN et al, 2008).

Devido ao alto crescimento da produção (SMAJDA et al, 2010), pode-se esperar que a população em geral e também o meio ambiente (solo, vegetação, água, sedimento e ar) serão expostos a quantidades variáveis de NTC nos próximos anos. Uma vez no ambiente, o NTC pode interagir com outros compostos, mudando a sua toxicidade de acordo com a composição química e biodisponibilidade (CORNELISSEN et al, 2005; FERGUSON et al, 2008; PÉREZ, FARRÉ e BARCELÓ, 2008)

Por outro lado, os NTC têm sido investigados para aplicações em problemas ambientais como materiais de remediação, foto-catalizadores, biossensores (LIU et al, 2008; LIANG e GUO, 2009) e adsorventes. Dessa forma, as investigações no sentido da compreensão das interações de NTC com poluentes são importantes não somente para a avaliação de risco ambiental, mas também para elucidação dos mecanismos de interação que podem ser utilizados para conceber novas aplicações ambientais.

Neste sentido, a adsorção de compostos orgânicos em NTC têm sido estudada a fim de entender seu comportamento no ambiente e avaliar o potencial de uso desses materiais como adsorventes (REN et al, 2011). Quando comparados a outros adsorventes como carvão ativado (REN et al, 2011) e sílica (LU, SU e HU, 2008) os NTC mostram superioridade e potencial de uso para a retirada de diferentes compostos em tratamentos de efluentes líquidos e gasosos (QU et al, 2008).

Os NTC apresentam alta capacidade de adsorção de hidrocarbonetos policíclicos acromáticos (HPAs) (KUENSENG et al, 2010) que, assim como seus derivados nitro-HPAs, possuem alta mutagenicidade e dispersão no meio ambiente (MUCK et al, 2002). Dessa forma, torna-se relevante o estudo das interações NTC-poluentes com representantes destas classes de compostos.

Dentre os nitro-HPA, o 1-Nitropireno (1-NP) é um dos mais abundantes no ambiente, e é conhecidamente mutagênico e carcinogênico (UMBUZEIRO et al, 2008) . Neste contexto, o presente trabalho avaliou a capacidade de modulação da genotoxicidade do 1-NP por diferentes amostras de NTC a fim de investigar as interações entre o poluente e o nanomaterial.

1.1 Poluente estudado: 1-Nitropireno

O 1-NP é o composto mais abundante no ambiente pertencente à classe dos nitro-HPAs, que possuem pelo menos um grupo nitro (-NO₂) ligado à cadeia aromática de um HPA. São formados direta ou indiretamente da combustão incompleta de combustíveis fósseis e matéria orgânica (UMBUZEIRO et al , 2008; MONGE et al, 2010) e são frequentemente encontrados no ambiente urbano e industrial, em fumaça de cigarro, água superficial e de chuva e efluentes (MUCK et al, 2002).

A formação dos nitro-HPAs ocorre por um processo de nitratação aromática que está associado ao aumento da genotoxicidade dos produtos quando comparado aos seus HPAs precursores (BENNEFOY, CHIRON e BOTTA, 2011). A metabolização de nitro-HPAs quando incubados *in vitro* com microsomas de mamíferos ou administrados aos animais é principalmente via C-oxidação com produção de fenóis e dihidrodiols sendo alguns destes metabólitos também mutagênicos através da nitroredução (CONSOLO, ANDERS e HOWARD,1988).

Como vários nitro-HPAs, o 1-NP é capaz de se ligar a proteínas e DNA (KING et al,1983) e é considerado um potente mutágeno, com resultados positivos para diversas linhagens de *Salmonella* em teste de Ames como: TA98, YG1041 (UMBUZEIRO et al, 2008), NM2000, NM2009, TA1535 (HATANAKA et al, 2001), causando preferencialmente

mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura (*frameshift*) (MERMELSTEIN et al, 1981).

A metabolização do 1-NP é dependente das nitroreduases e vários de seus metabólitos fenólicos e dihidrodiolicos possuem mutagenicidade. O metabólito 1-Nitropireno-3-ol conserva a mutagenicidade de seu precursor, enquanto outros, como 1-Nitropireno-6-ol, 1-Nitropireno-8-ol e 1,8-Dinitropireno, são em média 100 vezes menos mutagênicos (CONSOLO, ANDERS e HOWARD, 1988).

Os nitropirenos são também conhecidos pela sua carcinogenicidade. Tokiwa, Nakagawa e Ohnishi (1981) compilaram vários resultados que indicavam a formação de tumores mamários em ratos e de pulmão em camundongos. Howard et al (1995) demonstraram a capacidade do 1-NP de atravessar a placenta e tecidos mamários.

Quando exposto ao ambiente, o 1-NP é estável pelo menos por 28 dias a temperatura ambiente em ausência de luz. Entretanto, quando exposto a luz natural há perda do grupo nitro com formação de hidroxipireno e possivelmente de di-hidroxipireno e pirenodiona, sendo estes produtos menos mutagênicos para a linhagem TA98 em presença e ausência de ativação metabólica (BENSON et al, 1985). Em água superficial e água do mar, a microflora tem um papel importante na degradação do 1-NP sendo que, em condições estéreis, o composto pode permanecer estável por mais de 1500 dias (TAHARA et al, 1995).

Como apresentado, a alta mutagenicidade, importante ocorrência ambiental e características químicas favoráveis a adsorção do 1-NP a NTC (presença do grupamento nitro de hidrofobicidade) justificam a investigação desse composto no presente trabalho.

1.2 Nanotubos de Carbono

Nesta seção são apresentados alguns aspectos dos NTC relevantes para o desenvolvimento deste estudo como sua genotoxicidade de MWCNTs e a interação com poluentes orgânicos.

1.2.1 Genotoxicidade de Nanotubos de Carbono de Parede Múltipla

Vários métodos têm sido empregados na avaliação da genotoxicidade de nanomaterias como Teste de micronúcleo, Cometa, aberração cromossômica e *Salmonella*/microsoma (teste de Ames) (LANDSIEDEL et al, 2009). Empregando-se os três primeiros métodos na avaliação dos efeitos da exposição de células eucarióticas a NTC de paredes múltiplas, obtém-se resultados variados que são dependentes do tipo de células. Enquanto Ponti et al (2012) não observaram genotoxicidade para fibroblastos de camundongo expostos a NTC brutos e funcionalizados (-NH₂, -COOH) e Ema et al (2012) também obtiveram resultados negativos em fibroblatos de pulmão de hamster chinês e em eritrócitos de camugongos, várias alterações foram observadas por outros autores como: o aumento dose-dependente de micronúcleos em pneumócitos (*in vivo*) e células epiteliais (*in vitro*) de ratos (MULLER et al, 2008); presença de mutagenicidade em células tronco de embriões de rato (ZHU et al, 2007) e genotoxicidade em células dérmicas humanas (fibroblastos) (PATTOLA, KNIGHTEN e TCHOUNWOU, 2010).

Entretanto, obtém-se constantemente respostas negativas em teste de Ames que utiliza procaríotos como *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*. Os estudos encontrados (Quadro 1) indicam a ausência de mutagenicidade em Teste de Ames para MWCNT de diferentes características e submetidos a diferentes tratamentos. A causa sugerida por Landsiedel et al (2009) e Singh et al (2009) para essa ausência de mutagenicidade seria uma possível incapacidade da bactéria de assimilar esse material, impossibilitando o contato entre MWCNT e o DNA da bactéria.

No Quadro 1, pode-se também observar a ausência de citotoxicidade de MWCNT. Estes dados corroboram com Arias e Yang (2009) que não observaram efeito citotóxico de MWCNTs com diferentes grupos de superfície (-OH, -COOH, - NH₂) a *Salmonella typhimurium*.

Quadro 1 - Ausência de mutagenicidade de nanotubos de carbono de paredes múltiplas em Teste de Ames

Referência	DI SOTTO et al (2008)	SZENDI e VARGA (2008)	WIRNITZER et al (2009)	KIM et al (2010)	EMA et al (2012)	EMA et al (2012)
Método de síntese do NTC	CVD ¹	Dado não apresentado	Dado não apresentado	Dado não apresentado	Dado não apresentado	Dado não apresentado
Funcionalização	Não	Não	Não	Sim, oxidação em tratamento ácido	Não	Não
Tratamento da amostra	Não	Concentrado de urina de rato que receberam uma dose única de MWCNTs (50µg/KG)	A solução foi ultrasonificada por 5 min	Tratamento ácido com ácido nítrico e ácido sulfúrico. A solução-estoque foi ultrasonificada (3min 37 Hz)	Não	Não
Solvente	DMSO ²	DMSO ² (eluente)	Água ultra pura	Solução DPPC ³	Suspensão aquosa com carboximetilcelulose de sódio	Suspensão aquosa com carboximetilcelulose de sódio
Caracterização	Dimensões 110–170nm×5–9 µm Dureza 99,9% Densidade 1,35 g/cm ³ , Área superficial 1,3×10 ² m ² /g.	Dimensões 10-30nm ×1-2µm Pureza 95-98% do volume	Pureza 95% Aglomerados de 100 a 1000 µm quando dispersos em meio de cultura.	Diâmetro 10–15 nm Comprimento ≈10µm Pureza 99% em C	Diâmetro 44 nm Área superficial 69 m ² /g. Metais: Ca: 176 ppm, Al: 80 ppm, Cd: 16 ppm, Fe: 53 ppm, Li: 0.5 ppm.	Diâmetro 70 nm Área superficial 23 m ² /g. Metais : Fe: 3600 ppm, Cr: 14 ppm, Bi: 6 ppm, Ni: 4 ppm
Linhagens bacterianas	TA98, TA100 e <i>E. coli</i> WP2uvrA	TA98 e TA100	TA1535, TA100, TA1537, TA98 e TA102	TA98, TA100, TA1535, TA1537 e <i>E. coli</i> WP2uvrA	TA98, TA100, TA1535, TA1357 e <i>E. coli</i> WP2uvrA	TA98, TA100, TA1535, TA1357 e <i>E. coli</i> WP2uvrA

Ativação metabólica	Presença e ausência de S9	Presença e ausência das enzimas β -glucorosidade e sulfatase	Presença e ausência de S9	Presença e ausência de S9	Presença e ausência de S9	Presença e ausência de S9
Método (Teste de Ames)	Pre-incubação	Incorporação em placas	Pré-incubação e incorporação em placas	Incorporação em placas	OECD (1997)	OECD (1997)
Resultados	Negativo para todas as linhagens	Negativo para todas as linhagens	Negativo para todas as linhagens	Negativo para todas as linhagens	Negativo para todas as linhagens	Negativo para todas as linhagens
Citotoxicidade (ensaio de citotoxicidade ou avaliação do background)	ausência	ausência	ausência	ausência	ausência	ausência

(1)CVD Deposição química por vapor

(2)DMSO Dimetilsulfóxido

(3)DPPC solução de tampão fosfato (livre de Ca^{+2} e Mg^{+2}), D-glicose, albumina e 1,2-dipalmitato-sn-glicero-3-fosfocolina

1.2.2 Adsorção de compostos orgânicos em nanotubos de carbono

Os NTC têm apresentado imensa capacidade e alta eficiência de adsorção para vários contaminantes orgânicos como atrazina (SHI et al, 2010), fenantreno (YANG et al, 2006), fenóis (DIAZ-FLORES et al, 2007; YANG et al, 2008), e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (KUENSENG et al, 2010).

Em princípio, há quatro possíveis sítios de adsorção em aglomerados de NTC (Figura 1) : o interior dos nanotubos (1); os espaços intersticiais, que são aqueles entre um nanotubo e outro no interior do aglomerado (2); os vincos formados entre os nanotubos da camada externa do aglomerado (3) e a face externa dos nanotubos da camada externa do aglomerado (4) (REN et al, 2011). Para os MWCNT, ainda há mais um possível sítio de adsorção que consiste nos espaços existentes entre as camadas de grafeno (YANG e XING, 2010).

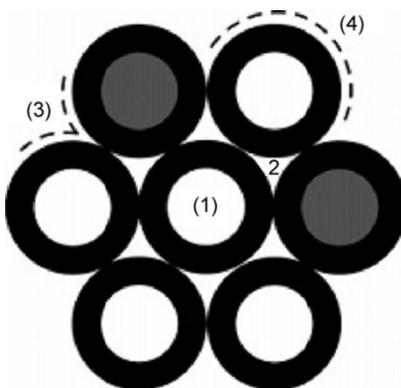


Figura 1 - Sítios de adsorção em NTC

Fonte: REN et al, 2011

Entretanto, Agnihotri et al (2005) sugerem que não há adsorção nos espaços intersticiais dos aglomerados e que os espaços entre as camadas de grafeno (0,335 nm) só podem abrigar moléculas pequenas (H_2 , N_2 , metais) não estando disponível para as moléculas orgânicas em geral.

Os NTC naturalmente se apresentam aglomerados devido à ocorrência das forças de van der Waals entre os tubos. Esses feixes possuem baixa dispersabilidade em qualquer tipo de solvente, de modo que é necessário desfazer estes aglomerados para dispersar os NTC em

meio líquido e retirar as impurezas originadas no processo de síntese. Para isso são utilizados tratamentos térmicos e/ou tratamentos químicos (SHEN et al, 2009; MARTINEZ, 2011).

Os tratamentos químicos mais comumente utilizados são os tratamentos ácidos utilizando ácidos fortes como o ácido nítrico, clorídrico e /ou sulfúrico. Esses ácidos não somente retiram as impurezas da face externa e do interior dos NTC como também modificam as paredes pela quebra seletiva da ligação C=C introduzindo grupos oxigenados como carboxila. (FIRME e BANDARU, 2010). Estes grupos ligam-se covalentemente com os carbonos do NTC (SOUZA FILHO e FAGAN, 2007).

Consequentemente, estes tratamentos modificam várias propriedades dos nanotubos de carbono como dispersão em soluções aquosas, área superficial disponível e a carga superficial dos NTC (CHO et al, 2008), influenciando assim a capacidade de adsorção de vários compostos. Em soluções aquosas, o aumento de grupos oxigenados na superfície de NTC pode prejudicar a adsorção não covalente dos poluentes orgânicos devido a competição com a água. Por outro lado, os grupos oxigenados podem favorecer a adsorção de outros grupos químicos, se esses puderem formar ligações covalentes com os grupos oxigenados (YANG e XING, 2010).

Vários autores observaram estes efeitos ao analisarem a capacidade de adsorção com amostras de nanotubos com diferentes quantidades de grupos oxigenados, como aumento da adsorção de cobre que é atraído por esses grupos e diminuição da adsorção de compostos hidrofóbicos como fenol (DIAZ-FLORES et al, 2007), naftaleno (CHO et al, 2008) e corantes diretos aniônicos, neste caso pela repulsão de cargas (KUO, HSIN e WU, 2008).

Além do grau de oxidação, as interações de adsorção entre NTC e poluentes orgânicos são afetadas por outras propriedades dos NTC (tamanho, tipo, área superficial, morfologia), pelas características dos poluentes (hidrofobicidade, polarizabilidade eletrônica, polaridade, tamanho e grupos funcionais) (REN et al, 2011) e pelas condições ambientais (pH (YANG et al, 2008), temperatura (WU, 2007), presença de matéria orgânica (ZHANG et al, 2010).

Yang e Xing (2010) reportam que cinco possíveis interações têm sido observadas como responsáveis pela adsorção de poluentes orgânicos em NTC: efeito da hidrofobicidade, pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas, covalentes, e ligações π - π . Esta última têm sido usada para explicar a adsorção de diversos compostos aromáticos, como diferentes corantes (LIU et al, 2008).

Chen et al (2007) observaram que a afinidade de adsorção de moléculas orgânicas (benzeno, tolueno, chlorobenzeno, 1,2-diclorobenzeno, 1,2,4- triclorobenzeno, 1,2,4,5-tetraclorobenzeno, nitrobenzeno, 4-nitrotolueno, 2,4-dinitrotolueno e ciclohexano) a NTC correlaciona-se pouco à hidrofobicidade. Entretanto, a afinidade aumenta conforme a seguinte ordem: compostos alifáticos não polares, aromático não polares, nitroaromáticos. Os mesmos autores ainda demonstraram que para o grupo dos nitroaromáticos, a afinidade aumenta com o número de grupos funcionais nitro, sugerindo assim que a interação π - π elétron-doador-receptor entre as moléculas nitroaromáticas (eletro aceitadoras) e as folhas de grafeno altamente polarizáveis (eletro doadoras) é a mais forte interação de adsorção entre NTC e compostos nitroaromáticos.

Os grupos funcionais nitro interferem também em compostos orgânicos ionizáveis como demonstrado por Yang et al (2008). Utilizando uma série de fenóis e anilinas com diferentes grupos funcionais, os autores concluíram que a presença de grupos funcionais aumenta a afinidade de adsorção na seguinte ordem grupo metil < grupo cloro < grupo nitro.

Shen et al., (2009) avaliaram a adsorção de compostos nitroaromáticos por NTC brutos e oxidados e observaram que este processo é espontâneo, exotérmico, dependente do tamanho da molécula e prejudicado pela oxidação dos nanotubos. A estrutura dos grupos nitro e o número deles apresentaram-se como os principais fatores na capacidade e taxa de adsorção.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral:

Considerando a alta capacidade de interação compostos nitroaromáticos com NTC , o presente trabalho visou avaliar a influência da interação entre diferentes amostras MWCNTs oxidados na capacidade de adsorção do 1-NP e sua genotoxicidade.

Objetivos específicos:

Avaliar a modulação da genotoxicidade do 1-NP por NTC de parede múltipla por meio de Teste Salmonella/microsoma, os mecanismos de interação entre o nanomaterial e o poluente;

Avaliar a influência do grau de oxidação dos NTC na modulação da genotoxicidade do 1-NP, através da comparação de amostras submetidas a tratamento ácido com HNO_3 por diferentes períodos.

3 MÉTODOS

3.1 Amostras

3.1.1 1-Nitropireno

Neste estudo, utilizamos amostra de 1-nitropireno 99,5% de pureza adquirido da empresa Sigma-Aldrich Co. A Figura 2 apresenta a estrutura química do composto.

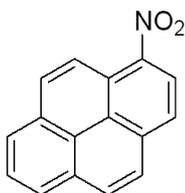


Figura 2 - Estrutura química do 1-Nitropireno

3.1.2 Preparo da amostra de nanotubos de carbono NTC-LQES

Os NTC brutos foram produzidos por deposição química de vapor pela empresa coreana CNT Co. Ltda., os NTC são do tipo de camadas múltiplas, com diâmetro de 10-40 nm e comprimento de 1-25 μm . A partir destes NTC, o Laboratório de Química do Estado Sólido (LQES-IQ-UNICAMP) produziu a amostra NTC-LQES que foi preparada submetendo os nanotubos a refluxo ácido e agitação constante com 7M HNO_3 por 24 horas a 140°C e em seguida tratamento semelhante com 5M HCl por 6 horas a 120°C . Ao fim dos tratamentos ácidos, a amostra foi lavada com água deionizada em sistema de filtração a vácuo (membrana Milipore 0.2 μm) até pH neutro e seca em linha de vácuo por 24 horas.

3.1.3 Preparo das amostras NTC1h, NTC12h e NTC24h

A partir de NTC brutos do mesmo lote que deu origem a amostra NTC-LQES, produzimos três novas amostras: NTC1h, NTC12h e NTC24h.

Na produção dos NTC1h, os NTC foram submetidos a tratamento ácido com 9 M HNO_3 em refluxo ácido a 150 °C e agitação por 1 hora (Figura 3). Ao fim desse tratamento, a amostra foi lavada com água deionizada em sistema de filtração a vácuo (membrana Milipore 0.2 μm) até pH 6, e seca em linha de vácuo. Para a produção da amostra NTC12h e NTC24h, os NTC foram submetidos aos mesmos tratamentos que a amostra NTC1h porém manteve-se o refluxo ácido por 12 e 24 horas, respectivamente.



Figura 3 - À direita: Refluxo ácido de NTC. À esquerda: lavagem e filtração da amostra

3.2 Caracterização das amostras NTC-LQES, NTC1h, NTC12h e NTC24h

As técnicas empregadas na determinação de características físico-químicas da amostra NTC-LQES foram:

- Estimativa da distribuição de tamanho: realizada por microscopia eletrônica de varredura com imagens obtidas em microscópio eletrônico da marca FEI NanoLab200 e microscopia eletrônica de transmissão com imagens adquiridas em microscópio da Carl Zeiss CEM-902 operando em 80 kV.
- Análise de área superficial dos NTC: a amostra no estado sólido foi analisada por método BET (isoterma de adsorção de nitrogênio) no equipamento da Quantachrome Instruments NOVA Win;
- Análise elementar qualitativa da amostra: determinada por espectroscopia de energia dispersiva utilizando o analisador acoplado ao microscópio eletrônico de varredura da marca JEOL 6360-VL;
- Análise de carga superficial [Potencial-Zeta]: suspensões da amostra NTC-LQES em água deionizada Milli-Q (10 µg/mL) foram analisadas no equipamento da Malvern Instruments nano-ZS.
- Defeitos estruturais (ID/IG): determinados por espectroscopia Raman confocal utilizando um laser de Nd-YAG (532 nm) com potência de excitação de 0,3 mW com espectros detectados por espectrômetro da marca WITECH TS-150, acoplado a um microscópio confocal.
- Temperatura de oxidação e pureza de carbono: determinados usando medidas termogravimétricas [equipamento SDTQ600 da TA] e o resíduo final metálico foi medido utilizando uma microbalança analítica [AD-6 Perkin-Elmer];
- Análise termogravimétrica: 3,5 mg de cada amostra foi adicionada em uma panela de platina e analisadas no equipamento SDTQ600 da TA Instruments. Condições da corrida: fluxo de ar sintético (100 mL/min.) com taxa de aquecimento de 5°C/min.

A área superficial, temperatura de oxidação e quantidade de defeitos de superfície foram determinadas pelos mesmos procedimentos descritos para a amostra NTC-LQES, durante a caracterização das amostras NTC1h, NTC12h e NTC24h.

3.3 Determinação do tempo de ultrassonicação das amostras NTC1h, NTC12h e NTC24h.

NTC possuem baixa capacidade de dispersão tanto em solventes polares quanto em apolares. Portanto, a utilização de processo de dispersão física como a ultrassonicação tem sido comumente empregada para melhorar a dispersão dos materiais em estudos toxicológicos e ambientais (MEAGAN, MAUTER e ELIMELECH, 2008; TAUROZZI, HACKLEYV e WIESNER, 2010).

Como as amostras NTC1h, NTC12h e NTC24h apresentam diferentes comportamentos em água, foram realizadas análises espectrofotométricas em soluções submetidas a diferentes tempos de ultrassonicação para encontrar o tempo de ultrassonicação mínimo para cada amostra e assim garantir que todas as amostras apresentassem boa dispersão nos testes de mutagenicidade. Foi estudada também a influência da presença da introdução de 0,99% (v/v) de DMSO na dispersão dos nanotubos em água ultra-pura.

3.3.1 Curvas de calibração

Para a realização das curvas de suspensões em água ultra-pura, preparou-se suspensões de NTC1h, NTC12h e NTC24h nas concentrações de 1, 10, 20, 25 e 30 mg.L⁻¹ e que foram submetidas a ultrassom por 30 minutos (42Khz± 6%) com variação máxima de temperatura de 3°C. Em seguida, realizaram-se leituras de absorbância em 530nm de comprimento de onda (MARSH et al, 2007) no espectrofotômetro GBC-Cintra06.

Foram realizadas também curvas de calibração de suspensões contendo 0,99 % em volume de DMSO, pois esta é a proporção deste solvente introduzida através da solução de 1-NP nos ensaios de mutagenicidade.

3.3.2 Curvas comparativas

Inicialmente preparou-se uma solução estoque de 50 mg.L^{-1} de NTC1h que foi ultrassonicada por um período total de 30 min. A cada 5 minutos de ultrassonicação, 3 aliquotas de 0,5 ml eram retiradas e vertidas em tubos de ensaio contendo 0,5 mL de água ultrapura e 10 μL de DMSO. Os tubos eram levemente agitados e permaneciam em repouso por 2 horas. Ao fim desse período, foram realizadas leituras em espectrofotômetro GBC-Cintra06 em $\lambda=530\text{nm}$. O mesmo procedimento foi repetido para as amostras NTC12h e NTC24h. O volume de DMSO inserido é equivalente a quantidade do solvente utilizado em cada réplica nos testes de Ames e a concentração de NTC escolhida (25mg.L^{-1}) é equivalente a curva de $25\mu\text{g}$ de NTC/placa. As soluções equivalentes as curvas 10 e $50 \mu\text{g}$ de NTC/placa não foram realizadas, pois a absorbância da primeira é muito próxima ao limite de quantificação do equipamento e a segunda possui $\text{abs} > 2$, estando fora da faixa de linearidade da Lei de Beer-Lambert.

3.4 Testes de mutagenicidade

3.4.1 Procedimento para amostra NTC-LQES

Os testes foram realizados pelo método de pré-incubação conforme revisado por Mortelmans e Zeiger (2000), com uso da linhagem TA98 da bactéria *Salmonella tiphimurium* em ausência de ativação metabólica.

Inicialmente preparou-se uma solução-estoque de $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ da amostra NTC-LQES em água ultra-pura estéril, esta suspensão foi ultrassonicada por 5 minutos ($42\text{Khz} \pm 6\%$) antes de cada ensaio. Três doses de NTC- LQES (10, 50 e $100 \mu\text{g/placa}$) foram colocadas em contato com diferentes doses de 1-NP (10, 30, 100, 300 e 1000 ng/placa) por tempo determinado (2, 4 e 6 horas) em temperatura ambiente e ausência de agitação.

Foram então adicionados ágar de superfície e caldo nutriente contendo bactérias em fase exponencial e essa nova mistura vertida em placa de ágar mínimo e incubada em estufa a $37\pm 1^\circ\text{C}$ por 66 horas. Por fim, as colônias revertentes foram contadas com auxílio de estereomicroscópio.

Os solventes das soluções-estoque de NTC-LQES e 1-NP foram água Mili-q e dimetilsulfoxido (DMSO) respectivamente. Os controles negativos eram compostos de DMSO e água estéril nas mesmas proporções que nas demais concentrações e os controles positivos por $0,5 \mu\text{g/placa}$ de 4-Nitroquinolina-1-óxido.

O fluxograma abaixo resume o procedimento empregado (Figura 4).

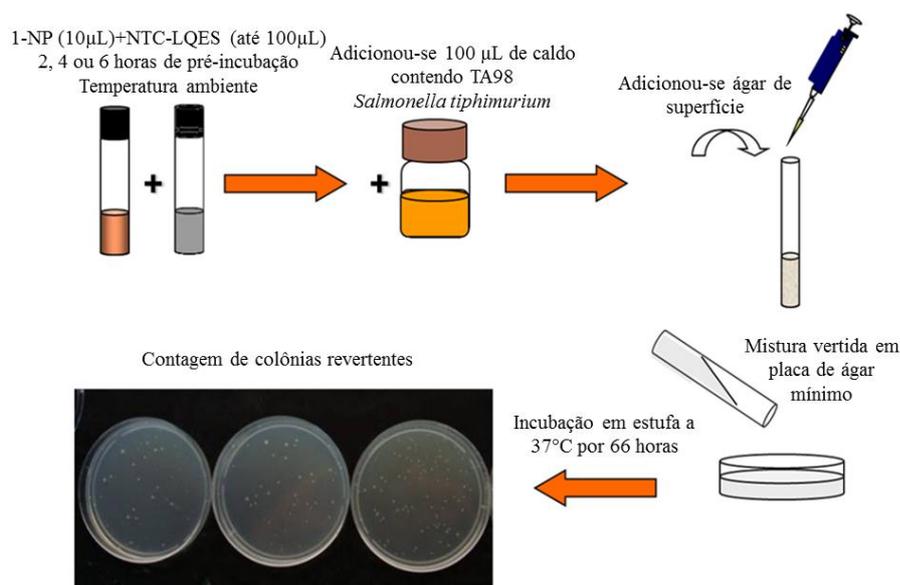


Figura 4 - Fluxograma do procedimento de teste de Ames

3.4.2 Procedimento para amostras NTC1h, NTC12h e NTC24h

Os ensaios foram realizados segundo norma ISO 16240:2005 *Water quality – Determination of the genotoxicity of water and waste water – Salmonella/microsome test (Ames test)*, utilizando a linhagem TA98 de *Salmonella tiphimurium*, em duplicatas e ausência de ativação metabólica. O método ISO:2005 permite a utilização de volumes maiores de

amostra quando comparado ao método de Mortelmans e Zeiger (2000) adequando-se melhor a amostra NTC1h que possui baixa capacidade de dispersão em água.

Antes de cada ensaio, preparou-se solução-estoque de 50 mg.L^{-1} das amostras de NTC em água estéril. As suspensões foram submetidas a ultrassonicação por 25 minutos para NTC1h, 15 minutos para NTC12h e NTC24h ($42\text{Khz} \pm 6\%$) com variação máxima de 3°C na temperatura do banho, afim de garantir dispersão semelhante nas amostras. Três doses de NTC (10, 25 e $50 \mu\text{g/placa}$) foram colocadas em contato com diferentes doses de 1-NP (10 a 1000 ng/placa , $10 \mu\text{L}$ de solução/placa) por 2 horas, havendo normalização do volume das suspensões com água ultra-pura estéril. Após o período de incubação, caldo nutriente contendo bactérias em fase exponencial e ágar de superfície foram adicionados, e a mistura vertida em placas de ágar mínimo. As placas foram incubadas em estufa a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 66 horas e as colônias revertentes contadas visualmente.

Os controles negativos eram compostos de água Mili-q estéril e DMSO nas mesmas proporções que nas demais concentrações e os brancos continham solução de NTC, água Mili-q estéril e DMSO. Como controle positivo foi utilizado $0,5 \mu\text{g/placa}$ de 1-nitroquinolona-1-óxido (4-nqo). Testes de esterilidade da água ultra-pura e das suspensões de NTC1h, NTC12h e NTC24h foram realizados a cada ensaio.

A potência de cada curva foi obtida regressão linear com variação do modelo linear denominada truncagem tipo Bernstein (BERNSTEIN et al., 1982) obtida em programa estatístico SALANAL elaborado por Dr. L. Myers do “Integrated Laboratory Systems”, Carolina do Norte, EUA

3.5 Tratamento e destinação dos resíduos

Como apresentado por Hallock et al (2009), as incertezas quanto aos aspectos toxicológicos e interações no ambiente dos nanomateriais sugerem que se devemos trata-los como materiais perigosos e adotar equipamentos de proteção como máscaras (ao manusear material seco), óculos de proteção e luvas.

Seguindo as recomendações destes autores, tratamentos e destinações dos resíduos gerados durante o desenvolvimento do projeto foram determinados. No Quadro 2, é apresentada a listagem dos resíduos, suas características, tratamento e destinação:

Quadro 2 – Tratamentos e destinação dos resíduos.

Resíduo	Fonte	Características	Armazenamento	Tratamento e destinação
Efluente ácido	Tratamento ácido das amostras NTC1h, NTC12h e NTC24h	Efluente com pH inicial -0,5 contendo resíduos de Fe e NTC. Possui cor amarelada.	Frascos de vidro âmbar de 1L de capacidade.	Neutralização com NaOH comercial com mudança de cor para castanho. Posterior envio a incineração.
Resíduos teste de Ames	Gerados durante a realização dos testes de mutagenicidade	Meios de cultura com carga biológica e contaminados por pequenas quantidades (microgramas de NTC)	Não se aplica	Descontaminação em autoclave (121°C, 30min) e descarte em lixo comum
Dispersões de nanotubos de carbono	Estudos de dispersão das amostras NTC1h, NTC12h e NTC24h; além de sobras de soluções estoque dos testes de Ames	Efluente com concentrações variadas de NTC em água ultra pura ou água de cultivo em pH próximo ao neutro	Bombona plástica de 4 L de capacidade	Incineração

4 RESULTADOS

4.1 Modulação da genotoxicidade do 1-Nitropireno por nanotubos de carbono NTC-LQES

4.1.1 Características da amostra NTC-LQES

As propriedades físico-químicas da amostra NTC-LQES foram apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1- Propriedades físico-químicas da amostra de nanotubos de carbono NTC-LQES

Propriedades	NTC-LQES ₁	NTC brutos
Diâmetro (nm)	10 – 40	10-40*
Comprimento (µm)	0.1 – 10	1-25*
Área superficial (m ² /g)	260 ± 10	158±15
Potencial Zeta (mV) ^a	- 27 ± 8.0	
Defeitos de superfície: I _D /I _G	1.64 ± 0.3	0,85
Temperatura de oxidação (°C)	610 ± 5.0	582±2,0
Pureza em Carbono (%)	99 ± 1.0	
Resíduo metálico final [Óxido de ferro] (%)	0.9 ± 0.1	7,6±0,4
Análise elementar qualitativa	C, O, Fe	C, O , Fe

^a em água Milli-Q * Dados fornecidos pelo fabricante

O tratamento ácido foi incapaz de alterar o diâmetro dos tubos, mas gerou encurtamento dos NTC e inseriu defeitos na superfície dos NTC. De acordo com a relação I_D/I_G obtida, a distância média entre os defeitos foi estimada em 11 nm (UMBUZEIRO, 2011).

A amostra não forma uma suspensão permanente em água Mili-q (potencial zeta menor que módulo de 40), mas mantém-se estável por tempo superior ao período do ensaio de

mutagenicidade. A amostra apresenta também grande área superficial possuindo assim, grande área disponível à adsorção do 1-NP. Os NTC da amostra NTC-LQES apresentam características desejáveis para utilização em ensaios biológicos como baixo teor de resíduos metálicos de síntese e ausência de elementos potencialmente tóxicos.

4.1.2 Modulação da genotoxicidade de 1-NP pela amostra NTC-LQES

A ausência de mutagenicidade da amostra NTC-LQES, foi observada em experimentos realizados pelo grupo do Prof. Israel. Felzenszwalb do Instituto de Biologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro–UERJ (ANEXO 1). Ausência de citotoxicidade para as bactérias foi também observada pelos colaboradores da UERJ eliminando suspeitas de falso negativo (UMBUZEIRO et al., 2011).

O 1-NP foi altamente mutagênico no teste de *Salmonella*/microsoma. A adição do NTC-LQES ao 1-NP, causou diminuição do número de colônias revertentes mostrando uma inibição dose-dependente (Tabela 2).

Tabela 2 - Número de colônias revertentes de 1-NP em ausência e presença de 10 µg de NTC-LQES

Dose 1NP (ng/placa)	Teste 1*			Teste 2*		
	Média±DP ¹ (TM) ²		Taxa de inibição	Média±DP ¹ (TM) ²		Taxa de inibição
	1NP	1NP + NTC-LQES		1NP	1NP + NTC-LQES	
0	30±7	29±4	-	30±7	23±3	-
10	44±7 (1,5)	28±7 (1,0)	100	43±8 (1,4)	17±4 (0,8)	100
30	69±14 (2,3)	32±3 (1,1)	92	48±7 (1,6)	27±6 (1,2)	75
100	95±21 (3,2)	67±5 (2,3)	42	81±13 (2,7)	38±8 (1,7)	70
300	560±13 (18,9)	293±19 (10,1)	50	560±22 (18,5)	374±69 (16,5)	34
1000	2650±111 (89,3)	1952±160 (67,3)	27	1206±269 (39,8)	1187±214 (52,4)	0

*2 horas de pré-incubação (1-NP + NTC-LQES)

¹ Desvio padrão

² Taxa de mutagenicidade (revertentes espontâneos + revertentes induzidos / revertentes espontâneos)

Dados brutos em Apêndice 1.

Diferentes doses (10; 50 e 100µg/ placa) de NTC-LQES foram investigadas. O aumento da dose de NTC-LQES levou a uma diminuição da taxa de mutagenicidade do 1-NP, sugerindo interação dos NTC com o 1-NP. Confirmou-se também a alta sensibilidade da

linhagem TA98 ao 1-NP, pois somente 30 ng/placa do composto gera resultado positivo (taxa de mutagenicidade ≥ 2) (Figura 5).

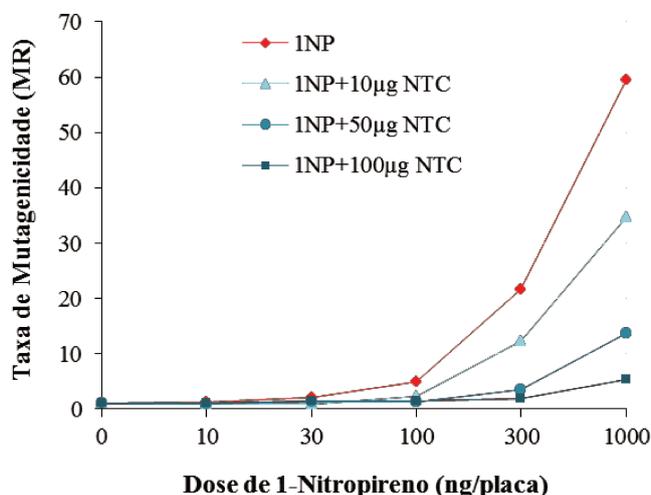


Figura 5 - Taxas de mutagenicidade do 1-NP na ausência e presença de 10, 50 e 100 µg de NTC-LQES.

Dados brutos em Apêndice 2

Considerando os resultados obtidos e a hipótese de Landsiedel et al (2009) e Singh et al (2009) de que a bactéria *Salmonella tiphimurium* é incapaz de assimilar os NTC, foram realizadas imagens com microscopia eletrônica de transmissão em amostras de colônias de *Salmonella* expostas a NTC-LQES e 1-NP nas mesmas condições dos testes de mutagenicidade. As amostras foram preparadas no LEAL e as microscopias realizadas por colaboradores do Instituto de Biologia da UNICAMP.

Observamos NTC aderidos à superfície externa da bactéria, mas nenhum no seu interior (Figura 6) o que corrobora a hipótese supracitada.

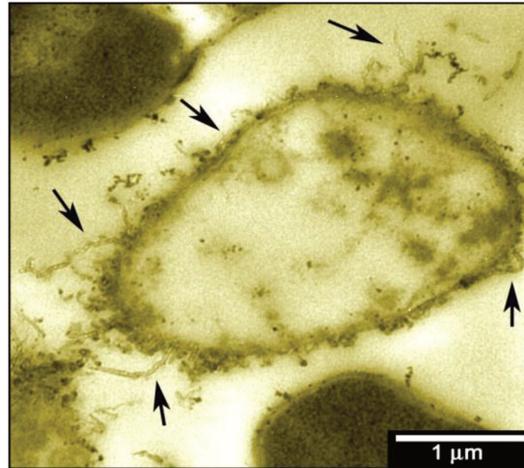


Figura 6 - Células bacterianas (Salmonella TA98) exposta a NTC-LQES encubadas com 1-NP (microscopia eletrônica de transmissão).

As flechas indicam os nanotubos. Fonte: UMBUZEIRO et al, 2011

Como o NTC estudado não penetram na parede da bactéria pode-se dizer que o teste de Ames detecta apenas as moléculas de 1-NP livres. Os 1-NP adsorvidos na superfície dos nanotubos são impedidos de entrarem nas bactérias. Durante o período de pré-incubação, parte das moléculas de 1-NP é aderida na superfície dos NTC e o restante permanece livre em solução. Após a introdução das bactérias, estas absorvem as moléculas livres na solução que causam mutações, enquanto que os NTC funcionalizados com 1-NP permanecem fora das células (Figura 7).

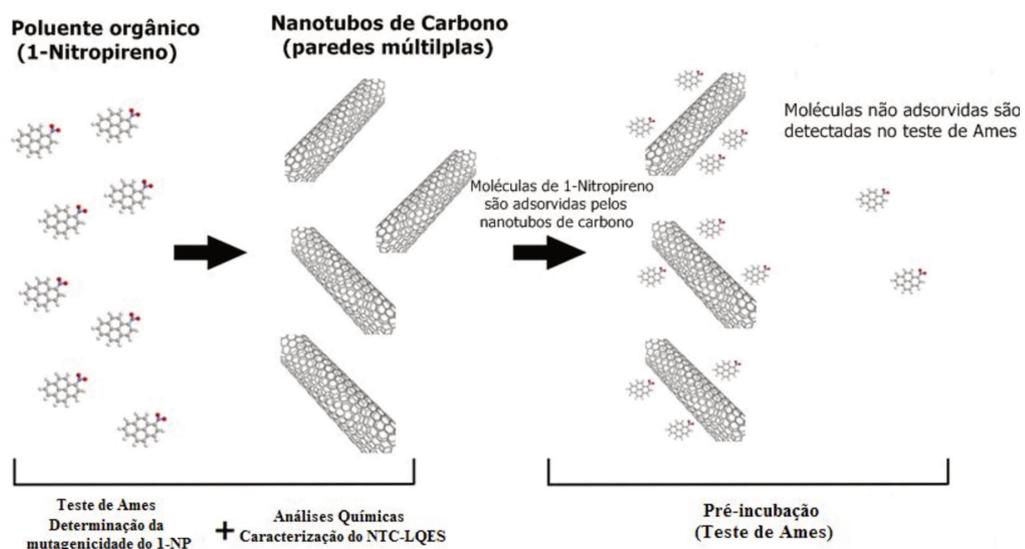


Figura 7 - Adsorção de 1-Nitropireno em nanotubos de carbono

Fonte: Adaptado de UMBUZEIRO et al (2011)

Supondo que toda a área superficial externa dos NTC-LQES ($2,6 \cdot 10^{14} \text{ nm}^2/\mu\text{g}$) estaria disponível para a adsorção das moléculas de 1-NP (superfície da molécula $\sim 1\text{nm}^2$), as proporções de superfície de nanotubos/superfície de moléculas de 1-NP utilizadas neste trabalho variaram de 1 a 1000; ou seja, haveria espaço disponível para a adsorção de todas as moléculas de 1-NP. Entretanto, não obtivemos redução total da mutagenicidade do 1-NP, o que indica que outros fatores influenciam na adsorção 1-NP, como por exemplo, a dispersão limitada dos NTC durante o ensaio biológico e os defeitos inseridos pelo tratamento ácido. Os defeitos permitem a ligação de grupos oxigenados à superfície dos NTC, o que dificulta a adsorção de compostos orgânicos.

Quando comparadas as proporções em massa NTC/1-NP utilizadas ao número de revertentes gerados (Figura 8), observa-se uma diminuição do número de revertentes até uma saturação que coincide com a faixa de distribuição das colônias revertentes espontâneas. A proporção em massa é proporcional à área disponível por 1-NP. O número de revertentes é estatisticamente igual ao número de revertentes espontâneo (controle) a partir da proporção 500. Dessa forma, podemos dizer que em uma proporção NTC/1-NP maior que 500 a mutagenicidade do 1-NP foi eliminada.

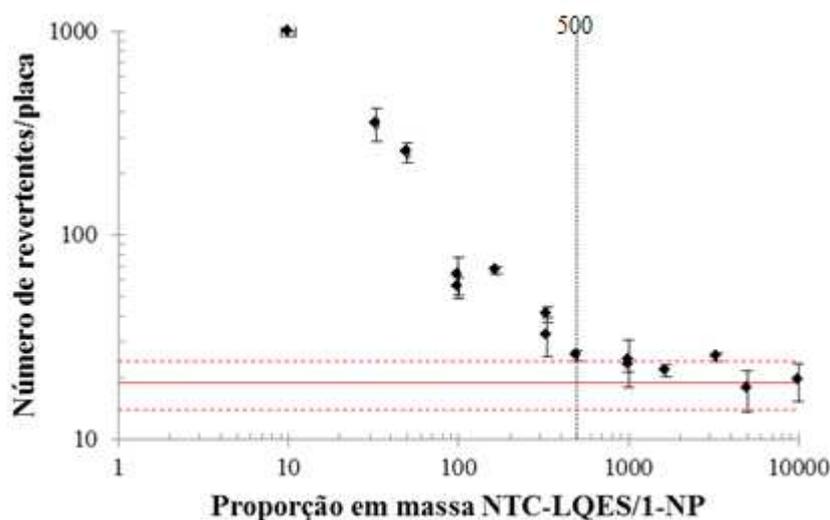


Figura 8 - Número de colônias revertentes em relação a proporção em massa NTC-LQES/1-NP.

Linha vermelha sólida corresponde a média de revertentes espontâneos e as linhas tracejadas representam média + e - desvio padrão. A linha vertical preta define a primeira proporção em que o número de revertentes espontâneos é estatisticamente igual ao controle (ANOVA 5 % de significância).

Para a avaliação de influência do período de pré-incubação na capacidade de adsorção do 1-NP ao NTC-LQES foi realizado um novo teste com 2, 4 e 6 horas de pré-incubação (Tabela 3)

Tabela 3 - Influência do período de contato entre 1-NP e NTC-LQES na mutagenicidade de 1-nitropireno

Dose 1-NP (ng/placa)	Média de revertentes por placa \pm Desvio padrão (TM ¹)		
	1NP+ 10 μ g NTC/placa (2h)	1NP+ 10 μ g NTC/placa (4h)	1NP+ 10 μ g NTC/placa (6h)
0	21 \pm 3,6	30 \pm 5,1	19 \pm 8,0
10	26 \pm 2,6 (1,2)	16 \pm 6,0 (0,5)	24 \pm 6,0 (1,2)
30	37 \pm 7,4 (1,8)	26 \pm 4,9 (0,9)	33 \pm 4,5 (1,7)
100	68 \pm 6,7 (3,2)	55 \pm 7,2 (1,9)	64 \pm 16 (3,4)
300	238 \pm 39 (11,3)	269 \pm 25 (9,1)	218 \pm 21 (11,5)
1000	721 \pm 49 (34,3)	662 \pm 59 (22,3)	794 \pm 126 (41,8)

¹ Taxa de mutagenicidade (revertentes espontâneos + revertentes induzidos / revertentes espontâneos)
 Dados brutos em Apêndice 3.
 (UMBUZEIRO et al, 2011)

Considerando os números de colônias revertentes e os desvios padrão obtidos, pode-se dizer que o processo de adsorção do 1-NP ao NTC é rápido (inferior a 2 horas) e mantém-se estável por pelo menos 6 horas.

4.2 Influência do tratamento ácido dos NTC na capacidade de modulação da genotoxicidade do 1-Nitropireno

4.2.1 Características das amostras NTC1h, NTC12h e NTC24h

As características obtidas estão descritas na Tabela 4:

Tabela 4 – Propriedades físico-químicas das amostras NTC1h , NTC12h e NTC24h

Propriedades	NTC1h	NTC12h	NTC24h
Diâmetro (nm)	10 - 40	10 - 40	10-40
Área superficial (m ² /g)	206,70	264,40	731,00
Defeitos de superfície: I _D /I _G	1,00	1,02	*
Temperatura de oxidação (°C)	593	587	575

*dado não obtido

A comparação entre a amostras NTC1h e NTC12h mostra que o aumento do período de refluxo ácido levou a um crescimento de aproximadamente 30% na área superficial dos NTC, provavelmente ligado ao encurtamento dos NTC. O aumento do tempo de tratamento ácido de 1 para 24 horas aumentou em aproximadamente 3 vezes a área superficial dos NTC, entretanto novas análises estão sendo realizadas para confirmação deste dado.

A razão I_D/I_G foi praticamente a mesma para as amostras NTC1h e NTC12h indicando uma semelhança nas distâncias entre os defeitos nessas amostras e a diminuição da temperaturas de oxidação na direção NTC1h> NTC12h> NTC24h indica aumento de grupamentos oxigenados na superfície dos NTC com o aumento do período de tratamento ácido.

4.2.2 Análises espectrofotométricas

As expressões das curvas de calibração obtidas para as amostras NTC1h, NTC12h e NTC24h estão expressos na Tabela 5:

Tabela 5 - Expressões das curvas de calibração das amostras NTC1h, NTC12h e NTC24h

Solução	Expressão	Coefficiente de calibração
NTC1h	$+26,5207x - 0,0467414$	0,999738
NTC12h	$+ 23,1877x + 0,0392177$	0,999764
NTC24h	$+ 28.5354x - 0.0441541$	0.999919
NTC1h + 0,99% de Dms0	$+ 23,0179x + 0,0134161$	0,999968
NTC12h + 0,99% de Dms0	$+ 25,2229x + 0,171234$	0,999688
NTC24h + 0,99% de Dms0	$+ 28.2557x + 0.0320822$	0.999875

Através das expressões, podemos estabelecer a relação de tempo de ultrassonicação da solução-estoque de NTC e a concentração mensurada após 2 horas de repouso, sendo que a concentração nominal inicial de todas as soluções é 25 mg.L^{-1} (Figura 9).

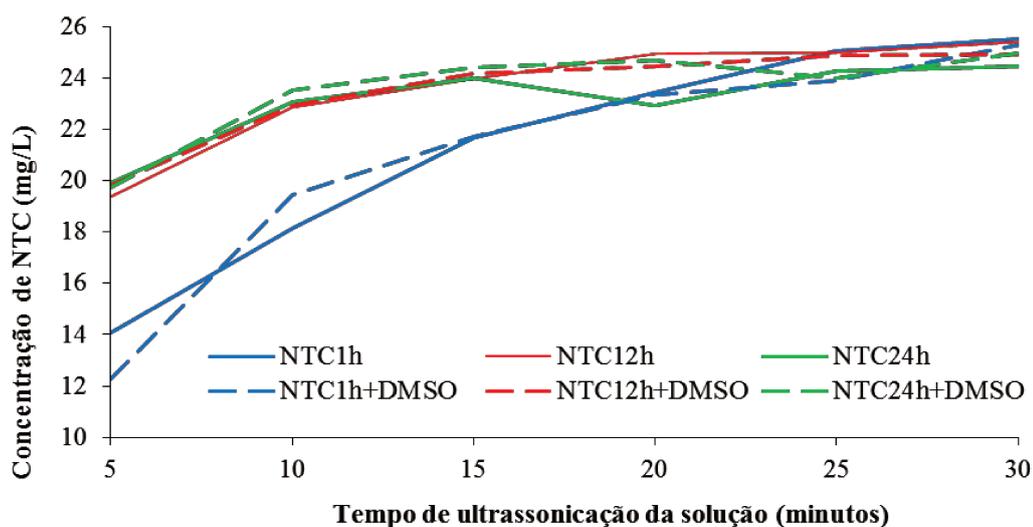


Figura 9 - Influência do tempo de ultrassonicação na dispersão dos NTC1h, NTC12h e NTC24h.

As amostras NTC12h e NTC24h se dispersam mais facilmente, apenas 15 minutos de ultrassonicação são suficientes para que as soluções apresentem concentrações próximas as da concentração nominal. A amostra NTC1h, por sua vez, necessita de 25 minutos de ultrassonicação para chegar a este estado. Pode-se observar também que a presença de 0,99% de DMSO nas soluções não alterou significativamente a dispersão das amostras, o que indica o efeito desprezível deste solvente nos testes de mutagenicidade.

Estes resultados permitiram minimizar a influencia da diferença de dispersão das amostras durante o ensaios de mutagenicidade das amostras NTC1h, NTC12h e NTC24h cujos resultados estão apresentados no item a seguir.

4.2.3 Comparação da capacidade de modulação da genotoxicidade do 1-NP entre as amostras NTC1h, NTC12h e NTC24h

Inicialmente realizaram-se testes com as amostras NTC1h e NTC12h utilizando soluções-estoque de NTC que foram ultrassonicadas por apenas 5 minutos. Entretanto, durante a realização dos ensaios foi observada aglomeração da amostra NTC1h no período de pré-incubação, situação esta que pode prejudicar a interação entre os NTC e o 1-NP. Por isso, foram realizadas análises espectrofotométricas para a determinação do tempo ótimo de ultrassonicação das soluções-estoque para cada amostra de NTC (ver item 4.2.2). Modificados os períodos de ultrassonicação, novos testes foram realizados e os resultados estão apresentados na Figura 10.

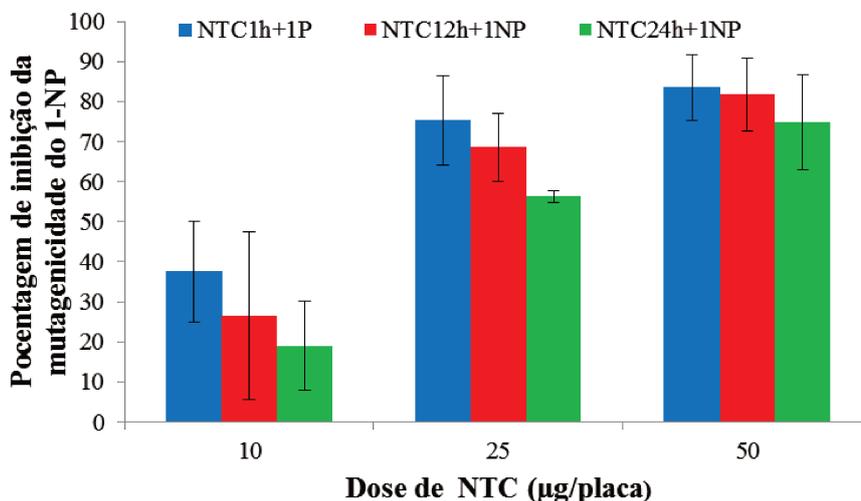


Figura 10 - Porcentagem de inibição da mutagenicidade do 1-NP por NTC1h, NTC12h e NTC24h.

As novas amostras, assim como amostra NTC-LQES, apresentaram capacidade de redução da mutagenicidade de 1-NP de forma dose-dependente. O aumento das doses de NTC gerou diminuição significativa (em ANOVA com 5% de significância) das potências obtidas para todas as amostras.

Comparando as diferentes amostras, aparentemente as inibições diminuíram no sentido do aumento do tempo de tratamento ácido (NTC1h a NTC24h), mas grandes variações foram observadas para cada dose e amostra. Desta forma, realizamos análise estatística ANOVA com 5% de significância e teste de Tukey considerando um nível de significância a fim de comparar as três amostras em cada dose utilizada (Quadro 3).

Quadro 3 - Potências mutagênicas do 1-NP na presença de NTC1h, NTC12h e NTC24h e comparação estatística entre as amostras.

10µg de NTC/placa							
Potências mutagênicas do 1-NP na presença de NTC				Comparação estatística entre as amostras (p=0,038)			
	NTC1h	NTC12h	NTC24h		NTC1h	NTC12h	NTC24h
Teste1	366	416					
Teste2	337	400		NTC1h	=	=	
Teste3	306	316		NTC12h			≠
Teste4	335	320	441	NTC24h			
Teste5	378	234	500				
Média	344	337	471				
Desvio padrão	28,3	73,4	41,7				
25µg de NTC/placa							
Potências mutagênicas do 1-NP na presença de NTC				Comparação estatística entre as amostras (p=0,024)			
	NTC1h	NTC12h	NTC24h		NTC1h	NTC12h	NTC24h
Teste1	77	146					
Teste2	96	142		NTC1h	=		≠
Teste3	146	212		NTC12h			=
Teste4	208	186	222	NTC24h			
Teste5	150	173	291				
Média	135	172	257				
Desvio padrão	51,4	29,0	48,8				
50µg de NTC/placa							
Potências mutagênicas do 1-NP na presença de NTC				Comparação estatística entre as amostras (p=0,388)			
	NTC1h	NTC12h	NTC24h		NTC1h	NTC12h	NTC24h
Teste1	129	68					
Teste2	71	174		NTC1h	=		=
Teste3	74	124		NTC12h			=
Teste4	101	115	166	NTC24h			
Teste5	60	24	115				
Média	87	101	141				
Desvio padrão	27,9	57,2	36,1				

Análise obtida utilizando software estatístico MINITAB versão 15.1.1.0, teste one-way ANOVA (nível de significância 5%) e teste de Tukey (nível de significância de 5%). Dados brutos em Apêndice 5 e 6

Pela análise estatística, as amostras NTC1h e NTC12h não diferenciam em nenhuma das doses testadas, enquanto que a amostra NTC24h apresentou menor capacidade de inibição da mutagenicidade do 1-NP que a amostra NTC12h para a dose de 10µg/placa e que a amostra NTC1h na dose de 25µg/placa. Na dose de 50µg/placa, todas as amostras são estatisticamente iguais.

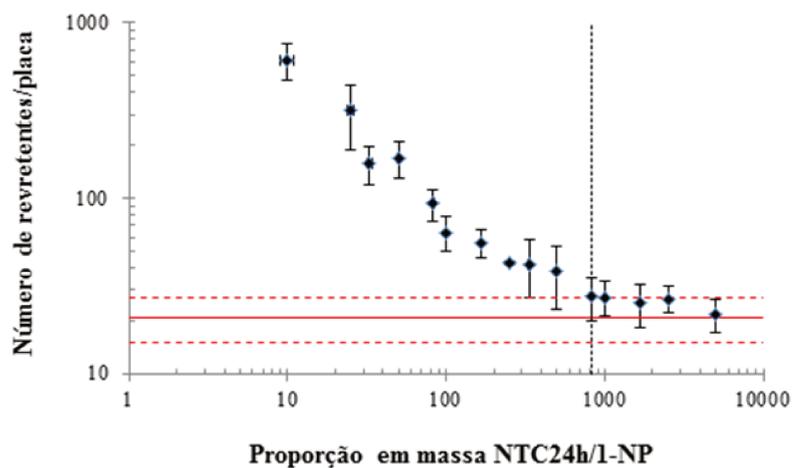
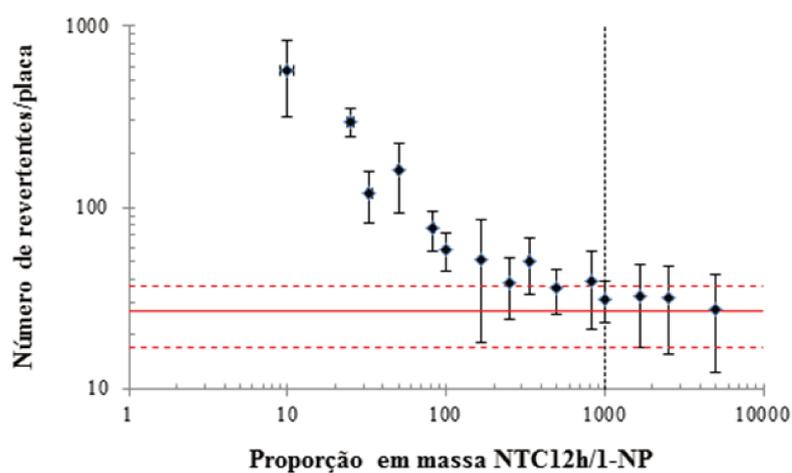
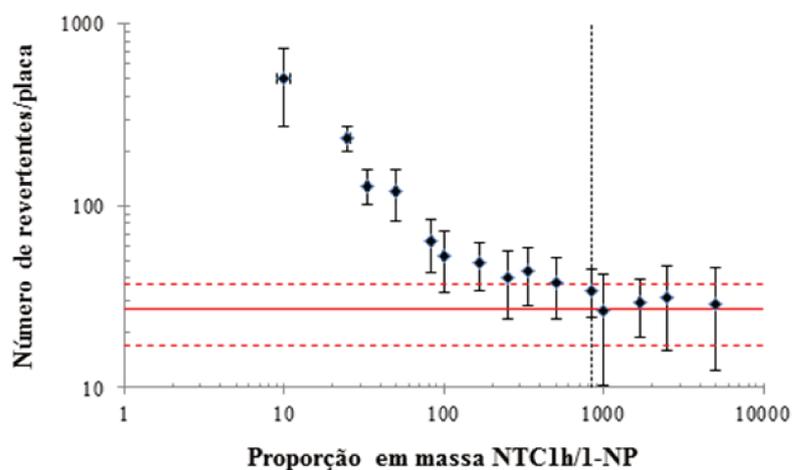
Dessa forma, pode-se dizer que um tratamento ácido de até 12 horas não interfere na capacidade de modulação da mutagenicidade do 1-NP. Por outro lado, o aumento do tempo de tratamento para 24 horas diminui esta capacidade quando os NTC são empregados em doses até 25µg/placa e não interfere em doses maiores.

Supondo que toda a área superficial externa dos NTC estimada por BET estaria disponível para a adsorção das moléculas de 1-NP (superfície da molécula ~ 1nm²), as proporções de superfície de nanotubos/superfície de moléculas de 1-NP variariam de aproximadamente 0,9 a 435 para NTC1h, 1 a 550 para NTC12h e 3 a 1520 para NTC24h.

Dessa forma seria esperado uma maior capacidade de modulação da amostra NTC24h em relação a outras amostras que não foi observado nos ensaios biológicos realizados. Contudo as medidas de área superficial são realizadas no material seco, enquanto que nos ensaios biológicos, os NTC estão em solução aquosa e nesta condição a área superficial disponível é desconhecida.

Relacionando as proporções em massa NTC/1-NP e o número de revertentes resultantes (Figura 12), podemos dizer que as três amostras apresentaram capacidade similares de modulação mutagenicidade do 1-NP. A mutagenicidade do 1-NP foi eliminada, ou seja, o número de revertentes é estatisticamente igual ao número de revertentes espontâneo (controle) a partir da proporção 830 para NTC1h e NTC24h e 1000 para NTC12h.

Através da caracterização obtida, podemos dizer que o tratamento ácido promove o aumento da área superficial dos NTC que poderia aumentar a adsorção de 1-NP aos NTC, entretanto houve também aumento da inserção de grupamentos carboxílicos na superfície dos NTC que dificultam a adsorção de compostos nitroaromáticos aos NTC (SHEN et al., 2009). Sugerimos então que estes efeitos opostos minimizariam a diferença entre as amostras, gerando resultados semelhantes nos ensaios biológicos.



Linha vermelha sólida corresponde a média de revertentes espontâneos e as linhas tracejadas representam média + e - desvio padrão. A linha vertical preta define a primeira proporção em que o número de revertentes espontâneos é estatisticamente igual ao controle (ANOVA 5 % de significância).

Figura 11 - Número de revertentes em relação a proporção em massa NTC/1-NP para as amostras NTC1h, NTC12h e NTC24h.

5 CONCLUSÕES

- Nanotubos de Carbono (NTC) de paredes múltiplas interagem com as moléculas de 1-NP de forma dose-dependente e a adsorção dos 1-NP aos NTC possivelmente ocorre por ligações não covalentes em regiões livres de defeito e mantém-se estável por pelo menos 6 horas;
- A amostra de NTC avaliada não foi capaz de penetrar na bactéria *Salmonella typhimurium* sugerindo que o teste Salmonella/microsoma (teste de Ames) não é um modelo adequado para avaliar a mutagenicidade desse material.
- Para comparação de resultados entre diferentes NTC é importante padronizar as condições de dispersão do material a ser testado;
- O aumento do período de tratamento ácido de 1 para 12h modifica a área superficial dos NTC e melhora a capacidade de dispersão dos mesmos em água sem modificar significativamente sua capacidade de adsorção do 1-NP;
- O tratamento ácido promove o aumento da área superficial dos NTC bem como o aumento da inserção de grupamentos carboxílicos das paredes dos NTC levando a efeitos opostos na capacidade de adsorção das moléculas de 1-NP.

PRODUÇÕES BIBLIOGRÁFICAS

Apresentação em Congressos (pôster)

HONORIO J. G, STÉFANI D., MORALES D. A., COLUCI V. R., ALVES O. L., UMBUZEIRO G. A. Potencial Modulação da Mutagenicidade do 1-Nitropireno por Nanotubos de Carbono. In : V Encontro Nacional de Química Ambiental, Estância de São Pedro, SP, 2010.

HONÓRIO J.G., MORALES D.A., STÉFANI D., ALVES O.A., COLUCI V.R. e UMBUZEIRO G.A. Modulation of the mutagenicity of 1-nitropyrene by acid-treated carbon nanotubes. In: 6th International Conference on the Environmental Effects of Nanoparticles and Nanomaterials, Londres-UK, 2011.

Artigo completo

UMBUZEIRO G.A., COLUCI V.R., HONÓRIO J.G., GIRO R., MORALES D.A., JAGE A.S.G., MAZZEI J.L., FELZENSZWALB I., SOUZA FILHO A.G., STEFANI D. e ALVES O.A. 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. 3, p. 437-446, 2011.

REFERÊNCIAS

ARIAS L. R. e YANG L. Inactivation of Bacterial Pathogens by Carbon Nanotubes in Suspensions. **Langmuir**, v. 25, p. 3003-3012, 2009.

AGNIHOTRI S., ROOD M. J. e ROSTAM-ABADI M. Adsorption equilibrium of organic vapors on single-walled carbon nanotubes. **Carbon**, v. 43, p. 2379–2388, 2005.

BAUN A., HARTMANN N. B., GRIEGER K. e KUSK K. O. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing. **Ecotoxicology**, v.17, p. 387–395, 2008.

BENSON J. M., BROOKS A. L., CHENG Y. S., HENDERSON T. R., WHITE J. E. Environmental transformation of 1-nitropyrene on glass surfaces. **Atmospheric Environment**, v. 19, n. 7, p.1169-1174, 1985.

BERNSTEIN, L.; KALDOR, J.; McCANN, J.; PIKE, M.C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the Salmonella test. **Mutation Research**, v.97, n.4, p.267-281, 1982.

BONNEFOY A., CHIRON S., BOTTA A. Environmental nitration processes enhance the mutagenic potency of aromatic compounds. Abstracts/**Toxicology Letters**, v.205S, p.S60-S175, 2011.

CHEN W, DUAN L e ZHU D. Adsorption of Polar and Nonpolar Organic Chemicals to Carbon Nanotubes. **Environmental Science Technology**, v.41, p. 8295-8300, 2007.

CHO H, SMITH B. A., WNUK J. D., FAIRBROTHER H., BALL W.P. Influence of Surface Oxides on the Adsorption of Naphthalene onto Multiwalled Carbon Nanotubes. **Environmental Science Technology**, v. 42, p.2899-2905, 2008.

CONSOLO M.C., ANDERS M., HOWARD P.C. Mutagenicity of the phenolic microsomal metabolites of 3-nitrofluoranthene and 1-nitropyrene in strains of Salmonella typhimurium. **Mutagenic Research**, v.210, p.263-269, 1988.

CORNELISSEN G., GUSTAFSSON O., BUCHELI T.D., KOELMANS M.O., VAN NOORT P.M. Extensive Sorption of Organic Compounds to Black Carbon, Coal, and Kerogen in Sediments and Soils: Mechanisms and Consequences for Distribution,

Bioaccumulation, and Biodegradation. **Environmental Science and Technology**, v.39, p.6881, 2005.

CORONATO M. Ciência de resultados. Indústria Brasileira, 2005. Banco de dados: Disponível em: <<http://www.usp.br/prp/nanotecnologia>>. Data de acesso: junho de 2010.

DIAZ-FLORES P.E, LÓPEZ-URI´AS F., TERRONESB M. e RANGEL-MENDEZA J.R. Simultaneous adsorption of Cd²⁺ and phenol on modified N-doped carbon nanotubes: Experimental and DFT studies. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 334, p. 124–131, 2009.

DI SOTTO A., CHIARETTI M., CARRUB G. A., BELLUCCI S., MAZZANTIA G. Multi-walled carbon nanotubes: Lack of mutagenic activity in the bacterial reverse mutation assay. **Toxicology Letters**, v.184, p.192–197, 2009

DOAK S.H., GRIFFITHS S.M, MANSHIAN B., SINGH N., WILLIAMS P. M, BROWN A. P e JENKINS G. J. Confounding experimental considerations in nanogenotoxicology. **Mutagenesis**, v.24, p.285-293, 2009.

EMA M., IMAMURA T, SUZUKI H., KOBAYASHI N., NAYA M., NAKANISHI J. Evaluation of genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in a battery of in vitro and in vivo assays. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, ahead of print, 2012.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2012.03.014>

EUROPEAN PATENT OFFICE. Banco de Patentes. Disponível em <<http://worldwide.espacenet.com>> Data de acesso: 15/05/20012.

FERGUSON P.L, CHANDLER G.T., TEMPLETON R.C., DEMARCO A., SCRIVENS W.A., ENGLEHART B.A. Influence of sediment-amendment with single-walled carbon nanotubes and diesel soot on bioaccumulation of hydrophobic organic contaminants by benthic invertebrates. **Environmental Science and Technology**, v.15, p.3879, 2008.

FIRME C.P, 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.

HALLOCK M.F., GREENLEY P., DIBERARDINIS L., KALLIN D. Potential risks of nanomaterials and how to safety handle materials of uncertain toxicity. **Journal of Chemical Health and Safety**, v.16, p. 16-23, 2009.

HATANAKA N., YAMAZAKI H., ODA Y., GUENGERICH P., NAKAJIMA M. e YOKOI T. Metabolic activation of carcinogenic 1-nitropyrene by human cytochrome P450 1B1 in *Salmonella typhimurium* strain expressing an O-acetyltransferase in SOS/umu assay. **Mutagenic Research**, v.497, p.223-233, 2001.

HOWARD P. C., CONSOLO M. C., DOOLEY K. L., BELAND F. A. Metabolism of 1-nitropyrene in mice: transport across the placenta and mammary tissues. **Chemico-Biological Interactions**, v.95, p.309-325, 1995.

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

ISO (International Organization for Standardization). *ISO 16240* - Water quality – Determination of the genotoxicity of water and waste water – *Salmonella/microsome test* (Ames test), 2005.

INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial). Banco de Patentes. Disponível em: <http://www.inpi.gov.br> data de acesso: 15/05/2012.

KIM J. S., LEE K., LEE Y. H., CHO H. S., KIM K. H., CHOI K. H. E LEE S. H., SONG K. S., KANG C. S. e YU I.J. Aspect ratio has no effect on genotoxicity of multi-wall carbon nanotubes. **Archives of Toxicology**, v.85, n. 7, p.775-86, 2011.

KING L.C., JACKSON M., BALL L.M., LEWTAS J. Binding of 1-Nitro[¹⁴C]pyrene to DNA and protein in cultured lung macrophages and respiratory tissues. *Cancer Letters*, v.19, p. 241-246, 1983.

KUESENG P., THAMMAKHET C., THAVARUNGKUL P. e KANATHARANA P. Multiwalled carbon nanotubes/cryogel composite, a new sorbent for determination of trace polycyclic aromatic hydrocarbons. **Microchemical Journal**, v. 96, p. 317–323, 2010.

KUO C., CHUNG-HSIN, WU W. Adsorption of direct dyes from aqueous solutions by carbon nanotubes. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 327, p.308–315, 2008.

LANDSIEDEL R., KAPP M. D., SCHULZ M., WIENCH K. e 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.

LIANG M., GUO L.H. Application of nanomaterials in environmental analysis and monitoring. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v.9, p.2283-2289, 2009.

LIU C.H., LI J.J., ZHANG H.L., LI B.R., GUO Y. Structure dependent interaction between organic dyes and carbon nanotubes. **Colloids and Surfaces A**, v.313-314 p. 9-12, 2008.

LU C., SU F., HU S. Surface modification of carbon nanotubes for enhancing BTEX adsorption from aqueous solutions. **Applied Surface Science**, v. 254, p.7035-7041, 2008.

MARSH D.H., RANCE G.A., ZAKA W.H., WHITBY R.J., KHLOBYSTOV A.N. Comparison of the stability of multiwalled carbon nanotube dispersions in water. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 9, p.5490–5496, 2007.

MARTINEZ D.S. Nanotubos de carbono: aspectos químicos e interação com biosistemas. Campinas, 2011. Tese – Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2011.

MEAGAN S., MAUTER , ELIMELECH M. Environmental Applications of Carbon-Based Nanomaterials. **Environmental Applications of Carbon-Based Nanomaterials**, v. 42, n.16, 2008.

MERMELSTEIN R., KIRIAZIDES D.K., BUTLER M., McCOY E.C., ROSENKRANZ H.S. The extraordinary mutagenicity of nitropyrenes in bacteria. **Mutation Research**, v.89, p.189-196, 1981.

MONGE M. E., D'ANNA B., MAZRI L., GIROIR-FENDLER A., AMMANN M., DONALDSON D. J. e GEORGE C. Atmospheric Chemistry Special Feature: Light changes the atmospheric reactivity of soot. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.07, p.6605-6609, 2010.

MORTELMANS K., ZEIGER E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, v. 455, p.29–60, 2000.

MUCK A., KUBÁT P., OLIVEIRA A., FERREIRA L.F.V., CVACKA J., CIVIS S., ZELINGER Z., BAREK J., ZIMA J. Photodegradation of 1-nitropyrene in solution and the adsorbed state. **Journal of Hazardous Materials**, v. B95, p.175-184, 2002.

MULLER J., DECORDIER I., HOET P.H., LOMBAERT N., THOMASSEN L., HUAUX F., D. LISON e KIRSCH-VOLDERS M. Clastogenic and aneugenic effects of multi-wall carbon nanotubes in epithelial cells. **Carcinogenesis**, v. 29, n.2, p.427–433, 2008.

PATLOLLA A, KNIGHTEN B. e TCHOUNWOU P. Multi-Walled Carbon Nanotubes Induce Cytotoxicity, Genotoxicity And Apoptosis In Normal Human Dermal Fibroblast Cells. **Ethnicity & Disease**, v. 20, p.65-72, 2010.

PÉREZ S., FARRÉ M., BARCELÓ D. Analysis, behavior and ecotoxicity of carbon-based nanomaterials in the aquatic environment. **Trends in Analytical Chemistry**, v.28, p.820, 2008.

QU S., HUANG F., YU S., CHEN G e KONG J. Magnetic removal of dyes from aqueous solution using multi-walled carbon nanotubes filled with Fe₂O₃ particles. **Journal of Hazardous Materials**, v. 160, p. 643–647, 2008.

REN X., CHEN C., NAGATSU M. e WANG X. Carbon nanotubos as adsorbents in environmental pollution management: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 170, p. 395-410, 2011.

PROJECT ON EMERGING NANOTECHNOLOGIES. Nanotech-enabled consumer products continue to rise, 2010. Disponível em: <<http://www.nanotechproject.org/news/archive/9231>>. Data de acesso: novembro de 2011.

PONTI J., BROGGI F., MARIANI V., MARZI L., COLOGNATO R., MARMORATO P., GIORIA S., GILLILAND D., GARCÌA C.P., MESCHINI S., STRINGARO A., MOLINARI A., RAUSCHER H., ROSSI F. Morphological transformation induced by multiwall carbon nanotubes on Balb/3T3 cell model as an in vitro end point of carcinogenic potential. **Nanotoxicology**, 2012. Ahead of print

ROYAL SOCIETY AND ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING. Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties, 2004. Banco de dados. Disponível em: <<http://www.nanotec.org.uk/finalReport.htm>> Data de acesso: junho de 2009.

SANTOS, C. Minas Gerais dá largada na produção de nanotubos de carbono no Brasil. *Jornal da Ciência*, 2010. Disponível em: <<http://www.jornaldaciencia.org.br/Detail.jsp?id=71167>> Data de acesso: fevereiro de 2012.

SHEN X., SHAN X., DONG D., HUAA X.; OWENS G. Kinetics and thermodynamics of sorption of nitroaromatic compounds to as-grown and oxidized multiwalled carbon nanotubes. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 330, p.1–8, 2009.

SHI B., ZHUANG X., YAN X., LU J., TANG H. Adsorption of atrazine by natural organic matter and surfactant dispersed carbon nanotubes. **Journal of Environmental Sciences**, v. 22, n.8, p.1195–1202, 2010.

SINGH N., MANSHIAN B., JETKINS G. J. S., GRIFFITHS S. M., WILLIAMS P. M., MAFFEIS T.G.G., WRIGHT C. J., DOAK S. H. NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. **Biomaterials**, v.30, p.3891-3914, 2009.

SMAJDA R, MIONIC M., DUCHAMP M., ANDRESEN J. C., FORRO L. E MAGREZ A. Production of high quality carbon nanotubes for less than \$1 per gram. **Physica status solidi C**, v. 7, p. 1236, 2010.

SOUZA FILHO A.G. e FAGAN S. B. Funcionalização de nanotubos de carbono. **Química Nova**, v.30, n. 7, p.1695-1703, 2007

SZENDI K., VARGA C. Lack of Genotoxicity of Carbon Nanotubes in a Pilot Study. **Anticancer research**, v. 28, p. 349-352, 2008.

TAHARA I, KATAOKA K., KINOUCI T., OHNISHI Y. Stability of 1-nitropyrene and 1,6-dinitropyrene in environmental water samples and soil suspensions. **Mutation Research**, v.343, p.109-119, 1995.

TANAKA K., YAMABE T. e FUKUI K (ed.) **The Science and Technology of Carbon Nanotubes**. Editora Elsevier, s.l., 1999.

TAUROZZI J.S., HACKLEYV.A. e WIESNER M.R. Ultrasonic dispersion of nanoparticles for environmental, health and safety assessment – issues and recommendations. **Nanotoxicology**, p. 1-19, 2010.

TOKIWA H., NAKAGAWA R. e OHNISHI Y. Mutagenic assay of aromatic nitro compounds with *Salmonella typhimurium*. **Mutation Research Letters**, v.91, p.321-325, 1981.

UMBUZEIRO G.A., COLUCI V.R., HONÓRIO J.G., GIRO R., MORALES D.A., JAGE A.S.G., MAZZEI J.L., FELZENSZWALB I., SOUZA FILHO A.G., STEFANI D. e ALVES O.A. 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. 3, p. 437-446, 2011.

UMBUZEIRO G. A., FRANCO A., MARTINS M.H., KUMMROW F., CARVALHO L., SCHMEISER H.H., LEYKAUF J., STIBOROVA M. e CLAXTON L.D. Mutagenicity and DNA adduct formation of PAH, nitro-PAH, and oxy-PAH fractions of atmospheric particulate matter from São Paulo, Brazil. *Mutation Research*, v.652, p.72–80, 2008.

USPTO.GOV (The United States Patents and Trademark Office) Banco de patentes, Disponível em <http://www.uspto.gov/> data de acesso 15/05/2012.

WIRNITZER U, HERBOLD B., VOETZ M. e RAGOT J. Studies on the *in vitro* genotoxicity of baytubes®, agglomerates of engineered multi-walled carbon-nanotubes (MWCNT). *Toxicology Letters*, v.186, p.160–165, 2009.

WU C. Adsorption of reactive dye onto carbon nanotubes: equilibrium, kinetics and thermodynamics. *Journal of Hazardous Materials*, v. 144, p.93–100, 2007.

YANG K., XING B. Adsorption of Organic Compounds by Carbon Nanomaterials in Aqueous Phase: Polanyi Theory and Its Application. *Chemical Reviews*, v. 110, p.5989–6008, 2010.

YANG K., WANG X., ZHU L.,XING B. Competitive Sorption of Pyrene, Phenanthrene, and Naphthalene on Multiwalled Carbon Nanotubes. *Environmental Science Technology*, v. 40, p.5804-5810, 2006.

YANG K., WU W., JING Q., ZHU L. Aqueous Adsorption of Aniline, Phenol, and their Substitutes by Multi-Walled Carbon Nanotubes. *Environmental Science Technology*., v. 42, p. 7931–7936, 2008.

ZANETTI-RAMOS B. G e CRECZYNSKI-PASA T. B. O desenvolvimento da nanotecnologia: cenário mundial e nacional de investimentos. *Revista Brasileira de Farmácia*, v.89, n.2, p.95-101, 2008.

ZARBIN A.J.G. Química de (Nano) Materiais. *Química Nova*, v. 30, n.6, p.1469-1479, 2007.

ZHANG S., SHAO T, BEKAROGLU SS, KARANFIL T. Adsorption of synthetic organic chemicals by carbon nanotubes: Effects of background solution chemistry. **Water Research**, 44, p. 2607- 2074, 2010.

ZHU L., CHANG D. W., DAI L. e HONG Y. DNA Damage Induced by Multiwalled Carbon Nanotubes in Mouse Embryonic Stem Cells. **Nano Letters**, v.12, n.7, p.3592-3597, 2007.

APÊNDICE

Apêndice 1 – Dados brutos: Testes iniciais com a amostra NTC-LQES

Condições de teste	
Método	Mortelmans e Zeiger (2000)
Linhagem:	TA98
Período de pré-incubação	2 horas
Período de ultrassonicação da amostra de NTC	5 minutos

TESTE 1

Amostra:		10 µg/placa de NTC-LQES + 1-Nitropireno				
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	26	27	34	29	4,4	1,0
10	35	22	28	28	6,5	1,0
30	32	35	30	32	2,5	1,1
100	63	65	73	67	5,3	2,3
300	297	273	310	293	18,8	10,1
1000	2052	1767	2037	1952	160,4	67,3
Potência da curva	380		colônias revertentes/µg de 1-NP			

Amostra:		1-Nitropireno				
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	27	38	24	30	7,4	1,0
10	47	36	48	44	6,7	1,5
30	83	68	56	69	13,5	2,3
100	120	82	84	95	21,4	3,2
300	572	547	560	560	12,5	18,9
1000	2778	2593	2579	2650	111,1	89,3
Potência da curva	693		colônias revertentes/µg de 1-NP			

TESTE 2

Amostra:		10 µg/placa de NTC-LQES + 1-Nitropireno				
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	20	22	26	23	3,1	1,0
10	22	15	14	17	4,4	0,8
30	23	24	34	27	6,1	1,2
100	35	32	47	38	7,9	1,7
300	413	415	294	374	69,3	16,5
1000	968	1396	1196	1187	214,2	52,4
Potência da curva	192		colônias revertentes/µg de 1-NP			

Amostra:		1-Nitropireno				
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	23	32	36	30	6,7	1,0
10	42	52	36	43	8,1	1,4
30	49	54	41	48	6,6	1,6
100	94	80	69	81	12,5	2,7
300	555	584	541	560	21,9	18,5
1000	912	1268	1439	1206	268,9	39,8
Potência da curva	493		colônias revertentes/ μ g de 1-NP			

Apêndice 2 – Dados brutos: Variação da concentração de NTC-LQES

Condições de teste	
Método	Mortelmans e Zeiger (2000)
Linhagem:	TA98
Período de pré-incubação	2 horas
Período de ultrassonicação da amostra de NTC	5 minutos

Amostra:		10 μg/placa de NTC-LQES + 1-Nitropireno				
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	30	26	30	29	2,3	
10	25	22	22	23	1,7	0,8
30	31	21	CONT.	26	7,1	0,9
100	79	60	53	64	13,5	2,2
300	296	427	337	353	67,0	12,3
1000	956	1027	CONT.	992	50,2	34,6
Potência da curva	358		colônias revertentes/ μ g de 1-NP			

Amostra:		50 μg/placa de NTC-LQES + 1-Nitropireno				
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	26	23	7	19	10,2	1,0
10	14	22	17	18	4,0	0,9
30	20	23	22	26	80,5	1,4
100	24	26	27	26	1,5	1,4
300	70	64	68	67	3,1	3,6
1000	232	288	245	255	29,3	13,7
Potência da curva	145		colônias revertentes/ μ g de 1-NP			

Amostra: 100 µg/placa de NTC-LQES + 1-Nitropireno						
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	16	17	16	16	0,6	-
10	24	17	17	19	4,0	1,2
30	26	24	26	25	1,2	1,6
100	28	17	28	24	6,4	1,5
300	31	26	40	32	7,1	2,0
1000	90	94	83	89	5,6	5,4
Potência da curva	65		colônias revertentes/µg de 1-NP			

Amostra: 1-Nitropireno						
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	14	21	23	19	4,7	1,0
10	19	32	CONT.	26	9,2	1,3
30	45	38	40	41	3,6	2,1
100	105	86	97	96	9,5	5,0
300	284	555	CONT.	420	191,6	21,7
1000	979	1455	1012	1149	265,8	59,4
Potência da curva	1070		colônias revertentes/µg de 1-NP			

Apêndice 3 – Dados brutos: Variação do período de pré-incubação

Condições de teste	
Método	Mortelmans e Zeiger (2000)
Linhagem:	TA98
Período de pré-incubação	2, 4 e 6 horas
Período de ultrassonicação da amostra de NTC	5 minutos

Amostra: 10 µg/placa de NTC-LQES + 1-Nitropireno (2h)						
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	22	24	17	21	3,6	
10	27	28	23	26	2,6	1,2
30	29	43	40	37	7,4	1,8
100	75	66	62	68	6,7	3,2
300	268	194	252	238	38,9	11,3
1000	730	764	668	721	48,7	34,3
Potência da curva	623		colônias revertentes/µg de 1-NP			

Amostra: 10 µg/placa de NTC-LQES + 1-Nitropireno (4h)						
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	31	24	34	30	5,1	
10	10	22	16	16	6,0	0,5
30	29	20	28	26	4,9	0,9
100	63	53	49	55	7,2	1,9
300	288	240	278	269	25,3	9,1
1000	674	715	598	662	59,4	22,3
Potência da curva	Não aplicável ao modelo Berstein					

Amostra: 10 µg/placa de NTC-LQES + 1-Nitropireno (6h)						
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	27	11	19	19	8,0	
10	18	30	23	24	6,0	1,2
30	28	37	33	33	4,5	1,7
100	58	52	83	64	16,4	3,4
300	223	195	236	218	21,0	11,5
1000	801	664	916	794	126,2	41,8
Potência da curva	681	colônias revertentes/µg de 1-NP				

Apêndice 4 – Dados brutos: Testes iniciais de comparação entre as amostras NTC1h e NTC12h

Condições de teste	
Método	ISO 16240/2005
Linhagem:	TA98
Período de pré-incubação	2 horas
Período de ultrassonicação da amostra de NTC	NTC1h:5min NTC12h:5min

TESTE 1 – Amostra NTC12h

Amostra: 10 µg/placa de NTC12h + 1-Nitropireno					
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	30	20	25	7,1	
10	29	23	26	4,2	1,0
30	29	40	35	7,8	1,4
100	104	71	88	23,3	3,5
300	164	202	183	26,9	7,3
1000	912	769	841	101,1	33,6
Potência da curva	680	colônias revertentes/µg de 1-NP			

Amostra: 25 µg/placa de NTC12h + 1-Nitropireno					
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	19	CONT.	19	-	
10	23	CONT.	23	-	1,2
30	34	36	35	1,4	1,8
100	61	43	52	12,7	2,7
300	117	122	120	3,5	6,3
1000	315	477	396	114,6	20,8
Potência da curva		360	colônias revertentes/µg de 1-NP		

Amostra: 50 µg/placa de NTC12h + 1-Nitropireno					
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	20	25	23	3,5	
10	26	27	27	0,7	1,2
30	24	20	22	2,8	1,0
100	49	30	40	13,4	1,8
300	67	65	66	1,4	2,9
1000	169	197	183	19,8	8,1
Potência da curva		160	colônias revertentes/µg de 1-NP		

Amostra: 1-Nitropireno					
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	20	18	19	1,4	
10	39	25	32	9,9	1,7
30	30	38	34	5,7	1,8
100	125	80	103	31,8	5,4
300	234	259	247	17,7	13,0
1000	1112	1268	1190	110,3	62,6
Potência da curva		750	colônias revertentes/µg de 1-NP		

TESTE 2- Amostra NTC1h

Amostra: 10 µg/placa de NTC1h + 1-Nitropireno					
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	20	36	28	11,3	
10	31	31	31	0,0	1,1
30	33	22	28	7,8	1,0
100	70	58	64	8,5	2,3
300	166	168	167	1,4	6,0
1000	566	542	554	17,0	19,8
Potência da curva		490	colônias revertentes/µg de 1-NP		

Amostra: 25 µg/placa de NTC1h + 1-Nitropireno					
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	30	16	23	9,9	
10	22	22	22	0,0	1,0
30	23	17	20	4,2	0,9
100	54	43	49	7,8	2,1
300	97	96	97	0,7	4,2
1000	331	382	357	36,1	15,5
Potência da curva		300	colônias revertentes/µg de 1-NP		

Amostra: 50 µg/placa de NTC1h + 1-Nitropireno					
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	31	20	26	7,8	
10	26	24	25	1,4	1,0
30	21	23	22	1,4	0,9
100	41	36	39	3,5	1,5
300	73	57	65	11,3	2,5
1000	244	219	232	17,7	9,1
Potência da curva		188	colônias revertentes/µg de 1-NP		

Amostra: 1-Nitropireno					
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	18	22	20	2,8	
10	29	28	29	0,7	1,4
30	57	36	47	14,8	2,3
100	130	100	115	21,2	5,8
300	257	219	238	26,9	11,9
1000	1029	1009	1019	14,1	51,0
Potência da curva		890	colônias revertentes/µg de 1-NP		

Apêndice 5 – Dados brutos: Comparação das amostras NTC1h, NTC12h, NTC24h

Condições de teste	
Método	ISO 16240/2005
Linhagem:	TA98
Período de pré-incubação	2 horas
Período de ultrassonicação da amostra de NTC	NTC1h:25min NTC12h:15min

TESTE 1

Amostra: 10 µg/placa de NTC1h + 1-Nitropireno						
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	19	27	22	23	4,0	
10	23	18		21	3,5	0,9
30	44	48		46	2,8	2,0
100	56	38		47	12,7	2,1
300	175	114		145	43,1	6,4
1000	969	884		927	60,1	40,9
Potência da curva		366				

Amostra: 25µg/placa de NTC1h + 1-Nitropireno						
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	19	27	27	24	4,6	
10	26	27		27	0,7	1,1
30	34	26		30	5,7	1,2
100	32	30		31	1,4	1,3
300	43	55		49	8,5	2,0
1000	263	275		269	8,5	11,1
Potencia da curva	rev/µg	77				

Amostra: 50 µg/placa de NTC1h + 1-Nitropireno						
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	23	18	23	21	2,9	
10	25	32		29	4,9	1,3
30	29	15		22	9,9	1,0
100	36	20		28	11,3	1,3
300	65	47		56	12,7	2,6
1000	145	181		163	25,5	7,6
Potencia da curva	rev/µg	129				

Amostra: 10 µg/placa de NTC12h + 1-Nitropireno						
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	15	23	18	19	4,0	
10	23	30		27	4,9	1,4
30	63	54		59	6,4	3,1
100	50	74		62	17,0	3,3
300	147	130		139	12,0	7,4
1000	1011	1040		1026	20,5	54,9
Potencia da curva	rev/µg	416				

Amostra: 25 µg/placa de NTC12h + 1-Nitropireno						
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	18	19	13	17	3,2	
10	17	24		21	4,9	1,2
30	35	34		35	0,7	2,1
100	30	CONT.		30		1,8
300	62	61		62	0,7	3,7
1000	370	317		344	37,5	20,6
Potencia da curva	rev/µg	146				

Amostra: 50 µg/placa de NTC12h + 1-Nitropireno						
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	20	20	19	20	0,6	
10	14	17		16	2,1	0,8
30	25	23		24	1,4	1,2
100	35	24		30	7,8	1,5
300	36	38		37	1,4	1,9
1000	180	145		163	24,7	8,3
Potencia da curva	rev/µg	68				

Amostra: 1-Nitropireno						
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	22	21	18	20	2,1	
10	25	28		27	2,1	1,3
30	75	77		76	1,4	3,7
100	86	CONT.		86		4,2
300	98	104		101	4,2	5,0
1000	1353	1359		1356	4,2	66,7
Potencia da curva	rev/µg	449				

TESTE 2

Amostra: 10 µg/placa de NTC1h + 1-Nitropireno						
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	53	67	58	59	7,1	
10	54	58		56	2,8	0,9
30	68	65		67	2,1	1,1
100	95	79		87	11,3	1,5
300	146	127		137	13,4	2,3
1000	397	457		427	42,4	7,2
Potencia da curva	rev/µg	337	colônias revertentes/µg de 1-NP			

Amostra: 25µg/placa de NTC1h + 1-Nitropireno						
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	67	51	53	57	8,7	
10	59	61		60	1,4	1,1
30	48	54		51	4,2	0,9
100	70	65		68	3,5	1,2
300	81	87		84	4,2	1,5
1000	247	221		234	18,4	4,1
Potência da curva	96		colônias revertentes/µg de 1-NP			

Amostra: 50 µg/placa de NTC1h + 1-Nitropireno						
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	48	52	49	50	2,1	
10	55	63		59	5,7	1,2
30	44	49		47	3,5	0,9
100	52	70		61	12,7	1,2
300	66	68		67	1,4	1,3
1000	136	137		137	0,7	2,7
Potência da curva	81		colônias revertentes/µg de 1-NP			

Amostra: 10 µg/placa de NTC12h + 1-Nitropireno						
Dose 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	45	35	58	46	11,5	
10	45	42		44	2,1	0,9
30	78	59		69	13,4	1,5
100	85	71		78	9,9	1,7
300	146	160		153	9,9	3,3
1000	432	499		466	47,4	10,1
Potência da curva	400		colônias revertentes/µg de 1-NP			

Amostra: 25 µg/placa de NTC12h + 1-Nitropireno						
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	52	41	54	49	7,0	
10	59	58		59	0,7	1,2
30	73	63		68	7,1	1,4
100	61	62		62		1,3
300	97	91		94	4,2	1,9
1000	297	322		310	17,7	6,3
Potência da curva	132		colônias revertentes/µg de 1-NP			

Amostra: 50 µg/placa de NTC12h + 1-Nitropireno						
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	49	57	50	52	4,4	
10	61	42		52	13,4	1,0
30	48	69		59	14,8	1,1
100	49	54		52	3,5	1,0
300	115	112		114	2,1	2,2
1000	216	233		225	12,0	4,3
Potência da curva		174	colônias revertentes/µg de 1-NP			

Amostra: 1-Nitropireno						
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	41	49	42	44	4,4	
10	58	48		53	7,1	1,2
30	89	103		96	9,9	2,2
100	120	128		124		2,8
300	167	254		211	61,5	4,8
1000	770	841		806	50,2	18,3
Potência da curva		689	colônias revertentes/µg de 1-NP			

TESTE 3

Amostra: 10 µg/placa de NTC1h + 1-Nitropireno						
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	27	18	16	20	5,9	
10	23	22		23	0,7	1,1
30	43	41		42	1,4	2,1
100	40	50		45	7,1	2,2
300	97	106		102	6,4	5,0
1000	350	356		353	4,2	17,4
Potência da curva		306	colônias revertentes/µg de 1-NP			

Amostra: 25µg/placa de NTC1h + 1-Nitropireno						
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	32	32	15	26	9,8	
10	31	28		30	2,1	1,1
30	33	36		35	2,1	1,3
100	43	36		40	4,9	1,5
300	52	45		49	4,9	1,8
1000	198	278		238	56,6	9,0
Potência da curva		146	colônias revertentes/µg de 1-NP			

Amostra: 50 µg/placa de NTC1h + 1-Nitropireno						
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	20	24	23	22	2,1	
10	20	18		19	1,4	0,9
30	28	21		25	4,9	1,1
100	39	31		35	5,7	1,6
300	36	39		38	2,1	1,7
1000	103	98		101	3,5	4,5
Potência da curva		74	colônias revertentes/µg de 1-NP			

Amostra: 10 µg/placa de NTC12h + 1-Nitropireno						
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	24	21	29	25	4,0	
10	26	24		25	1,4	1,0
30	54	61		58	4,9	2,3
100	57	47		52	7,1	2,1
300	94	147		121	37,5	4,9
1000	514	490		502	17,0	20,4
Potência da curva		316	colônias revertentes/µg de 1-NP			

Amostra: 25 µg/placa de NTC12h + 1-Nitropireno						
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	18	24	25	22	3,8	
10	35	24		30	7,8	1,3
30	43	47		45	2,8	2,0
100	39	38		39		1,7
300	87	75		81	8,5	3,6
1000	225	284		255	41,7	11,4
Potência da curva		212	colônias revertentes/µg de 1-NP			

Amostra: 50 µg/placa de NTC12h + 1-Nitropireno						
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	29	14	14	19	8,7	
10	23	18		21	3,5	1,1
30	39	24		32	10,6	1,7
100	39	38		39	0,7	2,0
300	39	37		38	1,4	2,0
1000	185	216		201	21,9	10,6
Potência da curva		124	colônias revertentes/µg de 1-NP			

Amostra:		1-Nitropireno				
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	33	23	26	27	5,1	
10	32	25		29	4,9	1,0
30	70	55		63	10,6	2,3
100	84	69		77	10,6	2,8
300	190	147		169	30,4	6,2
1000	467	658		563	135,1	20,6
Potência da curva		516	colônias revertentes/ μ g de 1-NP			

TESTE 4

Amostra:		10 μg/placa de NTC1h + 1-Nitropireno				
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	26	31	22	26	4,5	
10	17	19		18	1,4	0,7
30	41	47		44	4,2	1,7
100	58	43		51	10,6	1,9
300	168	115		142	37,5	5,4
1000	343	375		359	22,6	13,6
Potência da curva		335	colônias revertentes/ μ g de 1-NP			

Amostra:		25 μg/placa de NTC1h + 1-Nitropireno				
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	26	23	27	25	2,1	
10	23	25		24	1,4	0,9
30	33	36		35	2,1	1,4
100	44	31		38	9,2	1,5
300	104	74		89	21,2	3,5
1000	210	265		238	38,9	9,4
Potência da curva		208	colônias revertentes/ μ g de 1-NP			

Amostra:		50 μg/placa de NTC1h + 1-Nitropireno				
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	18	20	27	22	4,7	
10	19	26		23	4,9	1,0
30	31	32		32	0,7	1,5
100	37	34		36	2,1	1,6
300	58	40		49	12,7	2,3
1000	165	87		126	55,2	5,8
Potência da curva		101	colônias revertentes/ μ g de 1-NP			

Amostra: 10 µg/placa de NTC12h + 1-Nitropireno						
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	21	22	24	22	1,5	
10	39	33		36	4,2	1,6
30	40	54		47	9,9	2,1
100	54	41		48	9,2	2,1
300	153	106		130	33,2	5,8
1000	470	581		526	78,5	23,5
Potência da curva		320	colônias revertentes/µg de 1-NP			

Amostra: 25 µg/placa de NTC12h + 1-Nitropireno						
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	28	23	19	23	4,5	
10	26	35		31	6,4	1,3
30	24	29		27	3,5	1,1
100	38	28		33	7,1	1,4
300	111	72		92	27,6	3,9
1000	349	353		351	2,8	15,0
Potência da curva		186	colônias revertentes/µg de 1-NP			

Amostra: 50 µg/placa de NTC12h + 1-Nitropireno						
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	22	32	23	26	5,5	
10	40	23		32	12,0	1,2
30	28	18		23	7,1	0,9
100	37	32		35	3,5	1,3
300	41	47		44	4,2	1,7
1000	171	173		172	1,4	6,7
Potência da curva		115	colônias revertentes/µg de 1-NP			

Amostra: 10 µg/placa de NTC24h + 1-Nitropireno						
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	21	34	18	24	8,5	
10	21	32		27	7,8	1,1
30	44	63		54	13,4	2,2
100	71	45		58	18,4	2,4
300	182	104		143	55,2	5,9
1000	410	604		507	137,2	20,8
Potência da curva		441	colônias revertentes/µg de 1-NP			

Amostra: 25µg/placa de NTC24h + 1-Nitropireno						
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	22	30	29	27	4,4	
10	29	32		31	2,1	1,1
30	CONT.	21		21		0,8
100	CONT.	44		44		1,6
300	116	82		99	24,0	3,7
1000	311	179		245	93,3	9,1
Potência da curva		222	colônias revertentes/µg de 1-NP			

Amostra: 50 µg/placa de NTC24h + 1-Nitropireno						
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	20	29	19	23	5,5	
10	17	27		22	7,1	1,0
30	29	32		31	2,1	1,3
100	48	53		51	3,5	2,2
300	59	68		64	6,4	2,8
1000	227	164		196	44,5	8,6
Potência da curva		166	colônias revertentes/µg de 1-NP			

Amostra: 1-Nitropireno						
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	24	29	27	27	2,5	
10	32	46		39	9,9	1,5
30	52	70		61	12,7	2,3
100	88	86		87	1,4	3,3
300	145	161		153	11,3	5,7
1000	593	CONT.		593		22,2
Potência da curva		496	colônias revertentes/µg de 1-NP			

TESTE 5

Amostra: 10 µg/placa de NTC1h + 1-Nitropireno						
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	13	17	20	17	3,5	
10	14	15		15	0,7	0,9
30	19	23		21	2,8	1,3
100	41	34		38	4,9	2,3
300	98	145		122	33,2	7,3
1000	391	533		462	100,4	27,7
Potência da curva		378	colônias revertentes/µg de 1-NP			

Amostra: 25 µg/placa de NTC1h + 1-Nitropireno						
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	14	17	20	17	3,0	
10	22	14		18	5,7	1,1
30	22	23		23	0,7	1,3
100	26	23		25	2,1	1,4
300	48	51		50	2,1	2,9
1000	251	160		206	64,3	12,1
Potência da curva		150	colônias revertentes/µg de 1-NP			

Amostra: 50 µg/placa de NTC1h + 1-Nitropireno						
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	12	21	16	16	4,5	
10	16	17		17	0,7	1,0
30	21	23		22	1,4	1,3
100	30	31		31	0,7	1,9
300	41	28		35	9,2	2,1
1000	81	70		76	7,8	4,6
Potência da curva		60	colônias revertentes/µg de 1-NP			

Amostra: 10 µg/placa de NTC12h + 1-Nitropireno						
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	19	19	15	18	2,3	
10	23	28		26	3,5	1,4
30	23	23		23	0,0	1,3
100	60	46		53	9,9	3,0
300	73	50		62	16,3	3,5
1000	226	451		339	159,1	19,2
Potência da curva		234	colônias revertentes/µg de 1-NP			

Amostra: 25 µg/placa de NTC12h + 1-Nitropireno						
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	19	13	17	16	3,1	
10	13	23		18	7,1	1,1
30	22	20		21	1,4	1,3
100	21	29		25	5,7	1,5
300	59	51		55	5,7	3,4
1000	240	234		237	4,2	14,5
Potência da curva		173	colônias revertentes/µg de 1-NP			

Amostra: 50 µg/placa de NTC12h + 1-Nitropireno						
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	16	27	15	19	6,7	
10	18	19		19	0,7	1,0
30	25	26		26	0,7	1,3
100	26	25		26	0,7	1,3
300	26	23		25	2,1	1,3
1000	44	42		43	1,4	2,2
Potência da curva		24	colônias revertentes/µg de 1-NP			

Amostra: 10 µg/placa de NTC24h + 1-Nitropireno						
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	19	19	18	19	6,2	
10	23	33		28	7,1	1,5
30	28	34		31	4,2	1,7
100	61	78		70	12,0	3,7
300	153	189		171	25,5	9,2
1000	740	707		724	23,3	38,8
Potência da curva		500	colônias revertentes/µg de 1-NP			

Amostra: 25µg/placa de NTC24h + 1-Nitropireno						
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	16	26	26	23	5,8	
10	22	24		23	1,4	1,0
30	36	26		31	7,1	1,4
100	42	43		43	0,7	1,9
300	74	100		87	18,4	3,8
1000	289	486		388	139,3	17,1
Potência da curva		291	colônias revertentes/µg de 1-NP			

Amostra: 50 µg/placa de NTC24h + 1-Nitropireno						
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	23	18	cont.	21	3,5	
10	19	25		22	4,2	1,1
30	16	24		20	5,7	1,0
100	32	20		26	8,5	1,3
300	45	52		49	4,9	2,4
1000	155	135		145	14,1	7,1
Potência da curva		115	colônias revertentes/µg de 1-NP			

Amostra:	1-Nitropireno					
Dose (ng/placa) 1-Nitropireno	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	Taxa de mutagenicidade
0	14	19	15	16	2,6	
10	29	35		32	4,2	2,0
30	32	26		29	4,2	1,8
100	81	83		82	1,4	5,1
300	182	185		184	2,1	11,5
1000	702	966		834	186,7	52,1
Potência da curva		683	colônias revertentes/ μ g de 1-NP			

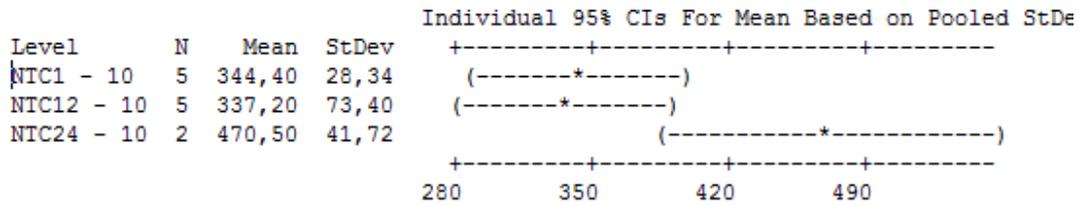
Apêndice 6 – Resultados estatísticos

Para dose de 10µg de NTC/placa

One-way ANOVA: NTC1 - 10; NTC12 - 10; NTC24 - 10

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	2	28166	14083	4,78	0,038
Error	9	26502	2945		
Total	11	54669			

S = 54,27 R-Sq = 51,52% R-Sq(adj) = 40,75%

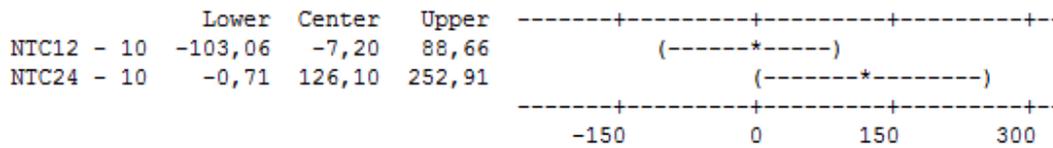


Pooled StDev = 54,27

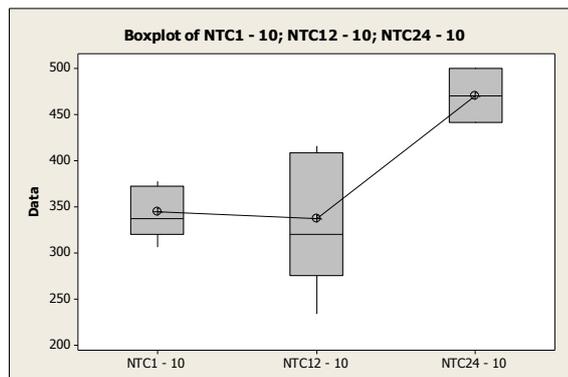
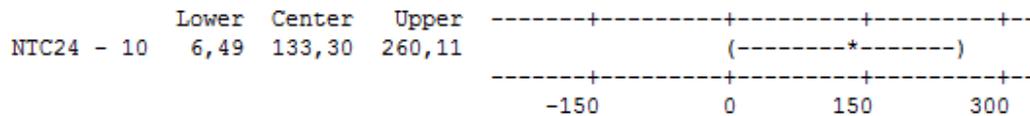
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons

Individual confidence level = 97,91%

NTC1 - 10 subtracted from:



NTC12 - 10 subtracted from:

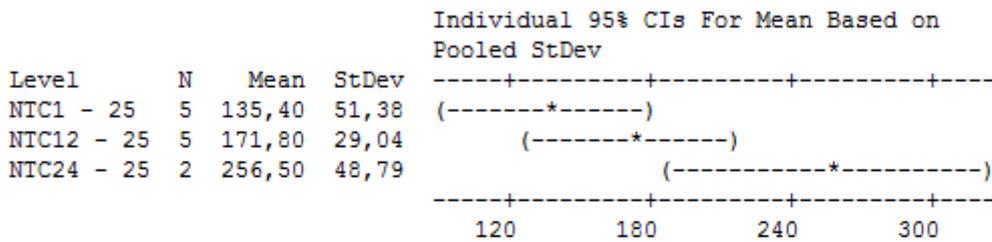


Dose de 25µg de NTC/placa

One-way ANOVA: NTC1 - 25; NTC12 - 25; NTC24 - 25

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	2	20960	10480	5,78	0,024
Error	9	16313	1813		
Total	11	37272			

S = 42,57 R-Sq = 56,23% R-Sq(adj) = 46,51%

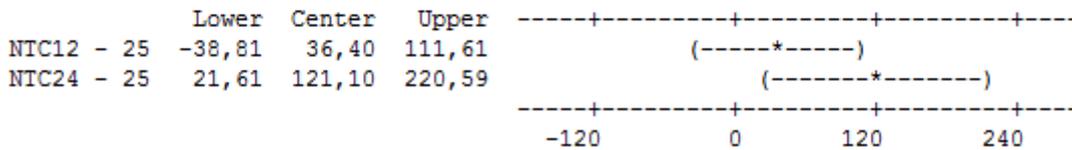


Pooled StDev = 42,57

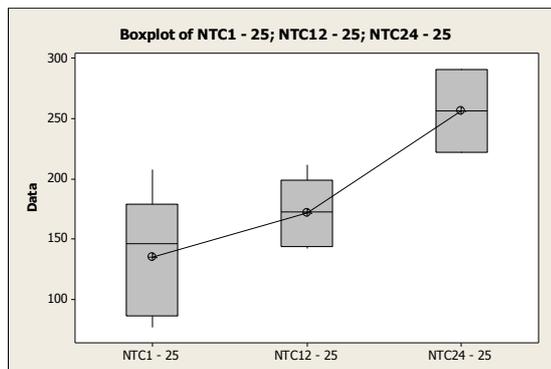
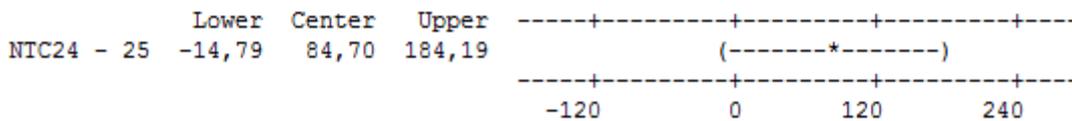
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals All Pairwise Comparisons

Individual confidence level = 97,91%

NTC1 - 25 subtracted from:



NTC12 - 25 subtracted from:

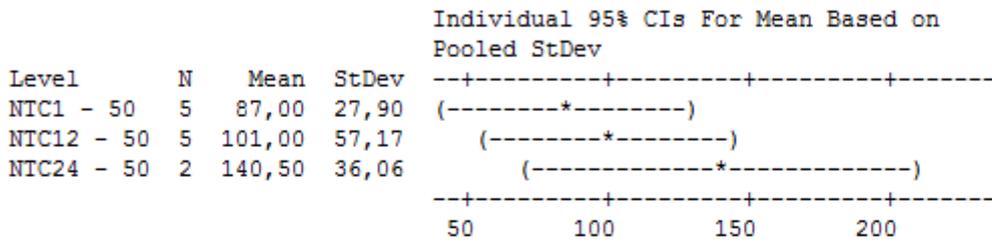


Dose de 50µg de NTC/placa.

One-way ANOVA: NTC1 - 50; NTC12 - 50; NTC24 - 50

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	2	4094	2047	1,05	0,388
Error	9	17487	1943		
Total	11	21580			

S = 44,08 R-Sq = 18,97% R-Sq(adj) = 0,96%

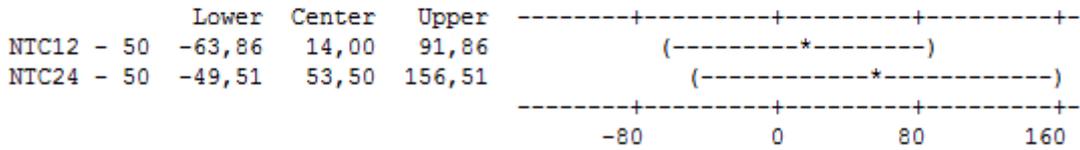


Pooled StDev = 44,08

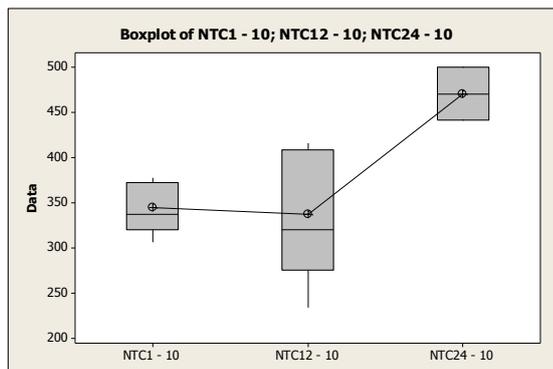
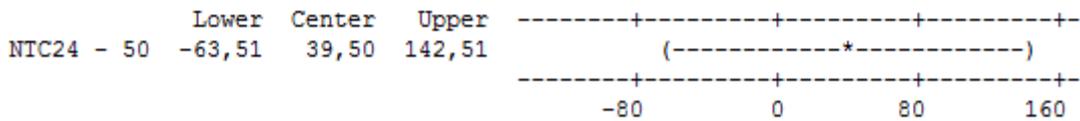
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons

Individual confidence level = 97,91%

NTC1 - 50 subtracted from:



NTC12 - 50 subtracted from:



ANEXO

Anexo 1 – Ausência de mutagenicidade da amostra NTC-LQES

Tradução de Umbuzeiro *et al*, 2011.

Média de colônias revertentes/placa ± DP ^a (TM ^b)					
Ausência de S9					
	TA97	TA98	TA100	TA1535	TA102
0	191±7	28±8	245±9	32±4	260±14
1	203±20 (1.1)	33±13 (1.2)	241±28 (1.0)	34±2 (1.1)	243±39 (0.9)
4	199±15 (1.0)	35 ±8 (1.2)	270±9 (1.1)	29±7 (0.9)	285±23 (1.1)
10	182±7 (1.0)	27±5 (1.0)	275±39 (1.1)	33±6 (1.0)	261±33 (1.0)
40	180±8 (0.9)	35 ±8 (1.3)	229±27 (0.9)	44±8 (1.4)	263±27 (1.0)
100	191±11 (1.0)	30 ±4 (1.1)	210±27 (0.9)	31±3 (1.0)	210±37 (0.8)
Controle Positivo^c	872±109(4.6)	42±63 (15.1)	563±71 (2.3)	565±44 (17.6)	2609±475 (10.2)

^a DP desvio padrão

^b TM Taxa de mutagenicidade (Revertentes espontâneos + induzidos/ revertentes espontâneos)

^c 1 and 0.5 µg 4-Nitroquinolina-1-óxido/placa para TA97 and TA98 respectivamente, 0.5 e 1 µg azida sódica/placa para TA100 e TA 1535 respectivamente, e 0.5 µg Mitomicina C/placa para TA102.

Média de colônias revertentes/placa ± DP ^a (TM ^b)					
Presença de S9					
	TA97	TA98	TA100	TA1535	TA102
0	217±88	31±8	134±17	19±4	225±24
1	259±63 (1.2)	32±11 (1.0)	136±26 (1.0)	24±11(1.3)	228±43 (1.0)
4	188±39 (0.9)	38±3 (1.2)	152±16 (1.1)	17±4 (0.9)	214±36 (0.9)
10	243±20 (1.1)	28±5 (0.9)	131±26 (1.0)	30±5 (1.6)	191±47 (0.8)
40	243±26 (1.1)	31±2 (1.0)	145±23 (1.1)	17±15 (0.9)	184±44 (0.8)
100	216±11 (1.0)	31±10 (1.0)	134±27 (1.0)	32±12 (1.7)	206±36 (0.9)
Controle Positivo^c	570±153 (2.6)	173±12 (5.6)	2688±640 (20.1)	135±19 (7.3)	472±19 (2.1)

^a DP desvio padrão

^b TM Taxa de mutagenicidade (Revertentes espontâneos + induzidos/ revertentes espontâneos)

^c 5 µg 2-Aminofluoreno/placa para TA97 e 2-aminoanthraceno A para TA98 (0.5 µg/placa), TA100, TA1535 (1 µg/placa), e TA102 (0,5 µg/placa).