

## CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DE NANOTUBOS DE CARBONO

**Leonardo P. Franchi e Raquel A. Santos**

Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, 14049-900 Ribeirão Preto – SP, Brasil

**Elaine Y. Matsubara, Juliana C. de Lima e J. Maurício Rosolen\***

Departamento de Química, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, 14040-901 Ribeirão Preto – SP, Brasil

**Catarina S. Takahashi**

Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, 14040-901 Ribeirão Preto - SP / Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, 14049-900 Ribeirão Preto – SP, Brasil

Recebido em 2/5/11; aceito em 6/9/11; publicado na web em 8/11/11

CYTOTOXICITY AND GENOTOXICITY OF CARBON NANOTUBES. There are many controversies regarding the cyto- and genotoxicity of carbon nanotubes (CNTs). In this work, we discuss that many of the incongruous arguments are probably associated with the poor physical-chemical characterization of the CNT samples used in many publications. This manuscript presents examples of carbon nanostructures observed under high resolution electron microscopy that can be found in typical CNT samples, and shows which roles in cyto- and genotoxicity need to be better investigated. Issues concerning chemical treatment are addressed and examples of misunderstandings that can occur during the studies of cyto- and genotoxicity of CNT samples are given.

Keywords: cell viability; DNA damage; carbon nanotube samples.

### INTRODUÇÃO

A ideia de nanotecnologia como uma ciência de manipulação molecular ou de escala nanométrica sempre foi um fascínio para muitos pesquisadores. Feynman em 1959 e Drexler em 1986 já chamavam a atenção da comunidade científica com relação à nanotecnologia.<sup>1,2</sup> Com os avanços da microscopia e de outras técnicas, a nanotecnologia se tornou nos últimos 10 anos uma das áreas mais importantes da ciência e da inovação tecnológica com projeções comerciais estimadas para 2015 em um trilhão de dólares.<sup>3,4</sup>

Nesse contexto a Nanotoxicologia desempenha um papel importante, pois investiga os efeitos dos nanodispositivos e nanoestruturas em sistemas biológicos.<sup>5</sup> A avaliação toxicológica de partículas e fibras em escala nanométrica<sup>6</sup> contribui para uma série de questões ligadas à utilização de nanomateriais em produtos comerciais. Sendo assim, o entendimento dos mecanismos de cito- e genotoxicidade de um dado nanomaterial é fundamental para a definição de seu impacto ambiental e de estratégias de proteção aos trabalhadores e consumidores.<sup>7</sup>

O presente artigo apresenta uma revisão de estudos realizados sobre a eventual indução de danos às células e ao DNA (citotoxicidade e genotoxicidade, respectivamente) por nanotubos de carbono (NTCs), conduzidos em experimentos *in vitro*. Na literatura existente é possível detectar várias controvérsias e questões que ainda precisam ser esclarecidas já que algumas dessas nanoestruturas se apresentam biocompatíveis. Recentes estudos demonstraram, por exemplo, que a enzima mieloperoxidase presente em neutrófilos humanos é capaz de degradar nanotubos de carbono de parede simples (NTCPS) e que os produtos da biodegradação dos NTCs não induziram inflamação quando expostos aos pulmões de camundongo.<sup>8-12</sup>

Embora haja um conflito sobre o mérito do descobrimento dos NTCs,<sup>13</sup> o fato é que esses são um dos nanomateriais mais fascinantes

e estudados nas últimas duas décadas. Um NTCPS pode ser descrito basicamente como uma folha de grafeno enrolada e fechada em cada extremidade por metade de um fullereno. Quando várias folhas de grafeno constituem a parede do tubo os mesmos são classificados como NTCs de parede múltiplas (NTCPM).<sup>14</sup> Os NTCs apresentam diâmetros normalmente na faixa de 0,7 a 100 nm e comprimento que pode atingir dezenas de microns. Diferentemente de nanofibras de carbono, os NTCs têm como característica marcante a presença de um canal central vazio no qual é possível hospedar várias espécies químicas, podendo assim formar inúmeros compostos de inserção ou intercalação.<sup>15</sup>

Visualmente as amostras de NTCs apresentam-se na forma de material particulado, ou seja, um pó de aspecto preto similar ao carbono amorfo que se encontra aglomerado formando estruturas muito mais densas do que as observadas tradicionalmente em negro de fumo, um aditivo usado em polímeros, tintas, pneus, etc. Esse aspecto é observado tanto para amostras contendo NTCPS quanto NTCPM (Figura 1).

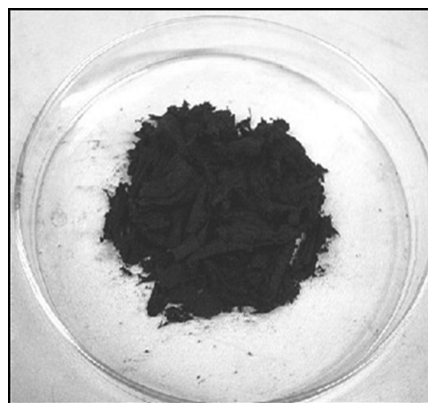


Figura 1. Fotografia de material particulado contendo nanotubos de carbono

\*e-mail: rosolen@ffclrp.usp.br

A importância dos estudos de cito- e genotoxicidade dos NTCs ocorre porque centenas de publicações sugerem que esse nanomaterial poderá vir a ser utilizado em baterias de íons de lítio, supercapacitores, células a combustível, células fotovoltaicas, em catálise heterogênea, desenvolvimento de membranas para captura de CO<sub>2</sub>,<sup>16</sup> materiais compósitos poliméricos,<sup>17,18</sup> filtros para a remoção de vários compostos orgânicos voláteis e tratamento de efluentes,<sup>19,20</sup> materiais micro/nanoestruturados<sup>21,22</sup> e várias outras aplicações tecnológicas.<sup>23</sup>

Estudos também têm demonstrado que NTCs podem afetar o crescimento de plantas, atuando como um eventual adubo.<sup>24,25</sup>

Na área biomédica os NTCs são estudados visando à produção ou melhoria de biomateriais, tais como próteses para artroplastia, placas ou parafusos para fixação de fraturas, suportes para a regeneração óssea, sistemas de entrega de drogas, sensores químicos e biológicos, suporte para enzimas em biorreatores, entre outros. Os NTCs se mostram bastante eficientes como vetores de agentes de contraste para imagens por ressonância.<sup>26,27</sup> Curiosamente, a absorção óptica intrínseca de NTCPS e NTCPM tem sido explorada para matar células cancerosas com efeito foto-térmico usando radiação no *infravermelho* próximo.<sup>28,29</sup> Os mesmos ainda são promissores para aplicação na engenharia de tecidos ósseos e no crescimento de células neurais.<sup>30,32</sup>

A indústria farmacêutica tem grande interesse no uso de NTCs como transportador molecular (proteínas, ácidos nucleicos e outras moléculas bioativas) com grande seletividade - *drug delivery*. Assim, os NTCs podem atuar como efetivo veículo de agentes terapêuticos no tratamento de tumores e outras doenças.<sup>33</sup> Essa capacidade de transportar drogas foi demonstrada para o antitumoral doxorubicina acoplada a NTCPS, onde se verificou uma eficiente inibição da proliferação de células de câncer cervical (HeLa). Os pesquisadores concluíram que esse sistema de entrega de drogas em nanoescala é mais seletivo e eficaz do que o próprio fármaco livre, pode reduzir a quantidade de droga a ser aplicada e os efeitos colaterais nos pacientes.<sup>34</sup> Além disso, o transporte e a entrega de siRNA (*silencing RNA*) por NTC em células HeLa foi realizado com sucesso e o silenciamento dos genes *lamina A/C* foi mais eficiente com NTCPS do que com o agente de transfecção lipofectamina. NTCPS também foram estudados como um sistema de carregamento de proteínas (por meio de um complexo de nanotubo-proteína citocromo C).<sup>35</sup> Este tipo de NTC também foi utilizado com sucesso para liberação de acetilcolina, no cérebro, no tratamento de camundongos com a doença de Alzheimer.<sup>36</sup>

Assim, essas dezenas de aplicações podem vir a consumir toneladas de NTC e mostram que os mesmos são efetivamente de grande interesse tecnológico sendo, portanto, importante para nanofarmacologia e a nanomedicina a realização de estudos de cito- e genotoxicidade de amostras de NTCs.

## NANOTUBOS DE CARBONO E PENETRAÇÃO CELULAR

Um dos fatores que deve ser levado em consideração nos estudos de cito- e genotoxicidade de NTCs relaciona-se à sua capacidade de penetrar as barreiras biológicas de mamíferos, plantas e microorganismos. Os mecanismos de captação de materiais em nanoescala e sua influência sobre a toxicidade devem ser estudados porque podem criar um nível de imprevisibilidade tóxica.<sup>37,38</sup>

Para os NTCs considera-se a penetração celular por endocitose/fagocitose ou nanopenetração. Endocitose representa o engolfamento de uma partícula extracelular pela célula, por exemplo, um vírus (~100 nm, em tamanho), pela criação de uma vesícula que é, então, integrada à célula. Fagocitose é semelhante à endocitose, mas geralmente envolve a captação de partículas maiores, tais como bactérias (~1 µm), e é característica de um subgrupo de células imunes - fagócitos (p.ex. neutrófilos, macrófagos, células dendríticas). Esses processos

são dependentes de energia e não ocorrem em baixas temperaturas e em ambientes com baixos níveis de ATP.<sup>39</sup> Vários estudos indicam a endocitose/fagocitose como o mecanismo de absorção celular de aglomerados de NTCs.<sup>40-43</sup> Acredita-se que esses aglomerados são absorvidos pelas células por endocitose dependente de energia e, por isso, visualizados dentro dos endossomos em imagens de microscopia eletrônica.<sup>44</sup> Por sua vez, tais aglomerados dentro dos endossomos podem liberar NTC individualizados, os quais então atravessam a membrana do endossomo e escapam para o citoplasma. Todavia, as dimensões dos aglomerados não foram descritas nos trabalhos mencionados, ou seja, ainda não foram estabelecidas as dimensões mínima e máxima para o processo de fagocitose de amostras de NTCs.

Por outro lado, a nanopenetração é um processo passivo independente de energia e, neste caso, os NTCs se difundem através da membrana celular. Assim, NTCs bem dispersos (individualizados) provavelmente atravessam a membrana celular e entram nas células diretamente através da nanopenetração.

Também existe a hipótese de que os NTCs poderiam se comportar similarmente a peptídeos de penetração celular, os quais representam sequências poli-catiônicas que aumentam a absorção de proteínas em células de mamíferos.<sup>42</sup>

O comprimento dos tubos é outra variável que também tem influência na penetração celular.<sup>44,45</sup> Por exemplo, os NTCs mais curtos (~0,22 µm de comprimento) são integrados com mais facilidade aos fagócitos e macrófagos do que os mais longos (0,8 µm). Tubos menores parecem provocar menos danos do que aqueles com dimensão da ordem de 1 micron.<sup>46,47</sup> Enfim, deve ser mencionado que alguns trabalhos descrevem que os NTCs penetram nas células, sem entrar no núcleo,<sup>48,50</sup> enquanto outros constataram a entrada no núcleo<sup>42,51-53</sup> e, ainda, que essa entrada pode ser reversível.<sup>54</sup> Em análises realizadas por microscopia eletrônica os NTCs são encontrados principalmente nos lisossomos e nas mitocôndrias.<sup>36</sup>

## CITOTOXICIDADE DE NANOTUBOS DE CARBONO

Um dos primeiros trabalhos conduzidos em relação à toxicidade *in vitro* de NTCs foi realizado com NTCPS. As exposições às linhagens de células humanas HaCat (queratinócitos) e células epiteliais dos brônquios resultaram em geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), peroxidação de lipídios, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e mudanças na morfologia celular.<sup>55</sup>

A toxicidade de substâncias pode ser avaliada tanto em culturas de células (*in vitro*) quanto em organismos vivos (*in vivo*) como peixes, ratos e camundongos. A maioria das pesquisas toxicológicas baseia-se primeiramente em testes *in vitro* para direcionar o caminho para futuros estudos *in vivo*. Os testes *in vitro* não exigem o uso de animais e, portanto não necessitam passar por comitê de ética, além de apresentarem um custo relativamente baixo quando comparados aos testes *in vivo*.

## Ensaios de viabilidade celular

Para a avaliação da viabilidade celular existe uma variedade de métodos aplicados e bem descritos na literatura como, por exemplo, os métodos baseados em reações bioquímicas: MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-YL)-2,5-difeniltetrazólio], XTT [2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida], WST (tetrazólio solúvel em água) que são marcadores para atividade enzimática das mitocôndrias; e LDH (lactato desidrogenase) que é um marcador de lise celular. Uma plethora de trabalhos com esses protocolos têm sido realizados. A comparação dos resultados apresentados na literatura representa uma difícil tarefa, pois além da falta de amostras de NTCs bem caracterizadas, as respostas biológicas

também são influenciadas pelo tipo celular, densidade de células, meio de cultivo e método de dispersão dos NTCs utilizados nos estudos.<sup>56</sup>

Somando-se a esses fatos, existe uma questão metodológica de extrema importância: os NTCs podem interagir com os corantes dos ensaios de viabilidade celular *Coomassie blue*, *Alamar Blue* e *neutral red*.<sup>57-59</sup> Evidências espectroscópicas demonstraram que NTCPs podem interagir diretamente com MTT.<sup>60</sup> Esta interferência não afeta diretamente a reação enzimática, mas o produto da metabolização do MTT (um corante insolúvel em água denominado formazam) pelas enzimas desidrogenases mitocondriais, que é adsorvido sobre a superfície de NTCPs, reduz a concentração desse corante e altera a leitura em espectrofotometria, ou seja, o indicador do número de células vivas.<sup>57</sup> Já para os testes WST-8, XTT e LDH (baseados em sais solúveis em água) não foi confirmada a interação com os NTCs.<sup>59</sup> Portanto, é necessário precaução na interpretação dos dados oriundos dessas metodologias e orienta-se que haja uma descrição detalhada e consistente do protocolo utilizado nos experimentos conduzidos com NTCs, bem como a aplicação independente de mais de um teste de viabilidade.<sup>62-66</sup>

### Ensaio clonogênico

O ensaio clonogênico tem se mostrado o método mais confiável para a avaliação da toxicidade *in vitro* de NTCs.<sup>67-70</sup> O ensaio não utiliza corantes celulares, assim não há a interação bioquímica com as partículas testadas. Além disso, diferente dos testes de viabilidade que mensuram um efeito biológico específico, este é um ensaio *in vitro* baseado na capacidade de uma única célula crescer e se tornar uma colônia, detectando assim morte celular reprodutiva, um efeito biológico mais amplo.<sup>71</sup>

O efeito de quatro diferentes tipos de amostras de NTCPM foi avaliado nas linhagens A549 (células de pulmão humano), NHIK3025 (células de carcinoma de cérvix humano) e RBE4 (células endoteliais de cérebro de rato). As amostras contendo NTCPM induziram uma diminuição do número de colônias, principalmente em células RBE4 em baixas concentrações que variaram de 5 a 20 µg/mL. O maior efeito foi observado para amostras de NTCPM com diâmetro de cerca de 50 nm.<sup>69</sup> Um outro trabalho usando amostra de NTCPs mostrou uma redução do número de colônias de células epiteliais de pulmão humano (BEAS-2B) e HaCaT.<sup>72</sup>

Com o uso do ensaio clonogênico é possível distinguir os efeitos de proliferação celular incluindo o tamanho da colônia como um parâmetro adicional. Por meio de uma análise quantitativa do tamanho das colônias, foi verificado que amostra de NTCPs diminuem o tamanho das colônias em três linhagens (BEAS-2B, HaCaT e A549).<sup>72</sup> Os NTCs presentes em meio de cultivo celular podem adsorver nutrientes necessários para o crescimento e manutenção celular e, portanto, reduzem a formação de colônias, sendo o tamanho das colônias a principal consequência. Sabe-se que as células em ambiente com deficiência de nutrientes respondem diminuindo a proliferação celular e que no ensaio podem ser detectadas como colônias de tamanho reduzido.<sup>67,73</sup>

Essa depleção foi comprovada por estudos de espectroscopia no qual NTCPs foram dispersos em meio de cultura comercial e então removidos do meio por ultracentrifugação e filtração. O esgotamento de nutrientes do meio de cultura, devido à adsorção de biomoléculas, aparece como uma explicação dada pelos autores para a citotoxicidade indireta de NTCPs em células A549. Assim, é importante que essa citotoxicidade indireta seja diferenciada de uma citotoxicidade inerente aos nanomateriais.<sup>68</sup>

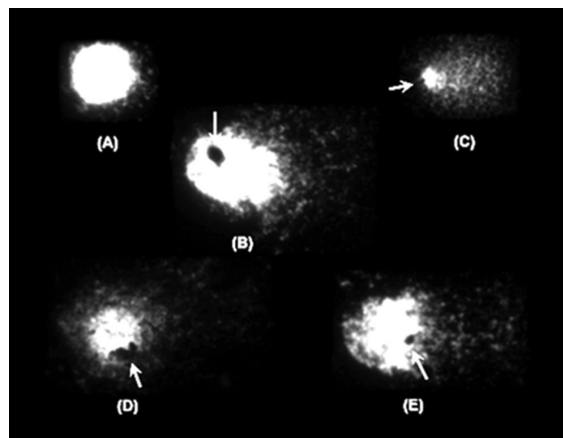
### GENOTOXICIDADE DE NANOTUBOS DE CARBONO

Estudos de genotoxicidade sugerem a existência de interação

direta entre NTCs e o DNA ou às proteínas relacionadas ao DNA que poderiam levar a danos físicos no material genético. Alternativamente, a genotoxicidade também tem sido associada com estresse oxidativo, inflamação e erro de sinalização celular.<sup>7</sup> Os catalisadores metálicos (usados no processo de síntese) têm sido apontados como a principal fonte dos efeitos genotóxicos, várias nanopartículas metálicas podem atuar como sítios para a geração de EROs.<sup>6</sup> O ataque oxidativo ao DNA tem se mostrado um dos principais efeitos que governam a genotoxicidade de amostras de NTCs contaminadas por metais.<sup>74-81</sup> Apesar de ser relativamente esperado que nanopartículas metálicas apresentem toxicidade, no caso dos NTCs não é possível saber se os efeitos são devidos a metais livres ou ligados ao carbono.

Existem ainda outros questionamentos que podem surgir da própria metodologia utilizada na investigação da genotoxicidade de NTCs. Entre os testes utilizados o mais empregado é o ensaio Cometa. O princípio do ensaio Cometa baseia-se na migração de fragmentos de DNA por eletroforese. O DNA (que possui carga negativa) migra em direção ao ânodo ao ser submetido a uma corrente elétrica, o que resulta em uma imagem que se parece com um cometa contendo duas partes: uma “cabeça” e uma “cauda”. Quanto maior o número de quebras na fita do DNA de uma célula, maior será sua cauda.<sup>82</sup>

A Figura 2A apresenta uma microfotografia de um nucleóide (DNA mais proteínas da matriz nuclear) de células de pulmão de hamster chinês (V79) que não foram tratadas com NTCPM, enquanto as Figuras 2B-E contêm amostras de NTCPM hidrofóbicos produzidos por deposição química de vapor, livre de metais e não submetidos a tratamento para remoção de carbono amorfo. Os nucleóides foram corados com iodeto de propídeo, que se intercala no DNA. As Figuras 2B-E mostram exemplos de nucleóides encontrados em uma análise de 50 nucleóides de células V79 tratadas com a concentração de 12,5 µg/mL de NTCPM e que induziu danos no DNA.



**Figura 2.** Ensaio Cometa com células de hamster chinês: controle negativo (sem tratamento com NTCPM - não há cauda) - (A); nucleóides de células tratadas com 12,5 µg/mL de NTCPM hidrofóbicos livres de metais (B-E), onde se pode evidenciar a presença de aglomerados de NTCs (indicados por setas brancas) e, também, cauda extensa indicativa de danos. A magnificação total é de 400× para as Figuras (A), (C), (D), (E) e 200× para (B) o aumento utilizado, geralmente, na análise, no qual os aglomerados não podem ser vistos com facilidade

Na literatura de genotoxicidade incluindo estudos com fulerenos e nanofibras<sup>82</sup> o que se observa é uma série de resultados divergentes. Por exemplo, a indução de quebras no DNA não foi verificada quando células mesoteliais foram expostas a amostras de NTCPs. No entanto, quando os danos oxidativos foram avaliados com o uso da enzima FPG (formamidopirimidina-DNA glicosilase - que reconhece bases oxidadas na molécula de DNA) um aumento significativo de danos foi

detectado.<sup>83</sup> O tratamento por 6 h com amostras de NTCPS também não induziu quebras no DNA de linfócitos humanos.<sup>84</sup>

Amostras de NTCPS com comprimento de 1,3 µm induziram quebras no DNA na dose de 96 µg/cm<sup>2</sup> após 3 e 24 h de exposição, em células de pulmão de hamster chinês (V79).<sup>85</sup> Uma mistura de NTCs (contendo ~50% de NTCPS) induziu um aumento dose-dependente de danos no DNA nas concentrações de 1 a 100 µg/cm<sup>2</sup>.<sup>86</sup> Também foram encontradas quebras no DNA, na dose de 25 µg/cm<sup>2</sup> de amostras de NTCPS e amostras de NTCPM,<sup>75,87</sup> outros dados detectaram indução significativa de quebras para amostras de NTCPS em concentrações ainda menores (5 e 10 µg/mL).<sup>88</sup> Curiosamente, um aumento significativo de quebras no DNA causadas por amostras de NTCPM em células A549 foi detectado, mas não foram detectadas lesões oxidativas do DNA, com o uso da enzima FPG.<sup>89</sup>

Uma grande variedade de técnicas citogenéticas, tais como Teste do Micronúcleo (MN), Troca de Cromátides Irmãs (SCE) e Aberrações Cromossômicas (CA), podem ser usadas com sucesso no monitoramento de exposição aos agentes genotóxicos. Relativamente poucos trabalhos investigaram os efeitos de NTCs utilizando-se tais técnicas e novamente é possível notar a existência de resultados conflitantes.<sup>86,90-97</sup>

A avaliação da genotoxicidade de NTCs é assim um desafio interdisciplinar e bastante complexo,<sup>98</sup> pois uma variedade de mecanismos pode influenciar no perfil genotóxico desses nanomateriais, tais como a interação de NTCs com os elementos estruturais da célula, ligação ao citoesqueleto, ao fuso mitótico, microtúbulos,<sup>51,86,94,99-101</sup> ao DNA telomérico<sup>102</sup> e às sequências de DNA ricas em GC nos cromossomos.<sup>102</sup> A exposição às amostras de NTCs pode acionar diferentes respostas celulares e a utilização de técnicas moleculares (ex.: *Western Blot*, RT-qPCR, *Microarray*, Citometria de Fluxo, etc.) também deve ajudar efetivamente na compreensão dos fenômenos relacionados à toxicidade destes materiais.<sup>7,74,75</sup>

## DOSIMETRIA NA NANOTOXICOLOGIA DE NANOTUBOS DE CARBONO

Como já citado, uma propriedade inerente aos NTCs é a sua hidrofobicidade e, portanto, uma propensão a se aglomerar especialmente sob condições fisiológicas. Além disso, NTCs são atraídos uns pelos outros por forças de van der Waals. Com relação à exposição humana, por conseguinte, é provável que na maioria das circunstâncias esses nanomateriais estejam sob a forma de aglomerados em vez de monodispersos.<sup>7</sup> Todavia, os testes de toxicidade *in vitro* geralmente envolvem a administração das substâncias testadas em um meio aquoso (água, tampão fosfato, meio de cultura), o que exige que as amostras de NTCs estejam bem dispersas no meio de cultura, assim a dispersão é importante pois afetará a dose que efetivamente entrará em contato com as células.<sup>103</sup>

Vários métodos vêm sendo utilizados para aumentar a dispersão dos NTCs em meio aquoso, e para tal fim a grande maioria dos NTCs disponíveis tem que ser submetida à funcionalização de suas superfícies ou, então, é necessária a utilização de surfactantes.<sup>104</sup> Como resultado a essas modificações, as respostas cito- e genotóxicas também são diferentes. Por exemplo, a dispersão de NTCs por meio da modificação química da superfície dos mesmos resultou em diminuição de toxicidade, ocasionada pelo aumento de funcionalização.<sup>104</sup> Em contrapartida, outros estudos mostraram que NTCs foram mais citotóxicos quando estabilizados com um surfactante.<sup>91</sup> O uso de surfactantes pode gerar um falso cenário de exposição, pois nem sempre estariam presentes nas situações de exposições fisiológicas.

Outro fator importante que deve ser considerado é que a maioria dos trabalhos publicados realizou a dispersão dos NTCs por sonicação. Diferentes aparelhos podem ser utilizados para este fim, por

exemplo, sonificador com sonda ou banho ultrassom. Dependendo do tempo e intensidade o processo de sonicação pode provocar quebras e a inserção de defeitos nos NTCs<sup>43,105</sup> alterando, conseqüentemente, a resposta biológica.

A forma como é realizada a exposição de amostras de NTCs às células é muito importante, pois a toxicologia é baseada em um conceito fundamental: o efeito dose-resposta, ou seja, um aumento de concentração ou dose implica em um aumento de cito- e genotoxicidade. Na toxicologia convencional, a dosimetria é baseada na concentração administrada (frequentemente massa por volume). No entanto, no caso de NTCs há um debate em relação à dosimetria, pois alguns estudos mostraram que não existe uma correlação direta entre massa de NTCs e o efeito cito- e genotóxico.<sup>86</sup> Neste sentido, novos indicadores vêm sendo propostos como parâmetro de efeito tóxico, entre eles o número de NTCs presentes no meio de exposição e não sua massa.<sup>106,107</sup> Já a área de superfície tem sido apontada como uma alternativa melhor para se entender a resposta celular de exposição aos NTCs, já que estaria correlacionada com a indução de estresse oxidativo no interior da célula.<sup>4,103,106,108</sup>

Outra questão que merece atenção se relaciona ao fato de que a maioria dos trabalhos tem utilizado doses que não necessariamente refletem a realidade de exposição aos nanomateriais. A avaliação da concentração de partículas por unidade de área sobre um determinado tecido dos seres vivos é relativamente difícil de ser obtida e em uma situação de exposição real poderá ser menor do que nos modelos de estudo em laboratório.<sup>8</sup>

## NANOTUBOS DE CARBONO E SUAS IMPUREZAS

Além dos problemas que as metodologias usadas para avaliação de cito- e genotoxicidade apresentam, é extremamente relevante definir nos trabalhos qual tipo de amostra de NTCs está sendo estudada. As propriedades dos NTCs dependem drasticamente da distribuição de diâmetro, comprimento e densidade de defeitos na parede ao longo do comprimento do tubo (p.ex. buracos, estruturas pentagonais e heptagonais ao invés de hexágonos). Esses parâmetros são estabelecidos e controlados pelo fornecedor dos NTCs e estas informações não são, necessariamente, apresentadas para quem adquire comercialmente as amostras. Há que se ressaltar que durante o processo de síntese de NTCs vários outros nanomateriais podem ser produzidos como carbono amorfo, nanografites, *onions* e fulerenos.<sup>109,110</sup>

Os NTCs podem conter impurezas metálicas, ou seja, catalisadores usados no seu crescimento (p.ex., Fe, Co, Ni, Mn, etc.). Dependendo do método de preparação os catalisadores podem ser observados nas extremidades, interior, nas paredes, presos em outras nanoestruturas e no interior de cavidades grafiticas, podendo estar ligados ou não a átomos de carbono.<sup>111</sup> Até o momento a maioria dos estudos sugere de uma forma mais consensual que os resíduos de catalisadores seriam responsáveis pela toxicidade apresentada nas amostras de NTCs.<sup>55</sup> Estes metais podem gerar EROs em sistemas biológicos induzindo a um estado de estresse oxidativo,<sup>48,49</sup> alterando assim a homeostase celular. Foram detectadas por alguns pesquisadores que amostras de NTCPS, contendo resíduos de ferro, possuem um alto potencial citotóxico em células de pulmão humano (A549)<sup>58</sup> e macrófagos pulmonares de camundongo (RAW 264.7),<sup>64</sup> embora esses ensaios de viabilidade celular tenham sido realizados por meio dos criticados métodos *Alamar blue*, *Neutral red* e MTT.<sup>65</sup> Já para amostras de NTCPS com baixa quantidade de ferro foram descritos níveis significativamente mais baixos de toxicidade.<sup>58,64</sup> Além disso, o tratamento de amostras de NTCPS não purificados com um quelante de ferro para remoção dos resíduos presentes demonstrou reduzir significativamente tanto a geração de oxidantes quanto a citotoxicidade.<sup>66</sup> Esses estudos com amostras contendo o metal ferro sugerem que o

efeito citotóxico de catalisadores metálicos depende da concentração e, possivelmente, da forma como estão associados aos NTCs. Entretanto, novamente a caracterização realizada nas amostras não permite dizer exatamente como estavam esses metais nas amostras de NTCs (extremidade dos tubos, enclausurados no canal central, dispersos em carbono amorfo, recobertos por camadas de grafeno, adsorvidos sobre as paredes, etc.).

A purificação química e a funcionalização são os tratamentos mais utilizados no preparo de amostras de NTCs para testes biológicos. No caso da purificação já é bem conhecido que a remoção dessas impurezas pode ser conduzida em grandes quantidades, porém a eliminação efetiva das várias impurezas depende muito da metodologia aplicada e esta quando não realizada com cuidado pode provocar uma série de defeitos estruturais, fracionamento e/ou destruição dos NTCs.<sup>112,113</sup> Dependendo do fornecedor ou do método usado na produção dos NTCs várias nanoestruturas podem estar presentes e os métodos de purificação nem sempre podem ser estendidos para qualquer tipo de amostra, pois a eficiência das metodologias pode depender muito das impurezas e do tipo de NTC da amostra. Por exemplo, a ação do ácido nítrico concentrado sobre os NTCs depende do seu diâmetro, densidade de defeitos, presença ou não de carbono amorfo, do empilhamento e número de camadas de grafeno que constituem a sua superfície.<sup>114-116</sup> O tratamento químico das amostras de NTCs é um fator importante na resposta celular. Por exemplo, NTCPM hidrofóbicos sem processamento pós-síntese apresentam menor toxicidade do que esta mesma amostra tratada com ácido nítrico.<sup>117</sup>

Essas variáveis também se aplicam para as várias metodologias de funcionalização, já que mesmo com os avanços obtidos a maioria dos tratamentos químicos pode gerar resíduos, fragmentos de tubos oxidados e fragmentos de carbonos carboxilados denominados *debris*,<sup>112,113</sup> ou outras nanoestruturas. Por exemplo, o uso de ácido nítrico concentrado pode gerar fragmentos de carbonos carboxilados *debris*, principalmente quando durante o processo de purificação não se remove o carbono amorfo das paredes dos tubos.<sup>114</sup> Esses *debris* interferem nos ensaios de cito- e genotoxicidade comprometendo as conclusões dos trabalhos. Isso significa que para utilização eficiente de métodos de purificação e funcionalização das amostras são necessários ajustes na concentração, tempo e temperatura dos tratamentos para que sejam gerados poucos *debris*.<sup>118</sup>

Nesse contexto fica claro que é importante fazer uma distinção entre cito- e genotoxicidade de “amostras de NTCs” e de “NTCs”, a primeira pode ser constituída de vários tipos de nanoestruturas de carbono ou mesmo nanopartículas metálicas, e não somente de NTCs. Sem uma correta avaliação das amostras (catalisador ligado ou livre, carbono amorfo, tipos de NTCs, outras nanoestruturas, influência da concentração de impurezas, etc.) torna-se difícil identificar os fatores que realmente estão governando o grau de toxicidade de amostras de NTCs e/ou de NTCs.

As Figuras 3 e 4 ilustram alguns tipos de impurezas que podem ser encontradas em amostras de NTCs e que certamente interferem nos resultados de cito- e genotoxicidade de NTCs.

A Figura 3 mostra uma típica microfotografia de varredura eletrônica de uma amostra particulada de NTCPM crescida sobre um substrato MgO por método de deposição química a vapor. A amostra cujo aspecto visual é aquele apresentado na Figura 1 é composta por uma aglomeração de tubos com vários diâmetros e comprimentos, cujas extremidades contêm partículas catalíticas que normalmente são facilmente removidas com a utilização de ácidos minerais como HCl ou HNO<sub>3</sub>, por exemplo.

A Figura 4 contém microfotografias de amostras de NTCPS coletadas em um microscópio de transmissão eletrônica de alta resolução e mostra outros tipos de impurezas que são mais difíceis

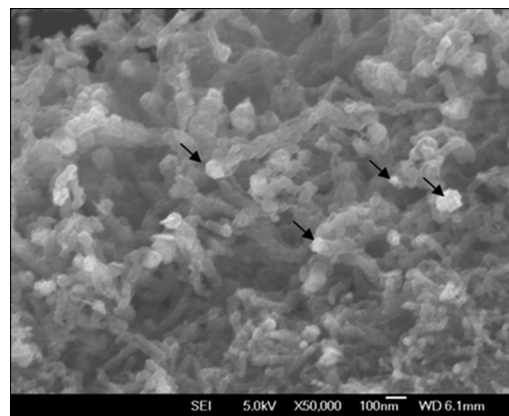
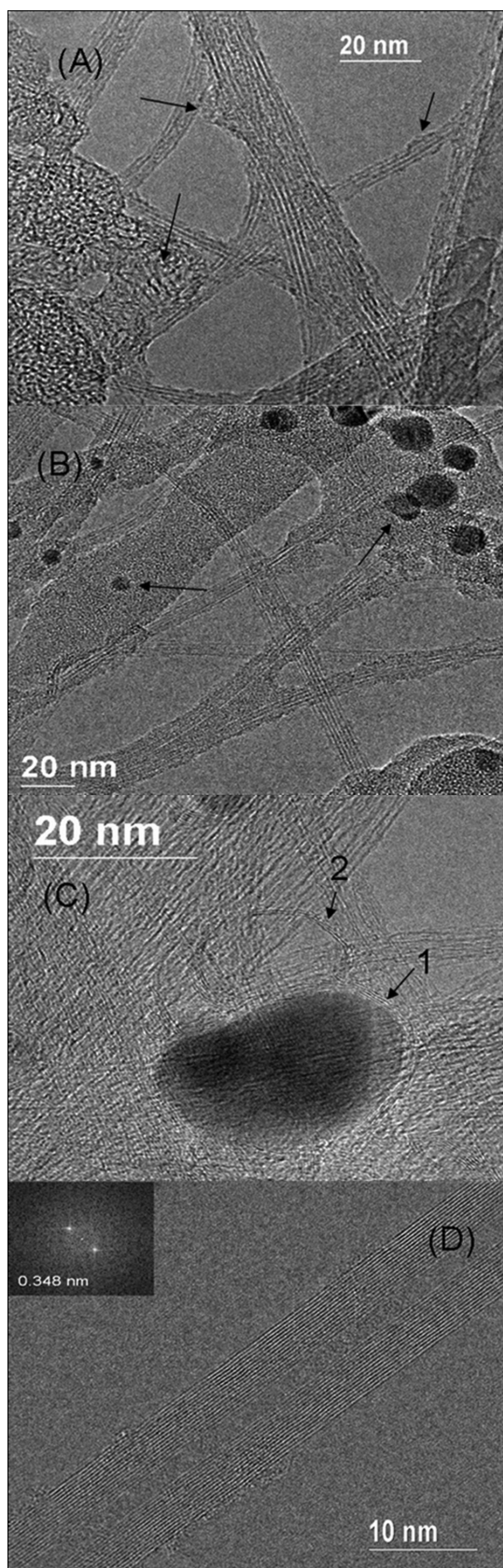


Figura 3. Microfotografia eletrônica de varredura de NTCPM

de serem observadas em amostras de material particulado usado em estudos de cito- e genotoxicidade. Essas análises foram realizadas dispersando-se o material particulado obtido a partir de um reator de arco em álcool isopropílico e gotejando o mesmo sobre uma grade tipo *lacey carbon*. Com esse tipo de análise é possível detectar uma importante impureza dos NTCs, o carbono amorfo, que pode ser encontrado nos poros gerados pelos aglomerados de tubos ou impregnado às paredes dos NTCs (Figura 4A). Na Figura 4B é possível ver nanopartículas metálicas (manchas escuras) impregnadas de carbono amorfo, adsorvidas sobre feixes de NTCPS. Essa figura revela que nanopartículas metálicas podem estar presentes não somente nas extremidades dos tubos, como no caso da Figura 3. Já a Figura 4C releva outro tipo de nanoestrutura muito interessante e que não é relativamente simples de ser removida: catalisadores envolvidos por várias camadas de grafeno.<sup>114</sup> A Figura 4D é um exemplo de um NTCPM bem paralelas (livre de defeitos) submetido à purificação, onde é possível observar uma baixíssima concentração de carbono amorfo adsorvido nas paredes.

As figuras anteriores revelam que a avaliação de quais nanopartículas e impurezas podem estar contidas em amostras de NTCs (comerciais ou não) é uma tarefa relativamente complexa. Embora a microscopia seja uma técnica fundamental para a área de NTCs, as microfotografias podem levar o leitor a conclusões errôneas sobre o real estado de pureza das amostras ou da qualidade dos NTCs. Isso ocorre porque esta técnica mostra somente frações pontuais da amostra, muitas vezes escolhidas pelo operador do equipamento de forma proposital. Além disso, para a realização de análises de microscopia eletrônica, é necessário obter uma boa dispersão dos NTCs, como observado na Figura 1. Nessa etapa de preparação o operador pode coletar regiões da dispersão para preparo da grade que não necessariamente contêm as impurezas presentes na amostra, pois as várias impurezas existentes nas amostras de NTCs precipitam de forma diferente porque são partículas de diferentes massas e formas, prejudicando a avaliação da microscopia.<sup>119</sup>

Por essas razões é importante para um trabalho de cito- e genotoxicidade que além da microscopia, as amostras sejam analisadas também por várias outras técnicas. A análise térmica é particularmente interessante porque pode detectar vários tipos de impurezas,<sup>114</sup> tais como a presença de carbono amorfo, metais e grafites, mas tem limitações com relação à concentração dessas impurezas em relação à massa de NTCs. Já a técnica ICPMS (espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado) é particularmente muito sensível para a detecção de metais, enquanto a EELS (espectroscopia de perda de energia de elétrons) pode ser conduzida em conjunto com a microscopia eletrônica de transmissão, sendo também muito sensível na detecção de impurezas.<sup>118,120,121</sup>



**Figura 4.** Microfotografias eletrônicas de transmissão de alta-resolução. (A) feixes de NTCPS com diâmetro da ordem de 2 nm e carbono amorfo, (B) feixes de NTCPS, carbono amorfo e partículas metálicas, (C) feixes de NTCPS com partículas metálicas envolvida por camadas de grafeno (1), esfera vazia com paredes de grafeno (2) e (D) NTCPM totalmente purificado (sem carbono amorfo ou partículas metálicas)

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As controvérsias existentes nos estudos descritos no decorrer da revisão originam-se, em parte, da diversidade de amostras produzidas: modo de síntese (descarga por arco elétrico, ablação por laser, HiPCO e deposição química de vapor), tipos de catalisadores usados, tamanho, área de superfície, modo de dispersão, método de purificação e funcionalização, além de problemas nas caracterizações físico-químicas das mesmas.

É importante ressaltar novamente que as amostras de NTCs usadas nos vários ensaios biológicos podem conter vários tipos de nanoestruturas de carbono, impurezas metálicas, além dos próprios NTCs. Neste sentido, trabalhos da literatura trazem o emprego do termo “Alta Pureza” e que deve ser interpretado com cautela. Como já descrito, amostras de NTCs purificadas com ácidos ainda podem conter carbono amorfo e traço de metais que só serão identificados com o emprego metodológico correto (p. ex. análises térmicas – ex.: TGA, EELS e microscopia de alta resolução).<sup>114,118</sup> Entre os vários trabalhos de genotoxicidade publicados<sup>75,85,94,121-124</sup> poucos têm feito uso de análises térmicas (um parâmetro importante para caracterização e recomendado pelo *National Institute of Standards and Technology*). Muitos trabalhos apresentam imagens de microscopia, porém essas são de baixa resolução<sup>74,83,85,87,88,93,97</sup> o que compromete o entendimento dos tipos de contaminantes existentes nos NTCs. Existem ainda trabalhos sem explicação detalhada do método de síntese, tratamentos de purificação, funcionalização e sem imagens das amostras estudadas.<sup>84,96</sup>

Quanto aos tratamentos químicos utilizados para a purificação há poucas informações descritas nos trabalhos.<sup>84,93,96,125,126</sup> Alguns destes utilizam amostras comerciais e não descrevem se o material foi ou não purificado ou quais ácidos foram usados para purificação. Essa informação é relevante, pois tratamentos com fortes oxidantes (p. ex.:  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{KMnO}_4$ ) danificam intensamente as paredes dos tubos e podem induzir a formação de fragmentos de carbono.<sup>112,113</sup> Estes fragmentos podem estar envolvidos na toxicidade de amostras purificadas e explicariam os resultados de maior toxicidade para amostras purificadas do que para amostras não purificadas,<sup>127,128</sup> ou de mesmo potencial genotóxico antes e após a purificação.<sup>75</sup>

Para experimentos em culturas de células exige-se esterilização da amostra em estudo (para que não haja contaminantes biológicos - micobactérias, bactérias e esporos de fungos). Isso pode ser feito por meio de diferentes métodos: filtragem em membranas, esterilização com UV, autoclavagem (calor úmido), aquecimento em estufas (calor seco - geralmente 200 °C/2 h), etc. Muitas das amostras de NTCs avaliadas em estudos de toxicidade *in vitro* passaram por esses procedimentos e não foram caracterizadas pós-esterilização.

É importante ressaltar que os estudos realizados até o momento são adaptações dos procedimentos padrões utilizados para outras substâncias químicas e as interferências dos NTCs sobre essas técnicas devem ser consideradas. Por exemplo, aglomerados de nanopartículas ( $\text{TiO}_2$  e  $\text{CuO}$ )<sup>82</sup> foram observados, ao microscópio, depositados sobre a “cabeça” do cometa e que também podem ser observados no estudos com amostras de NTCs, como demonstrado na Figura 2. Porém, os NTCs com grupos funcionais (p. ex., tratamento com ácido nítrico/ácido sulfúrico) também poderiam migrar para os eletrodos sob ação do campo elétrico existente, um efeito que comprometeria a contagem de nucleóides que efetivamente sofreram danos.<sup>90-92</sup>

## CONCLUSÃO

Diversos testes toxicológicos como, por exemplo, os ensaios de viabilidade celular e clonogênico estão disponíveis e padronizados para se avaliar a resposta biológica a uma substância química. No

entanto até o momento, não existem testes específicos e padronizados para a avaliação da toxicidade de amostras de NTCs. Essa dificuldade compromete a comparação de resultados e o consenso sobre a toxicidade desses nanomateriais. As respostas dos experimentos de toxicidade ainda sofrem interferências dos tipos de células usadas. Diferentes linhagens celulares possuem diferentes *backgrounds* genéticos e que contribuem para a resistência/tolerância, sensibilidade e recuperação da viabilidade após a exposição aos NTCs.

Os mecanismos de cito- e genotoxicidade podem ser diversos e de difícil elucidação. Assim, aconselha-se o uso de uma bateria de testes abrangendo uma vasta gama de mecanismos (geração de EROs, mutações gênicas e cromossômicas, ciclo celular, apoptose, processo inflamatório, entre outros) para a detecção correta dos efeitos ocasionados pelas amostras de NTCs. A aplicação destes métodos padronizados para NTCs exige, ainda, diversas adaptações e precauções na interpretação dos resultados.<sup>98</sup> Até o presente momento parte das controvérsias existentes nos estudos de cito- e genotoxicidade estão associadas, em parte, às dificuldades existentes na avaliação da efetiva pureza das amostras e aplicação correta dos métodos de purificação e/ou de funcionalização dos NTCs, já que a purificação não necessariamente torna esses materiais mais toleráveis em sistemas biológicos.

O tubo ideal para aplicações em sistemas biológicos deveria ser aquele que não necessitasse de tratamentos sofisticados de purificação ou funcionalização química. A funcionalização mesmo quando não baseada em ácidos minerais pode introduzir impurezas, reagentes e surfactantes, que não são completamente removidos com as lavagens. Os esforços para produzir NTCs mais biocompatíveis vêm se tornando cada vez maiores e uma das saídas que vem sendo utilizada com sucesso é o revestimento dos tubos com polímeros menos nocivos às células. A utilização de catalisadores alternativos sem toxicidade também representa uma estratégia promissora para a síntese de NTCs hidrofílicos<sup>129</sup> menos cito- e/ou genotóxicos. A correlação entre as diferentes estruturas e a biocompatibilidade dos NTCs é outro fator que merece investigação para melhor entendimento dos efeitos adversos destes nanomateriais.

Outro fato importante é que a produção em larga escala de muitos desses nanomateriais já ocorre, como os *baytubes*<sup>®</sup> da Bayer. A ficha de segurança desse produto afirma que o mesmo não é perigoso para saúde ou meio ambiente, de acordo com as diretivas da comunidade europeia 2006/121/EC. Portanto, a produção de NTCs em larga escala não representa grande ameaça, pois o mesmo não possui grande capacidade de se dispersar no ar, como o negro de fumo que é um nanomaterial comercial largamente utilizado pela indústria.

Com relação ao impacto ambiental dos laboratórios de NTCs ou empresas é interessante mencionar que o resíduo de nanoestruturas pode ser tratado. No caso dos metais pesados (catalisadores) já existem metodologias.<sup>130</sup> Outra alternativa seria o uso de peróxido concentrado, uma vez que esse tem o poder de destruir várias nanoestruturas de carbono, inclusive os próprios NTCs dependendo da concentração, temperatura e tempo de reação.<sup>114</sup> Íons de cálcio também podem auxiliar na descontaminação e remoção de NTCs (tratados com HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) de ambientes aquáticos. Na presença desses íons, esses NTCs formam aglomerados de tamanhos micro-métricos, que são retidos em filtros.<sup>131</sup>

Enfim, os dados existentes sobre toxicidade de NTCs são ainda limitados e conflitantes e muitos esforços ainda devem ser direcionados a este campo. O que se pode adiantar é que não há efeitos tóxicos generalizados para NTCs, mas o que se evidencia é a existência de diversos graus de riscos para as diferentes amostras de NTCs, sendo que esses dependem das condições de síntese e processamento das amostras.

## AGRADECIMENTOS

Às instituições de fomento à pesquisa CNPq, CAPES e FAPESP (processos 2010/10863-8, 2010/07681-5), ao INCT Nanomateriais de Carbono que engloba um grande número de pesquisadores da área de NTCs no país e ao LME/LNNano/CNPEM pelo suporte técnico durante o trabalho de microscopia eletrônica.

## REFERÊNCIAS

- Drexler, K. E.; *Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology*. Anchor Books/Oxford University Press: New York, 1986.
- Feynman, R. P.; *Engin. Sci.* **1960**, *23*, 22.
- Zarbin, A. J. G.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 1469.
- Nel, A.; Xia, T.; Madler, L.; Li, N.; *Science* **2006**, *311*, 5761.
- Donaldson, K.; Seaton, A. J.; *The Lancet* **2005**, *7*, 12; Oberdorster, G.; Oberdorster, E.; Oberdorster, J.; *Environ. Health Perspect.* **2005**, *113*, 7.
- Firme, C. P.; Bandaru, P. R.; *Nanomedicine-Nanotechnology Biol. Med.* **2010**, *6*, 2.
- Singh, N.; Manshian, B.; Jenkins, G. J. S.; Griffiths, S. M.; Williams, P. M.; Maffei, T. G. G.; Wright, C. J.; Doak, S. H.; *Biomaterials* **2009**, *30*, 23.
- Rivera Gil, P.; Oberdorster, G.; Elder, A.; Puentes, V.; Parak, W. J.; *ACS Nano* **2010**, *4*, 10.
- Schipper, M. L.; Nakayama-Ratchford, N.; Davis, C. R.; Kam, N. W. S.; Chu, P.; Liu, Z.; Sun, X.; Dai, H.; Gambhir, S. S.; *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 4.
- Smart, S. K.; Cassady, A. I.; Lu, G. Q.; Martin, D. J.; *Carbon* **2006**, *44*, 6.
- Yang, S.-T.; Wang, X.; Jia, G.; Gu, Y.; Wang, T.; Nie, H.; Ge, C.; Wang, H.; Liu, Y.; *Toxicol. Lett.* **2008**, *181*, 3.
- Pulskamp, K.; Diabate, S.; Krug, H. F.; *Toxicol. Lett.* **2007**, *168*, 1; Kagan, V. E.; Konduru, N. V.; Feng, W. H.; Allen, B. L.; Conroy, J.; Volkov, Y.; Vlasova, I.; Belikova, N. A.; Yanamala, N.; Kapralov, A.; Tyurina, Y. Y.; Shi, J. W.; Kisin, E. R.; Murray, A. R.; Franks, J.; Stolz, D.; Gou, P. P.; Klein-Seetharaman, J.; Fadeel, B.; Star, A.; Shvedova, A. A.; *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 5.
- Monthieux, M.; Kuznetsov, V. L.; *Carbon* **2006**, *44*, 9; Iijima, S.; *Nature* **1991**, *354*, 6348.
- Dresselhaus, M. S.; Dresselhaus, G.; Saito, R.; *Carbon* **1995**, *33*, 7.
- Oliveira, M. M.; Zarbin, A. J. G.; *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 48; Duclaux, L.; *Carbon* **2002**, *40*, 10; Kaskhedikar, N. A.; Maier, J.; *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 25; Nossol, E.; Zarbin, A. J. G.; *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19*, 24; Kosynkin, D. V.; Lu, W.; Sinititskii, A.; Pera, G.; Sun, Z.; Tour, J. M.; *ACS Nano* **2011**, *5*, 2; Popa, A. I.; Vavilova, E.; Täschner, C.; Kataev, V.; Büchner, B.; Klingeler, R. D.; *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 13; Yashina, L. V.; Eliseev, A. A.; Kharlamova, M. V.; Volykhov, A. A.; Egorov, A. V.; Savilov, S. V.; Lukashin, A. V.; Püttner, R.; Belogorokhov, A. I.; *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 9; Bazilevsky, A. V.; Sun, K.; Yarin, A. L.; Megaridis, C. M.; *Langmuir* **2007**, *23*, 14.
- Kuila, B. K.; Park, K.; Dai, L.; *Macromolecules* **2010**, *43*, 16; Li, X.; Jia, Y.; Wei, J.; Zhu, H.; Wang, K.; Wu, D.; Cao, A.; *ACS Nano* **2010**, *4*, 4; Opatkiewicz, J.; LeMieux, M. C.; Bao, Z.; *ACS Nano* **2010**, *4*, 6; Schnorr, J. M.; Swager, T. M.; *Chem. Mater.* **2010**, *23*, 3; Vázquez, E.; Cubarsi, R.; Unzueta, U.; Roldán, M.; Domingo-Espín, J.; Ferrer-Mirallas, N.; Villaverde, A.; *Biomaterials* **2010**, *31*, 35; Dresselhaus, M. S.; *ACS Nano* **2010**, *4*, 8; Javey, A.; *ACS Nano* **2008**, *2*, 7; de Moraes, I. R.; da Silva, W. J.; Tronto, S.; Rosolen, J. M.; *J. Power Sources* **2006**, *160*, 2; Moraes, I. R.; Matsubara, E. Y.; Rosolen, J. M.; *Electrochem. Solid-State Lett.* **2008**, *1*, 1; Matsubara, E. Y.; Rosolen, J. M.; Silva, S. R. P.; *J. Appl. Phys.* **2008**, *104*, 5.
- Pedroni, G.; Sotooviedo, M.; Rosolen, J. M.; Felisberti, M. I.; Nogueira, A. F.; *J. Appl. Polym. Sci.* **2009**, *112*, 3241.

18. Mostofizadeh, A.; Li, Y. W.; Song, B.; Huang, Y. D.; *J. Nanomaterials* **2011**, *2011*, 1.
19. Upadhyayula, V. K. K.; Deng, S. G.; Mitchell, M. C.; Smith, G. B.; *Sci. Total Environ.* **2009**, *408*, 1; Schirmer, W. N.; Lisboa, H. M.; Moreira, R. F. P. M.; Rosolen, J. M.; *Acta Scient. Technol.* **2010**, *32*, 160.
20. Fu, F.; Wang, Q.; *J. Environ. Manag.* **2011**, *92*, 3.
21. Gonçalves, V. R.; Matsubara, E. Y.; Rosolen, J. M.; de Torresi, S. I. C.; *Carbon* **2011**, *1*, 1; Rosolen, J. M.; Matsubara, E. Y.; Marchesin, M. S.; Lala, S. M.; Montoro, L. A.; Tronto, S.; *J. Power Sources* **2006**, *162*, 1; Matsubara, E. Y.; Silva, S. R. P.; Rosolen, J. M.; *J. Appl. Phys.* **2008**, *104*, 1; Rosolen, J. M.; *Br PI P10701709-0 A2*, **2007**.
22. Zhou, J. H.; Zhang, M. G.; Zhao, L.; Li, P.; Zhou, X. G.; Yuan, W. K.; *Catal. Today* **2009**, *147*, 1.
23. Schnorr, J. M.; Swager, T. M.; *Chem. Mater.* **2010**, *23*, 3.
24. Khodakovskaya, M.; Dervishi, E.; Mahmood, M.; Xu, Y.; Li, Z. R.; Watanabe, F.; Biris, A. S.; *ACS Nano* **2009**, *3*, 10.
25. Srinivasan, C.; Saraswathi, R.; *Curr. Sci.* **2010**, *99*, 3.
26. Sitharaman, B.; Shi, X. F.; Walboomers, X. F.; Liao, H. B.; Cuijpers, V.; Wilson, L. J.; Mikos, A. G.; Jansen, J. A.; *Bone* **2008**, *43*, 2.
27. Hartman, K.; Wilson, L.; *Adv. Exp. Med. Biol.* **2007**, *620*, 74.
28. Chakravarty, P.; Marches, R.; Zimmerman, N. S.; Swafford, A. D. E.; Bajaj, P.; Musselman, I. H.; Pantano, P.; Draper, R. K.; Vitetta, E. S.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 8697.
29. Burke, A.; Ding, X. F.; Singh, R.; Kraft, R. A.; Levi-Polyachenko, N.; Rylander, M. N.; Szot, C.; Buchanan, C.; Whitney, J.; Fisher, J.; Hatcher, H. C.; D'Agostino, R.; Kock, N. D.; Ajayan, P. M.; Carroll, D. L.; Akman, S.; Torti, F. M.; Torti, S. V.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 31.
30. Sahithi, K.; Swetha, M.; Ramasamy, K.; Srinivasan, N.; Selyamurugan, N.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2010**, *46*, 3.
31. Supronowicz, P. R.; Ajayan, P. M.; Ullmann, K. R.; Arulanandam, B. P.; Metzger, D. W.; Bizios, R.; *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, *59*, 3.
32. Lee, W.; Parpura, V.; *Nanoneurosci. Nanoneuropharmacol.* **2009**, *180*, 111.
33. Cai, D.; Blair, D.; Dufort, F. J.; Gumina, M. R.; Huang, Z. P.; Hong, G.; Wagner, D.; Canahan, D.; Kempa, K.; Ren, Z. F.; Chiles, T. C.; *Nanotechnology* **2008**, *19*, 1.
34. Zhang, X. K.; Meng, L. J.; Lu, Q. G.; Fei, Z. F.; Dyson, P. J.; *Biomaterials* **2009**, *30*, 30.
35. Kam, N. W. S.; Dai, H. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16.
36. Yang, Z.; Zhang, Y.; Yang, Y.; Sun, L.; Han, D.; Li, H.; Wang, C.; *Nanomed.: Nanotechnol., Biol., Med.* **2010**, *6*, 3.
37. Kang, B.; Yu, D. C.; Chang, S. Q.; Chen, D.; Dai, Y. D.; Ding, Y. T.; *Nanotechnology* **2008**, *19*, 37.
38. Wick, P.; Manser, P.; Limbach, L. K.; Dettlaff-Weglikowska, U.; Krumeich, F.; Roth, S.; Stark, W. J.; Bruinink, A.; *Toxicol. Lett.* **2007**, *168*, 2; Summers, H. D.; Rees, P.; Holton, M. D.; Rowan Brown, M.; Chappell, S. C.; Smith, P. J.; Errington, R. J.; *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 3.
39. Mukherjee, S.; Ghosh, R.; Maxfield, F.; *Physiol. Rev.* **1997**, *77*, 3.
40. Kam, N. W. S. a. D. H.; *Phys. Status Solidi* **2006**, *243*, 13.
41. Liu, Y.; Wu, D. C.; Zhang, W. D.; Jiang, X.; He, C. B.; Chung, T. S.; Goh, S. H.; Leong, K. W.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 30.
42. Pantarotto, D.; Briand, J. P.; Prato, M.; Bianco, A.; *Chem. Commun. (Camb)* **2004**, *1*, 16.
43. Raffa, V.; Ciofani, G.; Vittorio, O.; Riggio, C.; Cuschieri, A.; *Nanomedicine* **2010**, *5*, 1.
44. Mu, Q. B. D. L. a. Y. B.; *Nano Lett.* **2009**, *9*, 12.
45. Kostarelos, K.; *Adv. Colloid Interface Sci.* **2003**, *106*, 147.
46. Sato, Y.; Yokoyama, A.; Shibata, K.; Akimoto, Y.; Ogino, S.; Nodasaka, Y.; Kohgo, T.; Tamura, K.; Akasaka, T.; Uo, M.; Motomiya, K.; Jeyadevan, B.; Ishiguro, M.; Hatakeyama, R.; Watari, F.; Tohji, K.; *Mol. Biosyst.* **2005**, *1*, 2.
47. Poland, C. A.; Duffin, R.; Kinloch, I.; Maynard, A.; Wallace, W. A. H.; Seaton, A.; Stone, V.; Brown, S.; MacNee, W.; Donaldson, K.; *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 7.
48. Lacerda, L.; Bianco, A.; Prato, M.; Kostarelos, K.; *Adv. Drug Delivery Rev.* **2006**, *58*, 14.
49. Zhang, D. W.; Yi, C. Q.; Zhang, J. C.; Chen, Y.; Yao, X. S.; Yang, M. S.; *Nanotechnology* **2007**, *18*, 1.
50. Kang, S.; Mauter, M. S.; Elimelech, M.; *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 19.
51. Porter, A. E.; Gass, M.; Muller, K.; Skepper, J. N.; Midgley, P. A.; Welland, M.; *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 713.
52. Mooney, E.; Dockery, P.; Greiser, U.; Murphy, M.; Barron, V.; *Nano Lett.* **2008**, *8*, 8.
53. Cheng, C.; Muller, K. H.; Koziol, K. K. K.; Skepper, J. N.; Midgley, P. A.; Welland, M. E.; Porter, A. E.; *Biomaterials* **2009**, *30*, 25.
54. Cheng, C.; Müller, K. H.; Koziol, K. K. K.; Skepper, J. N.; Midgley, P. A.; Welland, M. E.; Porter, A. E.; *Biomaterials* **2009**, *30*, 25.
55. Shvedova, A. A.; Castranova, V.; Kisin, E. R.; Schwegler-Berry, D.; Murray, A. R.; Gandelman, V. Z.; Maynard, A.; Baron, P.; *J. Toxicol. Environ. Health, Part A* **2003**, *66*, 20.
56. Coccini, T.; Roda, E.; Sarigiannis, D. A.; Mustarelli, P.; Quartarone, E.; Profumo, A.; Manzo, L.; *Toxicology* **2010**, *269*, 1; Reddy, A. R. N.; Reddy, Y. N.; Krishna, D. R.; Himabindu, V.; *Toxicology* **2010**, *272*, 1; Thurnherr, T.; Brandenberger, C.; Fischer, K.; Diener, L.; Manser, P.; Maeder-Althaus, X.; Kaiser, J.-P.; Krug, H. F.; Rothen-Rutishauser, B.; Wick, P.; *Toxicol. Lett.* **2011**, *200*, 3; Wang, J.; Sun, P.; Bao, Y.; Liu, J.; An, L.; *Toxicol. in Vitro* **2011**, *25*, 1; Zhang, L. W.; Monteiro-Riviere, N. A.; *Toxicol. in Vitro* **2010**, *24*, 2; Qin, W.; Yang, K.; Tang, H.; Tan, L.; Xie, Q.; Ma, M.; Zhang, Y.; Yao, S.; *Colloids Surf., B* **2011**, *84*, 1; Lobo, A. O.; Corat, M. A. F.; Antunes, E. F.; Palma, M. B. S.; Pacheco-Soares, C.; Corat, E. J.; *Synth. Met.* **2009**, *159*, 21; Lobo, A. O.; Corat, M. A. F.; Antunes, E. F.; Palma, M. B. S.; Pacheco-Soares, C.; Garcia, E. E.; Corat, E. J.; *Carbon* **2010**, *48*, 1; Yan, P.; Wang, J.; Wang, L.; Liu, B.; Lei, Z.; Yang, S.; *Appl. Surf. Sci.* **2011**, *257*, 11; do Nascimento, G. M.; de Oliveira, R. C.; Pradie, N. A.; Lins, P. R. G.; Worfel, P. R.; Martinez, G. R.; Di Mascio, P.; Dresselhaus, M. S.; Corio, P.; *J. Photochem. Photobiol., A* **2010**, *211*, 2; Markovic, Z. M.; Harhaji-Trajkovic, L. M.; Todorovic-Markovic, B. M.; Kepic, D. P.; Arsikin, K. M.; Jovanovic, S. P.; Pantovic, A. C.; Dramicanin, M. D.; Trajkovic, V. S.; *Biomaterials* **2011**, *32*, 4; Cheng, W.-W.; Lin, Z.-Q.; Wei, B.-F.; Zeng, Q.; Han, B.; Wei, C.-X.; Fan, X.-J.; Hu, C.-L.; Liu, L.-H.; Huang, J.-H.; Yang, X.; Xi, Z.-G.; *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2011**, *43*, 4; Liao, H.; Qi, R.; Shen, M.; Cao, X.; Guo, R.; Zhang, Y.; Shi, X.; *Colloids Surf., B* **2011**, *84*, 2.
57. Monteiro-Riviere, N. A.; Inman, A. O.; *Carbon* **2006**, *44*, 6; Worle-Knirsch, J. M.; Pulskamp, K.; Krug, H. F.; *Nano Lett.* **2006**, *6*, 6.
58. Davoren, M.; Herzog, E.; Casey, A.; Cottineau, B.; Chambers, G.; Byrne, H. J.; Lyng, F. M.; *Toxicol. in Vitro* **2007**, *21*, 3.
59. Simon-Deckers, A.; Gouget, B.; Mayne-L'Hermite, M.; Herlin-Boime, N.; Reynaud, C.; Carriere, M.; *Toxicology* **2008**, *253*, 1; Belyanskaya, L.; Manser, P.; Spohn, P.; Bruinink, A.; Wick, P.; *Carbon* **2007**, *45*, 13.
60. Casey, A.; Herzog, E.; Davoren, M.; Lyng, F. M.; Byrne, H. J.; Chambers, G.; *Carbon* **2007**, *45*, 7.
61. Simon-Deckers, A.; Gouget, B.; Mayne-L'Hermite, M.; Herlin-Boime, N.; Reynaud, C.; Carrière, M.; *Toxicology* **2008**, *253*, 1.
62. Geys, J.; Nemery, B.; Hoet, P. H. M.; *Toxicol. in Vitro* **2010**, *24*, 2.
63. Boero, C.; Carrara, S.; Del Vecchio, G.; Calzà, L.; De Micheli, G.; *Sens. Actuators, B*, no prelo.
64. Kagan, V. E.; Tyurina, Y. Y.; Tyurin, V. A.; Konduru, N. V.; Potapovich, A. I.; Osipov, A. N.; Kisin, E. R.; Schwegler-Berry, D.; Mercer, R.; Castranova, V.; Shvedova, A. A.; *Toxicol. Lett.* **2006**, *165*, 1.
65. Monteiro-Riviere, N. A.; Inman, A. O.; Zhang, L. W.; *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2009**, *234*, 2.



66. Shvedova, A.; Kisin, E.; Murray, A.; Johnson, V.; Gorelik, O.; Arepalli, S.; Gandelsman, V.; Hubbs, A.; Mercer, R.; Kagan, V.; Castranova, V.; *Free Radical Biol. Med.* **2004**, *37*, S55.
67. Herzog, E.; Casey, A.; Lyng, F. M.; Chambers, G.; Byrne, H. J.; Davoren, M.; *Toxicol. Lett.* **2007**, *174*, 1.
68. Casey, A.; Herzog, E.; Lyng, F. M.; Byrne, H. J.; Chambers, G.; Davoren, M.; *Toxicol. Lett.* **2008**, *179*, 2.
69. Gellein, K.; Hoel, S.; Evje, L.; Syversen, T.; *Nanotoxicology* **2009**, *3*, 3.
70. Ponti, J.; Colognato, R.; Rauscher, H.; Gioria, S.; Broggi, F.; Franchini, F.; Pascual, C.; Giudetti, G.; Rossi, F.; *Toxicol. Lett.* **2010**, *197*, 1.
71. Franken, N. A. P.; Rodermond, H. M.; Stap, J.; Haveman, J.; van Bree, C.; *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 5.
72. Herzog, E.; Casey, A.; Lyng, F. M.; Chambers, G.; Byrne, H. J.; Davoren, M.; *Toxicol. Lett.* **2007**, *174*, 49.
73. Ozturk, S.; Kaseko, G.; Mahaworasilpa, T.; Coster, H.; *Hybrid Hybridomics* **2003**, *22*, 4.
74. Pacurari, M.; Yin, X. J.; Ding, M.; Leonard, S. S.; Schwegler-Berry, D.; Ducatman, B. S.; Chirila, M.; Endo, M.; Castranova, V.; Vallyathan, V.; *Nanotoxicology* **2008**, *2*, 3.
75. Pacurari, M.; Yin, X. J.; Zhao, J. S.; Ding, M.; Leonard, S. S.; Schwegler-Berry, D.; Ducatman, B. S.; Sbarra, D.; Hoover, M. D.; Castranova, V.; Vallyathan, V.; *Environ. Health Perspectives* **2008**, *116*, 9; Zhu, L.; Chang, D. W.; Dai, L. M.; Hong, Y. L.; *Nano Lett.* **2007**, *7*, 12.
76. Bhattacharya, K.; Dopp, E.; Kakkar, P.; Jaffery, F. N.; Schiffmann, D.; Jaurand, M.-C.; Rahman, I.; Rahman, Q.; *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2005**, *579*, 1.
77. Burmeister, B.; Schwerdtle, T.; Poser, I.; Hoffmann, E.; Hartwig, A.; Müller, W. U.; Rettenmeier, A. W.; Seemayer, N. H.; Dopp, E.; *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2004**, *558*, 1.
78. Dopp, E.; Schuler, M.; Schiffmann, D.; Eastmond, D. A.; *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1997**, *377*, 1.
79. Dopp, E.; Schiffmann, D.; *Toxicol. Lett.* **1998**, *96-97*, 155.
80. Takagi, A.; Hirose, A.; Nishimura, T.; Fukumori, N.; Ogata, A.; Ohashi, N.; Kitajima, S.; Kanno, J.; *J. Toxicol. Sci.* **2008**, *33*, 1.
81. Sakamoto, Y.; Nakae, D.; Fukumori, N.; Tayama, K.; Maekawa, A.; Imai, K.; Hirose, A.; Nishimura, T.; Ohashi, N.; Ogata, A.; *J. Toxicol. Sci.* **2009**, *34*, 1.
82. Karlsson, H.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398*, 651.
83. Jacobsen, N. R.; Pojana, G.; White, P.; Moller, P.; Cohn, C. A.; Korsholm, K. S.; Vogel, U.; Marcomini, A.; Loft, S.; Wallin, H.; *Environ. Mol. Mutagen.* **2008**, *49*, 6.
84. Zeni, O.; Palumbo, R.; Bernini, R.; Zeni, L.; Sarti, M.; Scarfi, M. R.; *Sensors* **2008**, *8*, 1.
85. Kisin, E. R.; Murray, A. R.; Keane, M. J.; Shi, X. C.; Schwegler-Berry, D.; Gorelik, O.; Arepalli, S.; Castranova, V.; Wallace, W. E.; Kagan, V. E.; Shvedova, A. A.; *J. Toxicol. Environ. Health, Part A* **2007**, *70*, 2071.
86. Lindberg, H. K.; Falck, G. C. M.; Suhonen, S.; Vippola, M.; Vanhala, E.; Catalán, J.; Savolainen, K.; Norppa, H.; *Toxicol. Lett.* **2009**, *186*, 3.
87. Catalán, J.; Järventaus, H.; Vippola, M.; Savolainen, K.; Norppa, H.; *Nanotoxicology* **2011**, *6*, 1.
88. Yang, H.; Liu, C.; Yang, D. F.; Zhang, H. S.; Xi, Z. G.; *J. Appl. Toxicol.* **2009**, *29*, 1.
89. Karlsson, H. L.; Cronholm, P.; Gustafsson, J.; Moller, L.; *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 9.
90. Boccaccini, A. R.; Cho, J.; Roether, J. A.; Thomas, B. J. C.; Jane Minay, E.; Shaffer, M. S. P.; *Carbon* **2006**, *44*, 15.
91. Alpatova, A. L.; Shan, W.; Babica, P.; Upham, B. L.; Rogensues, A. R.; Masten, S. J.; Drown, E.; Mohanty, A. K.; Alcolija, E. C.; Tarabara, V. V.; *Water Res.* **2010**, *44*, 2.
92. Murdock, R. C.; Braydich-Stolle, L.; Schrand, A. M.; Schlager, J. J.; Hussain, S. M.; *Toxicol. Sci.* **2008**, *101*, 2.
93. Cveticanin, J.; Joksic, G.; Leskovic, A.; Petrovic, S.; Sobot, A. V.; Neskovic, O.; *Nanotechnology* **2010**, *21*, 1.
94. Muller, J.; Decordier, I.; Hoet, P. H.; Lombaert, N.; Thomassen, L.; Huaux, F.; Lison, D.; Kirsch-Volders, M.; *Carcinogenesis* **2008**, *29*, 2.
95. Muller, J.; Huaux, F.; Fonseca, A.; Nagy, J. B.; Moreau, N.; Delos, M.; Raymundo-Pinero, E.; Beguin, F.; Kirsch-Volders, M.; Fenoglio, I.; Fubini, B.; Lison, D.; *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 9.
96. Szendi, K.; Varga, C.; *Anticancer Res.* **2008**, *28*, 1A.
97. Wurnitzer, U.; Herbold, B.; Voetz, M.; Ragot, J.; *Toxicol. Lett.* **2009**, *186*, 3.
98. Umbuzeiro, G. A.; Coluci, V. R.; Honório, J. G.; Giro, R.; Morales, D. A.; Lage, A. S. G.; Mazzei, J. L.; Felzenszwalb, I.; Filho, A. G. S.; Stéfani, D.; Alves, O. L.; *TrAC Trends Anal. Chem.* **2011**, *30*, 3.
99. Doak, S. H.; Griffiths, S. M.; Manshian, B.; Singh, N.; Williams, P. M.; Brown, A. P.; Jenkins, G. J. S.; *Mutagenesis* **2009**, *24*, 4.
100. Sargent, L. M.; Shvedova, A. A.; Hubbs, A. F.; Salisbury, J. L.; Benkovic, S. A.; Kashon, M. L.; Lowry, D. T.; Murray, A. R.; Kisin, E. R.; Friend, S.; McKinstry, K. T.; Battelli, L.; Reynolds, S. H.; *Environ. Mol. Mutagen.* **2009**, *50*, 8.
101. Holt, B. D.; Short, P. A.; Rape, A. D.; Wang, Y. L.; Islam, M. F.; Dahl, K. N.; *ACS Nano* **2010**, *4*, 8.
102. Li, X.; Peng, Y. H.; Ren, J. S.; Qu, X. G.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 52.
103. Teeguarden, J. G.; Hinderliter, P. M.; Orr, G.; Thrall, B. D.; Pounds, J. G.; *Toxicol. Sci.* **2007**, *95*, 2.
104. Sayes, C. M.; Liang, F.; Hudson, J. L.; Mendez, J.; Guo, W. H.; Beach, J. M.; Moore, V. C.; Doyle, C. D.; West, J. L.; Billups, W. E.; Ausman, K. D.; Colvin, V. L.; *Toxicol. Lett.* **2006**, *161*, 2; Souza Filho, A. G.; Fagan, S. B.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 1695; Lemos, V. C.; Barros, E. B.; Herbst, M. H.; Luengo, C. A.; Rosolen, J. M.; Huber, J. G.; Souza Filho, A. G.; *Carbon* **2005**, *43*, 2495; Salvatierra, R. V.; Oliveira, M. M.; Zarkin, A. J. G.; *Chem. Mater.* **2010**, *22*, 18; Ma, P. C.; Siddiqui, N. A.; Marom, G.; Kim, J. K.; *Comp. Part a-Ap. Sci. Manufac.* **2010**, *41*, 10; Qu, L.; Lee, K. M.; Dai, L. Em *Carbon Nanotechnology*; Liming, D., ed.; Elsevier: Amsterdam, 2006; Campos-Delgado, J.; Maciel, I. O.; Cullen, D. A.; Smith, D. J.; Jorio, A.; Pimenta, M. A.; Terrones, H.; Terrones, M.; *ACS Nano* **2010**, *4*, 3.
105. Raffa, V.; Ciofani, G.; Nitodas, S.; Karachalios, T.; D'Alessandro, D.; Masini, M.; Cuschieri, A.; *Carbon* **2008**, *46*, 12.
106. Wittmaack, K.; *Environ. Health Perspect.* **2007**, *115*, 2.
107. Dhawan, A.; Sharma, V.; Parmar, D.; *Nanotoxicology* **2009**, *3*, 1.
108. Toyokuni, S.; Tanaka, T.; Iwasa, Y.; Kondo, S.; Hiai, H.; *Free Radical Biol. Med.* **1998**, *25*, 342; Hsieh, S. F.; Bello, D.; Schmidt, D. F.; Pal, A. K.; Rogers, E. J.; *Nanotoxicology* **2011**, *5*, 1.
109. Silva, G.; Musumeci, A.; Gomes, A.; Liu, J.-W.; Waclawik, E.; George, G.; Frost, R.; Pimenta, M.; *J. Mater. Sci.* **2009**, *44*, 13.
110. Araujo, P. T.; Maciel, I. O.; Pesce, P. B. C.; Pimenta, M. A.; Doorn, S. K.; Qian, H.; Hartschuh, A.; Steiner, M.; Grigorian, L.; Hata, K.; Jorio, A.; *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.* **2008**, *77*, 24; Campos-Delgado, J.; Maciel, I. O.; Cullen, D. A.; Smith, D. J.; Jorio, A.; Pimenta, M. A.; Terrones, H.; Terrones, M.; *ACS Nano* **2010**, *4*, 3.
111. Vigolo, B.; Héroid, C.; Marêché, J.-F.; Ghanbaja, J.; Gulas, M.; Normand, F. L.; Almairac, R.; Alvarez, L.; Bantignies, J.-L.; *Carbon* **2010**, *48*, 4.
112. Salzmann, C. G.; Llewellyn, S. A.; Tobias, G.; Ward, M. A. H.; Huh, Y.; Green, M. L. H.; *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 6.
113. Fogden, S.; Verdejo, R.; Cottam, B.; Shaffer, M.; *Chem. Phys. Lett.* **2008**, *460*, 1.
114. Montoro, L. A.; Rosolen, J. M.; *Carbon* **2006**, *44*, 15.
115. Martínez, M. T.; Callejas, M. A.; Benito, A. M.; Cochet, M.; Seeger, T.; Ansón, A.; Schreiber, J.; Gordon, C.; Marhic, C.; Chauvet, O.; Fierro, J. L. G.; Maser, W. K.; *Carbon* **2003**, *41*, 12.
116. do Nascimento, G. M.; de Oliveira, R. C.; Pradie, N. A.; Lins, P. R. G.; Worfel, P. R.; Martinez, G. R.; Di Mascio, P.; Dresselhaus, M. S.; Corio, P.; *J. Photochem. Photobiol., A* **2010**, *211*, 2.

117. Bottini, M.; Bruckner, S.; Nika, K.; Bottini, N.; Bellucci, S.; Magrini, A.; Bergamaschi, A.; Mustelin, T.; *Toxicol. Lett.* **2006**, *160*, 2.
118. Stéfani, D.; Paula, A. J.; Vaz, B. G.; Silva, R. A.; Andrade, N. F.; Justo, G. Z.; Ferreira, C. V.; Filho, A. G. S.; Eberlin, M. N.; Alves, O. L.; *J. Hazard. Mater.* **2011**, *189*, 1.
119. Hou, P.-X.; Liu, C.; Cheng, H.-M.; *Carbon* **2008**, *46*, 15.
120. Stobinski, L.; Lesiak, B.; Kövér, L.; Tóth, J.; Biniak, S.; Trykowski, G.; Judek, J.; *J. Alloys Compd.* **2010**, *501*, 1.
121. Guo, Y.-Y.; Zhang, J.; Zheng, Y.-F.; Yang, J.; Zhu, X.-Q.; *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2011**, *72*, 2.
122. Patlolla, A.; Knighten, B.; Tchounwou, P.; *Ethnicity & Dis.* **2010**, *20*, 1.
123. Muller, J.; Huaux, F.; Moreau, N.; Misson, P.; Heilier, J. F.; Delos, M.; Arras, M.; Fonseca, A.; Nagy, J. B.; Lison, D.; *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, *207*, 3.
124. Kisin, E. R.; Murray, A. R.; Sargent, L.; Lowry, D.; Chirila, M.; Siegrist, K. J.; Schwegler-Berry, D.; Leonard, S.; Castranova, V.; Fadeel, B.; Kagan, V. E.; Shvedova, A. A.; *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2011**, *252*, 1.
125. Jacobsen, N. R.; Pojana, G.; White, P.; Møller, P.; Cohn, C. A.; Smith Korsholm, K.; Vogel, U.; Marcomini, A.; Loft, S.; Wallin, H.; *Environ. Mol. Mutagen.* **2008**, *49*, 6.
126. Giorgio, M. L. D.; Di Bucchianico, S.; Ragnelli, A. M.; Aimola, P.; Santucci, S.; Poma, A.; *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, no prelo.
127. Tian, F. R.; Cui, D. X.; Schwarz, H.; Estrada, G. G.; Kobayashi, H.; *Toxicol. in Vitro* **2006**, *20*, 7.
128. Rinaldi, A.; Zhang, J.; Frank, B.; Su, D. S.; Hamid, S. B. A.; Schlogl, R.; *ChemSusChem* **2010**, *3*, 2.
129. Rosolen, J. M.; Matsubara, E. Y.; *Br PI PI0901840-9 A2*, **2009**.
130. Ge, C.; Li, W.; Li, Y.; Li, B.; Du, J.; Qiu, Y.; Liu, Y.; Gao, Y.; Chai, Z.; Chen, C.; *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2011**, *11*, 3; Stobinski, L.; Lesiak, B.; Kövér, L.; Tóth, J.; Biniak, S.; Trykowski, G.; Judek, J.; *J. Alloys Compd.* **2010**, *501*, 1.
131. Yang, S.-T.; Wang, H.; Wang, Y.; Wang, Y.; Nie, H.; Liu, Y.; *Chemosphere* **2011**, *82*, 4.