

Saberes e práticas contemporâneas em gestão e inovação na Educação Profissional e em Sistemas Produtivos

Avaliação de fitotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do óxido de grafeno reduzido (RGO) em *Allium cepa*

Heloísa G. S. Tavares ¹; Bruna C. R. Silva ¹; Helder José Ceragioli³; Silvia P. Irazusta ^{1,2}

Resumo - O grafeno, uma folha bidimensional formada por átomos de carbono hibridizados em sp^2 , embalados em uma estrutura de favo de mel, recebeu recentemente, muita atenção por suas excelentes propriedades físicas e químicas. O óxido de grafeno reduzido é um nanomaterial que possui dimensões com cerca de 350 nm de comprimento e 5 nm de espessura. Os materiais de grafeno têm aplicações na área biomédica para terapia, diagnóstico e como transportador de droga. Por ser um material de ampla pesquisa e desenvolvimento, existe uma necessidade premente de se identificar os impactos da presença desta nanopartícula no ambiente. No presente trabalho, a fitotoxicidade, a genotoxicidade e a mutagenicidade do RGO foram avaliadas utilizando-se como bioindicador as sementes de cebola (*Allium cepa*).

Palavras-chave: Óxido de Grafeno Reduzido; Ecotoxicologia; *Allium cepa*.

Abstract - Graphene, a two-dimensional sheet formed by sp^2 -hybridized carbon atoms packed in a honeycomb structure, has recently received close attention for its excellent physical and chemical properties. Reduced graphene oxide (RGO) is a nanomaterial having dimensions of about 350 nm in length and 5 nm in thickness. Graphene materials have applications in the biomedical area for therapy, diagnosis and as a drug delivery. Since it is a material of extensive research and development, there is a urgent need to identify ecologically the effect of RGO in the environment. In the present work, the phytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of GRO were evaluated using onion seeds (*Allium cepa*) as bioindicator.

Keywords: Reduced graphene oxide; Ecotoxicology; *Allium cepa*.

Saberes e práticas contemporâneas em gestão e inovação na Educação Profissional e em Sistemas Produtivos

¹ Faculdade de Tecnologia “José Crespo Gonzales”- Fatec Sorocaba, Sorocaba-SP, Brasil;

² Unidade de Pós-graduação, Pesquisa e Extensão do Centro Paula Souza.

³ Laboratório de Nanoengenharia e Diamante – FEEC-Unicamp

1. Introdução

O grafeno pode ser definido como um hidrocarboneto aromático policíclico (PAH), com seis anéis de carbono, que se estendem alternados e infinitamente em um plano bidimensional (CASTRO, 2011; NUNES, 2013). Em função de suas inúmeras aplicações, tanto na área de engenharia de materiais, elétrica e de produção, bem como do possível emprego em biomedicina, torna-se necessário um amplo estudo sobre os impactos ambientais e ocupacionais do grafeno liberado no ambiente (CANCINO et al., 2014). O presente trabalho avaliará os potenciais impactos da presença do óxido de grafeno reduzido (RGO) no ambiente, utilizando o bioensaio com as sementes de cebola (*Allium cepa*). Este estudo vem somar-se ao conjunto da produção do laboratório de ecotoxicologia da Fatec-Sorocaba, bem como contribuir para com a literatura existente na área.

2. Referencial Teórico

Existem várias nanopartículas carbonáceas, destacando-se entre elas, os nanotubos de carbono (NTC) que são estruturas formadas por folhas do grafeno podendo ser classificados como nanotubos de parede simples (SWCNT - Single Wall Carbon Nanotubes), quando apresenta apenas uma camada de grafite ou, de múltiplas paredes (MWCNT - MultiWall Carbon Nanotubes), quando é formado por mais de uma camada (Li et al., 2013). Os nanotubos possuem diversas aplicações na engenharia por sua alta resistência mecânica, flexibilidade, elasticidade e baixa densidade, bem como na biomedicina, como transportador de fármacos, na terapia fototérmica (MACHADO et al., 2014). O grafeno, é formado por átomos de carbono em configuração hexagonal e foi o primeiro material cristalino a ser isolado de forma estável. O confinamento dos elétrons em duas dimensões, devido ao longo sistema π conjugado na estrutura do grafeno, confere propriedades excepcionais a estes materiais. (MEHL, 2014). O grafeno também tem sido conjugado com componentes de imageamento e terapêuticos, formando materiais teranósticos (sistema de nanoterapia) que combinam funções terapêuticas e de diagnóstico em um complexo nanoestruturado. E o grafeno por possuir forte absorção ótica na região do infravermelho, tornou-se pesquisa promissora na fototermia (CANCINO et al., 2014).

O óxido de grafeno reduzido (RGO) constitui um material que veio após os NTCs. Apesar de poucos estudos ainda, recentemente demonstrou-se que o óxido de grafeno reduzido (RGO) é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e, portanto possui potencial aplicação no tratamento de doenças neurológicas (MENDONÇA et al., 2016). Entretanto, os relatos a cerca de sua segurança ambiental e ocupacional são escassos.

Por constituírem uma grande variedade de tipos de nanopartículas do carbono e, pelo sua crescente produção e aplicabilidade, estas

Saberes e práticas contemporâneas em gestão e inovação na Educação Profissional e em Sistemas Produtivos

nanopartículas também apresentam desafios no uso seguro, sendo necessário, portanto, descobrir o seu potencial efeito tóxico.

O bioensaio utilizando sementes de cebola (*Allium cepa*) é amplamente utilizado como método de avaliação ecotoxicológica dos impactos ambientais de compostos puros ou amostras ambientais (COSTA, 2010). Este ensaio tem baixo custo de execução e utiliza um modelo que é suficientemente sensível para detectar inúmeras alterações cromossômicas provocadas por substâncias ou mistura delas, nas células em divisão (MARIN-MORALES, 2008). O teste de fitotoxicidade serve para determinar se uma amostra contém elementos que possam inibir a germinação de sementes, o crescimento e o desenvolvimento das plantas (OLESZCZUK et al., 2011). Já o teste de genotoxicidade, possibilita avaliar os efeitos genotóxicos, ou danos ao DNA, por meio da contagem de alterações nos cromossomos nas várias fases do ciclo celular, chamadas de aberrações cromossômicas (VALENTE et al., 2017). Para analisar efeitos mutagênicos, é registrada a ocorrência de micronúcleos (MN), que são considerados resultantes de uma ação mutagênica. Os MNs são gerados a partir de quebras ou perdas de cromossomos (MARIN-MORALES, 2008), na fase de divisão celular, na qual o material genético dentro do núcleo replica-se, podendo ocorrer erros (por ação de materiais ou substâncias em análise, exemplo formaldeído), que levam a danos no DNA (MACAGNAN et al., 2009).

A caracterização do RGO e avaliação dos seus efeitos sobre as células e organismos devem ser padronizadas sistematicamente para que os mecanismos de nanotoxicidade possam ser descobertos e haja um uso seguro dos mesmos. Além disso, a ecotoxicologia das nanopartículas precisa ser estudada de forma rápida, pois é essencial para desenvolvimento de regulamentações governamentais para o uso correto.

3. Método**3.1 Preparo do RGO**

O RGO em estudo foi sintetizado no laboratório de Nanoengenharia e Diamante da Faculdade de Engenharia Elétrica da Unicamp e foi caracterizado por Espectroscopia Raman, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e de Transmissão (MET). Também foi determinado seu potencial Zeta. Para o estudo o RGO foi preparado nas seguintes concentrações (Tabela 1) em água destilada e deionizada. As soluções foram submetidas a ultrassom por 20 min.

Tabela 1 – Soluções do grafeno

	Solução	Qtde. RGO	Diluições
1	100 ppm	10 mg	100 ml
2	10 ppm	0,5 mg	50 ml
3	1 ppm	0,05 mg	50 ml
4	0,1 ppm	0,005 mg	50 ml
5	0,01 ppm	0,0005 mg	50 ml

Saberes e práticas contemporâneas em gestão e inovação na Educação Profissional e em Sistemas Produtivos

Fonte: Elaborada pelo autor

3.2 Exposição das Amostras de *Allium cepa* em RGO

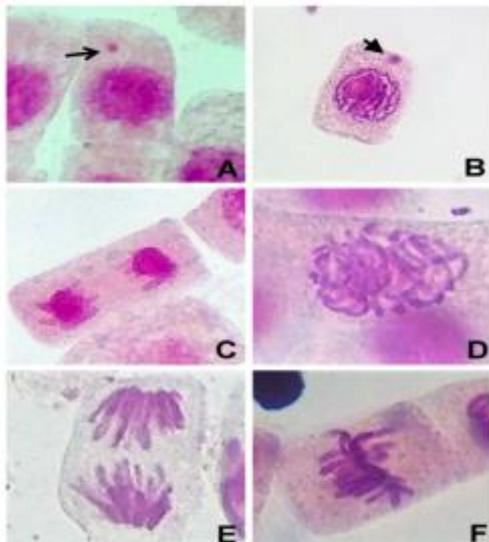
As sementes de *Allium cepa* foram colocadas em placas de Petri com papel filtro, contendo 100 sementes por placa, um total de 15 placas e 1500 sementes (método de triplicata) com 2 mL de cada uma das diluições do RGO descritas, bem como com água destilada para o controle negativo e, formol 3%, para o controle positivo. Foram envolvidas em filme plástico por cinco dias em local escuro. Quando as raízes atingiram 2 cm de comprimento foram coletadas, contadas, e armazenadas no fixador Carnoy e guardadas em geladeira até a confecção das lâminas.

Após os três dias as raízes foram tiradas dos frascos com o fixador, e colocadas em um béquer pequeno para o processo de hidrólise, onde colocou-se HCL 1N a 60°C no banho-maria, por 10 minutos. Após a hidrólise as raízes foram colocadas em frascos de vidro âmbar, contendo o reativo Schiff, onde ficaram por 2 horas em local escuro, após o que as raízes foram lavadas em água destilada, até que todo excesso de corante fosse retirado.

3.5 Confecção das lâminas

Sobre uma lâmina, colocou-se uma raiz com meristema intacto (porção terminal corada com roxo mais forte), e com auxílio de um bisturi cortou-se apenas a porção meristemática, sobre a qual foi adicionado Carmim e coberto com uma lamínula. Pressionou-se sobre o material com auxílio de um lápis com a borracha de apagar, até que as células fossem bem esmagadas. Para leitura, visualizaram-se as células através de um microscópio óptico na objetiva de 40x. Foram enumeradas 500 células por lâmina e cinco lâminas por tratamento (2500 células), avaliando-se a presença de aberrações cromossômicas (AC) e/ou micronúcleos (MN), conforme ilustrado na Figura 2.

Figura 2 – Aberrações cromossômicas e micronúcleos



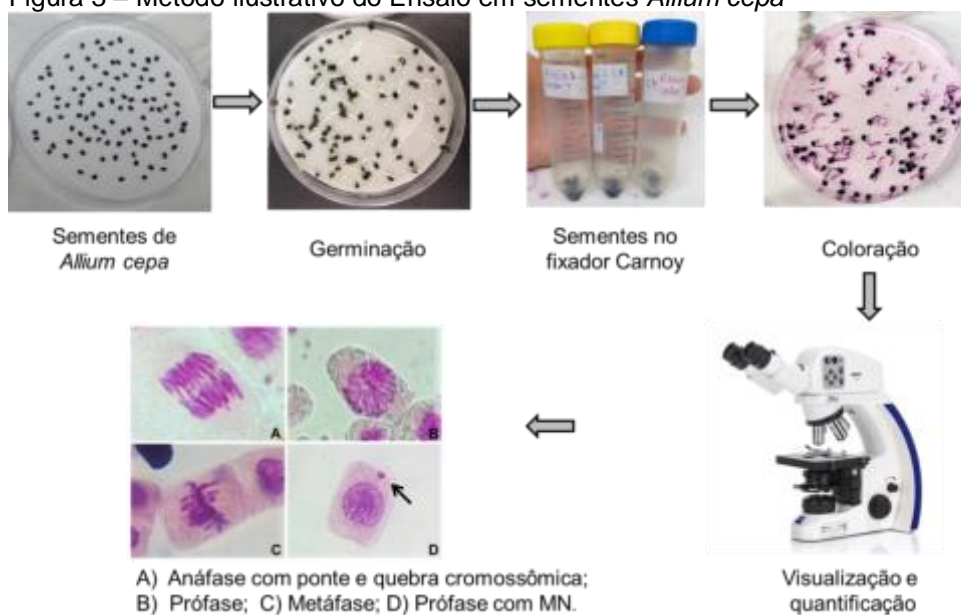
Saberes e práticas contemporâneas em gestão e inovação na Educação Profissional e em Sistemas Produtivos

Fonte: Elaborada pelo autor.

A. Micronúcleo (seta); B. Prófase com micronúcleo (cabeça de seta); C. Telófase; D. Prófase; E. Anáfase; F. Metáfase.

O ensaio em *Allium cepa* pode ser ilustrado conforme a Figura 3.

Figura 3 – Método ilustrativo do Ensaio em sementes *Allium cepa*



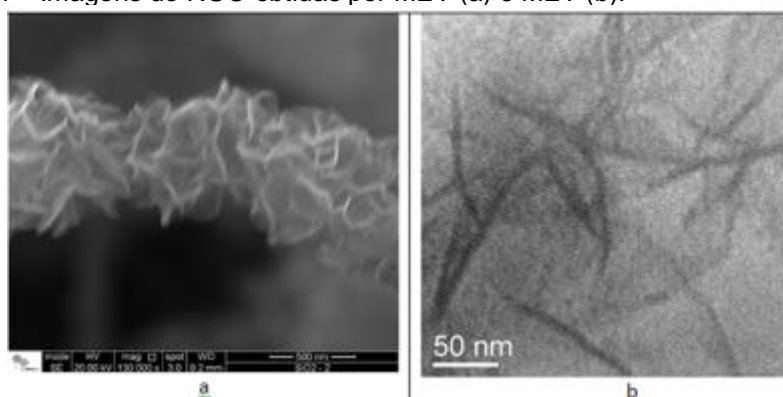
Fonte: Elaborada pelo autor.

A comparação entre os grupos foi feita por meio do teste ANOVA *one-way*, seguido do pós teste de Bonferroni, admitindo-se 95%, o intervalo de confiança.

4. Resultados e Discussão

A Figura 4 apresenta as imagens do RGO obtidas por MEV (a) e MET (b).

Figura 4 – Imagens do RGO obtidas por MEV (a) e MET (b).

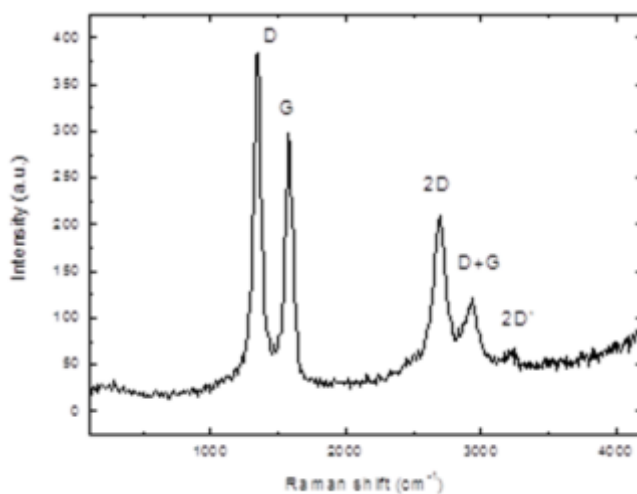


Fonte: autores

Saberes e práticas contemporâneas em gestão e inovação na Educação Profissional e em Sistemas Produtivos

A figura 5 mostra o espectro Raman das amostras, que é principalmente carbono hibridação sp^2 . As características mais intensos são os 1348 cm^{-1} , 1596 cm^{-1} e 2696 cm^{-1} , que são as bandas D, G e 2D. A banda D é geralmente atribuído a desordem e imperfeição de cristais de carbono, que é plausível, considerando a grande quantidade de cacadas na amostra. A banda G atribuído a um dos dois modos de E_{2g} vibrações de alongamento corresponde ao plano basal (domínios SP^2) de um único cristal de grafite ou grafeno. A banda D + G foi derivado da banda G harmônica de segunda ordem [4].

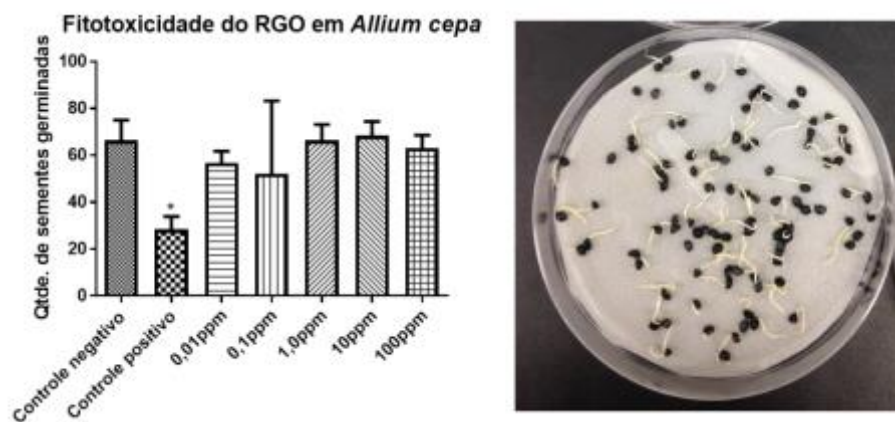
Figura 5 – Espectro de absorção do RGO por Raman.



Fonte: autores

Não foi observado efeito fototóxico do RGO sobre a germinação das sementes de *Allium cepa*, em nenhuma das concentrações, conforme demonstrado na Figura 6.

Figura 6 – Fitotoxicidade do RGO em *Allium cepa*



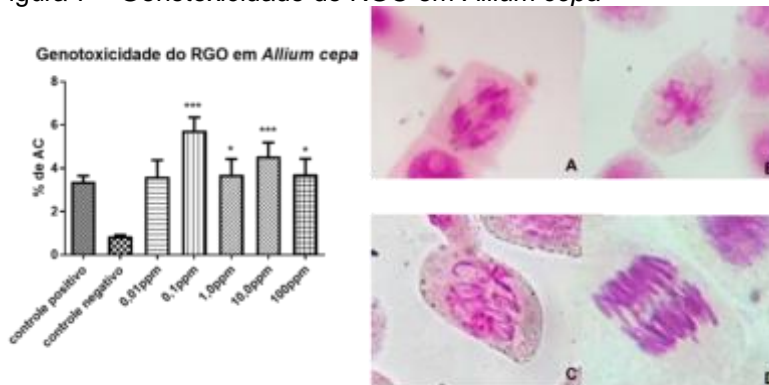
Fonte: Elaborada pelo autor.

As sementes germinadas são da placa de 100 ppm placa 3.

Saberes e práticas contemporâneas em gestão e inovação na Educação Profissional e em Sistemas Produtivos

O RGO apresentou efeito genotóxico a partir de 0,1 ppm, porém o efeito não foi relacionado com a concentração, conforme se observa no gráfico da Figura 7. Já o efeito mutagênico foi observado a partir da concentração de 10ppm e aqui também o efeito não foi concentração dependente. A figura 8 apresenta os resultados.

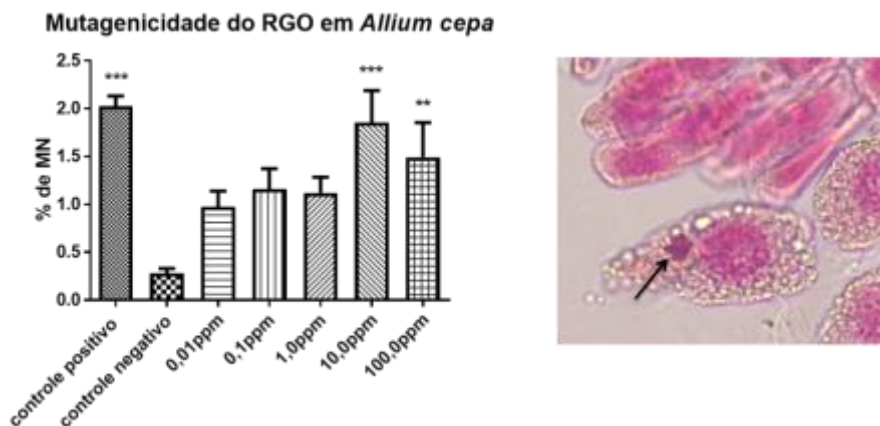
Figura 7 – Genotoxicidade do RGO em *Allium cepa*



Fonte: Autores.

Em A. Anáfase com ponte cromossômica; B. Metáfase normal; C. Metáfase com quebra cromossômica; D. Anáfase com ponte e quebra cromossômica. * $p < 0,05$

Figura 8 – Mutagenicidade do RGO em *Allium cepa*



Fonte: Autores

A seta preta indica um micronúcleo.

O RGO foi estudado neste trabalho para avaliar o seu potencial impacto, se presente no ambiente. Até onde pudemos pesquisar não há registro de estudos semelhantes ao nosso. Porém, há outros estudos do RGO como o de Mendonça et. al (2016) que avaliaram a toxicidade aguda do RGO *in vivo* do, analisando as células sanguíneas e os tecidos de ratos perfundidos com solução de RGO, e não observaram efeitos tóxicos significativos.

5. Considerações finais

Saberes e práticas contemporâneas em gestão e inovação na Educação Profissional e em Sistemas Produtivos

Em conjunto os resultados apresentados chamam a atenção para os potenciais efeitos tóxicos do RGO no ambiente, mesmo em baixas concentrações (0,1ppm), indicando potenciais impactos ambientais desta nanopartícula no ambiente. O efeito mutagênico só ocorreu nas maiores concentrações testadas, o que indica bom índice de reparo dos danos, pelas células, nas concentrações menores.

Os efeitos mutagênicos foram observados em concentrações que muito improvavelmente são esperadas no ambiente, o que pode ser uma garantia de segurança na utilização deste nanomaterial. Os achados aqui demonstrados colaboram com estudos anteriores deste grupo, utilizando outras nanopartículas carbonáceas, Andrade et al. (2013), utilizaram os ensaios de mutagenicidade com *Allium cepa* e de reversão de mutação com *Drosophila*, os quais não mostraram efeitos significativos para o MWCNT NT1. Silva (2014) realizou a exposição de *Tradescantia pallida* ao MWCNT – Helix, comercial, funcionalizado com Polietilenoglicol, não demonstrando efeitos tóxicos até 10 ppm. Com o mesmo MWCNT, a exposição de algas verdes *Pseudokirschineriella subcaptata*, resultou em efeitos tóxicos apenas na concentração de 100 ppm (GOMES, 2015).

Estudos prospectivos em relação aos possíveis níveis seguros de nanopartículas no ambiente, mostraram que os nanotubos de carbono (NTCs) não possuíam efeitos adversos em concentrações tão baixas como 0, 0,002, 0,02, 0,2 e 2 g / kg, mostrando que não é provável que isso interferisse na comunidade aquática, isto é, os NTCs não possuíam efeito ecotoxicológico significativo (GOTTSCHALK et. al., 2009). Enquanto os efeitos adversos potenciais da CNT não puderem ser descartados, recomenda-se a implementação de medidas de precaução ao longo da cadeia de valor (Incluindo o tratamento de fim de vida), a fim de reduzir a liberação e possíveis efeitos negativos sobre a saúde humana ou ambiental da CNT (KOHLENER et. al., 2008).

Referências

ANDRADE, L. R. de et al. Absence of mutagenic and recombinagenic activity of multi-walled carbon nanotubes in the *Drosophila* wing-spot test and *Allium cepa* test. *Ecotoxicology And Environmental Safety*. 99:1-6, 2013.

CANCINO, J. et al. Nanotecnologia em medicina: aspectos fundamentais e principais preocupações. *Química Nova*, São Paulo, 3 (23): 8-14, 2014.

CASTRO, M. O. de. Síntese do grafeno pelo método cvd. 2011. 85 f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

COSTA, T. C. Atividade mutagênica em bacia hidrográfica influenciada por sítio de contaminação de solos. 2010. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

Saberes e práticas contemporâneas em gestão e inovação na Educação Profissional e em Sistemas Produtivos

DAVIS, A. Discovery Toxicology in Lead Optimisation. In: DAVIS, Andrew; WARD, Simon e (Ed.). The Handbook of Medicinal Chemistry. Reino Unido: The Royal Society Of Chemistry, 2015. p. 398-398.

GOTTSCHALK, F.; SONDERER, T. SCHOLZ, R.; NOWACK, B. Modeled Environmental Concentrations of Engineered Nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for Different Regions. Environ. Sci. Technol. 43: 9216–9222, 2008.

GOMES, A. L. S. Avaliação toxicológica da interação dos nanotubos de carbono (CNT) em algas unicelulares: Análise ultraestrutural. 2015. 75 f. TCC (Graduação) - Curso de Sistemas Biomédicos, Faculdade de Tecnologia (FATEC), Sorocaba, 2015.

KOHLER, A. R. SOM, C.; HELLAND, A.; GOTTSCHALK, F. Studying the potential release of carbon nanotubes throughout the application life cycle. Journal of Cleaner Production 16: 927-937, 2008.

LI, K. et al. Self-Assembly of Graphene on Carbon Nanotube Surfaces. Scientific Reports. 3(1):.1-4, 2013.

MACAGNAN, K. K.; SARTORI, M. R. K.; CASTRO, F. G. Sinais e sintomas da toxicidade do formaldeído em usuários de produtos alisantes capilares. 2009. Disponível em: <<http://apps.unibrasil.com.br/revista/index.php/saude/article/viewFile/488/409>>. Acesso em: 20 de mai. de 2017.

MACHADO, I. R. L. et al. Nanotubos de carbono: potencial de uso em medicina veterinária. Ciência Rural, [s.l.], 44 (10): 1823-1829, 2014.

MARIN-MORALES, M. A. A Utilização de Allium cepa como Organismo Teste na Detecção da Genotoxicidade Ambiental. Rio Claro - SP: Instituto de Biociências - Unesp, 2008. 54 p.

MEHL, H. et al. The effect of variation of reactional parameters in the preparation of graphene by oxidation and reduction of graphite. Química Nova, 8: 1-9, 2014.

MENDONÇA, M.C.P. et al. Reduced graphene oxide: nanotoxicological profile in rats. Journal Of Nanobiotechnology, 14 (1): .1-13,. 2016.

NUNES, L. O. Síntese, caracterização e aplicação do óxido de grafite e grafeno em estudos eletroquímicos envolvendo ácido ascórbico, ácido úrico, dopamina e epinefrina. 2013. 104 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Sociais Aplicadas e Exatas, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha, Diamantina, 2013.

OLESZCZUK, P.; HOLLERT, H.. Comparison of sewage sludge toxicity to plants and invertebrates in three different soils. **Chemosphere**, 83 (4):502-509,2011.

Saberes e práticas contemporâneas em gestão e inovação na Educação Profissional e em Sistemas Produtivos

PARMAR, T. K.; RAWTANI, D.; AGRAWAL, Y. K.. Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution. *Frontiers In Life Science*,. 9(2):110-118, 2016.

SILVA, J. et al. Princípios bioéticos aplicados aos estudos ecotoxicológicos aquáticos. *Revista Bioética*, 23 (2):409-418, 2015.

SHAH, S. U. Importance of Genotoxicity & S2A guidelines for genotoxicity testing for pharmaceuticals. *Isr Journal of Pharmacy and Biological Sciences*.1 (2): 43-54, 2012.

VALENTE, D. et al. Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*, 42 (1): 1-21, 2017.

ZHAO, X.; LIU, R,. Recent progress and perspectives on the toxicity of carbon nanotubes at organism, organ, cell, and biomacromolecule levels. *Environment International*,. 40: 244-255, 2012.