

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

INSTITUTO DE QUÍMICA

**PREPARAÇÃO E AVALIAÇÃO DE FITOTOXICIDADE DE
NANOPARTÍCULAS DE ACETATO DE CELULOSE**

Maria Eduarda Maranni

Campo Grande – MS

2023

Maria Eduarda Maranni

**PREPARAÇÃO E AVALIAÇÃO DE FITOTOXICIDADE DE
NANOPARTÍCULAS DE ACETATO DE CELULOSE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no Instituto de
Química como requisito básico para a conclusão do Curso de
Química Bacharelado em Química Tecnológica

Orientador (a): Cicero Rafael Cena

Campo Grande - MS

2023


MARIA EDUARDA MARANNI

**PREPARAÇÃO E AVALIAÇÃO DE FITOTOXICIDADE DE
NANOPARTÍCULAS DE ACETATO DE CELULOSE**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado pela Banca Examinadora para obtenção do Grau de Graduação, no Curso de Química Bacharelado em Química Tecnológica da Universidade da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.


Campo Grande, 29 de junho de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **CICERO RAFAEL CENA DA SILVA**
Data: 01/07/2023 21:47:32-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Cicero Rafael Cena

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Documento assinado digitalmente
 **REGIANE GODOY DE LIMA**
Data: 01/07/2023 21:56:47-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr^a. Regiane Godoy de Lima

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. Sergio Carvalho de Araújo

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Dedico este trabalho a todos os amigos e familiares que por muitas vezes não mediram esforços ao me ajudar e incentivar. Sem vocês nada seria.

AGRADECIMENTOS

Muito obrigada!

É com essa expressão que devo iniciar meus sinceros e verdadeiros agradecimentos a todos que passaram comigo esta etapa da vida. O sentimento de gratidão que encontro neste momento é indescritível. Tão quais os sentimentos de orgulho por realizar a primeira e maior conquista da minha vida e o do medo pelo novo, pelo não planejado ou até mesmo pelo planejado que pode ser frustrado. Mesmo com tantos sentimentos, hoje o que predomina é a gratidão.

Primeiramente, a mim que nunca desisti. Até mesmo quando desistir parecia ser a melhor solução. Em segundo lugar, a minha família e amigos em que cada um teve um papel importantíssimo nesta jornada.

Minha mãe, Mauriceia, nome complicado para uma mulher simples e singela que sempre deu tudo de si para família. Nunca hesitou ao deixar suas vontades ou caprichos pelo outro. Minha mãe não só me deu a vida como também sua melhor qualidade, a empatia. Meu pai, Carlos, é um homem de personalidade, é decidido, é forte e por muitas vezes incompreendido. Jamais vi meu pai abaixar a cabeça, jamais o vi desistir. Meu pai, assim como minha mãe, deu-me sua melhor qualidade a resiliência. Para os dois o mesmo parágrafo, pois essa união é o sinônimo de partilha, de comunhão e de amor. Dentro e fora de casa, meus pais sempre foram exemplo para mim e meus irmãos.

Ana, minha irmã, o nome pequeno para uma menina pequena, mas de qualidades gigantes. Tampouco sei como descrevê-la, Ana é Ana. A irmandade é o que nos uniu, mas não nos resume. A nossa ligação é de outras vidas. A Ana me deu tudo e a ela eu dou minha admiração.

Heitor, meu caçula, foi meu desejo. Sempre quis um menino, sempre quis meu menino. Para ele eu ensinei tudo que eu sei e a cada dia que passar ensinarei mais. O Heitor me traz leveza, me leva de volta a infância e a ingenuidade.

João, um companheiro para toda vida, mostrou-me o que é o amor. Um incentivador nato, nunca falhou no quesito apoio. Ele é a minha melhor escolha, com ele nunca me faltou carinho, acolhimento e amor.

Cirço, carinhosamente chamado um grande mentor. Uma escolha familiar para trilhar o meu caminho até aqui e com certeza será levado para além disso. Cícero trouxe um olhar divertido para o caótico universo universitário.

Aos meus amigos, Manuela, Gustavo, Igor, Vinicius, Climei, Luiz e mais recentemente Nilson, foi incrível viver isso com vocês. Os dias de lamentações e risadas fizeram tudo ser mais leve e prazeroso.

Aos companheiros de pesquisa, aos grupos que C.A.B.R.A e GOF e, principalmente, a Regiane. Minha gratidão por tantos ensinamentos e companheirismo, também, por toda paciência.

Por fim, quero agradecer a todas as pessoas não mencionadas, mas passaram por esta caminha. Vocês com certeza têm um espaço em meu coração.

RESUMO

O uso de polímeros biocompatíveis e de baixo custo para produzir nanopartículas não tóxicas para sistemas de carregamento é uma alternativa promissora para aplicações biotecnológicas. Neste contexto, é escasso as investigações voltadas para a produção de nanopartículas poliméricas de baixo custo e que apresentem propriedades não tóxicas. Dentre a diversidade de polímeros que podem ser utilizados para a produção de nanopartículas de baixo custo, destaca-se em potencial a aplicação do acetato de celulose, um biopolímero natural com propriedades biocompatíveis e biodegradáveis, que já vem sendo amplamente utilizado como fibras, membranas e filmes em diversas aplicações biotecnológicas. Neste trabalho, fornece-se uma rota simples e de baixo custo para produzir nanopartículas de acetato de celulose (CA-NP's) pela técnica de emulsificação-evaporação do solvente, que produz nanopartículas com um diâmetro médio de 200nm e uma morfologia esférica e lisa para uso potencial como nanocarreador em aplicações agrícolas. As propriedades não fitotóxicas das nanopartículas de acetato de celulose produzidas foram comprovadas pela realização de um teste de toxicidade para plantas pelo ensaio *Allium cepa*. Os testes de citotoxicidade e genotoxicidade permitiram avaliar o processo mitótico, anormalidades cromossômicas, inibição/atraso no crescimento radicular e indução de micronúcleos. Em suma, os resultados demonstraram que CA-NP's não induziram efeitos fitotóxicos, citotóxicos ou genotóxicos, e não promoveram alterações no alongamento radicular, germinação ou nos índices mitótico, aberração cromossômica e micronúcleo. Conseqüentemente, os presentes resultados indicaram que CA-NP's podem ser potencialmente usados como nanopartículas ecologicamente corretas.

Palavras-chave: Não tóxico; acetato de celulose; nanopartículas poliméricas; *Allium cepa*.

ABSTRACT

The use of biocompatible and low-cost polymers to produce non-toxic nanoparticles for delivery systems is a promising alternative for biotechnological applications. In this context, there is a scarcity of investigations focused on the production of low-cost polymeric nanoparticles with non-toxic properties. Among the diversity of polymers that can be used to produce low-cost nanoparticles, cellulose acetate stands out as a potential application, a natural biopolymer with biocompatible and biodegradable properties that has already been widely used as fibers, membranes, and films in various biotechnological applications. In this work, a simple and low-cost route is provided to produce cellulose acetate nanoparticles (CA-NPs) by the emulsification-evaporation of the solvent technique, which produces nanoparticles with an average diameter of 200nm and a spherical and smooth morphology for potential use as a nanocarrier in agricultural applications. The non-phytotoxic properties of the produced cellulose acetate nanoparticles were demonstrated by conducting a plant toxicity test using the *Allium cepa* assay. Cytotoxicity and genotoxicity tests allowed the evaluation of the mitotic process, chromosomal abnormalities, root growth inhibition/delay, and micronuclei induction. In summary, the results showed that CA-NPs did not induce phytotoxic, cytotoxic, or genotoxic effects and did not promote alterations in root elongation, germination, or mitotic index, chromosomal aberration, and micronucleus. Consequently, the present results indicated that CA-NPs can be potentially used as environmentally friendly nanoparticles.

Keywords: non-phytotoxic; cellulose acetate; polymeric nanoparticles; *Allium cepa*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Diagrama esquemático do ensaio <i>Allium cepa</i>	17
Figura 2. (A) Micrografia eletrônica de varredura das nanopartículas de acetato de celulose (CA-NP's) com aumento de $\times 20.000$ e zoom de $\times 50.000$; (B) histograma com ampla distribuição de 100 a 600 nm, com valores médios de diâmetro em torno de $216 \pm 8,21$ nm.....	18
Figura 3. Espectros de FTIR de nanopartículas de acetato de celulose (CA-NPs) (linha preta); acetato de celulose da Sigma-Aldrich (linha vermelha); e estrutura química do acetato de celulose em detalhes.....	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diâmetro hidrodinâmico (DSize-DLS), a média Z é o tamanho hidrodinâmico médio ponderado pela intensidade (DZ-Average-DLS) e índice de polidispersão (PDI) dos CA-NPs. O diâmetro da nanopartícula determinado por micrografia eletrônica de varredura (DSEM) também é mostrado.....	19
Tabela 2. Resultados do ensaio <i>Allium cepa</i> tratado com soluções de CA-NP's. Os dados representam a média \pm erro padrão.....	21

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CA – Acetato de celulose;

NP's – Nanopartículas;

CA-NP's – Nanopartículas de acetato de celulose;

o/w – Óleo/água;

PVA – Álcool polivinílico;

PDI – Índice de polidispersividade;

DLS – Dispersão dinâmica de Luz;

MEV- Microscopia Eletrônica de varredura;

ξ – Potencial zeta;

DI – Água Deionizada;

MI – Índice mitótico;

CAI – Índice de aberração cromossômica;

MNI – Índice de micronúcleos;

GI – Índice de germinação;

REI – Índice de alongamento da raiz;

FTIR – Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. JUSTIFICATIVA	12
2.1. NANOPARTICULAS POLIMÉRICAS	12
2.2. BIOPOLÍMEROS E BIODEGRADABILIDADE.....	13
2.2.1. CELULOSE E ACETATO DE CELULOSE.....	13
3. OBJETIVOS.....	14
3.1 GERAL.....	14
3.2 ESPECÍFICOS.....	14
4. METODOLOGIA.....	15
4.1. MATERIAIS.....	15
4.2. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS.....	15
4.3. TAMANHO DE PARTÍCULAS HIDRODINÂMICAS E CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL ZETA.....	15
4.4. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS NP'S.....	16
4.5. IDENTIFICAÇÃO DE NP'S - ESPECTRO INFRAVERMELHO MOLÉCULA	16
4.6. ENSAIOS EM Allium Cepa.....	16
5. RESULTADOS.....	18
6. CONCLUSÕES.....	23
7. REFERÊNCIAS.....	24

1. INTRODUÇÃO

A celulose é um polímero natural facilmente obtido pela extração de plantas, bactérias, fungos e tunicados (animal marinho invertebrado - filo dos cordados). Considerado o biopolímero natural mais abundante do mundo, compreendendo 40 a 50% das reservas totais de biomassa da Terra. A celulose se destaca como um biopolímero renovável, biodegradável e não tóxico [1], capaz de sofrer reações de acilação, esterificação, oxidação e desoxigenação devido a seus grupos hidroxila [2].

O acetato de celulose é um éster derivado da celulose com potencial biocompatível e biodegradável, com modificações químicas limitadas [3]. Polímeros derivados de celulose são candidatos promissores para substituir materiais poliméricos não biodegradáveis usuais, contribuindo para diminuir os níveis de poluição ambiental [4]. Entre todos os derivados de celulose, o acetato de celulose tem tido grande reconhecimento devido à sua resistência mecânica, o que facilita seu processamento em filmes, membranas e fibras a partir de fundidos ou soluções [4,5,6] para amplas aplicações industriais e comerciais [7]. O efeito tóxico das folhas de acetato de celulose em plantas foi avaliado pela primeira vez em 1952 por Karl Maramorosch [8]; desde então, materiais à base de acetato de celulose têm sido explorados para uso potencial em aplicações biológicas [9], para adsorver material para tratamento de água [10] e como ferramentas analíticas [11], mas a literatura para avaliar os efeitos tóxicos do acetato de celulose em nanoescala permanece escasso.

Recentemente, diferentes materiais de acetato de celulose tornaram-se soluções promissoras para aplicações relacionadas à agricultura. Uma membrana líquida iônica modificada com acetato de celulose foi usada como adsorvente para a remoção de “Pirimicarb”, um inseticida, de águas residuais [5]. O hidrogel derivado de acetato de celulose e EDTAD foram utilizados como substrato para fertilizante NPK no solo e foram capazes de reduzir a lixiviação de fertilizantes e melhorar o desempenho de mudas de eucalipto [12]. Membranas de acetato de celulose embebidas em trioleína reduziram a biodisponibilidade vegetal de bifenilos policlorados (PCBs) no solo [13].

O acetato de celulose também é considerado um bom candidato para aplicações biotecnológicas por ser de baixo custo, hidrofílico, não tóxico, processável e por suas propriedades biodegradáveis e renováveis. A existência de grupos como grupos hidroxila, carboxila e éter em sua cadeia principal fornece características

iônicas, tornando-o um excelente nanorreator para misturar inúmeras nanopartículas funcionais e catalíticas em sua superfície [14]. Estudos têm sido conduzidos para melhorar as propriedades do CA por meio da incorporação de diferentes materiais: nanocargas bioativas [15]; nanocápsulas de óleos essenciais com atividade antimicrobiana [16]; nanocompósitos para embalagens biomédicas e segurança alimentar [17]; e nanopartículas como aplicações de sistema de entrega de drogas [18].

Apesar dos diversos avanços da nanotecnologia com aplicações de CA, estudos sobre nanopartículas de acetato de celulose e suas propriedades fitotóxicas ainda são escassos. Uma vez que alguns efeitos tóxicos dessas nanopartículas em plantas são decisivos para motivar novas aplicações, como nanocarreadores agroquímicos [19], por isso, deve-se explorar o papel desempenhado por materiais derivados de CA em nanoescala. Portanto, neste estudo, CA-NP's foram produzidos com sucesso usando uma técnica modificada de evaporação do solvente de emulsificação o/w, e testes fitotóxicos foram realizados usando o ensaio *Allium cepa*. Os testes de citotoxicidade e genotoxicidade permitiram avaliar o comportamento tóxico típico das NP's (como no processo mitótico, anormalidades cromossômicas, inibição/atraso no crescimento radicular e indução de micronúcleos) [20,21].

2. JUSTIFICATIVA

Pela definição, são consideradas nanopartículas aquelas que possuem variações de tamanho dentro da faixa de 1 a 100nm. A qual é independente da substância de composição. Existem variados tipos de nanopartículas como as nanopartículas de carbono, semicondutoras, cerâmica, metálicas, poliméricas e derivados de biomoléculas. Cada tipo se diferencia em formato, dispersão, tamanho e aplicações [2,22].

2.1 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Através de uma extensa revisão da literatura, notou-se que as nanopartículas poliméricas possuem um destaque nos estudos científicos. Seu uso é amplamente investigado na farmacocinética e cosmetologia, devido ao seu tamanho pequeno (podendo variar de 1nm a 1µm), não-toxicidade, alta estabilidade, vida útil longa e solubilidade em água [2,23]. As nanopartículas poliméricas além de permitir uma rota

sintética mais rápida, também possibilita o uso de biopolímero biodegradável e biocompatível como material de partida. Por isso, suas principais aplicações são biológicas voltadas para estudos de compatibilidade e comportamento em organismos vivos como a entrega de fármacos e diagnósticos.

2.2 BIOPOLÍMEROS E BIODegradABILIDADE

Biopolímeros são os polímeros naturais ou aqueles provenientes de fontes renováveis como milho, cana-de-açúcar, celulose, soja, amido de arroz, quitina etc. Estes polímeros possuem um ciclo de vida curto quando comparados aos polímeros de fontes fósseis [24]. A principal vantagem do uso destes polímeros é sua cadeia de produção menos poluente [25].

Porém, nem todo biopolímero é biodegradável, como exemplo, os bioplásticos, plásticos verdes e bio-based são polímeros derivados de forma parcial ou total de fontes renováveis, mas com estruturas semelhantes à de polímeros convencionais. Assim, característica como tempo de degradação é idêntica aos polímeros de fontes não-renováveis. Portanto, possui unicamente a vantagem de ter baixo impacto ambiental ao ser produzido [25].

Já os polímeros biodegradáveis partem de fontes naturais e renováveis, podem ser sintetizados por bactérias, derivados de fontes animais ou até mesmo fontes fósseis [24]. Estes materiais se degradam pela ação de enzimas ou de microrganismos, gerando biomassa, dióxido de carbono e água. Levam semanas ou até meses para completa degradação, dependendo das condições do meio [25]. Logo, a escolha de síntese para este trabalho, leva em consideração sua capacidade de degradação, bem como, a fonte natural e renovável de origem.

2.2.1 CELULOSE E ACETATO DE CELULOSE

A celulose muito abundante na natureza está presente em árvores, animais, fungos e bactérias. É um polímero linear com unidades repetidas de d-glicopirranose, em que estão ligados por ligações β -1,4- glicosídicas [25,26]. Os grupos hidroxilas presentes na estrutura da celulose estabelecem fortes ligações intra e intermoleculares por ligações de hidrogênio que são responsáveis pela rigidez e resistência da cadeia. Características que proporcionam a celulose insolubilidade na maioria dos solventes orgânicos e em água.

Assim, para melhorar a solubilidade e processabilidade da celulose são feitas modificações químicas em sua estrutura, produzindo os derivados de celulose [27].

O acetato de celulose é um dos derivados mais conhecidos da celulose, juntamente com éteres de celulose, como carboximetilcelulose e nitrato de celulose. É formado a partir da esterificação das cadeias de celulose utilizando o anidrido acético. Sendo o éster derivado da celulose mais utilizado na indústria devido ao seu baixo custo, biocompatibilidade, solubilidade em diversos solventes, capacidade de ser processado, resistência química, não-toxicidade [25,28,29].

Sabe-se que a degradação do CA ocorre como a degradação da celulose. Por clivagem homo ou heterolíticas de cadeia, o rompimento da ligação ocorre entre as unidades de glicose. Porque as ligações de éster são sensíveis à degradação, principalmente por clivagem hidrolítica ou presença de celulase, enzima que atua na hidrólise de celulose [30]

O CA é frequentemente aplicado para produção de filmes finos, membranas e fibras para suas diversas funcionalidades, porque, este biopolímero possui alta resistência mecânica que facilita seu processamento. Karl Maramorosch avaliou a toxicidade das folhas de acetato de celulose em plantas pela primeira vez em 1952. Desde então, o CA como material de partida tem sido explorado, principalmente, para uso potencial em aplicações biológicas, porém pouco se sabe sobre os efeitos tóxicos do acetato de celulose em escala nano.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Através da síntese de nanopartículas usando como matéria prima de partida o acetato de celulose, busca-se avaliar seu efeito fitotóxico em plantas.

3.2 ESPECÍFICOS

Para atingir o objetivo principal, objetivos específicos devem ser atingidos. Sendo eles:

- Sintetizar partículas em escala nano através do biopolímero acetato de celulose;
- Utilizar uma rota sintética de baixo custo;
- Aprimorar o tempo de síntese;

- Obter partículas com formatos homogêneos;
- Eliminar durante a rota qualquer solvente tóxico;
- Caracterizar morfologia, composição e potencial eletroestático das nanopartículas;
- Realizar ensaios de fitotoxicidade em *Allium cepa*;
- Processar todos os resultados obtidos para concluir a atividade das nanopartículas de acetato de celulose.

4. METODOLOGIA

4.1. MATERIAIS

Os reagentes químicos foram adquiridos de fontes comerciais (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA e Synth, Diadema, São Paulo, Brasil) e utilizados sem purificação adicional. Acetato de celulose (Mw ~ 50.000) e surfactante de álcool polivinílico foram adquiridos Sigma-Aldrich (Mw = 30.000–70.000). O diclorometano, da Synth.

4.2. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas de acetato de celulose foram produzidas usando uma técnica modificada de evaporação do solvente de emulsificação o/w [31]. A matéria-prima de acetato de celulose foi adicionada a uma solução aquosa de álcool PVA a 2,2% (m/v). Foi utilizado o método de adição da fase orgânica à fase aquosa: adição em uma única alíquota sendo agitada por 5 min a 1000 rpm e em seguida aplicada ao Sonifer® Branson SFX550 (Branson Ultrasonics, Danbury, Connecticut, EUA) com sonicação de 90s a 30 % de amplitude, com vibração pulsada de 10" e ponta de 0,5". A suspensão das NP's resultantes foi agitada por 24h à temperatura ambiente para evaporar completamente o solvente orgânico. As NP's foram centrifugadas (15 min a 14.000 rpm) e lavadas três vezes com água Millipore. A suspensão de NP's obtida foi congelada em nitrogênio líquido e liofilizada a -55 °C e 0,5 kPa. As NP's em pó foram armazenadas a -10 °C até o uso.

4.3. TAMANHO DE PARTÍCULAS HIDRODINÂMICAS E CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL ZETA

A distribuição de tamanho hidrodinâmico e o índice de polidispersividade (PDI) foram medidos por dispersão dinâmica de luz (DLS) usando um instrumento de dispersão de luz em um ângulo de dispersão de 90° em um equipamento Malvern Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, WorcesTershire, Reino Unido). O índice de refração foi de 1.330, e a temperatura foi mantida a 25 °C. Essas análises foram realizadas em triplicata à temperatura ambiente, cada uma compreendendo 15 corridas de 10 s com um período de estabilização térmica de 120s. As nanopartículas foram liofilizadas em solução e dispersas em água Mili-Q. As medidas de potencial zeta (ξ) de NP's foram determinadas pela técnica de eletroforese a laser Doppler. As medidas de ξ refletem o potencial de superfície das partículas, verificando a estabilidade dos sistemas.

4.4. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS NP'S

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos CA-NP's foi realizada em um microscópio JEOL JSM-6380 LV (JEOL, Akishima, Tóquio, Japão). As imagens MEV das CA-NP's foram obtidas após a liofilização e deposição das NP's em um stub de metal; um filme fino condutor (Au) foi pulverizado na superfície da amostra por uma técnica de pulverização catódica. As avaliações morfológicas dos CA-NP's foram realizadas usando imagens MEV com aumento de 20.000 e 50.000 vezes, e a distribuição do diâmetro dos NP's foi calculada com base nas medições de 100 partículas escolhidas aleatoriamente usando o software ImageJ.

4.5. IDENTIFICAÇÃO DE NP'S - ESPECTRO INFRAVERMELHO MOLÉCULA

A identificação molecular dos CA-NP's foi realizada em um espectrômetro infravermelho Perkin–Elmer (Perkin-Elmer, Waltham, Massachusetts, EUA), modelo espectro 100, na região de 4.000 a 700 cm^{-1} , com refletância total atenuada (ATR), usando 10 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} . As NP's liofilizadas e o material bruto de acetato de celulose foram investigados para comparação.

4.6. ENSAIOS EM *ALLIUM CEPA*

O ensaio de *Allium cepa* foi realizado utilizando-se sementes sem agrotóxicos (variedade Baia Periforme), adquiridas da empresa Isla (Ilha Sementes Ltda, Porto Alegre-RS, Brasil). Para cada grupo estudado, 30 sementes de *Allium cepa* foram colocadas em placas de Petri com uma camada de papel filtro e expostas

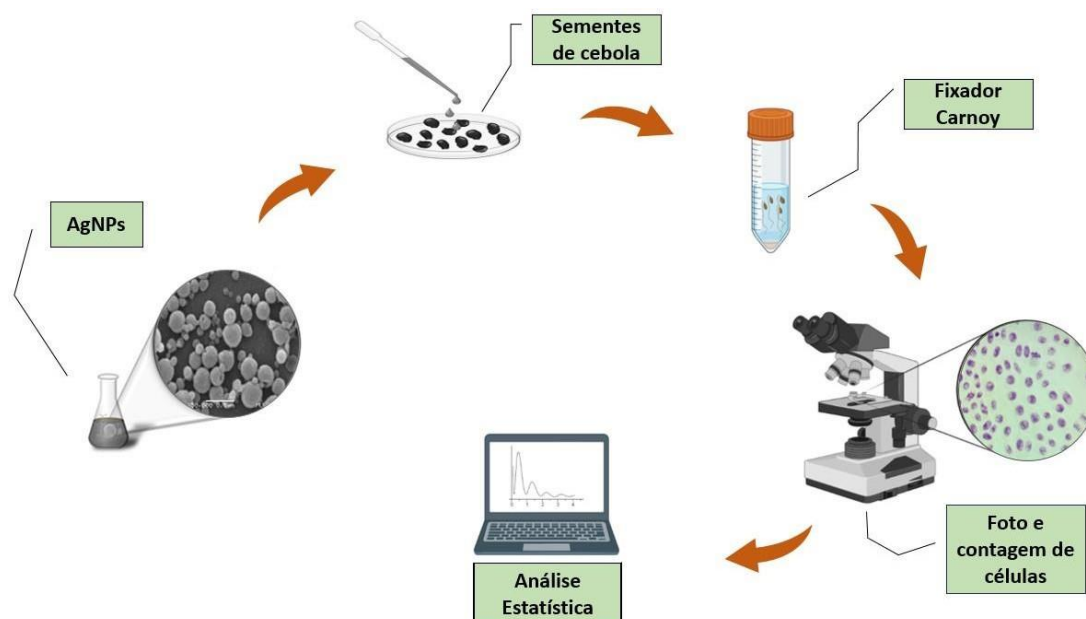
continuamente a uma solução aquosa de CA-NP's, nas concentrações de 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL. Em seguida, as sementes foram colocadas em câmara de germinação e crescimento, tipo B.O.D (Biochemical Oxygen Demand), com controle de temperatura de 25 °C, umidade de 85 ± 5% e iluminação de 12 h/dia durante 4 dias. Também foi considerado um grupo controle negativo, no qual as sementes foram expostas à água destilada durante a germinação. Assim, o experimento foi dividido em grupos de concentrações de CA-NP e controle negativo. Todos os testes foram realizados em triplicata, totalizando 90 sementes por grupo.

O índice de germinação (GI) foi calculado após 96 h usando a Equação (1):

$$GI = \frac{\text{Total de sementes germinadas}}{\text{Total de sementes expostas aos tratamentos}} \times 100 \quad (1)$$

O índice de alongamento radicular (REI) foi determinado calculando-se a média aritmética dos tamanhos das raízes de cada grupo, usando um paquímetro digital Digimess® após 96 h de exposição das sementes para germinação. As raízes de cada tratamento foram coletadas e fixadas em tubo Falcon juntamente com 20 mL de Carnoy 3:1 (etanol absoluto/ácido acético glacial (v/v)). Após 8 h, o fixador foi removido e 20 mL de um novo fixador de Carnoy foram adicionados e armazenados a 4 °C. Posteriormente, as raízes foram lavadas com água destilada, seguida de hidrólise ácida com HCl 1 M a 60 °C por 10 min, e novamente lavadas repetidamente com água destilada. Após algum tempo, foram imersos em solução de reagente de Schiff, em repouso por 2 h. Posteriormente, para o preparo das lâminas, as regiões meristemáticas das raízes de *Allium cepa* foram coletadas e seccionadas com bisturi e colocadas em lâmina de vidro, sendo adicionada uma gota de carmim acético 45%, coberta com lamínula e triturada cuidadosamente. Para cada tratamento, foram preparadas 5 lâminas e observadas em microscópio óptico Nikon com aumento de 400x, de modo que foram contadas 1000 células por lâmina, totalizando 5000 células. Resumidamente, o teste *Allium cepa* é representado no diagrama esquemático da Figura 1.

Figura 1. Diagrama esquemático do ensaio *Allium cepa*.



Fonte: Adaptado de Lima, R.G. et.al.(2022)

O índice mitótico (MI), índice de aberração cromossômica (CAI) e índice de micronúcleos (MNI) foi estimado conforme descrito pelas Equações (2)–(4):

$$MI = \frac{\text{Total de células em divisão}}{\text{Total de células observadas}} \times 100 \quad (2)$$

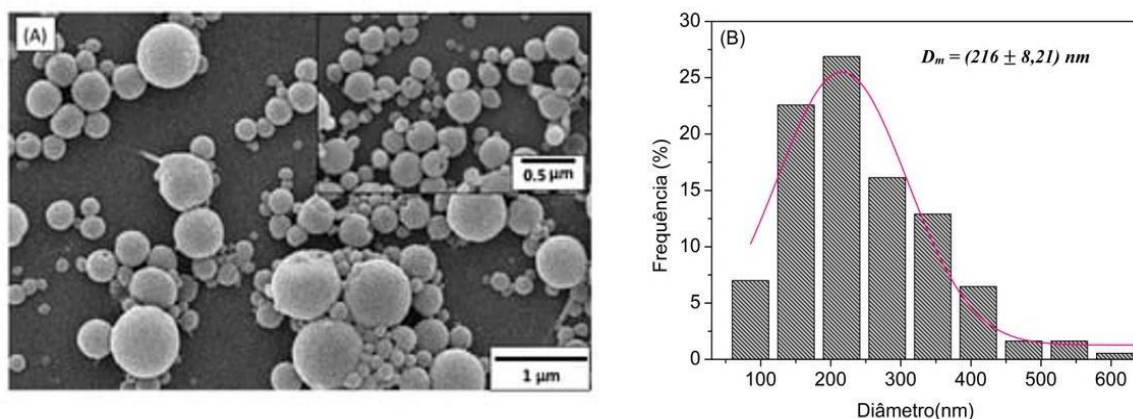
$$CAI = \frac{\text{Total de células com anormalidades cromossômicas}}{\text{Total de células observadas}} \times 100 \quad (3)$$

$$MNI = \frac{\text{Total de células portadoras de micronúcleos}}{\text{Total de células observadas}} \times 100 \quad (4)$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A morfologia da superfície dos CA-NP's foi examinada por imagens MEV, conforme mostrado na Figura 2A, observa-se nanopartículas com formato esférico regular e superfície lisa. Na Figura 2B, o histograma de diâmetro dos CA-NP's mostra uma grande distribuição de 100 a 600 nm, com diâmetro médio em torno de $216 \pm 8,21$ nm.

Figura 2. (A) Micrografia eletrônica de varredura das nanopartículas de acetato de celulose (CA-NP's) com aumento de $\times 20.000$ e zoom de $\times 50.000$; **(B)** histograma com ampla distribuição de 100 a 600 nm, com valores médios de diâmetro em torno de $216 \pm 8,21$ nm.



Fonte: Adaptado de
Lima, R.G. et.al. (2022)

A distribuição de tamanho de partícula determinada por DLS com base na intensidade (Tabela 1) ($D_{\text{Size-DLS}}$) e o tamanho hidrodinâmico médio Z ($D_{\text{Z-Average-DLS}}$) são consistentes com os tamanhos de partícula observado na micrografia MEV mostrado na Figura 2A e suas respectivas distribuições de partículas, mostrado na Figura 2B. As nanopartículas apresentaram alguma polidispersão e podem conter partículas agregadas. O potencial zeta de CA-NP's medido em pH neutro indica superfícies carregadas negativamente devido à presença de grupos hidroxila e carboxílico em suas superfícies, com uma estabilidade relativamente coloidal [32]. Para todas as nanopartículas, os valores do ξ indicam uma boa estabilidade dos sistemas de nanopartículas devido à repulsão eletrostática efetiva das partículas [15,33].

Tabela 1. Diâmetro hidrodinâmico ($D_{\text{Size-DLS}}$), a média Z é o tamanho hidrodinâmico médio ponderado pela intensidade ($D_{\text{Z-Average-DLS}}$) e índice de polidispersão (PDI) dos CA-NP's. O diâmetro da nanopartícula determinado por micrografia eletrônica de varredura (D_{SEM}) também é mostrado.

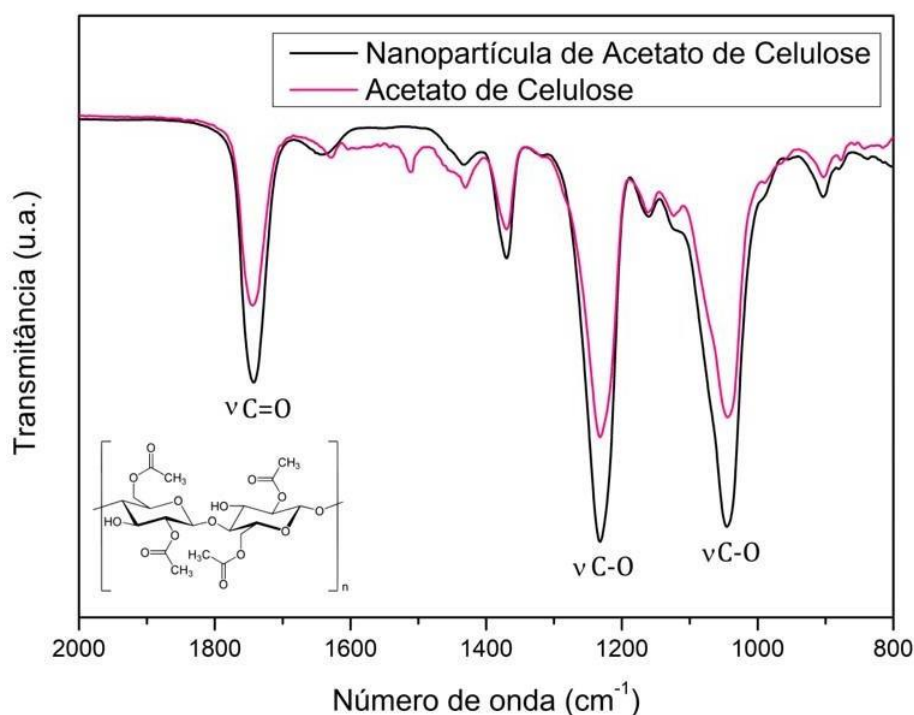
Partículas	D_{SEM} (nm)	PDI	$D_{\text{Size-DLS}}$ (nm)	$D_{\text{Z-Average-DLS}}$ (nm)	Zeta (mV)
CA-NPs	216 ± 8.21	0.933	508.3 ± 49.7	1945 ± 87.6	-2.52

Fonte: Adaptado de Lima, R.G. et.al.(2022)

As nanopartículas de acetato de celulose e o acetato de celulose dos espectros Sigma-Aldrich FTIR, mostrados na Figura 3, exibem uma alta similaridade. As bandas características do CA estão na faixa espectral de 1745 cm^{-1} (vibração de alongamento

dos grupos C=O), 1433,5 e 1370,5 cm^{-1} (vibração de deformação C-H) 1231 e 1044,5 cm^{-1} (vibração de alongamento dos grupos C-O) [34,35,36]. Em 1645 cm^{-1} , é possível observar uma banda de dividida H-O-H, associada à absorção de água e alargada no espectro das nanopartículas [6]. Apenas uma pequena diferença foi identificada para a banda de 1512 cm^{-1} , atribuída à vibração de deformação o dos grupos C-H [34], o que não foi observado para CA-NP's.

Figura 3. Espectros de FTIR de nanopartículas de acetato de celulose (CA-NPs) (linha preta); acetato de celulose da Sigma-Aldrich (linha vermelha); e estrutura química do acetato de celulose em detalhes.



Fonte: Adaptado de Lima, R.G. et.al.(2022)

Os efeitos dos CA-NP's no alongamento radicular (REI) e nos índices de germinação (GI) são apresentados na Tabela 2. As CA-NP's não levaram a uma redução significativa no GI e REI, o que indica que os CA-NP's não induzem efeitos de fitotoxicidade. Embora uma redução relativa no valor do índice de germinação possa ser observada para maiores concentrações de CA-NP's, não foi estatisticamente significativa.

Tabela 2. Resultados do ensaio *Allium cepa* tratado com soluções de CA-NP's. Os dados representam a média \pm erro padrão.

Tratamento	MI (%)	CAI (%)	MNI (%)	IG (%)	REI (mm)
------------	--------	---------	---------	--------	----------

controle (DI- água)	1.64 ± 0.38	0.08 ± 0.04	0.04 ± 0.04	70.00 ± 16.67	9.51 ± 0.88
12.5 µg·mL ⁻¹	1.38 ± 0.44	0.12 ± 0.07	0.04 ± 0.02	74.44 ± 10.11	9.45 ± 0.46
25 µg·mL ⁻¹	1.36 ± 0.64	0.08 ± 0.06	0 ± 0.00	65.56 ± 7.70	9.12 ± 2.30
50 µg·mL ⁻¹	0.90 ± 0.22	0.04 ± 0.02	0.02 ± 0.02	65.56 ± 10.18	11.72 ± 2.15
100 µg·mL ⁻¹	0.74 ± 0.28 *	0 ± 0.00	0.10 ± 0.06	67.78 ± 10.18	11.39 ± 1.51

*(asterisco) representa a diferença significativa entre as amostras de controle e tratadas com NP (*p < 0,05); DI-água —Água Deionizada; MI—índice mitótico; CAI — índice de aberração cromossômica; MNI—índice de micronúcleos; GI—índice de germinação; REI - índice de alongamento da raiz.

Fonte: Adaptado de Lima, R.G. et.al.(2022)

A Tabela 2 também mostra os resultados de MI de células de *Allium cepa* submetidas a CA-NPs. Em concentrações mais altas as nanopartículas de CA causaram uma redução na divisão celular em células de meristema. A concentração de 100 µg·mL⁻¹ induziu uma redução estatisticamente significativa de cerca de 45% no MI quando comparado ao grupo controle. A diminuição do MI pode ser explicada pelas variações na duração do ciclo mitótico devido ao aumento da duração da fase S [37], ou pode estar relacionada ao bloqueio na fase G1, que suprime o DNA síntese [38].

Os efeitos genotóxicos de CA-NP's em células de *Allium cepa* também foram avaliados; no entanto, não foram observadas alterações estatisticamente significativas em comparação com o controle negativo. Além disso, a Tabela 2 mostra que o MNI também não apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle. Esses resultados sugerem que CA-NP's não geraram alterações citotóxicas e genotóxicas em células meristemáticas de *Allium cepa*. Esses resultados são de grande interesse, uma vez que essas NP's poliméricas podem ser usadas para fornecer pesticidas e/ou fertilizantes e oferecem muitas vantagens, devido à sua natureza altamente estável e capacidade de encapsular diferentes ingredientes ativos [39,40]. Assim, a questão de sua nanotoxicidade é muito importante [41].

Em geral, as nanopartículas poliméricas de base biológica são não tóxicas e biodegradáveis e são consideradas nanocarreadores superiores [39]. Alguns polímeros, como alginato, quitosana, poli (álcool vinílico), poli (vinilpirrolidona), fluoreto

de polivinilideno, tripolifosfato (TPP) e poli (etilenoglicol) metil éter-bloco-láctido-co-glicólido (mPEG-PLGA) são comumente usados em diferentes áreas de aplicação [42,43,44]. Atualmente, muitas nanopartículas poliméricas são amplamente utilizadas na ciência vegetal para melhorar o rendimento das culturas, mas causam alguns danos ao meio ambiente [45,46].

O presente estudo fornece mais informações sobre a toxicidade ambiental de CA-NP's, mostrando que este nanomaterial apresenta grande potencial como nanocarreador, uma vez que não detectamos toxicidade no teste de *Allium cepa*, principalmente para concentrações menores que $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. No entanto, faz-se necessário investigar mais profundamente as concentrações ideais de CA-NP's em suas futuras aplicações em plantas. Uma vez que ainda há lacunas nas pesquisas que envolvem essa área [39].

6. CONCLUSÕES

A produção de CA-NP's esféricos com um diâmetro principal de cerca de 200 nm foi possível através de uma técnica modificada de evaporação do solvente de emulsificação o/w (óleo/água). A análise FTIR não mostrou grandes mudanças nos modos vibracionais moleculares da nanopartícula de acetato de celulose devido ao processo de síntese. As CA-NP's apresentaram taxas insignificativas no alongamento e germinação radicular e nos índices mitótico, aberração cromossômica e micronúcleo, portanto não induziram efeitos fitotóxicos e não geraram alterações citotóxicas e genotóxicas no teste de *Allium cepa*.

Ainda que necessário a investigação sobre as concentrações ideais de CA-NP's, há um grande potencial para aplicações futuras como nanocarreadores para a entrega de pesticidas e/ou fertilizantes, bem como, ampliar estudos de toxicidade *in vitro* para possibilidade de carreamento de fármacos em humanos e/ou até aplicações dermocosméticas. Pois, em comparação com outros polímeros, o acetato de celulose é um biopolímero de baixo custo e mais fácil de encontrar/produzir.

7. REFERÊNCIAS

1. Joseph, B.; Sagarika, V.K.; Sabu, C.; Kalarikkal, N.; Thomas, S. Cellulose nanocomposites: Fabrication and biomedical applications. *J. Bioresour. Bioprod.* **2020**, *5*, 223–237.
2. Sajid, M.; Płotka-Wasyłka, J. Nanoparticles: Synthesis, characteristics, and applications in analytical and other sciences. *Microchem. J.* **2020**, *154*, 104623.
3. Kulterer, M.R.; Reichel, V.E.; Kargl, R.; Köstler, S.; Sarbova, V.; Heinze, T.; Stana-Kleinschek, K.; Ribitsch, V. Functional polysaccharide composite nanoparticles from cellulose acetate and potential applications. *Adv. Funct. Mater.* **2012**, *22*, 1749–1758.
4. Jin, X.; Xu, J.; Wang, X.; Xie, Z.; Liu, Z.; Liang, B.; Chen, D.; Shen, G. Flexible TiO₂/cellulose acetate hybrid film as a recyclable photocatalyst. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 12640–12648.
5. Zulfiqar, S.; Rafique, U.; Akhtar, M.J. Removal of pirimicarb from agricultural wastewater using cellulose acetate—Modified ionic liquid membrane. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2019**, *26*, 15795–15802.
6. Barud, H.S.; de Araújo Júnior, A.M.; Santos, D.B.; de Assunção, R.M.N.; Meireles, C.S.; Cerqueira, D.A.; Rodrigues Filho, G.; Ribeiro, C.A.; Messaddeq, Y.; Ribeiro, S.J.L. Thermal behavior of cellulose acetate produced from homogeneous acetylation of bacterial cellulose. *Thermochim. Acta* **2008**, *471*, 61–69.
7. Hamed, O.A.; Jodeh, S. Cellulose acetate from biomass waste of olive industry. *J. Wood Sci.* **2015**, *61*, 45–52.
8. Karl, M. Toxicity of cellulose acetate sheets to plants and fish. *Science* **1952**, *115*, 236.
9. Spasova, M.; Manolova, N.; Rashkov, I.; Tsekova, P.; Georgieva, A.; Toshkova, R.; Markova, N. Cellulose Acetate-Based Electrospun Materials with a Variety of Biological Potentials: Antibacterial, Antifungal and Anticancer. *Polymers* **2021**, *13*, 1631.
10. Sayyed, A.J.; Pinjari, D.V.; Sonawane, S.H.; Bhanvase, B.A.; Sheikh, J.; Sillanpää, M. Cellulose-based nanomaterials for water and wastewater treatments: A review. *J. Environ. Chem. Eng.* **2021**, *9*, 106626.

11. Ruiz-Palomero, C.; Laura Soriano, M.; Valcarcel, M. Nanocellulose as analyte and analytical tool: Opportunities and challenges. *TRAC-Trends Anal. Chem.* **2017**, *87*, 1–18.
12. Senna, A.M.; Botaro, V.R. Biodegradable hydrogel derived from cellulose acetate and EDTA as a reduction substrate of leaching NPK compound fertilizer and water retention in soil. *J. Control. Release* **2017**, *260*, 194–201.
13. Wang, Y.; Wang, Y.; Wang, L.; Fang, G.; Cang, L.; Herath, H.M.S.K.; Zhou, D. Reducing the bioavailability of PCBs in soil to plant by biochars assessed with triolein-embedded cellulose acetate membrane technique. *Environ. Pollut.* **2013**, *174*, 250–256.
14. Bifaria, E.N.; Khanb, S.B.; Alamryb, K.A.; Asirib, A.M.; Akhtard, K. Cellulose Acetate Based Nanocomposites for Biomedical Applications: A Review. *Curr. Pharm. Des.* **2016**, *22*, 3007–3019.
15. Varshosaz, J.; Taymouri, S.; Jafari, E.; Jahanian-najafabadi, A.; Taheri, A. Formulation and characterization of cellulose acetate butyrate nanoparticles loaded with nevirapine for HIV treatment. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2018**, *48*, 9–20.
16. Liakos, A.I.L.; Iordache, F.; Scarpellini, A.; Oneto, M.; Bianchini, P.; Grumezescu, A.M.; Holban, A.M. Cellulose acetate—Essential oil nanocapsules with antimicrobial activity for biomedical applications. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2018**, *172*, 471–479.
17. Marrez, D.A.; Abdelhamid, A.E.; Darwesh, O.M. Eco-friendly cellulose acetate green synthesized silver nano-composite as antibacterial packaging system for food safety. *Food Packag. Shelf Life* **2019**, *20*, 100302.
18. Huda, E.; Rahmi; Khairan. Preparation and characterization of cellulose acetate from cotton. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **2019**, *364*, 012021.
19. Scherer, M.D.; Sposito, J.C.V.; Falco, W.F.; Grisolia, A.B.; Andrade, L.H.C.; Lima, S.M.; Machado, G.; Nascimento, V.A.; Gonçalves, D.A.; Wender, H.; et al. Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles on meristematic cells of *Allium cepa* roots: A close analysis of particle size dependence. *Sci. Total Environ.* **2019**, *660*, 459–467.
20. Pathiratne, A.; Hemachandra, C.K.; De Silva, N. Efficacy of *Allium cepa* test system for screening cytotoxicity and genotoxicity of industrial effluents originated from different industrial activities. *Environ. Monit. Assess.* **2015**, *187*, 730.

21. Leme, D.M.; Marin-Morales, M.A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutat. Res./Rev. Mutat. Res.* **2009**, *682*, 71–81.
22. Moritz M, Geszke-Moritz M: Application of nanomaterials in medical sciences. *Chemik* **2012**, *66*, 219–226.
23. Moritz M, Geszke-Moritz M: The newest achievement in synthesis, immobilization and practical applications of antibacterial nanoparticles. *Chem Eng J* **2013**, *228*, 596–613.
24. Brito, G. F.; Agrawal, P.; Araújo, E. M.; Mélo, T. J. A Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. *REMAP*, **2011**, *62*, 127–139.
25. Cougo, C. L. Imobilização de fotocatalisadores em polímeros biodegradáveis: Revisão da Bibliografia. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, **2021**.
26. Mansoori, S.; Davarnejad, R.; Matsuura, T.; Ismail, A. F. Membranes based on non-synthetic (natural) polymers for wastewater treatment. *Polymer Testing*, **2020**, *84*, 106381.
27. Oprea, Madalina; Voicu, Stefan Ioan. Recent advances in composites based on cellulose derivatives for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, **2020**, *247*, p. 116683.
28. Khoshnevisan, K.; Maleki, H.; Samadian, H.; Shahsavari, S.; Sarrafzadeh, M. H.; Larijani, B.; Dorkoosh, F. A.; Haghpanah, V.; Khorramizadeh, M. R. Cellulose acetate electrospun nanofibers for drug delivery systems: Applications and recent advances. *Carbohydrate Polymers*, **2018**, *198*, 131–141.
29. Imam, S. S.; Adnan, R.; Mohd Kaus, N. H. Immobilization of BiOBr into cellulose acetate matrix as hybrid film photocatalyst for facile and multicycle degradation of ciprofloxacin. *Journal of Alloys and Compounds*, **2020**, *843*, 155990.
30. Silva, J. O. da. Obtenção de acetato de celulose a partir de bagaço de cana-de-açúcar e análise de degradação in vitro. Dissertação. Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, **2019**.
31. Rafiei, P.; Haddadi, A. Docetaxel-loaded PLGA and PLGA-PEG nanoparticles for intravenous application: Pharmacokinetics and biodistribution profile. *Int. J. Nanomed.* **2017**, *12*, 935–947.
32. Margarida Cardoso, M.; Peça, I.N.; Raposo, C.D.; Petrova, K.T.; Teresa Barros, M.; Gardner, R.; Bicho, A. Doxorubicin-loaded galactose-conjugated poly(D,L-lactide-

- co-glycolide) nanoparticles as hepatocyte-targeting drug carrier. *J. Microencapsul.* **2016**, *33*, 315–322.
33. Fodor-Kardos, A.; Kiss, Á.F.; Monostory, K.; Feczko, T. Sustained: In vitro interferon-beta release and in vivo toxicity of PLGA and PEG-PLGA nanoparticles. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 15893–15900.
34. Candido, R.G.; Godoy, G.G.; Gonçalves, A. Characterization and application of cellulose acetate synthesized from sugarcane bagasse. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *167*, 280–289.
35. Culica, M.E.; Chibac-Scutaru, A.L.; Melinte, V.; Coseri, S. Cellulose Acetate Incorporating Organically Functionalized CeO₂ NPs: Efficient Materials for UV Filtering Applications. *Materials* **2020**, *13*, 2955.
36. Rodrigues Filho, G.; Monteiro, D.S.; da Silva Meireles, C.; de Assunção, R.M.N.; Cerqueira, D.A.; Barud, H.S.; Ribeiro, S.J.L.; Messadeq, Y. Synthesis and characterization of cellulose acetate produced from recycled newspaper. *Carbohydr. Polym.* **2008**, *73*, 74–82.
37. Kumari, M.; Mukherjee, A.; Chandrasekaran, N. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Sci. Total Environ.* **2009**, *407*, 5243–5246.
38. Magnusson, J.; Ramel, C.; Eriksson, A. Mutagenic effects of chlorinated phenoxyacetic acids in *Drosophila melanogaster*. *Hereditas* **1977**, *87*, 121–123.
39. Jogaiah, S.; Paidi, M.K.; Venugopal, K.; Geetha, N.; Mujtaba, M.; Udikeri, S.S.; Govarthanan, M. Phytotoxicological effects of engineered nanoparticles: An emerging nanotoxicology. *Sci. Total Environ.* **2021**, *801*, 149809.
40. Tong, Y.; Wu, Y.; Zhao, C.; Xu, Y.; Lu, J.; Xiang, S.; Zong, F.; Wu, X. Polymeric Nanoparticles as a Metolachlor Carrier: Water-Based Formulation for Hydrophobic Pesticides and Absorption by Plants. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 7371–7378.
41. Zielińska, A.; Costa, B.; Ferreira, M.V.; Miguéis, D.; Louros, J.M.S.; Durazzo, A.; Lucarini, M.; Eder, P.; Chaud, M.V.; Morsink, M.; et al. Nanotoxicology and nanosafety: Safety-by-design and testing at a glance. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 4657.
42. Viana, J.L.; França, T.; Cena, C. Solution blow spinning poly(Vinyl alcohol) sub-microfibers produced from different solvents. *Orbital* **2020**, *12*, 1–6.

43. Sobral, F.; Silva, M.J.; Canassa, T.; Goncalves, A.M.; Cena, C. PVDF/KNO₃ Composite Sub-Microfibers Produced by Solution Blow Spinning as a Hydrophobic Matrix for Fertilizer Delivery System. *Polymers* **2022**, *14*, 1000.
44. Cena, C.R.; Silva, M.J.; Malmonge, L.F.; Malmonge, J.A. Poly(vinyl pyrrolidone) sub-microfibers produced by solution blow spinning. *J. Polym. Res.* **2018**, *25*, 238.
45. Esler, D.; Trust, K.A.; Ballachey, B.E.; Iverson, S.A.; Lewis, T.L.; Rizzolo, D.J.; Mulcahy, D.M.; Miles, A.K.; Woodin, B.B.R.; Stegeman, C.J.J.; et al. Cytochrome p4501a biomarker indication of oil exposure in harlequin ducks up to 20 years after the Exxon Valdez oil spill. *Environ. Toxicol. Chem.* **2010**, *29*, 1138–1145.
46. Nandini, B.; Puttaswamy, H.; Prakash, H.S.; Adhikari, S.; Jogaiah, S.; Nagaraja, G. Elicitation of novel trichogenic-lipid nanoemulsion signaling resistance against pearl millet downy mildew disease. *Biomolecules* **2020**, *10*, 25.
47. Lima, R.G.; Maranni, M.; Araujo, L.O.; Maciel, B.M.; Canassa, T.; Caires, A.R.L.; Cena, C. Preparation and Phytotoxicity Evaluation of Cellulose Acetate Nanoparticles. *Polymers* **2022**, *14*, 5022.