

---

## ENSAIOS DE GENOTOXICIDADE PARA BIOPLÁSTICOS DE AMIDO NANOESTRUTURADOS

---

Juan Antonio Ruano Ortiz, Mônica Pascoli, Renata de Lima, Thaísa de Menezes Alves Moro,  
Carlos Wanderlei Piler Carvalho, José Luis Ramírez Ascheri.

UFRRJ, Seropédica/RJ  
Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP  
Embrapa Agroindústria de Alimentos, 23020-470, Rio de Janeiro/RJ

**Projeto Componente: PC3 Plano de Ação: PA3**

---

### Resumo

Diferentes bioplásticos nanoestruturados foram elaborados com o objetivo de avaliar a genotoxicidade das nano cargas de argila e fibras adicionadas, estas apresentam uma grande área superficial, frequentemente exibem propriedades mecânicas, ópticas, magnéticas ou químicas distintas de partículas e superfícies macroscópicas. Foi realizada a análise de aberração cromossômica com ensaios *Allium cepa* nas nanocargas: Cloisite, Novaclay, Zeolita Cubana, Bentonita, Zeolita Purificada, Vermiculita e Nanolinter de algodão e na sua combinação nos bioplásticos desenvolvidos a partir de amido (mandioca/ milho) e glicerol. Ao avaliar o índice mitótico observou-se que os materiais contendo as nanocargas Novaclay, Zeolita purificada e Vermiculita não afetaram a divisão celular. Em contra parte, as nanocargas Zeolita cubana e Cloisite sugerem comportamento genotóxico.

**Palavras-chave:** Bioplásticos, toxicidade, extrusão, compósitos.

---

### Introdução

---

A aplicação de nano cargas em bioplásticos vem sendo amplamente estudada em pesquisas que visam o desenvolvimento de embalagens alimentícias livres de resinas sintéticas (ROONEY, 1995). Não há dúvida de que a nanotecnologia oferece melhorias nas propriedades tecnológicas dos materiais desenvolvidos, entretanto, como qualquer área da tecnologia que faz uso intensivo de novos materiais, ela pode trazer alguns riscos ao meio ambiente e à saúde humana (GIMENEZ et al., 2009). As mesmas características que tornam as nanopartículas interessantes do ponto de vista de aplicação tecnológica podem ser indesejáveis quando estas são liberadas ao meio ambiente. Neste trabalho a realização de teste genotoxicidade foi abordada em nanocargas e bioplásticos elaborados a partir destas.

### Materiais e métodos

---

#### *Elaboração dos bioplásticos*

Os extrudados de amido de mandioca (45%) e de milho (55%) foram elaborados em uma extrusora dupla rosca Clextral Evolun HT25 (Firminy, França) e nano estruturadas com: Cloisite, Novaclay, Zeolita Cubana, Bentonita, Zeolita Purificada, Vermiculita e Nanolinter de algodão nas concentrações de 3 e 5% em substituição a mistura de amidos. O material extrudado foi cortado em pedaços regulares com 5g e termo-prensado em uma prensa hidráulica manual (São Carlos, Brasil) a 10 ton de força de compressão por 30 s a 90°C. \

#### *Avaliação da genotoxicidade*

O material biológico utilizado como sistema-teste constituiu-se de sementes pré-germinadas de *Allium cepa* (2n=16 cromossomos), quais foram submetidas a tratamento durante 24 horas em soluções dos materiais em pó: Cloisite, Novaclay, Zeolita Cubana, Bentonita, Zeolita Purificada e Bermiculita, todos na concentração de 60mg/ml. No controle negativo as sementes foram tratadas apenas com água Milli-Q, e no controle positivo com o agrotóxico trifluralina. Após o tratamento com as soluções dos diversos materiais, as raízes

foram coletadas e fixadas em Etanol: Acido Acético (3:1 v/v) por 24 horas, e em seguida lavadas três vezes com água destilada para remoção do excesso do fixador.

Após a fixação, as raízes foram submetidas a uma hidrólise ácida em banho maria a 60°C em solução de HCl 1M, lavadas, coradas em reativo de Schiff na ausência de luz durante duas horas, e lavadas novamente em água ultra pura para a retirada do excesso do corante.

As lâminas foram preparadas em triplicata e para o preparo destas, os meristemas das raízes foram corados com Carmim e levemente esmagados com uma lamínula. Posteriormente armazenadas em temperatura a - 80°C.

A análise das lâminas foi realizada por leitura em microscópio das divisões celulares e das anormalidades cromossômicas como pontes, fragmentos, danos celulares e desarranjos, assim foram calculados os Índices Mitóticos e de Alterações.

## Resultados e discussão

Analisando os dados da leitura das lâminas é possível verificar que estas apresentaram uma boa taxa de divisão celular para que esta avaliação de genototoxicidade pudesse ser realizada. Os Índices Mitótico e de Alterações (Tab. 1), seguido da avaliação da significância, podem ser observados nas Fig. 1 e 2.

Na Fig. 1 pode ser observado que em relação ao Índice Mitótico, é possível constatar que o material Novaclay apresentou nas células qual ficou em contato, índice mais próximo ao controle negativo, seguido dos materiais Zeolita Purificada, e Bermiculita. As células que ficaram expostas ao tratamento com o material Cloisite apresentam índice mitótico muito próximo do índice do controle positivo, e as que ficaram em contato com Zeolita Cubana apresentam índice mitótico ainda inferior a estes, o que sugere que estes materiais possam diminuir ou bloquear a divisão celular.

Tab. 1 - Dados referentes leituras realizadas das células submetidas aos diversos tratamentos com os bioplásticos - Técnica *Allium cepa*.

| Tratamento  | Média Índice Mitótico | Desvio Índice Mitótico | Média Índice de Alterações | Desvio Índice de Alterações |
|-------------|-----------------------|------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Negativo    | 0,0269                | 0,0033                 | 0,015                      | 0,014                       |
| Cloisite    | 0,0254                | 0,0192                 | 0,042                      | 0,040                       |
| Novaclay    | 0,0285                | 0,0098                 | 0,064                      | 0,037                       |
| Zeolita C.  | 0,0085                | 0,0015                 | 0,229                      | 0,036                       |
| Bentonita   | 0,0186                | 0,0044                 | 0,001                      | 0,000                       |
| Zeolita P.  | 0,0224                | 0,0017                 | 0,089                      | 0,072                       |
| Bermiculita | 0,0210                | 0,0032                 | 0,027                      | 0,026                       |
| Positivo    | 0,0094                | 0,0024                 | 0,230                      | 0,047                       |

Contudo, estes resultados não demonstraram significância quando avaliados pelo GraphPad Prism 5.

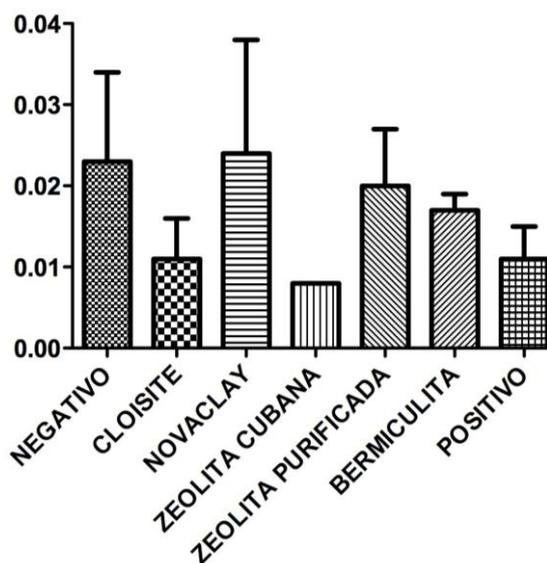


Fig. 1 Gráfico comparativo dos Índices Mitóticos apresentados em cada tratamento com os bioplásticos.

Com relação aos Índices de Alterações (Fig. 2), o controle negativo apresentou um índice bem baixo, junto com as células tratadas com Zeolita Purificada. Outras amostras como Cloisite, Novaclay e Bermiculita também apresentaram índices baixos de alterações.

De contra partida, o controle positivo, e o material Zeolita Cubana apresentaram altos e significativos índices (análise de dados realizada pelo GraphPad Prism) de alterações nas células.

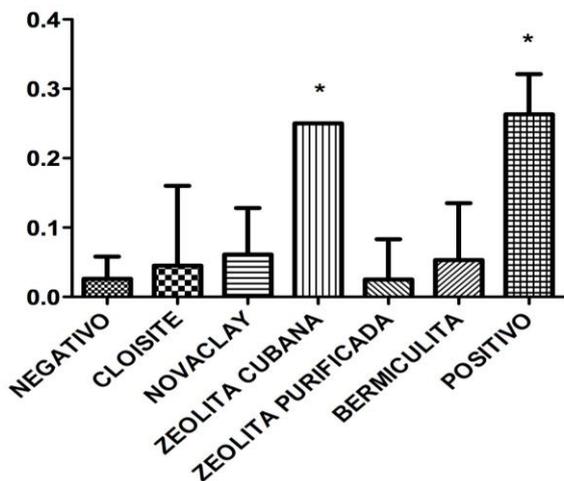


Fig. 2 Gráfico comparativo dos Índices de Alterações apresentados em cada tratamento.

Os dados obtidos com a leitura das lâminas de *Allium cepa* para análise de Linter, apresentados na Tab. 2 e representados nas Fig. 3 e 4, demonstram que o Linter nas diversas concentrações testadas manteve tanto o índice Mitótico quanto o Índice de Alterações muito semelhante ao Tratamento Negativo em todas as concentrações.

Tab. 2 Dados referentes leituras realizadas das células submetidas aos diversos tratamentos com o Linter - Técnica *Allium cepa*.

| Tratamento       | Média Índice Mitótico | Desvio Índice Mitótico | Média Índice de Alterações | Desvio Índice de Alterações |
|------------------|-----------------------|------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Negativo         | 1,065                 | 0,002                  | 0,060                      | 0,004                       |
| Linter 0,01mg/ml | 1,057                 | 0,006                  | 0,054                      | 0,005                       |
| Linter 0,1mg/ml  | 1,064                 | 0,000                  | 0,060                      | 0,000                       |
| Linter 1mg/ml    | 1,069                 | 0,004                  | 0,065                      | 0,004                       |

Frente isso, sua utilização pode ser utilizada sem restrições visando o reforço de bioplásticos de amido.

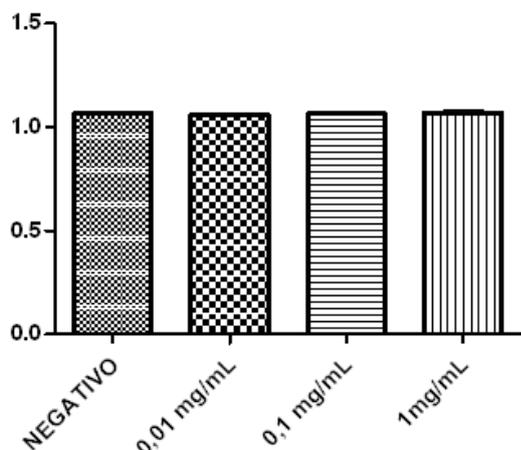


Fig. 3 Gráfico comparativo dos Índices Mitóticos apresentados nos diversos tratamentos com as diferentes concentrações de Linter.

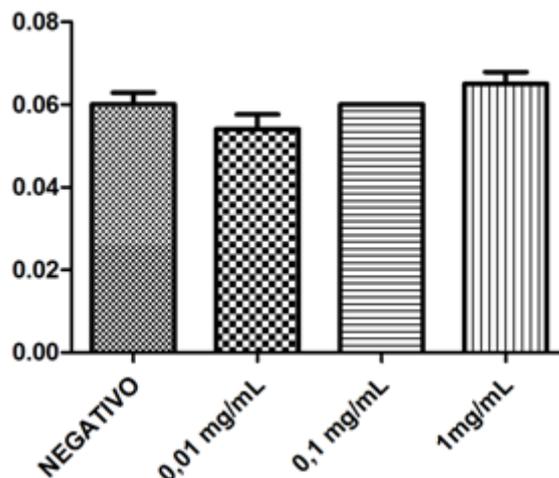


Fig. 4 Gráfico comparativo dos Índices de Alterações apresentados nos diversos tratamentos com as diferentes concentrações de Linter.

### Conclusões

De acordo com os experimentos realizados e resultados expostos, conclui-se que se faz necessário maiores estudos com atenção voltada principalmente ao material Zeolita Cubana, que frente a este teste, sugere possuir caráter genotóxico podendo limitar a utilização desta carga nos bioplásticos.

### Agradecimentos

CNPq, FAPERJ, FINEP, Embrapa e especialmente ao Programa CAPES-Rede Nanobiotech Brasil n°07 (Edital CAPES 04/CII-2008).

### Referências

- GIMENEZ, B., Gomez-Estaca, J., Aleman, A., Gomez-Guillen, .C.; Montero, M.P. Food Hydrocoll. 23, 585–592., 2009.
- ROONEY, M. L. In M. L. Rooney (Ed.), Active food packaging (pp. 1–37). Glasgow, Ireland: Blackie Academic and Professional., 1995.