



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LÍLIAN DOS REIS RONZANI

**POTENCIAL ANTICITOTÓXICO E ANTIGENOTÓXICO DE
NANOPARTÍCULAS COM EXTRATO DE *Ruta graveolens* L.**

São João Del-Rei – MG

2023

LÍLIAN DOS REIS RONZANI

**POTENCIAL ANTICITOTÓXICO E ANTIGENOTÓXICO DE
NANOPARTÍCULAS COM EXTRATO DE *Ruta graveolens* L.**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de São João del-Rei, Campus Dom Bosco, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador (a): Profa. Fernanda Carlota Nery

Coorientador (a): Profa. Vanessa Cristina Stein

São João Del-Rei – MG

2023

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB)
e Núcleo de Tecnologia da Informação (NTINF) da UFSJ,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R775p

Ronzani, Lilian dos Reis .
POTENCIAL ANTICITOTÓXICO E ANTIGENOTÓXICO DE
NANOPARTÍCULAS COM EXTRATO DE RUTA GRAVEOLENS L. /
Lilian dos Reis Ronzani ; orientadora Fernanda
Carlota Nery; coorientadora Vanessa Cristina Stein.
-- São João del-Rei, 2023.
31 p.

Trabalho de Conclusão (Graduação - Biotecnologia)
- Universidade Federal de São João del-Rei, 2023.

1. Nanopartícula de grafeno. 2. Extrato de Ruta
graveolens L. . 3. Allium cepa test. 4.
Anticitotóxica e antigenotóxica. 5. Aberração
cromossômica . I. Nery, Fernanda Carlota , orient.
II. Stein, Vanessa Cristina, co-orient. III. Título.

LÍLIAN DOS REIS RONZANI

**POTENCIAL ANTICITOTÓXICO E ANTIGENOTÓXICO DE
NANOPARTÍCULAS COM EXTRATO DE *Ruta graveolens* L.**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de São João del-Rei, Campus Dom Bosco, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

São João Del-Rei, 26 de outubro de 2023.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Fernanda Carlota Nery – DBTEC/UFSJ

Profa. Dra. Vanessa Cristina Stein – DBI/UFLA

Msc. Camila Moreno Lopes de Andrade – DBI/UFLA

Msc. Thaís Teixeira Valério Caetano – DBI/UFLA

Profa. Dra. Fernanda Carlota Nery
Orientador (a)

Dedicatória

Aos meus pais, professores e todos aqueles que estiveram comigo durante minha jornada, me incentivando na manufatura deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me guiar e zelar por mim em todos os caminhos, abençoando meus passos.

Aos meus pais Wilze e Damon e ao meu irmão Pedro Henrique, minha base, que sempre me incentivaram e me apoiavam em todas as minhas escolhas, providenciando tudo que eu precisei para chegar até aqui.

A minha orientadora Fernanda e coorientadora Vanessa, que estiveram ali desde o início me auxiliando e passando todos ensinamentos necessários que foram essenciais para o sucesso deste trabalho.

Ao meu parceiro Henrique, são anos de companheirismo, sempre disponível para me ajudar em qualquer situação.

A minha família, minha avó Nelma que sempre se mostrou interessada na minha formação com orgulho, aos meus avós, meus tios e primos pelo incentivo, apoio e suporte.

Aos meus amigos de longa data e aos amigos que cultivei pelo caminho que foram indispensáveis na minha jornada, estando sempre ali para o que der e vier.

A todos que, diretamente e indiretamente, participaram do desenvolvimento deste trabalho.

A Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ) e ao curso de Biotecnologia por todo aprendizado e conhecimento passado durante esses anos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1A. PREPARAÇÃO DO EXTRATO USANDO FOLHAS DE ARRUDA	18
FIGURA 1B. EXTRATO DE ARRUDA PÓS SUSPENSÃO	18
FIGURA 2. NANOPARTÍCULA DE GRAFENO 200MG/L	18
FIGURA 3A E 3B. DISTRIBUIÇÃO DAS SEMENTES DE <i>ALLIUM CEPA</i> NAS PLACAS DE PETRI A SEREM EMBEBIDAS PELA SOLUÇÃO CONTENDO AS GNP.....	19
FIGURA 4A. GLIFOSATO 48% P/V	20
FIGURA 4B. SEMENTES NA CÂMARA DE GERMINAÇÃO	20
FIGURA 5. RADÍCULAS DE <i>ALLIUM CEPA</i> EMBEBIDAS COM SOLUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE GRAFENO EM TODAS AS CONCENTRAÇÕES, ONDE (A) SÃO AS SEMENTES TRATADAS COM ÁGUA DESTILADA; (B) GNP 2,5MG/L; (C) GNP 5MG/L; (D) GNP 7,5MG/L; (E) GNP 10MG/L	21
FIGURA 6: RADÍCULAS DE <i>ALLIUM CEPA</i> PRÉ EMBEBIDAS EM GLIFOSATO 48% P/V, ONDE (A) SÃO AS SEMENTES TRATADAS COM ÁGUA DESTILADA; (B) COM O EXTRATO DE ARRUDA; (C) COM A GNP; (D) COM A COMBINAÇÃO DO EXTRATO DE ARRUDA E A GNP	22
FIGURA 7: TABELA ESTATÍSTICA DO TESTE ANTICITOTÓXICO SEM O USO DO GLIFOSATO	22
FIGURA 8: TABELA ESTATÍSTICA DO TESTE ANTICITOTÓXICO COM O USO DO GLIFOSATO	23
FIGURA 9A E 9B: LÂMINAS DO EXTRATO DE <i>RUTA GRAVEOLENS</i> L. NA CONCENTRAÇÃO 5MG/L	23
FIGURA 10A E 10B: LÂMINAS DO EXTRATO DE NANOPARTÍCULA DE GRAFENO NA CONCENTRAÇÃO 2,5MG/L	24

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 11A E 11B: LÂMINAS DO EXTRATO DE <i>RUTA GRAVEOLENS</i> L. (PRÉ-EMBEBIDO EM GLIFOSATO)	24
FIGURA 12A E 12B: LÂMINAS DO EXTRATO DE NANOPARTÍCULA DE GRAFENO (PRÉ-EMBEBIDO EM GLIFOSATO)	25
FIGURA 13: TABELA ESTATÍSTICA DO TESTE ANTIGENOTÓXICO SEM O USO DO GLIFOSATO	25
FIGURA 14: TABELA ESTATÍSTICA DO TESTE ANTIGENOTÓXICO COM O USO DO GLIFOSATO	25

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
REVISÃO DE LITERATURA	14
<i>Ruta graveolens</i> L.	14
Nanopartículas	14
Nanopartícula de grafeno	15
<i>Allium cepa</i> como teste de bioensaio	16
Agentes citotóxicos e genotóxicos	17
METODOLOGIA	18
Obtenção da <i>Ruta graveolens</i> L.	18
Extrato vegetal	18
Nanopartícula de grafeno	18
<i>Allium cepa</i> test	19
Análise do potencial citotóxico e genotóxico	19
Análise do potencial anticitotóxico e antigenotóxico	19
Análise estatística	20
RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
Teste anticitotóxico	21
Testes de germinação	21
Testes de germinação com glifosato	21
Teste antigenotóxico	23

Teste genético	23
Teste genético com glifosato	24
CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS	27

RESUMO

As nanopartículas (NP's) combinadas com extratos vegetais podem ser uma alternativa sustentável e ecológica, portanto seus efeitos nos diferentes organismos vivos precisam ser investigados. O *Allium* test, é um bioensaio que utiliza a cebola (*Allium cepa*) como organismo modelo, para investigar a citotoxicidade e genotoxicidade de compostos. O objetivo deste estudo foi verificar se a NP de grafeno em adição ao extrato de arruda (*Ruta graveolens* L) apresenta efeito anticitotóxico e antigenotóxico em organismo teste (*Allium cepa*). Foi realizado teste de germinação de sementes de cebola em diferentes soluções: extrato bruto de folha arruda, NP de grafeno e extrato bruto de arruda combinado com NP de grafeno, em diferentes concentrações (0; 2,5; 5; 7,5; 10 mg.L⁻¹). Foram analisados os parâmetros: índice de velocidade de germinação (IVG), primeira contagem (PC), porcentagem de germinação (G) e comprimento da radícula (CR). Além disso, foram realizados testes de anticitotoxicidade e antigenotoxicidade onde as sementes foram pré-embecidas em glifosato e depois foram realizados os testes de germinação com os mesmos tratamentos descritos acima. O extrato bruto de arruda (7,5 mg.L⁻¹) e NP de grafeno (2,5 mg.L⁻¹) apresentaram melhores resultados para a G e CR. Para as sementes pré-tratadas com glifosato (7,5 mg.L⁻¹), o extrato bruto e a NP apresentaram os melhores resultados no IVG. Conclui-se que os extratos de arruda e o uso de NP de grafeno podem promover a germinação de sementes. Para os testes genéticos, os parâmetros de índice mitótico (IM) e aberração cromossômica (AC) foram analisados, a GNP teve um IM maior, e com isso maior índice de AC. Enquanto a arruda, teve menor IM e menor AC. A arruda combinada a GNP confirmou a hipótese que a arruda atua como inibidor da alta divisão celular e conseqüentemente o número de AC, uma vez que, em comparação com o extrato de GNP, a arruda combinada GNP obteve um valor menor nesses índices. O uso do glifosato como teste negativo também mostrou que a arruda e a arruda combinada a GNP obtiveram melhores resultados na germinação, confirmando o poder de regeneração da arruda. Para o teste genético, a GNP foi melhor para o IM e a arruda melhor pra AC.

Palavras-chaves: aberração cromossômica, arruda, citotoxicidade, genotoxicidade, germinação, grafeno, índice mitótico, nanopartícula.

Agência Financiadora: CNPq

INTRODUÇÃO

As nanopartículas (NP's) são partículas caracterizadas pelo seu minúsculo diâmetro (1 a 100 nanômetros) e são utilizadas em diversas áreas científicas e tecnológicas (Atwater et al., 2010). Podem ser formadas por diversos materiais, como prata, ouro, carbono e quitosana, cada uma com sua aplicação, tamanho e potencial. As NP's de prata (AgNP's) são um dos nano-materiais mais estudados e utilizados atualmente uma vez que, apresentam características positivas do ponto de vista científico/comercial, dentre elas estabilidade química, flexibilidade e atividade catalítica devido a variedade morfológica e tamanho (Díaz-Cruz et al., 2016).

As nanopartículas de grafeno (GNP's) não apresentam tantos estudos quanto às nanopartículas metálicas, como as de prata. Porém, apresentam uma capacidade de revolução tecnológica promissora (Chua et al., 2014), apresentando propriedades físico-químicas de potencial interesse econômico/científico, como ser um bom condutor de calor e eletricidade, o que confere aplicação em armazenamento de energia entre outras formas. Além disso, garante estabilidade aos átomos de carbono e tem grande aplicabilidade na área biomédica com o transporte e controle de fármacos (Chua et al., 2014).

O uso de nanopartículas para germinação de plântulas, por exemplo, é uma inovação na área da nanotecnologia, trazendo um impacto positivo tecnológico, uma vez que, as NP's produzidas a partir de plantas são mais sustentáveis, de baixo custo, alto rendimento e sem liberação de subprodutos danosos (Hammed et al., 2019). Neste contexto, as plantas são recursos naturais preciosos que fornecem fitoquímicos e podem ser utilizadas em conjunto com as nanopartículas, garantindo a estabilidade do composto intensificando suas propriedades (Jalilian et al., 2020; Díaz-Cruz et al., 2016).

No entanto, as aplicações cada vez maiores de NP's têm causado preocupações sobre seus efeitos potenciais sobre os organismos vivos e componentes não vivos (abióticos) dos ecossistemas. As plantas são vitais componentes de sistemas ecológicos e servem como importante componente ecológico receptores e como uma rota potencial para o transporte e bioacumulação de NP's na cadeia alimentar em diferentes níveis tróficos (Zhu et al., 2010).

Estudos realizados usando técnicas avançadas de detecção demonstraram que as NP's podem ser facilmente absorvidos por plantas germinadas ou cultivada em soluções

nutritivas suplementado com materiais nanométricos, que podem alterar processos metabólicos fundamentais levando a diferentes impactos no metabolismo das plantas (Irin et al., 2012; Khodakovskaya et al., 2012). A interação das nanopartículas com as plantas, podem influenciar nas etapas do ciclo de vida vegetal, como germinação, crescimento, tamanho das radículas e reações fotossintéticas, impactando positivamente na produção vegetal, livrando as plântulas de estresses abióticos (Khan et al., 2017).

Os mecanismos de toxicidade das NP's ainda não são totalmente compreendidos (Ma et al., 2011), tornando-se necessários estudos sobre os efeitos de anti/citotoxicidade e anti/genotoxicidade, uma vez que os organismos vivos estão frequentemente expostos a substâncias mutagênicas que afetam a maquinaria celular. Alterações celulares e cromossômicas podem ser induzidas por agentes citotóxicos e mutagênicos genotóxicos, que induzem lesões no material genético. Esses processos podem levar a modificações e morte celular (Costa; Menk, 2000).

A espécie *Ruta graveolens* L., pertencente à família das *Rutaceae*, é uma planta arbustiva cultivada em todo o mundo e é muito utilizada como planta medicinal, apresentando propriedades curativas, desde sua erva fresca, em versão pó ou óleos (Dimmito et al., 2021). Alguns dos fitoquímicos liberados pelas espécies de *Ruta graveolens* L. apresentam aplicações para o tratamento de doenças como inflamações, doenças reumáticas, dermatite, esclerose múltipla, epilepsia e doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer (Bar-Sela G et al., 2013; Dimmito et al., 2021; Colucci-D'Amato et al., 2020). Devido a seu efeito reparador, torna-se interessante sua aplicação em testes tanto antígenotóxicos e anticitotóxicos, quanto genotóxicos e citotóxicos.

O potencial anticitotóxico e antígenotóxico das nanopartículas combinadas ao extrato de *Ruta graveolens* L. podem ser elucidados utilizando-se o *Allium* test levando em consideração a nanotoxicologia e o diâmetro da NP (Pullagurala et al., 2018). Os testes de anticitotoxicidade/antígenotoxicidade realizados pelo sistema teste de *Allium cepa* baseiam-se em diversos parâmetros de análise (Grover; Kaur, 1999), como avaliações perante a divisões das células meristemáticas (Vicentini et al., 2001). Pensando nesse panorama, o presente trabalho visou avaliar os efeitos citotóxicos e genotóxicos de nanopartículas de grafeno e sua interação com extratos vegetais de *Ruta graveolens* L., popularmente conhecida como arruda, através da utilização do *Allium* test.

REVISÃO DE LITERATURA

***Ruta graveolens* L.**

A *Ruta graveolens* L., popularmente conhecida como arruda, é uma planta oriunda do mediterrâneo e da Ásia, onde geralmente cresce em solos secos, locais pedregosos e matagais (Alonso, 1998). Pertencente à família das Rutáceas, trata-se de uma espécie subarborescente, aromática e perene, podendo alcançar cerca de 40 a 90 cm de altura. Conta com um caule ramoso e ereto, com folhas subdivididas e bem segmentadas com espatuladas e oblongos de 15mm de largura, local onde se encontra glândulas translúcidas de óleos essenciais que a caracterizam pelo seu odor balsâmico forte (Alonso, 1998).

A *Ruta graveolens* L. vêm ganhando atenção, uma vez que, apresenta compostos neuroativos, capazes de promover na neuroproteção, dentre todos seus componentes, a rutina (compostos fenólico) é o mais abundante e interage com o sistema nervoso central (SNC), atuando contra a neurotoxicidade (Colucci-D'Amato et al., 2020). É uma planta famosa pelo seu conteúdo medicinal, uma vez que, todas as partes da planta podem ser utilizadas para este propósito, desde as raízes aos frutos (Colucci-D'Amato et al., 2020). Em suas folhas, as principais substâncias encontradas são princípios amargos, resinas, saponinas, taninos, flavonoides, alcaloides etc. (Oliveira, 2006). Algumas dessas substâncias, atuam no SNC, usadas na defesa e ação hormonal, com propriedades estimulantes de circulação, agindo na redução da fragilidade dos capilares. Além de ser anti-inflamatório, antiesclerótico, antiedematoso e fortalecendo vasos capilares (Deschamps, 2004).

A *Ruta graveolens* possui metabólicos e fitoquímicos que interagem com o sistema endocanabinoide, a rutamarina, composto fenólico e muito abundante nesta planta, apresenta afinidade seletiva ao receptor CB2 (Dimmito et al., 2021; Messina et al., 2015). O sistema endocanabinoide está envolvido na regulação de uma ampla gama de processos fisiológicos, atuando desde o sistema nervoso central até em órgãos periféricos (Fonseca et al., 2013).

Nanopartículas

As nanopartículas (NP's), são utilizadas na área biomédica, científica, industrial e agrícola. Sendo um foco de interesse devido às suas proporções de superfície para tamanho e volume extremamente pequeno que auxilia em modificações físicas e químicas atuando na atividade bioquímica com maior estabilidade (Jadoun et al., 2020).

Tais avanços biotecnológicos trouxeram oportunidades para diagnóstico molecular e terapia celular, uma vez que, a aplicação do potencial das NP's inclui um sistema de liberação de drogas, sistema de direcionamento projetados para reconhecimento das células alvo, conseguindo atuar como sondas de imagens, fornecendo informações valiosas sobre a presença de anormalidades em várias estruturas e órgãos do corpo, determinando a extensão de uma doença, permitindo a sua visualização não invasiva (Praetorius et al., 2007). No entanto, sofre com processos de toxicidade celular que necessitaram de estudos revisados e doses moderadas para evitar a liberação de subprodutos danosos, principalmente devido ao fato de serem sintetizados por processos que utilizam irradiação (Jadoun et al., 2020).

Infelizmente, uma ampla gama de aspectos precisa ser analisada para a compreensão da ligação entre a toxicidade e as características das nanopartículas (Vouitsis et al., 2023) uma vez que, em razão da sua baixa massa e alta área superficial, pode apresentar problemas mais sérios para a saúde humana e meio ambiente quando comparada com partículas maiores, isso levando em consideração seu tamanho, distribuição e absorção (Malak et al., 2021).

Nanopartículas de grafeno

O grafeno, é definido como um composto cujo apresenta uma camada bidimensional de átomos de carbono que estão organizados em estruturas hexagonais. Com uma hibridização do tipo sp^2 , é mecanicamente forte, flexível e um altíssimo condutor de calor e eletricidade, o que o torna um material capaz de revolucionar a tecnologia (Chang et al., 2013). O grande interesse nesse material se deve a sua enorme densidade, no qual, nem mesmo o hélio é capaz de ultrapassar sua forte resistência, sendo muito superior ao aço, mais duro que um diamante é tão leve quanto fibras de carbono, possuindo uma área de superfície elevada (Young et al. 2013).

Os nanocompostos a partir do grafeno e o grafeno oxidado (GO) apresentam diversas inovações com estudos promissores. Foi feita uma pesquisa, em que os resultados mostraram uma ligação fortíssima entre o grafeno oxidado e o cloridrato de doxorubicina (DOX), revelando uma interação π -stacking capaz de realizar o transporte de fármacos (Feng et al., 2013). Além disso, o GO mostrou-se com uma elevada seletividade ao alvo, liberação controlada do fármaco, biocompatibilidade no qual supera qualquer tipo de transportador convencional (Feng et al., 2013). As nanopartículas de grafeno exibem características materiais, físicas, elétricas e químicas, apresentando aplicabilidade em setores eletrônicos, médicos e de energia (Zhang et al., 2020).

No entanto, seu efeito tóxico ainda deve ser investigado. Recentemente, um estudo em 2023 relatou o efeito tóxico da nanopartícula de grafeno oxidado em camundongos, onde a NP causou inflamação no fígado, no entanto as funções neuronais não foram afetadas (Rhazouani et al., 2023). É importante ressaltar que ainda há muito a ser estudado sobre os efeitos tóxicos das nanopartículas de grafeno. Portanto, é crucial que sejam tomadas medidas adequadas para gerenciar e mitigar os possíveis riscos associados ao seu uso.

***Allium cepa* como teste de bioensaio**

O teste com *Allium cepa* consiste num ensaio rápido e sensível para detecção de citotoxicidade e genotoxicidade em células nas raízes da cebola (organismos teste). Permitindo assim, a avaliação de mutagênese e anormalidades no crescimento radicular, no índice mitótico, aberrações cromossômicas e formação de micronúcleos (Bonciu et al., 2018). Esse teste foi criado para realizar uma avaliação abrangente de toxicidade de produtos químicos, nano materiais, fitoquímicos e amostras ambientais, sendo sensível a poluição ambiental e consequentemente eficiente na detecção e triagem de poluição contida na qualidade da água, por exemplo. Dessa forma, faz a indicação do perigo real, indicando a toxicidade da biota local (Athanasio et al., 2014).

O teste em si, utiliza sementes e/ou bulbos de cebola para avaliar a toxicidade por meio de ensaios de germinação, em contato com a amostra a ser testada (Soares et al., 2021). No geral, as observações a serem determinadas neste teste são: o crescimento das raízes, o índice mitótico em células meristemáticas, onde ocorre maior probabilidade de ocorrer alterações, e a presença de alterações cromossômicas ou nucleares em células meristemáticas. O propósito final é analisar o potencial tóxico, citotóxico, genotóxico e mutagênico a nível cromossômico das amostras no organismo teste (cebola) (Bolonhesi et al., 2018)

Esse método é avaliado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP), como um teste eficiente para análise e monitoramento *in situ* (Cabrera; Rodriguez,1999). Recentemente em 2021, um estudo no Brasil foi realizado para a avaliação da qualidade da água de rios brasileiros utilizando células meristemáticas de *Allium cepa* como bioindicador (Soares et al., 2021). De acordo com Soares et al. (2021), foi possível verificar o efeito citotóxico e genotóxico que compromete a qualidade dessas águas, comprovando a eficácia do modelo.

Portanto, é seguro afirmar que o *Allium cepa* como teste de bioensaio é eficientemente acurado com seus resultados, considerado um teste rápido, de custo-benefício e sensível aos dados gerando estatísticas satisfatórias (Souza, 2017), evidenciando efeitos mutagênicos induzidos por agentes clastogênicos ou aneugênicos (Vidakovic-Cifrek et al., 2002). Sua visualização é de fácil identificação da atividade mitótica em todas as fases do ciclo celular, com observação dos danos celulares que são classificados como genotóxico, devido às anormalidades cromossômicas (Souza, 2017).

Agentes citotóxicos e genotóxicos

Agentes citotóxicos são definidos como agentes com propriedades causadoras de danos às células, podendo causar teratogenicidade, uma vez que, induzem o aumento de mutações no DNA (Erdtmann; 2003). Enquanto os agentes genotóxicos, são capazes de induzir ou aumentar as mutações genéticas dentro do material genético, ao interagir com as moléculas do DNA, podendo causar doenças como cânceres e doenças hereditárias (Erdtmann; 2003). As alterações causadas por esses agentes, quando passado para as seguintes gerações, são tratadas como mutações genéticas, causando prejuízo aos organismos, isto é, desequilibrando sua fisiologia e atividade bioquímicas/celulares (Owolarafe et al., 2020). Enquanto isso, para a genotoxicidade, é necessário, principalmente uma análise no crescimento radicular e no índice mitótico para determinação da toxicidade de um agente (Owolarafe et al., 2020).

Aberrações como a aderência cromossômica, definida como uma alteração na estrutura ou no número de cromossomos, em que esta, ocasiona uma perda das características de condensação, é um exemplo dos perigos que os agentes genotóxicos podem fazer (Fernandes et al., 2009). Existem ainda, a perda e as pontes cromossômicas, definidas como a ligação mal feita no fuso mitótico que ficam divididos de maneira aleatória entre as células e a quebra dos cromossomos quando forem separados respectivamente (Leme et al., 2009), este último é consequência da aderência cromossômica. Além disso, outra alteração é a mitose multipolar, ocasionada quando dois centrossomos se dividem duas vezes durante o ciclo celular, formando células polinucleadas (Fernandes et al., 2009). Podem também ocorrer a C-Metáfase, em que nenhuma placa equatorial é formada, fazendo a divisão ser interrompida e os cromossomos espalhados pela célula condensada (Fernandes et al., 2009). Por fim, pode ocorrer a formação de micronúcleos, que consiste em uma pequena massa nuclear separada do núcleo principal, envolta por uma membrana (Owolarafe et al., 2020).

METODOLOGIA

Obtenção da *Ruta graveolens* L.

As plantas de *Ruta graveolens* L. foram colhidas dentro da própria horta da Universidade Federal de Lavras (UFLA), uma vez que, são de fácil cultivo e se adaptam em fáceis condições de temperatura e umidade.

Extrato vegetal

As folhas da arruda (Figura 1a) foram coletadas após 30 dias de cultivo e passaram pelo processo de secagem durante uma semana à temperatura de 40°C numa estufa. Após a secagem, cerca de 25g das folhas foram maceradas até virarem pó e misturado com 87,5ml de etanol 70% para serem suspensas (Figura 1b). Após a extração, as amostras foram filtradas e agitadas por 40h a temperatura ambiente e levadas novamente para estufa a 40°C para evaporação do etanol, deixando um extrato bruto seco de cerca de 1,75g que foi ressuspensionado em parte 1:20 de etanol e água destilada (Ghramh et al., 2020).



Figura 1a: Preparação do extrato usando folhas de Arruda

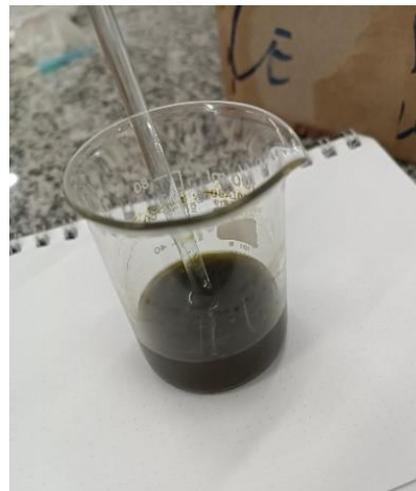


Figura 1b: Extrato de arruda pós suspensão

Nanopartícula de grafeno

As nanopartículas de grafeno (Figura 2) foram cedidas pela professora Michele Valquíria dos Reis da Universidade Federal de Lavras – UFLA. A biossíntese foi feita por um grupo de estudos da UFMG.



Figura 2: Nanopartícula de grafeno 200mg/L

***Allium cepa* test**

Análise do potencial citotóxico e genotóxico

A cebola (*Allium cepa* L.) foi utilizada como organismo teste. As sementes de cebola orgânicas sem pesticidas comerciais (Isla - Isla Sementes Ltda., Brasil, Scherer et al., 2019) foram distribuídas em placas de petri, contendo o papel filtro (Figura 3a e 3b) e em seguida foi adicionado 3ml da solução aquosa contendo as nanopartículas de grafeno com extrato de *Ruta graveolens* L. em diferentes concentrações (0; 2,5 ; 5,0 ; 7,5 e 10,0 mg.L⁻¹) que foram incubadas numa Câmara de Germinação, no fotoperíodo, a 25 C° durante 7 dias. Como controle, foi utilizado água destilada.

Foram analisados os parâmetros: índice de velocidade de germinação, porcentagem de germinação após 7 dias, comprimento da radícula e comprimento da parte aérea (Brasil, 2009). Foram utilizadas 25 sementes por tratamento, sendo cada tratamento composto por 5 repetições. O experimento foi conduzido em modelo inteiramente casualizado e os resultados comparados pelo teste de Tukey 5% de significância.



Figura 3a e 3b: Distribuição das sementes de *Allium cepa* nas placas de petri a serem embebidas pela solução contendo as GNP

Análise do potencial anticitotóxico e antigenotóxico

Foi comprovada a ausência de citotoxicidade e genotoxicidade através da germinação das sementes e portanto foi realizada a análise do potencial anticitotóxico e antigenotóxico.

Para o ensaio anticitotóxico, após 6 dias de germinação (segundo-se metodologia descrita no item 4.4.1.) (Figura 4b), as radículas das sementes germinadas foram coletadas, fixadas em Carnoy (3:1, etanol: ácido acético glacial) e acondicionadas em freezer. Para o

ensaio antigenotóxico, as sementes foram embebidas em glifosato (solução que induz genotoxicidade) (Figura 4a) por 48 horas e depois retiradas da solução, lavadas e novamente, colocadas em contato solução aquosa contendo as nanopartículas de grafeno com extrato de arruda para análise em óptico trinocular Primo Star Zeiss, em magnitude de 40x (Guerra e Souza, 2002). Foram analisadas 500 células, pela técnica de varredura, para cada uma das cinco concentrações testadas 0, 2,5 ; 5 ; 7,5 e 10,0 mg L⁻¹. Foi avaliado o índice mitótico (IM) e o número total de aberrações cromossômicas (AC) em todas as fases da divisão celular



Figura 4a: Glifosato 48% P/V



Figura 4b: Sementes na câmara de germinação

Análise estatística

Todos os experimentos foram conduzidos em modelo inteiramente casualizado. A avaliação estatística dos dados foi baseada na ação anticitotóxica e antigenotóxica das nanopartículas de grafeno via extrato de *Ruta graveolens L.*, que foi calculada mediante os testes variância univariada (ANOVA) e ao teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Teste anticitotóxico

Testes de germinação

Não houve diferença estatística no IVG e na primeira contagem dos extratos em geral nas variáveis dos dados (Figura 7). Para a % de germinação no último dia de contagem, o extrato de arruda isolado e a nanopartícula de grafeno (GNP) mostraram melhores resultados em comparação ao controle, sendo o extrato de arruda na concentração de 7,5mg/L e a GNP, na concentração de 2,5mg/L com os maiores índices de % de germinação, com o índice da GNP se sobressaindo sobre a arruda (Figura 7). Para o comprimento da radícula (Figura 5) após 7 dias, a GNP se mostrou significativamente melhor, com maior índice desse comprimento na concentração de 7,5mg/L (Figura 7).

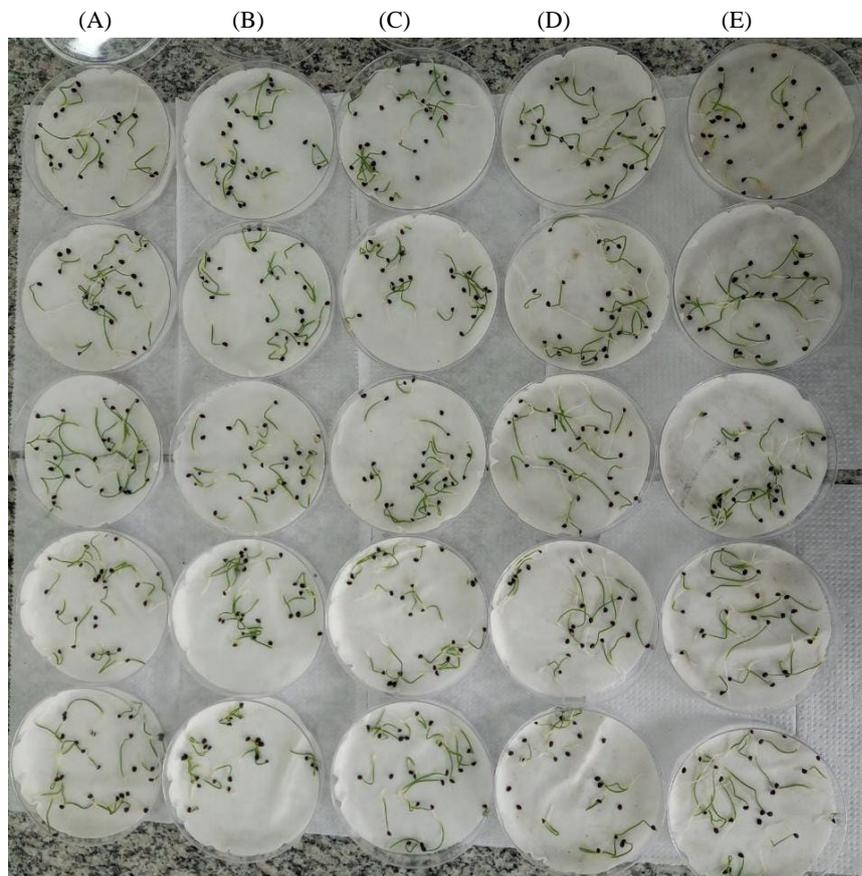


Figura 5: Radículas de *Allium cepa* embebidas com solução de nanopartículas de grafeno em todas as concentrações, onde (A) são as sementes tratadas com água destilada; (B) GNP 2,5mg/L; (C) GNP 5mg/L; (D) GNP 7,5mg/L; (E) GNP 10mg/L

Testes de germinação com glifosato

Para o IVG, o extrato de arruda isolado e da nanopartícula de grafeno isolado mostraram os melhores resultados na germinação sobre as demais (Figura 8). Para a primeira contagem, o extrato de arruda isolado e o extrato de arruda combinada a nanopartícula de grafeno se sobressaíram (Figura 8). Para a % de germinação no último dia de contagem, o

extrato de arruda isolado e a nanopartícula de grafeno isolado também mostraram os melhores resultados sobre as demais (Figura 8). Para o comprimento da radícula (Figura 6) após 7 dias não houve diferença estatística (Figura 8).

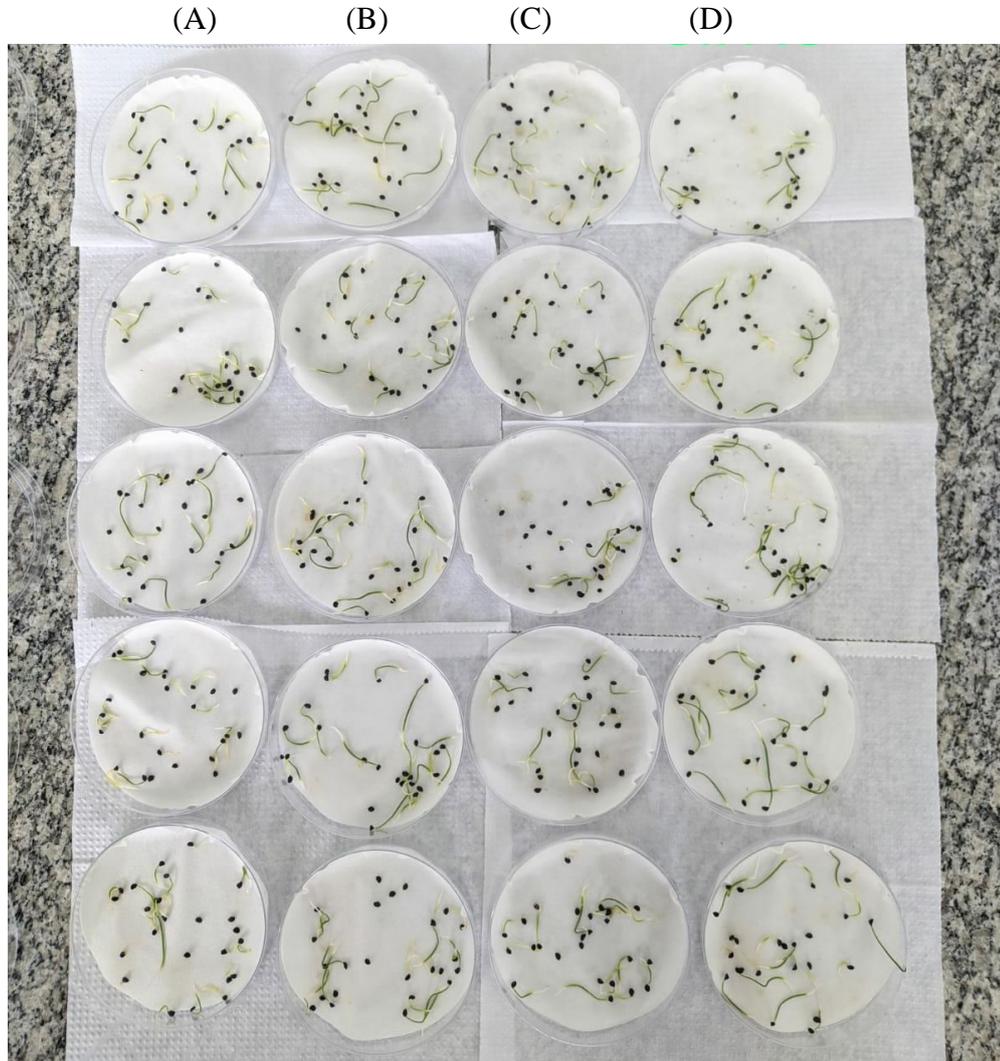


Figura 6: Radículas de *Allium cepa* pré embebidas em glifosato 48% P/V, onde (A) são as sementes tratadas com água destilada; (B) com o extrato de arruda; (C) com a GNP; (D) com a combinação do extrato de arruda e a GNP

Extrato	Concentração	IVG	Primeira contagem	Germinação (%)	Comprimento da raiz (cm)
Arruda	0	8.77 a	69.6 a	85.6 a	3.57 a
	2,5	8.71 a	70.4 a	85.6 a	2.94 a
	5	9.33 a	68.8 a	90.4 b	3.18 a
	7,5	9.21 a	79.2 a	94.4 b	3.02 a
	10	9.34 a	74.4 a	91.2 b	3.28 a
GNP	0	8.77 a	69.6 a	85.6 a	3.57 a
	2,5	8.56 a	76.0 a	97.6 b	2.29 c
	5	9.41 a	80.8 a	96.8 b	2.59 c
	7,5	8.55 a	75.2 a	93.6 b	4.01 b
	10	9.22 a	81.6 a	96.8 b	3.16 a
Arruda + GNP	0	8.77 a	69.6 a	85.6 a	3.57 a
	2,5	8.27 a	67.2 a	89.6 a	3.03 a

	5	8.57 a	66.4 a	86.4 a	2.95 a
	7,5	8.37 a	63.2 a	87.2 a	2.88 a
	10	9.27 a	76.0 a	91.2 a	3.22 a

Figura 7: Tabela estatística do teste anticitotóxico sem o uso do glifosato

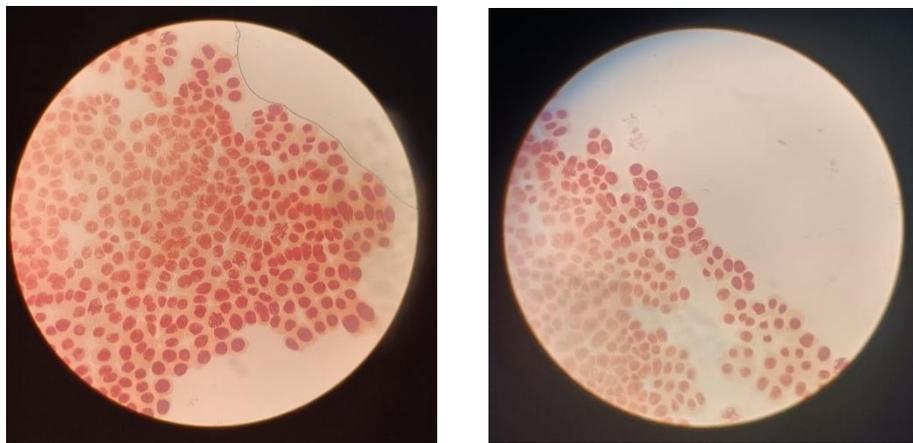
Glifosato	Concentração	IVG	Primeira contagem	Germinação (%)	Comprimento da raiz (cm)
Com glifosato	Arruda	7.94 b	64.0 b	96.0 b	2.38 a
	GNP	8.34 b	53.0 a	95.0 b	1.97 a
	Arruda + GNP	6.50 a	69.0 b	92.0 a	2.02 a
	Sem extrato	6.64 a	55.0 a	86.0 a	1.89 a
Sem glifosato	Arruda	9.72 a	83.0 a	97.0 b	3.04 a
	GNP	8.71 a	78.0 a	96.0 b	3.80 b
	Arruda + GNP	9.02 a	69.0 a	90.0 a	3.02 a
	Sem extrato	9.23 a	72.0 a	86.0 a	3,58 b

Figura 8: Tabela estatística do teste anticitotóxico com o uso do glifosato

Teste antigenotóxico

Teste genético

Para o índice mitótico (IM) do extrato de *Ruta graveolens* L., o controle se mostrou com menor número de divisões mitóticas, enquanto dentre as demais concentrações, houve diferença estatística com a concentração de 5 mg/L se sobressaindo (Figura 9a e 9b). O mesmo resultado se aplica a nanopartícula de grafeno (GNP), com a concentração de 2,5 mg/L (Figura 10a e 10b) sendo a melhor para o IM; e ao extrato de arruda combinada a GNP, também com a concentração 2,5 mg/L se sobressaindo (Figura 13). Por outro lado, para o índice de aberrações cromossômicas (AC), o extrato de arruda não teve índices de AC, seguido pela combinação do extrato de arruda e de GNP e por fim, do extrato de GNP isolado, que se mostrou com maior número de AC em todas as concentrações testadas, com exceção do controle (Figura 13).

Figura 9a e 9b: Lâminas do extrato de *Ruta graveolens* L. na concentração 5mg/L

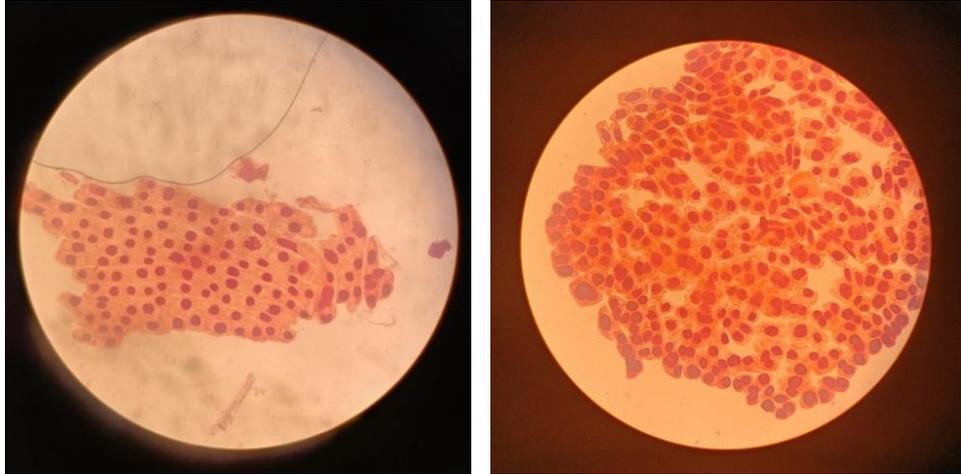


Figura 10a e 10b: Lâminas do extrato de nanopartícula de grafeno na concentração 2,5mg/L

Teste genético com glifosato

Com o glifosato, para o índice mitótico (IM), o extrato de arruda (Figura 11b) e o extrato de nanopartícula de grafeno (12a), apresentaram maior divisão mitótica, ambos na concentração de 7,5mg/L (Figura 14). Enquanto no tratamento sem o glifosato, novamente o extrato com a nanopartícula de grafeno apresentou maior divisão celular, assim como o controle (sem extrato) (Figura 14). Para as aberrações cromossômicas (AC) no tratamento com o glifosato, o extrato de arruda (Figura 11a) e a combinação entre o extrato de arruda e de nanopartícula de grafeno (GNP) apresentaram os menores índices de AC, enquanto o extrato contendo as nanopartículas de grafeno teve maior índice de AC (Figura 12b) (Figura 14). Enquanto, no tratamento sem glifosato não houve um resultado significativo de aberrações cromossômicas, porém a GNP, mesmo sem o glifosato, teve o maior índice de aberrações (Figura 14).

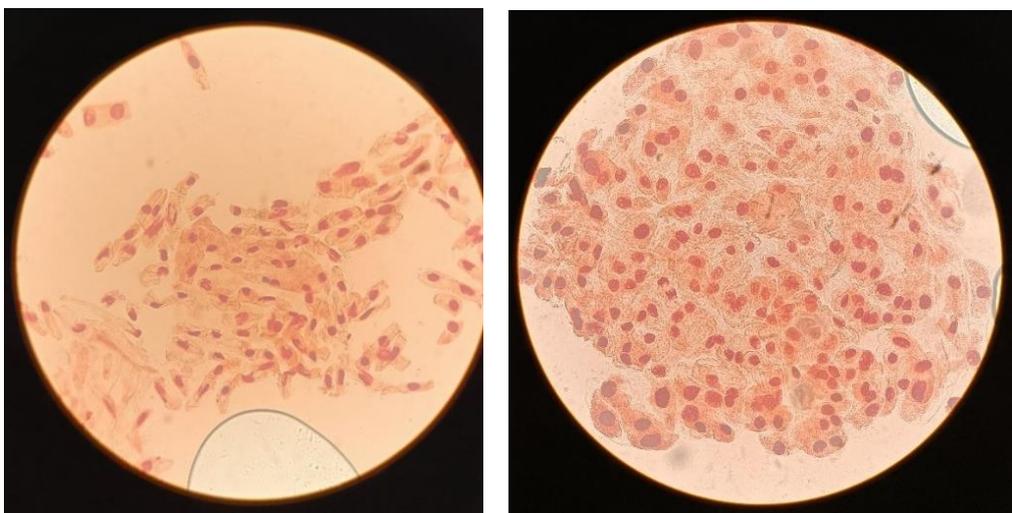


Figura 11a e 11b: Lâminas do extrato de *Ruta graveolens* L. (pré-embebido em glifosato)

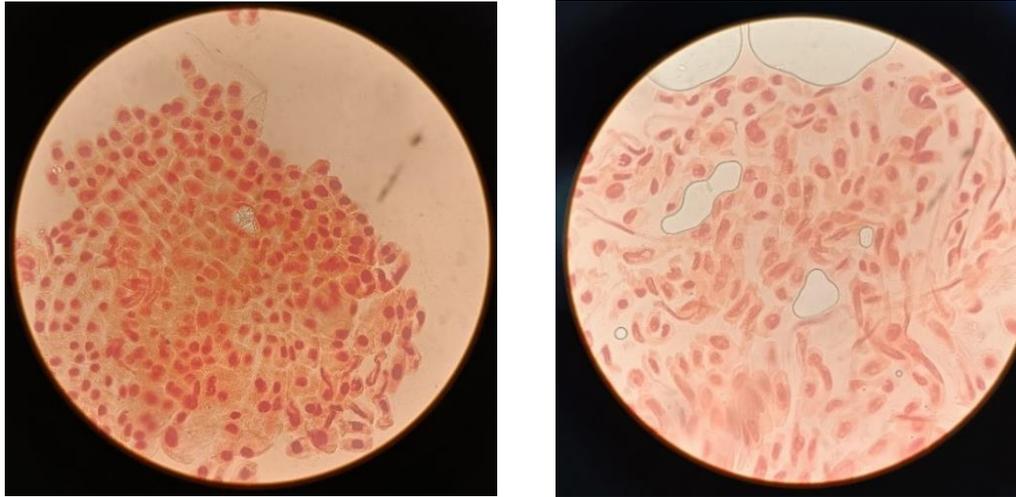


Figura 12a e 12b: Lâminas do extrato de nanopartícula de grafeno (pré-embebido em glifosato)

Extrato	Concentração	Índice mitótico	Aberrações cromossômicas
Arruda	0	0,483 a	0,000 b
	2,5	0,551 b	0,000 b
	5	0,573 b	0,000 b
	7,5	0,546 b	0,000 b
	10	0,545 b	0,000 b
GNP	0	0,484 a	0,000 b
	2,5	0,598 b	0,012 a
	5	0,572 b	0,044 a
	7,5	0,567 b	0,031 a
	10	0,541 b	0,032 a
Arruda + GNP (7,5mg/L)	0	0,484 a	0,000 b
	2,5	0,550 b	0,000 b
	5	0,532 b	0,004 b
	7,5	0,531 b	0,013 b
	10	0,534 b	0,038 b

Figura 13: Tabela estatística do teste antígeno-tóxico sem o uso do glifosato

Glifosato	Concentração	Índice mitótico	Aberrações cromossômicas
Com glifosato	Arruda	0,562 b	0,048 b
	GNP	0,570 b	0,114 a
	Arruda + GNP	0,542 a	0,071 b
	Sem extrato	0,547 a	0,133 a
Sem glifosato	Arruda	0,540 A	0,000 B
	GNP	0,575 B	0,029 B
	Arruda + GNP	0,535 A	0,012 B
	Sem extrato	0,595 B	0,000 B

Figura 14: Tabela estatística do teste antígeno-tóxico com o uso do glifosato

CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos acima, é possível afirmar que tanto a nanopartícula de grafeno quanto o extrato de *Ruta graveolens* L. se mostraram aptos na estimulação de germinação de sementes de *Allium cepa* e não apresentaram citotoxicidade. A combinação dos extratos (arruda e GNP) também não apresentou citotoxicidade, porém não foi tão eficaz na germinação quanto aos extratos isolados de arruda e GNP isolados. O extrato de nanopartícula de grafeno em especial, na germinação de sementes de *Allium cepa*, teve um resultado inesperado, sendo mais eficiente do que o extrato da planta arruda. O uso do glifosato como teste negativo, mostrou que tanto a *Ruta graveolens* L. quanto a nanopartícula de grafeno apresentam um poder de regeneração na germinação, com um destaque maior para o extrato vegetal de arruda.

Em relação ao teste genético, para análise dos parâmetros de índice mitótico (IM) e aberrações cromossômicas (AC), todos os tratamentos foram positivos para o IM em comparação ao controle. Novamente, o extrato de nanopartícula de grafeno se mostrou mais eficiente do que quando combinado com o extrato de *Ruta graveolens* L. e o seu extrato isolado. Diante dos dados da GNP, é possível afirmar que conforme o número de divisão mitótica aumenta, também aumentam as aberrações cromossômicas. Com isso, o extrato de GNP apresentou maior número de AC, ou seja, genotóxica. Por outro lado, o extrato de *Ruta graveolens* L. teve o resultado contrário, apresentando menor divisão e menor número de aberrações, sendo possível afirmar seu potencial inibidor da divisão celular e de aberrações cromossômicas, uma vez que, quando combinado com a GNP também houve uma queda nesses índices.

REFERÊNCIAS

- Alonso, Jorge S. Tratado de fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas. 1998
- Athanásio, C. G.; Prá, D.; Rieger, A.; Water Quality of Urban Streams: The *Allium cepa* Seeds/Seedlings Test as a Tool for Surface Water Monitoring. **The Scientific World Journal. Brazil.** December. 2014
- Atwater, H.A., Polman, A., Plasmonics for improved photovoltaic devices. **Materials for Sustainable Energy.** Amsterdam. 2010
- Bar-Sela G.; Vorobeichik M.; Drawsheh S.; Omer A.; Goldberg V.; Muller E.; The medical necessity for medicinal *Cannabis*: prospective, observational study evaluating the treatment in cancer patients on supportive or palliative care. **Evid Based Complement Alternat Med.** Israel. July. 2013
- Bonciu, E.; Firbas, P.; Fontanetti, C. S.; Wusheng, J.; Karaismailoglu, M. C.; Liu, D.; Menicucci, F.; Pesnya, D. S.; Popescu, A.; Romanovsky, A. V.; Schiff, S.; Slurarczyk, J.; Souza, C. P.; Srivastava, A.; Sutan, A.; Papini, A.; An evaluation for the standardization of the *Allium cepa* test as cytotoxicity and genotoxicity assay. **International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics.** September. 2018
- Bolonhesi. I. B.; Lopes. D. D. Analysis of toxicity from the effluent generated in a furniture industry spray booth using the species *Lactuca sativa* and *Allium cepa*. **Revista Ambiente e Água.** Taubaté. 2018.
- Cabrera, G. L.; Rodriguez, D. M. G. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.** Maio 1999.
- Carvalho, N. M.; Nakagawa, J. Regras para análise de sementes. Brasília. Mapa/ACS, 2009. 399 p.
- Chua C.K, Pumera M. Chemical reduction of graphene oxide: a synthetic chemistry viewpoint. **Chemical Society Reviews.** 2014
- Chang, H., WU, H., Graphene-Based Nanomaterials: Synthesis, Properties, and Optical and Optoelectronic Applications. **Advanced Functional Materials.** 2013.
- Colucci-D'Amato, L.; Cimaglia, G.; *Ruta graveolens* as a potential source of neuroactive compounds to promote and restore neural functions. **Journal of**

Traditional and Complementary Medicine. Sweden. 2020

- Costa R. M. A, Menk C. F. M.; Biomonitoramento de mutagênese ambiental. **Biotecnologia: ciência e desenvolvimento.** São Paulo. 2000
- Deschamps, Cícero, - Apostila 2004 – Princípio Ativos e Óleos Essenciais. Escola Rural – Especial Ervas Mediciniais – Ano I nº 4, São Paulo.
- Díaz-cruz, C.; Alonso, G.; Espinoza-Gómez, H.; Flores-López, L. Z.; Effect of molecular weight of PEG or PVA as reducing-stabilizing agent in the green synthesis of silver nanoparticles. **European Polymer Journal.** México. October. 2016
- Dimmito, P. M.; Stefanucci, A.; Valle. D. A.; Scioli, G.; Cichelli, A.; Mollica, A.; An overview on plants cannabinoids endorsed with cardiovascular effects. **Biomedicine & Pharmacotherapy.** Italy. 2021
- Erdtmann, B. Genética Toxicológica. In: Erdtmann, B.; Henriques, J.A.P.; Silva, J. Genética Toxicológica. Porto Alegre: Editora Alcance, p.28-35, 2003.
- **Fung, H., Cheng, R., Zhao, X., Duan, X., Li, J., A low-temperature method to produce highly reduced graphene oxide. Nature Communications. 2013**
- Fernandes, T. C. C.; Mazzeo, D. E. C.; Marin-Morales, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent—Trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety.** September. 2009
- Fonseca BM, Costa MA, Almada M, Correia-da-Silva G, Teixeira NA. Endogenous cannabinoids revisited: a biochemistry perspective. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.** 2013
- Ghramh, H. A., Ibrahim, E. I., Kilnay, M., Ahmad, Z., Alhag, S. K., Khan, K. A., Taha, R., Asiri, F. M., Silver Nanoparticle Production by *Ruta graveolens* and Testing Its Safety, Bioactivity, Immune Modulation, Anticancer, and Insecticidal Potentials. **Hindawi Publishing Corporation.** Saudi Arabia. 2020
- Grover, I. S.; Kaur, S.; Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected micronucleus assays. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.** India. May. 1999
- Guerra, M., Souza, M. J., Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. **FUNPEC.** Brasil. Ribeirão Preto. 2002
- Hamed, S.; Shah, S. A.; Iqbal, J.; Numam, M.; Muhammad, W.; Junaid, M.; Shah, S.; Khurshees, R.; Umer, F.; Cannabis sativa Mediated Synthesis of Gold

Nanoparticles and its Biomedical Properties. **Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterials**. Pakistan, 2019

- Irin, F.; Shrestha, B.; Canas, J. E.; Saed, M. A.; Green, M. J.; Detection of carbon nanotubes in biological samples through microwave-induced heating. **Carbon**. USA. Texas. October. 2012
- Jadoun, S.; Arif, R.; Jangid, N. K.; Meena, R. K.; Green synthesis of nanoparticles using plant extracts: a review. **Environmental Chemistry Letters**. 2020
- Jalilian, F.; Chahardoli, A.; Sadrjavadi, K.; Fattahi, A.; Shokoohinia, Y.; Green synthesized silver nanoparticle from *Allium ampeloprasum* aqueous extract: Characterization, antioxidant activities, antibacterial and cytotoxicity effects. **Advanced Powder Technology**. Iran. March. 2020
- Khan, M. N. et al. Role of nanomaterials in plants under challenging environments. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.110, p. 194-209, 2017.
- Khodakovskaya, M.V., De-Silva, K., Biris, A.S., Dervishi, E., Villagarcia, H., Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells. **ACS Nano**. USA. February. 2012
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Allium cepa test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**. July. 2009
- Ma, J.; Lü, X.; Huang, Y.; Genomic analysis of cytotoxicity response to nanosilver in human dermal fibroblasts. **Journal Biomed Nanotechnol**. China. April. 2011
- Malakar, A., Kanel, S.R., Ray, C., Snow, D.D., Nadagouda, M.N. Nanomaterials in the environment, human exposure pathway, and health effects: a review. **Science of the Total Environment**. 2021
- Messina, F.; Rosati, O.; Curini, M.; Marcotulio, M. C.; Cannabis and Bioactive Cannabinoids. **Studies in Natural Products Chemistry**. 2015
- Owolarafe, T. A., Salawu, K., Ihegboro, G. O., Ononamadu, C. J., Alhassan, A. J., Wudil, A. M. Investigation of cytotoxicity potential of different extracts of *Ziziphus mauritiana* (Lam) leaf *Allium cepa* model. **Toxicology Reports**. 2020.
- Pullagurala, V. L. R.; Rawat, S.; Adisa, I. O.; Hernandez-Viezcas, J. A.; Peralta-Videa, J. R.; Gardea-Torresdey, J. L.; Plant uptake and translocation of contaminants of emerging concern in soil. **Science Total Environment**. USA. September. 2018

- Praetorius NP, Mandal TK. Mandal, Engineered nanoparticles in câncer therapy. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**. 2007
- Rhazouani, A., Gamrani, H., Ed-dia, S., Lafhal, K., Boulbaroud, S., Gebrati, L., Fdil, N., Aziz, F., Sub-acute toxicity of graphene oxide (GO) nanoparticles in male mice after intraperitoneal injection: Behavioral study and histopathological evaluation. **Food and Chemical Toxicology**. Morocco. 2023
- Soares, L. M.; Coldebella, P. F.; Frigo, J. P.; Water quality assessment of brazilian rivers using *Allium cepa* meristematic cells as a bioindicator: an integrative review. **Brazilian Journal of Development**. Brazil. Foz do Iguaçu. Janeiro. 2021
- Souza. V. C. Avaliação citogenotóxica da efluente têxtil tratado por processo biológico e físico – químico. 2017. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2017.
- Scherer, M. D.; Sposito, J. C. V; Flaco, W. F.; Grisolia, A. B.; Andrade, L. H.C; Lima, S. M.; Machado, G.; Nascimento, V. A.; Golçalves, D. A.; Wender, H.; Oliveira, S. L.; Caires, R. L.; Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles on meristematic cells of *Allium cepa* roots: A close analysis of particle size dependence. **Science of The Total Environment**. Brasil. Campo Grande. 2019
- Oliveira, A. L. T. T. L.; *Ruta graveolens* L. (arruda) O conhecimento e suas particularidades. FACULDADES INTEGRADAS “ESPÍRITA”. Curitiba, 2006
- Vidakovic’-Cifrek, Z.; Pavlica, M.; Regula, I.; Papes, D.; Cytogenetic damage in shallot (*Allium cepa*) root meristems induced by oil industry "high-density brines". **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. Croatia. 2002
- Vicentini, V. E. P.; Camparoto, M. L.; Teixeira, R. O.; Mantovani, M. S.; *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and test systems. **Acta Scientiarum Agronomy**.23:593-598. Brasil. Paraná. 2001
- Vouitsis, I., Portugal, J., Kontses, A., Karlsson, H. L., Faria, M., Elihn, K., Juárez-Facio, A. T., Amato, F., Piña, B., Samaras, Z. Transport-related airborne nanoparticles: Sources, different aerosol modes, and their toxicity. **Atmospheric Environment**. Greece. 2023
- Young R.J., Kinloch I.A., Gong L., Novoselov K.S.; *The mechanics of graphene*

nanocomposites: A review. Composites Science Technology. 2013

- Zhang, M.; Zhang, L.; Tian, S.; Zhang, X.; Guo, J.; Guan, X.; Xu, P.; Effects of graphite particles/Fe³⁺ on the properties of anoxic activated sludge. **Chemosphere**. China. August. 2020
- Zhu, X., Wang, J., Zhang, X., Chang, Y., Trophic transfer of TiO₂ nanoparticles from Daphnia to zebrafish in a simplified freshwater food chain. **Chemosphere**. USA. Arizona. 2010