

EFEITOS DE NANOTUBOS DE CARBONO NA GERMINAÇÃO DE *LACTUCA SATIVA*

Paula Ariane de Andrade¹, Michele Valquíria dos Reis², Renato Paiva², José Manoel Marconcini³, Juliano Elvis Oliveira^{1*}

¹Departamento de Engenharia, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG

²Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG

³Embrapa Instrumentação, São Carlos-SP

*juliano.oliveira@deg.ufla.br

Classificação: Cenários e avaliação dos riscos ambientais e sociais dos nanocompostos.

Resumo

A evolução da nanociência e sua vasta aplicação na sociedade humana requer um avanço nas análises das interações dos nanodispositivos e das nanoestruturas com sistemas biológicos. Objetivando avaliar os efeitos ecotoxicológicos dos nanotubos de carbono na germinação e crescimento inicial da espécie vegetal *Lactuca sativa* L. (alface), foram realizados testes de germinação onde as sementes foram expostas a seis diferentes concentrações de nanotubos. Foram medidos o percentual de germinação, o comprimento da raiz primária e do hipocótilo das plântulas. A caracterização dos nanotubos de carbono por microscopia eletrônica de transmissão indicou um diâmetro de aproximadamente 14,16nm e por espectroscopia Raman uma razão de intensidades de banda (I_D/I_G) de 1,583. As soluções de nanotubos de carbono utilizadas não afetaram a porcentagem de germinação dos tratamentos. Foi observada uma relação benéfica sobre o crescimento inicial da espécie vegetal em certa faixa de concentração (2-8 $\mu\text{g/mL}$), sendo o tratamento de concentração 6 $\mu\text{g/mL}$ o de influência mais significativa para o comprimento do hipocótilo. Entretanto não é possível afirmar se estes resultados foram devidos a nanopartículas ou a outro componente, como íons metálicos presentes na solução utilizada e que podem influenciar os efeitos ecotoxicológicos neste sistema biológico.

Palavras-chave: nanotubos de carbono, nanotoxicologia, *lactuca sativa*

ANALYSIS OF THE TOXICOLOGICAL EFFECTS OF CARBON NANOTUBES ON LETTUCE GERMINATION

Abstract

The nanoscience evolution and its wide application in human society requires an advance in the analysis of the interactions of nanodevices and nanostructures with biological systems. Aiming to evaluate the ecotoxicological effects of carbon nanotubes on the germination and initial growth of the plant species *Lactuca sativa* L. (lettuce), germination tests were carried out where the seeds were exposed to six different concentrations of nanotubes. The percentage of germination, the length of the primary root and the hypocotyl of the seedlings were measured. The carbon nanotubes characterization by transmission electron microscopy indicated a diameter of approximately 14.16nm and by Raman spectroscopy a ratio of band intensities (I_D/I_G) of 1.583. The carbon nanotubes solutions used did not affect the percentage of germination of the treatments, but a beneficial relation was observed on the initial growth of the vegetal species in a certain range of concentration (2-8 $\mu\text{g/mL}$), where the treatment of 6 $\mu\text{g/mL}$ concentration was the most significant influence on hypocotyl length. However, it is not possible to say if these results were due to nanoparticles or to another component, such as metal ions that can influence the ecotoxicological effects in this biological system.

Keywords: carbon nanotubes, nanotoxicology, *lactuca sativa*

1 INTRODUÇÃO

Um dos nanomateriais de maior interesse tecnológico são os nanotubos de carbono. Formados por estruturas tubulares, possuem grande potencial de inovação para os setores de materiais, eletrônica e biotecnologias. A utilização dos nanotubos pode ser observada em supercapacitores, células a

combustível, células fotovoltaicas, materiais compósitos poliméricos, sistemas de controle de fármacos entre várias outras aplicações (FRANCHI et al., 2012)

A ciência que estuda e procura combater os efeitos nocivos ou adversos causados pelos nanomateriais é denominada nanotoxicologia. Seu objetivo é garantir o desenvolvimento seguro e sustentável da nanotecnologia. Há uma grande necessidade de esforços dedicados a essa área, pois, uma vez que se trata de sistemas em escala nanométrica, as interações desses materiais são muito amplas e suas análises devem levar em consideração vários fatores físicos, morfológicos e químicos. A literatura ainda encontra-se contraditória em alguns aspectos relacionados à nanotoxicologia (SILVA et al., 2014).

A importância dos estudos da toxicidade dos nanotubos de carbono (NTC's) ocorre pelo seu atual emprego e sua grande expectativa de utilização em aplicações tecnológicas em diversas áreas. O contato humano com os nanomateriais, os quais estão presentes em produtos desde cosméticos a equipamentos industriais, é um fato inevitável e seus efeitos adversos à saúde humana e ambiental são motivos de grande preocupação (CERAVOLO, 2015)

De acordo com Oliveira et al. (2014) a germinação de sementes é um processo que compreende vários eventos metabólicos do desenvolvimento inicial da planta, culminando no surgimento da raiz primária dos envoltórios da semente. A exposição de plantas à concentrações de alíquotas de NTCs podem alterar seu crescimento e desenvolvimento. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo analisar as alterações dos aspectos morfológicos, por conseguinte os efeitos das interações dos NTCs, na fase inicial do desenvolvimento da alface.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para analisar os efeitos toxicológicos de Nanotubos de Carbono na germinação da alface foram feitos ensaios de germinação utilizando-se soluções em 6 diferentes concentrações de NTCPM - 0, 2, 4, 6, 8 e 10 $\mu\text{g/mL}$ (respectivamente T0, T1, T2, T3, T4 e T5). Para a realização do experimento foram empregadas sementes de *Lactuca Sativa L.*, de mesmo lote da marca Isla (linha PAK), e nanotubos de carbono (Sigma Aldrich ®).

2.1 Preparo das soluções

A solução estoque de NTC foi preparada usando 0,1 g NTCPM funcionalizados com ácido carboxílico (Sigma Aldrich ®) e 0,9 g de P478 – Tween 80 (Sigma Aldrich ®) que foram colocados em béquer e água destilada até completar 300 mL para compor a solução estoque contendo 0,05% de NTC. A solução foi levada ao sonicador (Brenson – Digital Sonifier ®, modelos 250 & 450) com amplitude 30% por 15 minutos.

2.2 Caracterização por Espectroscopia Raman

Os dados foram obtidos utilizando espectrofotômetro Raman por transformada de Fourier (RIS 100/S, Bruker, Inc., Karlsruhe, Alemanha), excitado por laser Nd:YAG a 1064 nm e resolução espectral de 4 cm^{-1} .

2.3 Caracterização por Microscopia Eletrônica de transmissão

As dispersões em meio aquoso dos nanotubos foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão TECNAI™G2 F20 no modo STEM, em campo claro (*Bright Field*) e campo escuro (*Dark Field*). As amostras foram preparadas a partir da suspensão dos NTC em hexano e depois foram sofínicadas em ultrasonificador Brenson 450 durante 5 minutos. As suspensões foram depositadas na superfície de uma grade de cobre com filme de Formvar de 400 mesh (Ted Pella) e armazenadas em um dessecador por 24 horas, no mínimo, antes das análises de MET.

2.4 Ensaios de germinação

Foram selecionadas aproximadamente 900 sementes da espécie de alface utilizada, as quais foram desinfetadas (trinta segundos em álcool 70% e dois minutos em hipoclorito 2,5%) e distribuídas em Placas de Petri sobre papéis filtro (2 em cada placa) embebidos com a solução. A determinação do volume de solução a ser utilizado para cada papel filtro foi baseada na literatura (RAS).

Água destilada foi usada como controle e cada tratamento foi realizado em cinco repetições. Em cada uma das placas de petri foram dispostas 30 sementes, posicionadas em 5 fileiras de 6 sementes, com espaçamento uniforme e suficiente para minimizar a competição por espaço entre as sementes. As placas foram lacradas e armazenadas em um local com luz artificial na temperatura ambiente de 25°C.

O número de sementes germinadas foi contabilizado diariamente, no mesmo horário, durante 14 dias. De acordo com a necessidade as placas foram molhadas, utilizando suas respectivas soluções para cada tratamento, com aproximadamente 0,5ml para que se mantivessem úmidas. Ao final desse período de germinação, as sementes foram analisadas com o equipamento GroundEye, do Laboratório Central de Sementes da Universidade Federal de Lavras.

Após seis meses a solução estoque de NTC foi novamente sonicada para a dispersão dos nanotubos aglomerados e os testes de germinação foram novamente reproduzidos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados na caracterização por espectroscopia Raman da amostra indicaram uma relação entre as intensidades das bandas D e G (I_D/I_G) do espectro de 1,58. Esse valor é sinal de um elevado grau de desordem presente na estrutura dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas.

Na caracterização por microscopia eletrônica de transmissão da amostra foi possível a visualização da estrutura dos nanotubos. Com essa técnica foi possível observar um aspecto quebradiço e contorcido das nanoestruturas (Figura 1), o qual pode ser resultado do método de sonicção, utilizado no preparo das amostras. Através da microscopia foi também possível a determinação do diâmetro médio aproximado de 14,16nm dos NTCPM's.

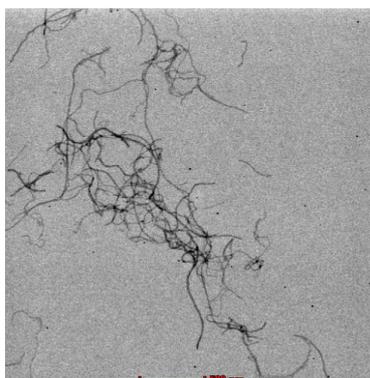


Figura 1. Microscopia MET da amostra de NTCPM em *Bright Field* na escala 500nm

Após o período de exposição das sementes às soluções de diferentes concentrações de NTC, foram coletadas as médias para cada tratamento de porcentagem de sementes de alface germinadas, comprimento da raiz primária e comprimento do hipocótilo. A tabela 1 apresenta os resultados obtidos com seus respectivos erros padrões.

Tabela 1. Médias obtidas para as variáveis porcentagem de sementes germinadas, comprimento da raiz primária e comprimento do hipocótilo.

| Tratamento | Porcentagem média de germinação 1 (%) | Porcentagem média de germinação 2 (%) | Comprimento médio da raiz primária (cm) | Comprimento médio do hipocótilo (cm) |
|------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---|--------------------------------------|
| T0 | 84,5 (± 3,2) | 91,2 (± 2,9) | 2,7 (± 0,4) | 1,4 (± 0,1) |
| T1 | 93,3 (± 2,8) | 89,6 (± 1,6) | 3,8 (± 0,4) | 1,6 (± 0,1) |
| T2 | 84,7 (± 4,7) | 90,4 (± 4,1) | 2,9 (± 0,2) | 1,6 (± 0,1) |
| T3 | 93,1 (± 2,1) | 87,2 (± 2,9) | 5,3 (± 0,4) | 1,5 (± 0,1) |
| T4 | 93,3 (± 2,8) | 86,4 (± 4,1) | 4,0 (± 0,3) | 1,5 (± 0,1) |
| T5 | 85,3 (± 2,9) | 82,4 (± 2,7) | 3,7 (± 0,3) | 1,3 (± 0,1) |

A variável porcentagem de sementes germinadas foi analisada com a ferramenta de análise de variância (ANOVA). Foi aplicado o teste estatístico de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade para ambas as reproduções. Os coeficientes de variação para o primeiro e o segundo conjuntos de dados do experimento foram, respectivamente, 8% e 8,12%.

Com os dados obtidos aplicou-se o teste estatístico Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Os coeficientes de variação obtidos para comprimento médio da raiz primária e do hipocótilo foram, respectivamente, 48,09% e 37,31%.

A partir das análises estatísticas e gráficas para os comprimentos da raiz primária e hipocótilo pode-se constatar que a concentração do tratamento T3 (6 $\mu\text{g/mL}$) foi a que influenciou mais positivamente para o crescimento de ambas as estruturas. Com os resultados do comprimento do hipocótilo também é possível supor uma faixa ideal de concentração (2-8 $\mu\text{g/mL}$) para a aplicação de nanotubos de carbono no processo de germinação das sementes da espécie vegetal em questão. Acima dessa faixa, as nanoestruturas deixam de ser benéficas para tal variável.

Ao se tratar da porcentagem de sementes germinadas para a primeira reprodução do experimento, pode-se afirmar que não foi obtida nenhuma resposta apreciável em função de escala e variações não significativas. Já na segunda, todos os tratamentos se mantiveram equivalentes. A baixa no número de sementes vivas na segunda bateria de dados pode ter ocorrido por fatores decorrentes do meio de cultivo e também pelo estado das soluções utilizadas. Mesmo com os devidos cuidados tomados, as desinfetações aplicadas não foram totalmente eficazes para prevenir a ação de fungos sobre a espécie vegetal. Com relação as soluções utilizadas, o tempo entre a primeira e a segunda reprodução dos experimentos pode ter afetado a qualidade da solução estoque de NTC. Na caracterização inicial da amostra de nanotubos foi possível identificar um grande grau de desordem. Com o passar do tempo é possível que defeitos, como impurezas e grãos de fronteira, tenham se incorporado às nanoestruturas, aumentando assim esse grau de desordem do sistema. Além disso, o método de sonicação utilizado com a intenção de desaglomeração dos nanotubos aumenta o aspecto quebradiço, contribuindo para a elevação de defeitos. Para constatações conclusivas dessa hipótese seria necessária uma segunda caracterização através da técnica de espectroscopia Raman.

Como a amostra de nanotubos utilizada apresentou características de grande desordem nos espectros Raman iniciais, não é possível afirmar se as respostas dos testes de germinação foram devidas aos nanotubos em si ou se foram consequência de alguma impureza metálica.

4 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados por meio dos experimentos realizados com a Alface Regina de Verão (*Lactuca sativa*), foi possível observar uma relação benéfica da solução de nanotubos de carbono utilizada sobre o crescimento inicial da espécie vegetal em certa faixa de concentração (2-8 $\mu\text{g/mL}$). As alíquotas aplicadas funcionaram como uma forma de adubo para o crescimento das plântulas com a metodologia utilizada, sendo o tratamento de concentração 6 $\mu\text{g/mL}$ o de influência mais significativa para o comprimento do hipocótilo, não afetando porém a porcentagem de germinação dos tratamentos.

Entretanto, através da caracterização da amostra de NTC um elevado número de defeitos nas nanoestruturas foi constatado.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas pela disponibilização dos materiais e espaço necessários para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- FRANCHI, L. P. et al. Citotoxicidade e genotoxicidade de nanotubos de carbono. *Quim. Nova*, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 571–580, 2012.
- SILVA, L. H. da. et al. Revisão bibliográfica sobre relações entre nanomateriais, toxicidade e avaliação de riscos: a emergência da nanotoxicologia. *Disciplinarum Scientia*, v. 15, n. 1, p. 19–30, 2014.
- CERAVOLO, M. de L. A. Nanotecnologia : riscos ocupacionais e amparo legal. *Laborativa*, v. 4, n. 2, p. 53–63, 2015.
- OLIVEIRA, A. K. M. et al. Germinação de sementes de pau-de-esperto (*Casearia gossypiosperma*) em diferentes temperaturas. *Floresta*, v. 45, n. 1, p. 97–106, 2014.