



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-135-6

EFEITO DO ÓXIDO DE GRAFENO EM *Lactuca sativa* SOB INFLUÊNCIA DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

Yasmin Gomes **Nery**¹; Rodrigo Fernandes **Castanha**²; Paula Pinheiro **Morão**³; Vera Lúcia S.S. de **Castro**⁴; Claudio Martín **Jonsson**⁵

Nº 16412

RESUMO - *Diversas áreas revelam o grafeno como um nanomaterial promissor em várias aplicações, tais como transporte de fármacos, remoção de poluentes de água e ar (metais, orgânicos e microrganismos). Nas áreas de agricultura e meio ambiente, seu uso é promissor na remoção de pesticidas de águas contaminadas por esses insumos agrícolas. É esperado que materiais a base de grafeno estejam presentes nas estações de tratamento de efluentes em quantidades consideráveis, o que pode comprometer a qualidade do lodo agrícola usado como biofertilizante. A semente de alface *Lactuca Sativa* (*L. sativa*) é um organismo bioindicador de contaminação de áreas úmidas de transição entre o compartimento aquático e o compartimento solo. No presente trabalho avaliou-se o efeito do óxido de grafeno na germinação e taxa de crescimento das raízes de *L. sativa*, sob diferentes concentrações do nanomaterial e de influência do ácido húmico neste efeito. Esta última substância pode afetar a biodisponibilidade do nanomaterial. Como resultado observou-se que mesmo na maior concentração testada, 100 mg L⁻¹, não houve alteração significativa ($P > 0,05$) da germinação e do crescimento de *Lactuca sativa*. A presença do material húmico, na concentração de 20 mg L⁻¹, não contribuiu para manifestar efeito adverso do material-teste.*

Palavras-chaves: Grafeno, *Lactuca sativa* L., ecotoxicologia, nanomateriais.

1-Bolsista CNPq: Graduação em Engenharia Ambiental e Sanitária, PUC-CAMPINAS, Campinas-SP; yasmin_nery@hotmail.com

2-Colaborador: Técnico, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

3-Colaboradora: Graduação em Ciências Biológicas, Unicamp, Campinas-SP.

4-Colaboradora: Pesquisadora, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

5-Orientador: Pesquisador, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; claudio.jonsson@embrapa.br



ABSTRACT - *Several areas show graphene as a promising nanomaterial in various applications such as transportation of drugs, removal of water and air pollutants (metals, organics and microorganisms). In the areas of agriculture and environment, it is promising use in removing water contaminated by pesticides. It is expected that graphene based materials are present in the wastewater treatment plants in considerable quantities, which can compromise the quality of agricultural sludge used as bio-fertilizer. Lettuce (*L. sativa*) seed is a bioindicator organism used to evaluate the contamination of the transition area between the water compartment and the ground. In the present study we evaluated the effect of graphene oxide on the germination and growth rate of *L. sativa* roots under different nanomaterial concentrations and the influence of humic acid in this effect. This latter substance can affect the bioavailability of the nanomaterial. As a result, even the highest concentration tested (100 mg L^{-1}) did not produced significant change ($P > 0.05$) on the germination and growth of *L. sativa*. The presence of the humic material at the concentration of 20 mg L^{-1} did not contributed to manifest adverse effect of the test-material.*

KEYWORDS: Graphene; *Lactuta sativa* L.; ecotoxicology; nanomaterials.

1 INTRODUÇÃO

O uso e estudo do grafeno, o qual é considerado um nanomaterial, vem atraindo bastante interesse por sua alta tensão de ruptura, alta condutividade térmica e elétrica, ótima propriedade mecânica, grande área específica e por ter uma nanocamada plana de átomos de carbono organizados em uma rede bidimensional (NGUYEN et al. 2009; RAFIEE et al., 2010). Isto confere a oportunidade de obter materiais com diferentes funcionalidades (FIM, 2012).

Diversas áreas revelam o grafeno como um nanomaterial promissor em várias aplicações, tais como transporte de fármacos, remoção de poluentes de água e ar (metais, orgânicos e microrganismos) e dispositivos eletrônicos. (MALIYEKAL et al., 2013) relataram sobre seu uso promissor na remoção de inseticidas, tais como clorpirifós, endosulfan e malation, de águas contaminadas por esses insumos agrícolas.

O grafeno já é utilizado em diversos setores, principalmente o da eletrônica, na fabricação de eletrodos de baterias, telas táteis e outros dispositivos. Portanto, o mercado de produtos a base de grafeno e seus derivados (como o óxido de grafeno) deva atingir cerca de 675 milhões de dólares em 2020, é esperado que estes compostos estejam presentes nas estações de tratamento de efluentes em quantidades consideráveis (AHMED & RODRIGUES, 2013). Este fenômeno



poderia ter influência sobre a alteração da qualidade do lodo agrícola usado como biofertilizante (SMITH, 2009).

As substâncias húmicas, como ácido húmico, estão presentes na natureza e são originárias de estágios de decomposição de restos de animais e vegetais. Consistem em macromoléculas poliméricas formadas principalmente por grupos carboxílicos e fenólicos. São capazes de solubilizar, em meio aquoso, materiais hidrofóbicos e nanomateriais. Assim, nanopartículas podem ter sua aglomeração reduzida devido à alteração de carga de superfície pela substância húmica (HYUNG et al., 2007, ZHANG et al., 2009), o que por sua vez pode alterar a biodisponibilidade do nanomaterial.

A semente de alface (*L. sativa*) constitui um organismo bioindicador de contaminação de áreas úmidas de transição entre o compartimento aquático e o compartimento solo (SOBRERO & RONCO, 2004). Tem sido utilizada em estudos de avaliação de risco e de biomonitoramento de áreas degradadas (BAUTISTA et al., 2013; RODRIGUES et al., 2013).

Assim, com base no exposto anteriormente, no presente trabalho avaliou-se o efeito do óxido de grafeno na germinação e taxa de crescimento das raízes de *L. sativa*, sob diferentes concentrações do nanomaterial e influência do ácido húmico neste efeito.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O material teste foi o óxido de grafeno (OG) (Figura1) que foi adquirido de Sigma Aldrich (código do produto: 763713). As suspensões estoque (1g L^{-1}) foram sonicadas durante 30 minutos antes da realização do teste.

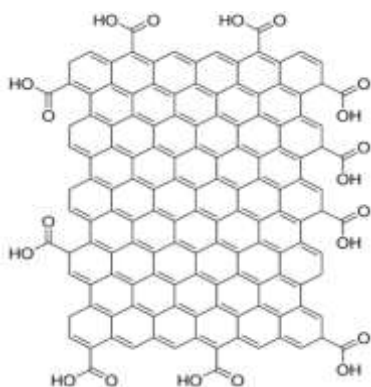


Figura 1. Estrutura do óxido de grafeno (OG).

Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product>



O ácido húmico (AH) (Figura 2), foi adquirido Sigma Aldrich, apresentando as seguintes características físico-químicas.

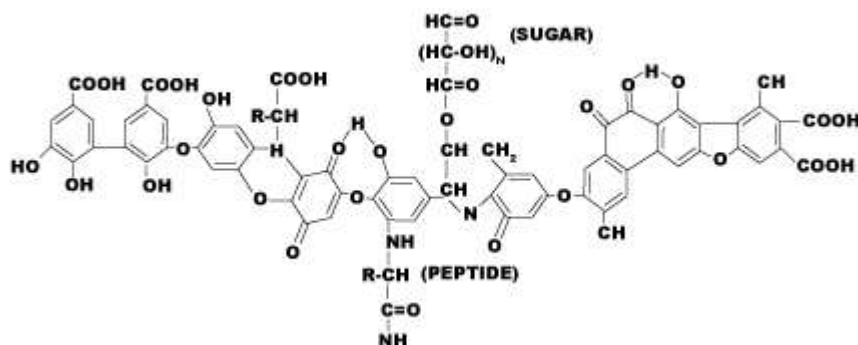


Figura 2. Estrutura proposta do ácido húmico.

Fonte: <http://jhbitech.com/uncategorized/humax-powder-65/>

2.1 Organismo-teste e delineamento experimental

As sementes de alface (*Lactuca sativa*) foram adquiridas pela ISLA SEMENTES. Foram utilizadas placas de poliestireno com 12 poços, com capacidade de aproximadamente 5 mL cada, tipo NEST, código MPCC12E. Cada semente foi alocada sobre um disco de papel de filtro, tipo Whatman número 2, posicionado no fundo de cada poço. Previamente à alocação das sementes, a cada filtro se adicionou 400µL da solução-teste em diferentes concentrações do material-teste em água destilada. Assim, os organismos foram expostos às concentrações equivalentes a 0,0 (controle); 0,1; 1; 10 e 100 mg.L⁻¹ de OG, e nestas mesmas concentrações adicionadas de AH na concentração de 20 mg.L⁻¹. A cada tratamento lhe correspondeu três placas, totalizando assim 36 organismos por concentração-teste. As placas foram distribuídas ao acaso em sala com temperatura controlada. A exposição foi realizada num período de 72 h (BAUTISTA et al., 2013) a uma temperatura controlada de 20±1 °C, no escuro.

Foram avaliadas a porcentagem de germinação no final da exposição e a taxa de crescimento das raízes. Neste último caso, os organismos foram fotografados no início do teste, e a cada 24 h, através da câmera Optika 4083B3 acoplada a estereomicroscópio (Optika, Itália). As medidas do tamanho das raízes foram realizadas através do software Optika View Versão 7.1.1.5. As taxas de crescimento foram determinadas pelo cálculo dos coeficientes angulares de curvas de regressão linear do tamanho da raiz em função do tempo (BASU & PAL, 2011).



Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis do módulo “One Way ANOVA” contido programa Statgraphics Centurion XVII Version 1.17.04 (STAT POINT TECHNOLOGIES, 2014).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito na germinação de sementes

A Figura 3 apresenta os valores de porcentagem de germinação de sementes de *L. sativa* expostas ao óxido de grafeno (OG) na presença e ausência de 20 mg.L⁻¹ de ácido húmico. A taxa média de germinação no grupo controle foi de aproximadamente 75 %. As maiores alterações observadas em relação ao grupo controle foram para as concentrações de 1 e 10 mg L⁻¹ de OG na ausência de substância húmica. Estas alterações corresponderam, respectivamente, as porcentagens de germinação de aproximadamente 40 e 95%. Porém, estas diferenças com relação ao grupo isento de OG (controle), assim com as observadas para todos os outros tratamentos, não foram estatisticamente significativas (P>0,05).

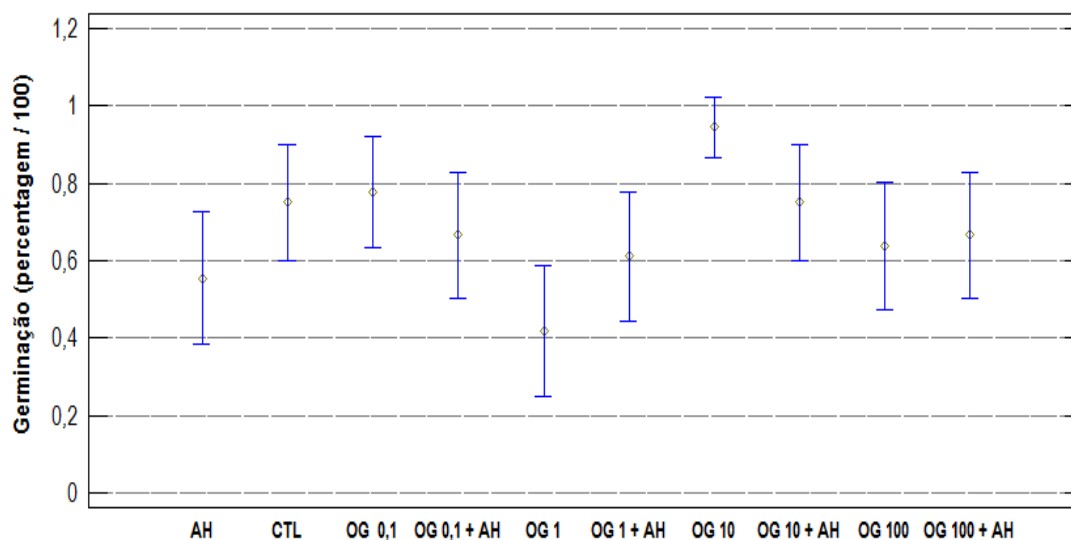


Figura 3. Valores médios (\pm intervalos de confiança 95 %) das taxas de germinação de sementes de *L. sativa* expostas ao óxido de grafeno (OG) na presença e ausência de 20 mg.L⁻¹ de ácido húmico. (AH). Controle (CTL); 0,1 mg L⁻¹ OG + AH (OG 0,1 + AH); 1 mg L⁻¹ OG + AH (OG 1 + AH); 10 mg L⁻¹ OG + AH (OG 10 + AH); 100 mg L⁻¹ OG + AH (OG 100 + AH); 0,1 mg L⁻¹ OG (OG 0,1); 1 mg L⁻¹ OG (OG 1); 10 mg L⁻¹ OG (OG 10); 100 mg L⁻¹ OG (OG 100).



3.2 Efeito no crescimento da raiz

De modo semelhante ao constatado quanto aos efeitos na germinação, não foi observada uma relação dose-resposta na taxa de crescimento da raiz de *L.sativa* exposta às diferentes concentrações do material-teste, tanto na ausência com na presença de ácido húmico. A Figura 4 apresenta as curvas de crescimento de *L. sativa* expostas ao oxido de grafeno (OG) na presença e ausência de 20 mg/L de ácido húmico. Várias das sementes tiveram crescimento nulo e o crescimento das raízes só foi observado nas horas subsequentes às 24 horas de exposição.

A Figura 5 apresenta a dispersão de dados referente ao comprimento da raiz nas 72 h exposição somente para as sementes germinadas. Nesta situação, a análise estatística não demonstrou diferença significativa dos tratamentos em relação ao controle ($p>0,05$). Assim como também, não se constatou efeito significativo na taxa de crescimento, tal como demonstrado na Figura 6.

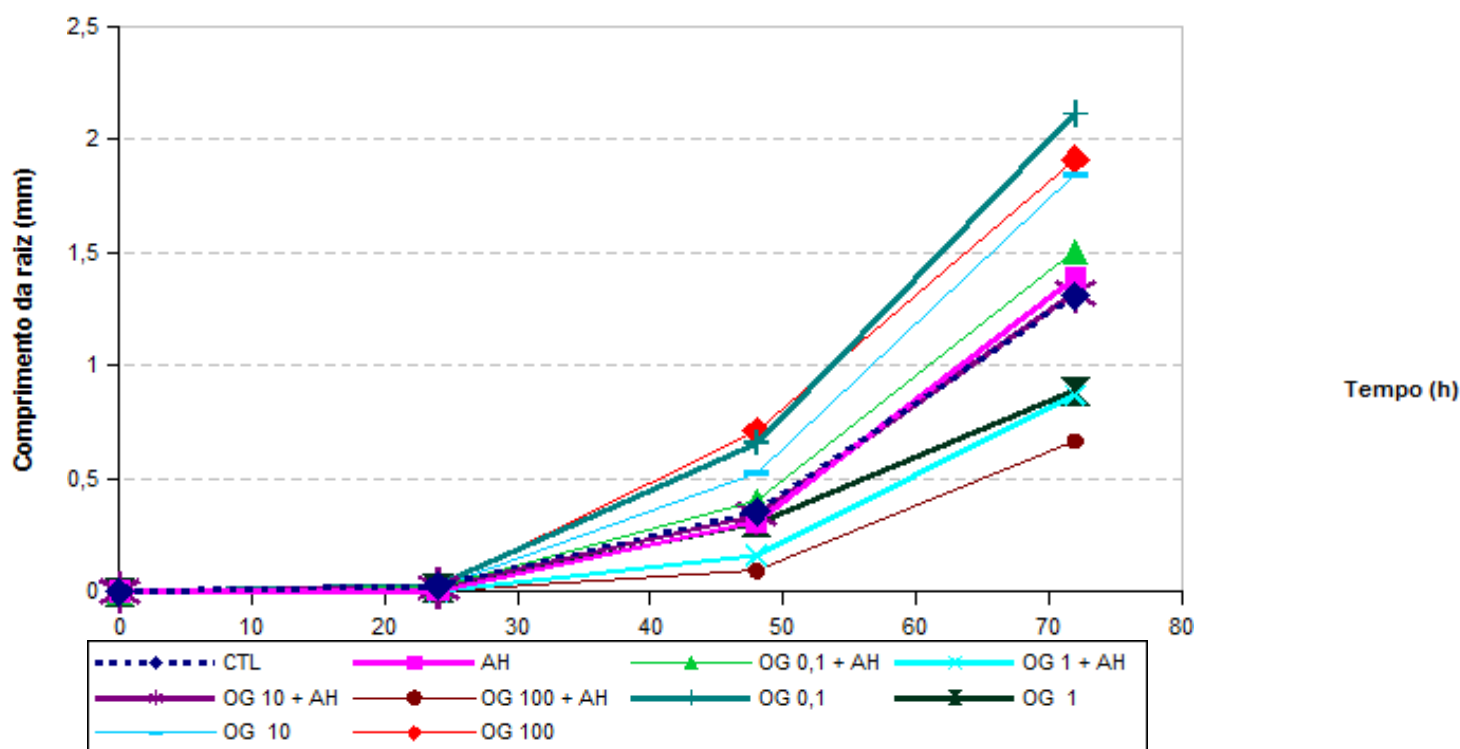


Figura 4. Curvas de crescimento de *L. sativa* expostas ao oxido de grafeno (OG) na presença e ausência de 20 mg/L de ácido húmico (AH Controle (CTL); 0,1 mg L⁻¹ OG + AH (OG 0,1 + AH); 1 mg L⁻¹ OG + AH (OG 1 + AH); 10 mg L⁻¹ OG + AH (OG 10 + AH); 100 mg L⁻¹ OG + AH (OG 100 + AH); 0,1 mg L⁻¹ OG (OG 0,1); 1 mg L⁻¹ OG (OG 1); 10 mg L⁻¹ OG (OG 10); 100 mg L⁻¹ OG (OG 100)).

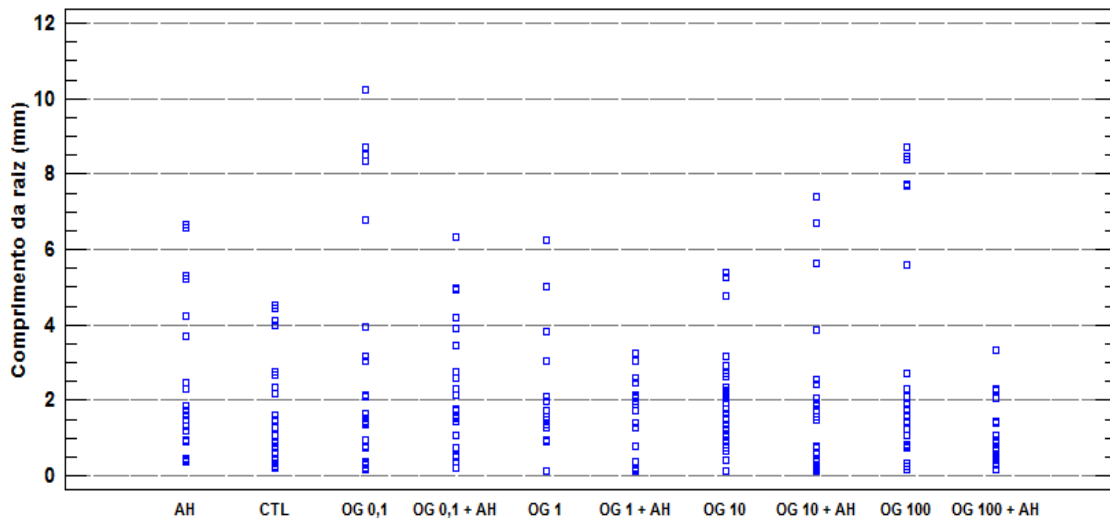


Figura 5. Longitudes de raízes de sementes germinadas de *L. sativa* para as 72 h de exposição ao oxido de grafeno (OG) na presença e ausência de 20 mg/L de ácido húmico (AH): Controle (CTL); 0,1 mg L⁻¹ OG + AH (OG 0,1 + AH); 1 mg L⁻¹ OG + AH (OG 1 + AH); 10 mg L⁻¹ OG + AH (OG 10 + AH); 100 mg L⁻¹ OG + AH (OG 100 + AH); 0,1 mg L⁻¹ OG (OG 0,1); 1 mg L⁻¹ OG (OG 1); 10 mg L⁻¹ OG (OG 10); 100 mg L⁻¹ OG (OG 100).

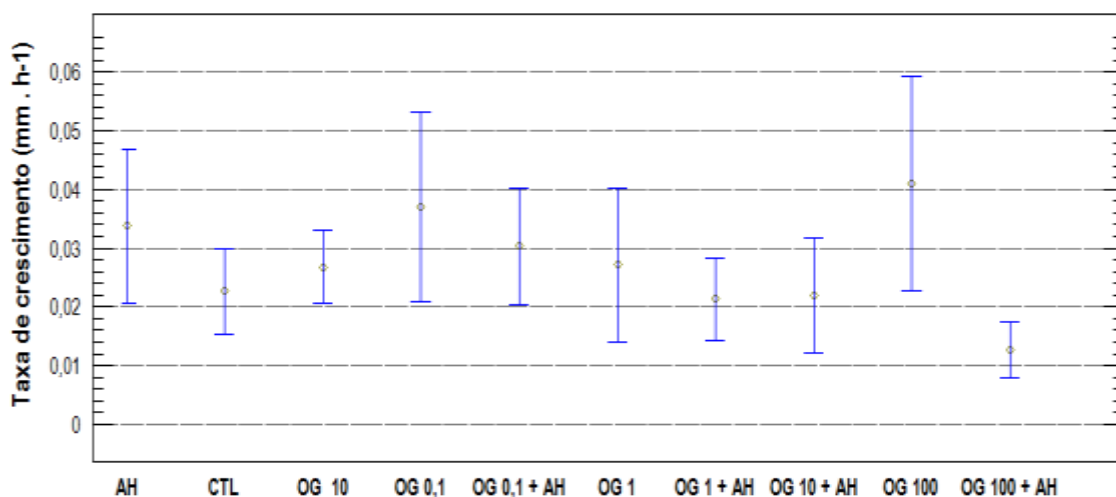


Figura 6. Valores médios (\pm intervalos de confiança 95%) das taxas de crescimento das sementes germinadas de *L. sativa* expostas ao oxido de grafeno (OG) na presença e ausência de 20 mg/L de ácido húmico (AH): Controle (CTL); 0,1 mg L⁻¹ OG + AH (OG 0,1 + AH); 1 mg L⁻¹ OG + AH (OG 1 + AH); 10 mg L⁻¹ OG + AH (OG 10 + AH); 100 mg L⁻¹ OG + AH (OG 100 + AH); 0,1 mg L⁻¹ OG (OG 0,1); 1 mg L⁻¹ OG (OG 1); 10 mg L⁻¹ OG (OG 10); 100 mg L⁻¹ OG (OG 100).



4 CONCLUSÃO

Conclui-se que o OG, na concentração de 100 mg L⁻¹, não altera significativamente a germinação nem o crescimento de *Lactuca sativa*, mesmo em altas concentrações como a de 100 mg L⁻¹. A presença do material húmico, na concentração de 20 mg L⁻¹, não contribuiu para manifestar efeito adverso do material-teste nas concentrações avaliadas.

Portanto, a concentração efetiva média (CE50-72h) > 100 mg L⁻¹ determinada com base nos parâmetros avaliados, categorizaria o material-teste (USEPA, 1985) como ausente de efeitos fitotóxicos para *L. sativa*.

Os presentes resultados, em conjunto com valores de parâmetros de ecotoxicidade de OG determinados em outros organismos-teste bioindicadores, são de utilidade para orientar políticas públicas quanto ao estabelecimento de níveis de segurança de nanomaterias em compartimentos ambientais.

5 AGRADECIMENTOS

À Embrapa Meio Ambiente pela oportunidade e suporte para a realização do estudo da Iniciação Científica. Ao CNPq por conceder a bolsa de Iniciação Científica para o devido estudo.

6 REFERÊNCIAS

- AHMED, F¹; RODRIGUES, D.F. **Investigation of acute effects of graphene oxide on wastewater microbial community: a case study.** *J Hazard Mater.* V. 256-257, p.33-39. 2013.
- BASU, P.; PAL, A . **Spatio-temporal analysis of development of basal roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.).** *Plant Signaling & Behavior* 6:7, 982-985; July 2011; © 2011 Landes Bioscience.
- BAUTISTA, O.V; FISCHER, G; CÁRDENAS, J.F. **Cadmium and chromium effects on seed germination and root elongation in lettuce, spinach and Swiss chard Efecto del cadmio y cromo sobre la germinación y elongación radical de lechuga, espinaca y acelga.** *Agronomía Colombiana.* v.31. n.1 Bogotá, 2013.
- FIM, F.C. **Síntese e propriedades de nanocompósitos de polietileno/nanolâminas de grafeno obtidos através de polimerização in situ.** Porto Alegre, 2012.
- HYUNG, H; FORTNER, J.D; HUGHES, J.B; KIM, J.H. **Natural organic matter stabilizes carbon nanotubes in the aqueous phase.** *Environ Sci Technol.* 2007; 41(1): 179-84.



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-135-6

MALIYEKKAL, S.M; SREEPRASAD, T.S; KRISHNAN, D; KOUSER, S; MISHRA, A.K; WAGHMARE, U.V; PRADEEP, T. **Graphene: a reusable substrate for unprecedented adsorption of pesticides**. *Small*. V.9, n.2, p.273-283. 2013.

NGUYEN, D.A.; LEE, Y.R.; RAGHU, A.V.; *et al.*, **"Morphological and physical properties of a thermoplastic polyurethane reinforced with functionalized graphene sheet"**, *Polymer International*, v. 58, pp. 412-417, 2009.

RAFIEE, M.A.; LU, W.; THOMAS, A.V.; *et al.*, **"Graphene nanoribbon composites"**, *ACS Nano*, v. 4, pp. 7415-7420, 2010.

RODRIGUES, L.C. A.; BARBOSA, S; PAZIN, M; MASELLI, B.S; BEIJO, L.A; KUMMROW, F. **Fitotoxicidade e citogenotoxicidade da água e sedimento de córrego urbano em bioensaio com *Lactuca sativa***. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. V.17,n.10,p.1099-1108.2013.

SMITH, S. R. Organic contaminants in sewage sludge (biosolids) and their significance for agricultural recycling. **Philos Trans A Math Phys Eng Sci. V. 367, p. 4005-4041. 2009.**

SOBRERO, M.C.; RONCO, A. **Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.)**. In: Castillo Morales, G. (Ed.) *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas*. IMTA: Jiutepec, p. 71-79, 2004.

STATPOINT TECHNOLOGIES. *Statgraphics Centurion XVII (Version 17.1.04)*, StatPoint Technologies, Inc., Herndon, VA, 2014.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. Hazard Evaluation Division. **Standard evaluation procedure: acute toxicity test for freshwater invertebrates**. Washington, D.C., 1985. 12 p.

ZHANG, Y; CHEN, Y; WESTERHO, P; CRITTENDEN, J. **Impact of natural organic matter and divalent cations on the stability of aqueous nanoparticles**. *Water Res.* 2009; 43(17): 4249–57.