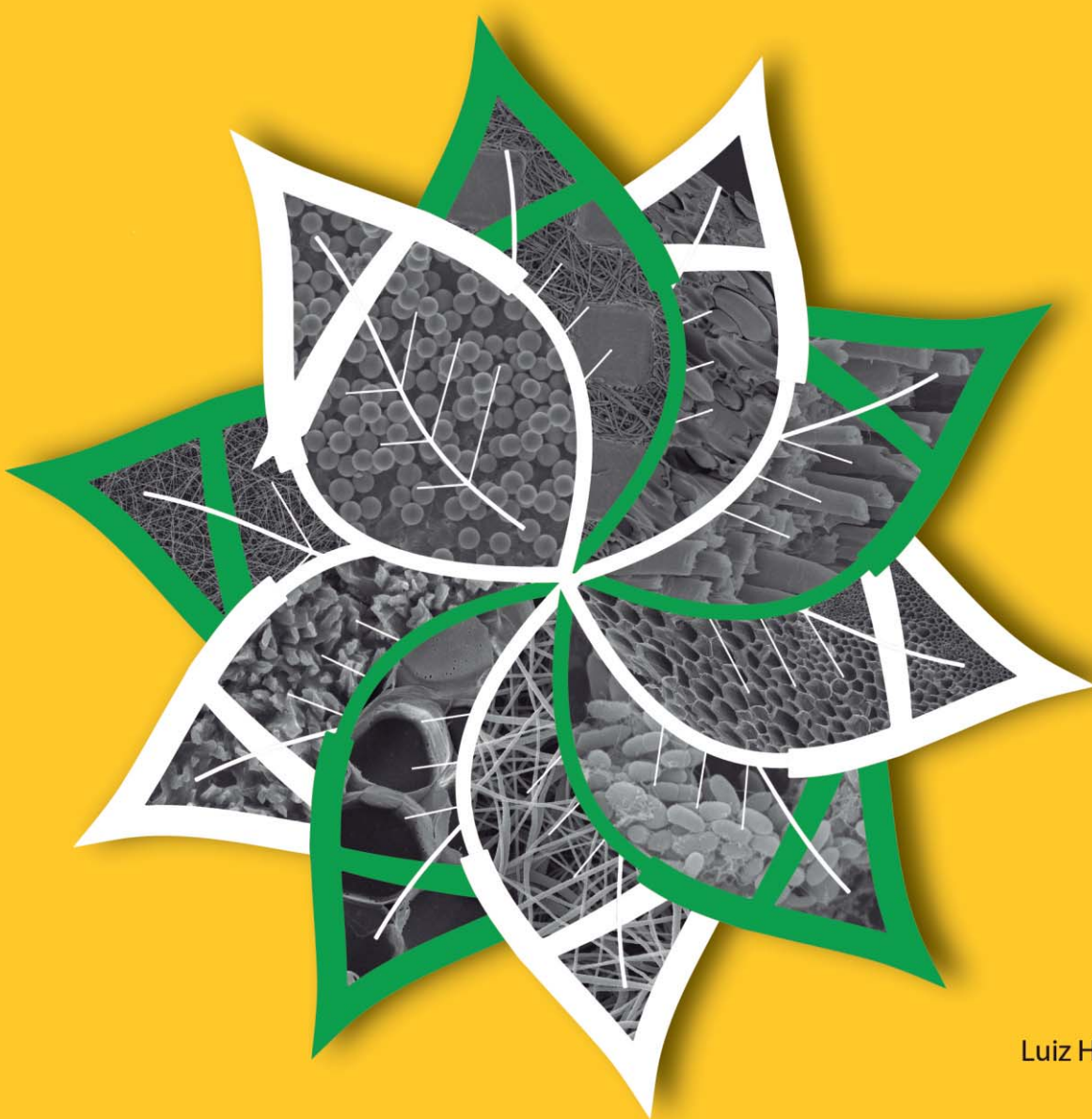


Rede de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio Anais do IX Workshop 2017



Editores

Caue Ribeiro de Oliveira
Elaine Cristina Paris
Luiz Henrique Capparelli Mattoso
Marcelo Porto Bemquerer
Maria Alice Martins
Odílio Benedito Garrido de Assis

ISSN 2175-8395

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Instrumentação
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

**ANAIS DO IX WORKSHOP DE NANOTECNOLOGIA
APLICADA AO AGRONEGÓCIO**

Caue Ribeiro
Elaine Cristina Paris
Luiz Henrique Capparelli Mattoso
Marcelo Porto Bemquerer
Maria Alice Martins
Odílio Benedito Garrido de Assis

Editores

Embrapa Instrumentação

São Carlos, SP

2017

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Instrumentação

Rua XV de Novembro, 1452

Caixa Postal 741

CEP 13560-970 - São Carlos-SP

Fone: (16) 2107 2800

Fax: (16) 2107 2902

www.embrapa.br/instrumentação

E-mail: www.embrapa.br/fale-conosco

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Wilson Lopes da Silva

Secretária executiva: Maria do Socorro Gonçalves de Souza Monzane

Membros:

Carlos Renato Marmo

Cíntia Cabral da Costa

Cristiane Sanchez Farinas

Elaine Cristina Paris

Maria Alice Martins

Paulo Renato Orlandi Lasso

Capa - Desenvolvimento: NCO; criação: Letícia Longo

Editoração eletrônica: Valentim Monzane

1ª edição

1ª impressão (2017): tiragem 300

As opiniões, conceitos, afirmações e conteúdo desta publicação são de exclusiva e de inteira responsabilidade dos autores, não exprimindo, necessariamente, o ponto de vista da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), vinculada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados internacionais de catalogação (CIP)

Embrapa Instrumentação

Anais do IX Workshop da rede de nanotecnologia aplicada ao agronegócio – 2017 – São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2017.

ISSN 2175-8395

1. Nanotecnologia – Evento. I. Ribeiro, Caue. II. Paris, Elaine Cristina. III. Mattoso, Luiz Henrique Capparelli. IV. Bemquerer, Marcelo Porto. V. Martins, Maria Alice. VI. Assis, Odílio Benedito Garrido de. VII. Embrapa Instrumentação.

SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA UTILIZANDO EXTRATOS VEGETAIS PARA O CONTROLE DE *Meloidogyne incognita*

(POLEZ, V.L.P.¹; ROCHA, T.L.¹; JESUS, K.R.²; SOLL, C.B.¹; PUPE, J.¹; VIEIRA, R.F.¹; SILVA, D.B.¹; ALVES, R.B. N.¹; COSTA, D.C.¹; ABIORAMA, A.F.¹; BONATTO, C.C.¹; SILVA, L.P.¹)

(¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e ²Embrapa Meio Ambiente) vera.polez@embrapa.br

Classificação: Novos materiais e processos em nanotecnologia e suas aplicações no agronegócio.

Resumo

O fitonematoide *Meloidogyne incognita* é responsável pela redução na produtividade e na qualidade dos produtos agrícolas em termos mundiais. O controle deste fitoparasita permanece centrado no uso de nematicidas sintéticos, problemáticos à saúde humana, animal e ao meio ambiente. Assim, a nanotecnologia verde está sendo proposta visando ao controle de *M. incognita*. A síntese verde de nanopartículas (NPs) apresenta custo baixo, biocompatibilidade, ausência/baixa toxicidade e um menor impacto ao meio ambiente. Neste caso, foi proposta a síntese de nanopartículas de prata (AgNPs) utilizando-se extratos vegetais aquosos de dez espécies pertencentes à Coleção de Germoplasma de Plantas Medicinais e Aromáticas da Embrapa visando ao controle de *M. incognita*. A síntese de AgNPs foi realizada utilizando-se extratos aquosos e nitrato de prata na concentração de 1mM. O diâmetro hidrodinâmico das AgNPs variaram entre 68,5±2,4 a 329,8±44,13nm no período de seca e 39,7±8,9 a 218,0±3,1nm no período chuvoso. Todas as AgNPs apresentaram ação nematotóxica. Duas foram selecionadas devido à estabilidade e ação nematotóxica. A avaliação dos riscos das AgNPs está sendo realizada pela formulação de indicadores específicos dos riscos ambientais e ecotoxicológicos e serão testados durante a execução da pesquisa para garantir o desenvolvimento de forma sustentável e segura para o meio ambiente.

Palavras-chave: Nanopartículas; Síntese verde; Banco de Germoplasma; Controle; *Meloidogyne incognita*;

GREEN SYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES USING PLANT EXTRACTS FOR THE CONTROL OF *Meloidogyne incognita*

Abstract

The phytonematode *Meloidogyne incognita* is responsible for the reduction in productivity and quality of agricultural products in world terms. The control of this phytoparasite remains centered on the use of nematicides synthetics, problematic to human health, animal and the environment. Thus, the green nanotechnology is being proposed for the control of *M. incognita*. The nanoparticles (NPs) synthesis show low cost, biocompatibility, absence/low toxicity, as well as a lesser impact on the environment. In this case it was proposed the silver nanoparticles (AgNPs) synthesis using plant extracts of 10 species belonging to the Germplasm Medicinal and Aromatic Plants Collection from Embrapa aiming the control of *M. incognita*. The AgNPs synthesis was performed using aqueous extracts and silver nitrate at concentration of 1mM. The AgNPs hydrodynamic diameter ranged from 68.5±2,4 to 329.8±44,13nm during the dry season and 39.7±8,9 to 218,0±3,1nm in the rainy season. All the AgNPs presented nematotoxic action. Two were selected due to the stability and nematotoxic action. The risk assessment of AgNPs is being performed, so specific indicators of environmental and ecotoxicological risks are being formulated and will be tested during the execution of the research to ensure the development in a sustainable and safe way for the environment.

Keywords: Nanoparticles; Green synthesis; Germplasm Bank; Control; *Meloidogyne incognita*.

1 INTRODUÇÃO

A nanobiotecnologia é uma área promissora que integra diferentes ciências como a química, a física, a biologia e a ciência de materiais. As nanopartículas metálicas (NPMs) podem ser geradas por métodos químicos, físicos e biológicos. Os métodos químicos e físicos utilizam substâncias tóxicas,

logo, suas aplicações nas áreas de saúde e ambiental são limitadas (SILVA et al., 2017). Por outro lado, a síntese biológica de nanomateriais (nanotecnologia verde) visa ao aproveitamento da biodiversidade, sendo uma importante estratégia devido ao custo-benefício, à biocompatibilidade, à ausência ou toxicidade baixa e ao baixo impacto ambiental. Neste caso, este tipo de síntese de NPMs pode ser proveniente de organismos procariontes ou eucariontes, e pode constituir organismo inteiro, parte dele ou apenas compostos (BONATTO & SILVA, 2014; SILVA et al., 2017). Os recursos biológicos provenientes de plantas são fontes significativas de moléculas redutoras e estabilizadoras para a síntese de NPMs, tais como: metabólitos secundários (alcaloides, terpenoides, ácido cumárico), proteínas, entre outros (SILVA et al., 2017). Os bancos ativos de germoplasmas são fontes importantes de recursos biológicos para a síntese de NPMs pois, congregam algumas das características desejáveis em tais processos como a rastreabilidade dos materiais biológicos e o conhecimento de inúmeras características das plantas como por exemplo perfis fitoquímicos determinados. As NPMs apresentam aplicações em diversos setores tais como na biotecnologia, na saúde e na agropecuária.

O fitonematoide *Meloidogyne incognita* se destaca por parasitar um número significativo de culturas de interesse econômico tais como a cana-de-açúcar, o café, a soja, o feijão, o algodão, entre outras (BRASS et al., 2008; LOPES et al., 2011). Atualmente, o método mais explorado para o controle desse organismo está centrado na utilização intensa de nematicidas sintéticos, os quais podem resultar em diversos danos para o meio ambiente e para a saúde animal e humana (CABONI, 2014). Nesse contexto, o uso de estratégias mais sustentáveis e ambientalmente mais seguras vem sendo apresentadas como alternativas para o controle de pragas/patógenos.

Assim, o objetivo do trabalho foi sintetizar e iniciar a caracterização físico-química e biológica das nanopartículas de prata (AgNPs) utilizando extratos de folhas de plantas medicinais proveniente da Coleção de Germoplasma de Plantas Medicinais e Aromáticas da Embrapa visando ao controle de *M. incognita*.

Na literatura, até o momento, não existem artigos referentes à ação de AgNPs, via síntese verde, para o controle de fitonematoides mas existem trabalhos preliminares gerados pela equipe que demonstram esse potencial (SILVA, 2014; BONATTO, 2016). Outra vertente importante refere-se às avaliações de segurança das AgNPs que vem sendo desenvolvidas e já estão disponíveis para uso e comercialização sem que reflexões sobre seu uso seguro. Desta forma, é de extrema importância a formulação de parâmetros técnicos que identifiquem esses riscos com a finalidade de auxiliar os desenvolvedores destas tecnologias de forma segura e sustentável (JESUS & MASSINI, 2016).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Desenvolvimento e caracterização das AgNPs

Material biológico: No presente trabalho foram utilizadas folhas expandidas de 10 espécies de diferentes famílias selecionadas da coleção de Germoplasma de Plantas Medicinais e Aromáticas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. As amostras de folhas frescas foram coletadas, higienizadas e congeladas (-40°C) para posterior extração aquosa. As coletas foram realizadas em dois períodos do ano (seca e chuva). O voucher de cada espécie foi depositado no herbário da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia sendo fiel depositário para amostras do patrimônio genético. Todos os procedimentos para coleta e acesso foram realizados de acordo com a legislação brasileira (Lei 131232015) seguindo todas as recomendações e as normas da Embrapa.

Síntese das AgNPs: As reações de sínteses das AgNPs foram realizadas de acordo com Bonatto e Silva (2014) onde foram realizadas apenas uma síntese em cada período (seca e chuva) e as folhas coletadas no inverno foram realizadas as sínteses com as folhas congeladas e liofilizadas. Os controles foram os extratos aquoso das folhas e o nitrato de prata. A reação de síntese foi realizada a 70°C durante 2 horas e 30 minutos e as absorbâncias das amostras foram mesuradas a cada 30 minutos em seguida foram armazenadas a -4°C.

Caracterização das AgNPs: As AgNPs foram analisadas por espalhamento de luz dinâmico e potencial Zeta. As AgNPs foram caracterizadas referente ao diâmetro hidrodinâmico-DH (nm), ao índice de polidispersividade - PdI, Potencial Zeta (mV) e condutividade elétrica (mS/cm). As amostras foram analisadas após diluição em água ultrapura (1:10 v/v). As medidas foram realizadas em triplicata conforme procedimento padronizado.

2.2. Exposição dos nematoides às AgNPs

Bioensaios com *Meloidogyne incognita*: Os nematoides foram mantidos em casa de vegetação em plantas de *Nicotiana tabacum* infestadas. A extração dos ovos de *M. incognita* foi realizada após três meses de infestação. O processo de extração dos ovos nas raízes foi realizado de acordo com adaptação de Hussey e Barker (1973). O preparo dos ovos para a eclosão e ensaios foram realizados conforme procedimento padronizado. As AgNPs e seus respectivos controles (extrato folha e nitrato de prata) foram transferidos individualmente para tubos de microcentrifuga contendo cada um 60 nematoides na fase infectiva (J2) em um volume final de 500 μ L em quatro diferentes concentrações de AgNPs e seus respectivos controles. Os tubos foram mantidos a 25°C e após 48 horas os nematoides foram contados com o auxílio de microscópio óptico e lâmina de Peters. Os ensaios foram realizados em triplicata, e tiveram como controle positivo (água) e negativo (álcool 70%).

2.3. Formulação dos indicadores de riscos para ensaios com nematoides expostos às AgNPs.

Os indicadores de riscos ecotoxicológicos foram formulados por intermédio de uma minuciosa análise da literatura científica referente ao tema sendo elaborados 10 indicadores (JESUS & MASSINI, 2016) que retrataram os aspectos mais relevantes concernente ao desenvolvimento de uma NPM, sua efetividade para o organismo alvo e não alvo do controle para ensaios preliminares que possam indicar o potencial de risco da tecnologia. Os indicadores empregados para os testes com nematoides estão apresentados na Tabela 2 e permitem embasar a avaliação da segurança das AgNPs de modo incipiente na pesquisa. Novos indicadores estão sendo propostos pela equipe e serão empregados nos experimentos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O monitoramento por espectroscopia de absorção durante o período de síntese indicou diferenças nos perfis de absorção indicativos de formação das AgNPs, sendo observadas influências interespecíficas e intersazonais. Adicionalmente, foram observadas diferenças nos picos referentes à RPS (Ressonância de Plasmônica de Superfície). A caracterização das AgNPs por DLS indicou formação de partículas de tamanho na faixa nanométrica, PDI variado e estabilidade coloidal incipiente e moderada (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização das AgNPs sintetizadas (diâmetro hidrodinâmico-DH, PDI e potencial zeta).

Coleta	DH(nm)	PDI	Potencial Zeta
Período de seca	68,5 \pm 2,4	0,275 \pm 0,005	-22,1 \pm 9,6
	329,8 \pm 44,13	0,662 \pm 0,187	-36,5 \pm 0,9
Período de chuva	39,7 \pm 8,9	0,236 \pm 0,034	-5,1 \pm 4,0
	218,0 \pm 3,1	0,801 \pm 0,174	-37,0 \pm 3,3

Todas as AgNPs apresentaram ação nematotóxica. Duas foram selecionadas devido à estabilidade coloidal (inferida pelo potencial Zeta) e ação nematotóxica mais pronunciada onde foi detectado que as AgNPs podem matar os nematoides (observação de formação de vacúolos na região intestinal sugerindo um mecanismo de ruptura de membrana – dados não demonstrados) ou podem comprometer o movimento de forma irreversível o que poderá resultar no impedimento da infestação da planta sendo essa ação dose-dependente. Adicionalmente, apesar da solução de nitrato de prata resultar na morte de 100% do J2 de *M. incognita* (Figura 1) vale enfatizar que o composto está na sua forma livre (Ag⁺) enquanto que nas AgNP-4 e AgNP-10 encontram-se na forma nanoestruturada que poderá ser liberada de uma forma gradual e sustentada.

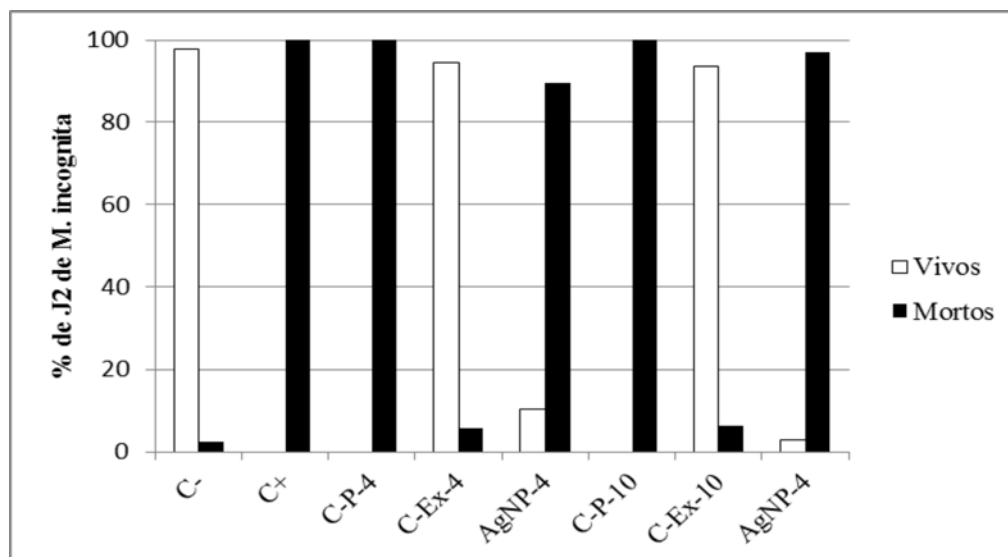


Figura 1. Bioensaio *in vitro* com as AgNP-4 e AgNP-10 contra J2 de *M. incognita*. Controles: água (C-); etanol (C+); nitrato de prata (C-P-4 e C-P-10) e extrato aquoso da folha (C-Ex-4 e C-Ex-10).

Os riscos envolvidos em todos os momentos de exposição às NPs, desde a produção, até a limpeza, o estoque e o transporte, devem ser estudados e enumerados. Devido ao fato das NPs serem frequentemente formuladas para apresentarem propriedades muito específicas é possível que esta nova estrutura possa apresentar efeitos ecotoxicológicos incomuns quando acumulados ou disperso no meio ambiente. Neste contexto, foram testados pela equipe alguns indicadores de riscos ecotoxicológicos (JESUS & MASSINI, 2016) propostos por pesquisas anteriores da Rede AgroNano (Tabela 2) e estão apresentados abaixo os testes realizados de modo incipiente, mas estão previstos ensaios para avaliações de riscos mais amplas em pesquisas futuras.

Tabela 2. Lista preliminar de indicadores de riscos ecotoxicológicos para testes de segurança e efetividade da exposição de nematoides às AgNPs

Área Ecotoxicologia	Resultados das avaliações com AgNPs
1- Resultado positivo para o teste de toxicidade <i>in vitro</i>	Resultado positivo para o teste <i>in vitro</i> : AgNPs tem ação efetiva.
2- Resultado positivo do Teste de toxicidade <i>in vivo</i>	Resultado em andamento
3- Avaliação da relação dose/resposta das AgNPs com potencial tóxico antes da sua liberação	Não foi feita liberação no ambiente.
4- Presença de partícula tóxicas associados a NPs (óxidos de metais, prata, fulereno, etc)	Foram empregados nitrato de prata, indicando necessidade de protocolos específicos para descartes. Em formulação pela equipe.
5- Relato de ocorrência anterior de algum dano à saúde humana e animal ocasionado pela exposição às AgNPs.	Não existe relato de dano associado com outras partículas ou substância de origem vegetal.

4 CONCLUSÃO

A Coleção de Germoplasma de Plantas Medicinais e Aromáticas apresenta-se como uma fonte importante para a obtenção de extratos para a síntese de AgNPs. Todas as AgNPs apresentaram ação nematotóxica principalmente as AgNP-4 e AgNP-10 indicando potencial para o controle do fitonematoide *M. incognita*.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento ao suporte financeiro EMBRAPA (SEG:03.14.03.010.00.00; 08/2016 a 07/2019).

REFERÊNCIAS

- BONATTO, C. C.; SILVA, L. P. Higher temperatures speed up the growth and control the size and optoelectrical properties of silver nanoparticles greenly synthesized by cashew nutshells. *Industrial Crops and Products*, v. 58, p. 46-54, 2014.
- BONATTO, C.C. Desenvolvimento e avaliação de atividades biológicas in vitro e in vivo de micro- e nanopartículas de prata utilizando plantas do Cerrado. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília, UnB, DF, 2016.
- BRASS, F.E.B.; VERONEZZE, N.C.; PACHECO, E. Aspectos biológicos do *Meloidogyne* spp. relevantes a cultura de café. *Rev. Cient. Eletron. Agron.*, número 14. 2008.
- CABONI, AND N. G. NTALLI. Botanical Nematicides, Recent Findings. In *Biopesticides: State of the Art and Future Opportunities*, American Chemical Society), pp. 145–157. 2014.
- HUSSEY, R. S., BARKER, K. R. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique”. *Plant Disease Reporter*, 57 (12): 1025-1028.1973.
- JESUS, K. R. E.; MASSINI, K. C. Risk indicators of the nanoparticles-a decision making process aiming to support the nanomaterials development. In: ENCONTRO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PESQUISA EM MATERIAIS, 15., 2016, Campinas. [Abstracts...] Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Pesquisas em Materiais, 2016. Resumo B62K. p. 1625.
- LOPES, E.; DALLEMOLE-GIARETTA,R.; VIEIRA, B.S. 2011.Nematoides das galhas. Artigo revisado partir de Mitkowski, N.A. and G.S. Abawi. *The Plant Health Instructor*. 2003.
- SILVA, L. P.; BONATTO, C. C.;PEREIRA, F. D. E. SOARES; SILVA, L. DIAS; ALBERNAZ, V. L.; POLEZ, V. L. P. Nanotecnologia verde para síntese de nanopartículas metálicas. In: RESENDE, R.R (Coord). *Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria*. Editora Blucher, 2017. v. 4, p. 967-1012.
- SILVA, L.D. Síntese verde, caracterização e atividade biológica de nanopartículas de prata obtidas utilizando extratos de *Hancornia speciosa* Gomes - Apocynaceae (mangabeira). Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, UnB, DF, 2014.