



13º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2019
30 e 31 de julho de 2019 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-149-3

AVALIAÇÃO DA FITOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Rafaela **Patrucci**¹; Isabela Aparecida **Moretto**²; Rodrigo Fernandes **Castanha**³; Vera Lucia S. S. de **Castro**⁴; Claudio Martín **Jonsson**⁵

Nº 19409

RESUMO- *As nanopartículas de prata (AgNP) têm propriedades óticas, elétricas, térmicas e antimicrobianas que tem sido aplicadas em diversos setores, como em sensores químicos/biológicos e em materiais cirúrgicos. No setor agrícola, formulações a base de AgNP ajudam a prevenir patógenos vegetais através da desinfecção de sementes e controle de doenças de plantas causadas por bactérias. No entanto, o consumo de produtos que contem AgNP podem levar à liberação dessas nanopartículas metálicas nos compartimentos ambientais. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito tóxico desse nanomaterial nos organismos bioindicadores *Pseudokirchneriella subcapitata* (microalga unicelular) e *Lactuca sativa* (semente de alface), sendo este último um bioindicador de áreas úmidas. Em baixas concentrações de AgNP, ocorreu bioestimulação associada ao aumento de porcentagem de crescimento algáceo (0,1 a 1,0 mg L⁻¹) e à alongação da raiz em *L. sativa* (0,01 mg L⁻¹). Uma relação dose efeito foi determinada para ambos organismos-teste tendo-se calculada a Concentração Efetiva média (CE50) associada à taxa de inibição de crescimento. Esta foi equivalente a 3,67 mg L⁻¹ (CE50-168h) e 35,31 mg L⁻¹ (CE50-96h), respectivamente para *P. subcapitata* e *L. sativa*. A determinação de valores de Concentração de Efeito Não Observado (0,58 e 1,45 mg L⁻¹, respectivamente para *P. subcapitata* e *L. sativa*), é útil para o estabelecimento de níveis máximos permissíveis do nanocomposto no compartimento aquático e em áreas adjacentes a este.*

Palavras-chaves: Nanoprata, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Lactuca sativa*, Ecotoxicologia, Nanomaterial

1 Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Ciências Biológicas, UNIP, Campinas, SP; patrucci.rafaela@gmail.com

2 Bolsista CNPq: Graduação em Ciências Biológicas, Campinas, SP;

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

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

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



ABSTRACT- *Silver nanoparticles (AgNP) have optical, electrical, thermal and antimicrobial properties that have been applied in several sectors, such as chemical / biological sensors and surgical materials. In the agricultural sector, formulations based on AgNP help to prevent plant pathogens through seed disinfection and control of plant diseases caused by bacteria. Therefore the consumption of products containing AgNP can lead to the release of these metallic nanoparticles in the environmental compartments. The purpose of the present work is to evaluate the toxic effect of the nanomaterial was evaluated in the bioindicator organisms *Pseudokirchneriella subcapitata* (unicellular microalgae) and *Lactuca sativa* (lettuce seed), the latter as a bioindicator of humid areas. At low concentrations of AgNP, biostimulation was associated with an increase in percentage of algae growth (0.1 to 1.0 mg L⁻¹) and elongation of root in *L. sativa* (0,01 mg L⁻¹). A dose-effect relationship was determined for both organisms by calculating the Mean Effective Concentration (EC50) associated with the inhibition of the growth rate. This was equivalent to 3.67 mg / L (EC50-168h) and 35.31 mg / L (EC50-96h), respectively for *P. subcapitata* and *Lactuca sativa*. The determination of the Non Observed Effect Concentration (NOEC) values (0.58 and 1.45 mg L⁻¹, respectively for *P. subcapitata* and *L. sativa*) is useful for the establishment of maximum permissible levels of the nanocomposite in the aquatic system and in adjacent areas to these compartments.*

KEYWORDS: Nanosilver, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Lactuca sativa*, Ecotoxicology, Nanomaterial

1 INTRODUÇÃO

As nanopartículas de prata (AgNP) têm propriedades óticas, elétricas e térmicas exclusivas e estão sendo incorporadas em produtos que variam de fotovoltaicos a sensores biológicos e químicos. Uma aplicação cada vez mais comum é o uso de nanopartículas de prata para revestimentos antimicrobianos, tecidos e dispositivos biomédicos, entre outros. Assim sendo, estas nanopartículas liberam continuamente um baixo nível de íons de prata para fornecer proteção contra bactérias (OLDENBURG, 2019).

No setor agrícola, soluções a base de AgNP ajudam a prevenir patógenos vegetais, além de reduzir o uso de agroquímicos na proteção de plantas (AHT, 2019). De acordo com Castro-Restrepo (2017), as AgNP constituem uma alternativa para a desinfecção de sementes e materiais de propagação como bulbos e estacas, e no controle de doenças de plantas causadas por



13º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2019
30 e 31 de julho de 2019 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-149-3

bactérias. Hae-Jun et al. (2006) desenvolveram um produto a base de AgNP e sílica o qual está sendo utilizado com êxito no controle de *Podospaera pannosa* em abóboras. Os mesmos autores estudaram a concentração efetiva do produto na inibição de crescimento de fungos como *Pythium ultimum*, *Magnaporthe grisea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea* e *Rhizoctonia solani*, constatando-se 100% de inibição usando 100 ppm do produto.

O aumento do consumo de produtos que contém AgNP pode levar à liberação dessas nanopartículas metálicas nos compartimentos ambientais.

O escasso conhecimento sobre o comportamento das AgNP no ambiente torna necessária a realização de avaliações em diferentes espécies aquáticas (RIBEIRO et al., 2014). Portanto, devido à crescente prevalência de nanopartículas de prata em produtos de consumo, há um grande esforço internacional em andamento para verificar a segurança e conhecer as suas propriedades tóxicas em diferentes organismos bioindicadores.

A microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* é uma clorofícea colonial planctônica, constituída por células lunadas de ápice pontiagudo. Tem sido amplamente utilizada como bioindicadora em estudos de ecotoxicidade de poluentes ambientais e recomendada no registro de agentes químicos e de biopesticidas por órgãos nacionais e internacionais (DUARTE et al., 2014).

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. Tem sido utilizada em estudos de avaliação de risco e de biomonitoramento de áreas degradadas (SOBRERO; RONCO, 2004).

Assim, com base no exposto, no presente trabalho avaliou-se o efeito fitotóxico de AgNP quanto ao crescimento da cultura da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*; e também, quanto à germinação e taxa de crescimento das raízes de *L. sativa* sob distintas concentrações desse nanomaterial.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Material-teste: as partículas de nanop prata (AgNP) foram fornecidas pelo Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio da Embrapa Instrumentação. Foram sintetizadas solubilizando-se 1,8 g polivinil álcool (PVA) em 80 mL água deionizada, sob aquecimento (aproximadamente 60°C). Em seguida, adicionou-se 720 mg de nitrato de prata e colocou-se em banho de gelo sob agitação por 30 minutos. Posteriormente, adicionou-se 40 mL solução de borohidreto de sódio (316 mg em 40 mL) por gotejamento (1 gota por segundo) até a obtenção de uma solução com coloração amarela (BERNI NETO et al., 2008).



13º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2019
30 e 31 de julho de 2019 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-149-3

Ensaio com microalgas: as algas (*P. subcapitata*) foram obtidas de culturas em meio preparado de acordo com a OECD (1984). Foram expostas por 168 h a $20\pm 2^\circ\text{C}$ sob iluminação contínua (~ 1300 lux) em placas de poliestireno com 96 poços. A concentração inicial foi de aproximadamente 10^6 células/mL com um volume total de suspensão de teste de 300 μL por poço. Um total de 12 réplicas foram preparadas para cada concentração-teste (0,0–100 mg L^{-1}). O crescimento de algas foi monitorado por leituras de absorvância (750 nm, leitor de microplacas; Sunrise Tecan Group) a cada 24h ou 48h durante 168h. A taxa de crescimento específica foi calculada de acordo com a OECD (1984), e a Concentração Efetiva que inibiu 50% da taxa de crescimento específico (CE50-168h) foi determinada em função do logaritmo da concentração do material-teste de acordo com o modelo de regressão ajustado.

Ensaio com sementes de alface: sementes de *L. sativa* foram obtidas comercialmente e os ensaios realizados no escuro por 96 horas $20\pm 1^\circ\text{C}$ em placas de poliestireno de 12 poços, de acordo com Bautista et al. (2013). Um total de 24 sementes foram expostas para cada concentração-teste, colocadas individualmente em cada poço sobre um disco de papel de filtro Whatman n.2, ao que foi adicionado 400 μL de solução-teste com concentração 0,0-100,0 mg L^{-1} . Disco de papel de filtro com a adição de 400mL de solução de teste. As sementes foram observadas e fotografadas a cada 24h, utilizando-se câmara (Optika 4083B3) acoplada a um estereomicroscópio. O tamanho de raiz foi medido utilizando o software Optika View, Ver 7.1.1.5, para a determinação da porcentagem de germinação e da taxa de crescimento das raízes ao final do período de exposição. As taxas de crescimento foram calculadas através dos coeficientes angulares da regressão “tamanho da raiz versus tempo” (BASU; PAL, 2011).

Determinação de parâmetros toxicológicos: a Concentração Efetiva Média que causa efeito em 50% dos organismos durante determinado período (CE50) no intervalo de confiança de 95%, foi determinada usando o modulo "Regressão Simples" do programa Statgraphics Centurion XVII, Versão 1.17.04 (StatPoint Technologies). A Concentração de Efeito Não Observado (CENO) foi determinada pelo cálculo da Concentração Efetiva de inibição em 10% do crescimento do organismo-teste. O limite superior do intervalo de confiança 95% da CE10 foi tomado como equivalente à CENO (HOEKSTRA J.A.; VAN EWIJK, 1993). As taxas de germinação das sementes foram comparadas pelo modulo “One Way ANOVA” do programa Statgraphics Centurion XVII, assim como as curvas de crescimento.



3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito nas microalgas.

As curvas de crescimento de *P. subcapitata* sob diferentes concentrações de AgNP e durante um período de 168h, são apresentadas na Figura 1. No final da exposição, constatou-se aumento do crescimento algáceo em relação ao controle nas concentrações de 0,1 e 1,0 mg L⁻¹, sugerindo que ocorreu um efeito bioestimulante pelos íons prata. Este efeito foi também constatado por Schmittschmitt et al. (1996) em exposições da mesma microalga a Ag⁺⁺ em concentrações de 30 – 50 µg L⁻¹ de AgNO₃ e Ag₂SO₄. A bioestimulação foi também verificada por Sibi et al. (2017) após a exposição de microalgas a nanopartículas de metais, incluindo metais pesados como o chumbo, em que os autores reportaram aumento significativo do conteúdo de proteína e de lipídeos. Por outro lado, houve um decréscimo da porcentagem de crescimento nas exposições de 10 e 100 mg L⁻¹.

As curvas permitiram calcular as taxas específicas de crescimento que foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis onde se constatou que somente a taxa de crescimento referente à maior concentração testada (100 mg L⁻¹) foi significativamente diferente (p<0,05) à do controle. Uma correlação negativa dose-feito foi constatada entre a taxa específica de crescimento e o logaritmo da concentração de AgNP (Figura 2), o que permitiu determinar valores dos parâmetros de toxicidade. Assim, a CE50-168h (com intervalo de confiança entre parênteses) e a CE10-168h foram respectivamente de 3,67 (2,46 -5,31) e 0,23 mg L⁻¹. O valor de CENO foi equivalente a 0,58 mg L⁻¹.

O valor de CE50-168h foi bem superior ao determinado por Schmittschmitt et al. (1996) em *P. subcapitata*, para a prata na forma de AgNO₃ (75,8 µg L⁻¹) o que implicaria numa menor toxicidade quando o metal se encontra na forma de nanopartículas. O valor desse parâmetro de toxicidade foi muito próximo ao relatado por Mclaughlin e Bonzongo (2012) (EC50 = 1,6 mg L⁻¹) para *P. subcapitata* .

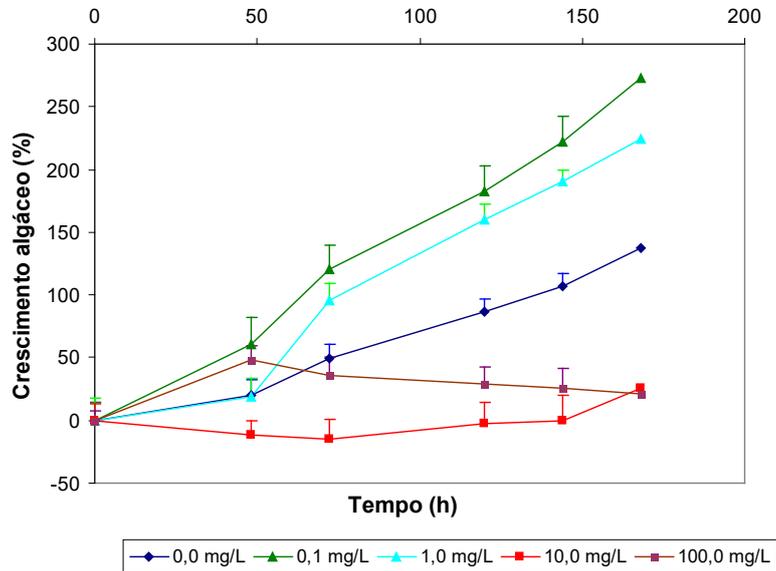


Figura 1. Curvas de crescimento de *Pseudokirchneriella subcapitata* exposta a diferentes concentrações de AgNP .

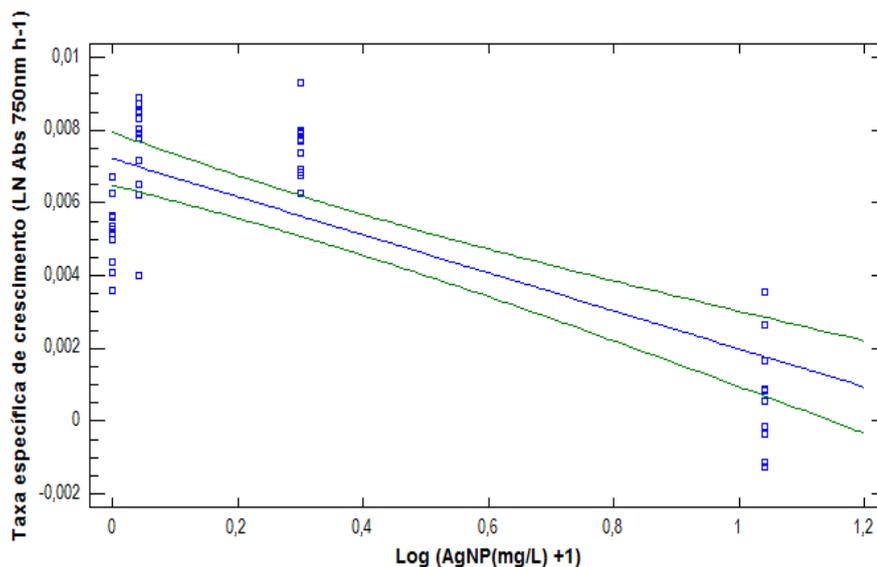


Figura 2. Curva de concentração-efeito de AgNP (—) na taxa específica de crescimento de *Pseudokirchneriella subcapitata* exposta durante 168 horas ao material-teste. Intervalo de confiança 95% (—).

Efeito nas sementes de alface.



Na Figura 3 estão apresentadas as taxas de germinação das sementes de *L. sativa* após as 96h de exposição à AgNP.

A porcentagem de germinação para todos os tratamentos se manteve em média entre 88 e 100%. Após análise dos dados pelo teste de Kruskal-Wallis, não se constatou diferenças significativas entre as sementes isentas do material-teste e as expostas à AgNP.

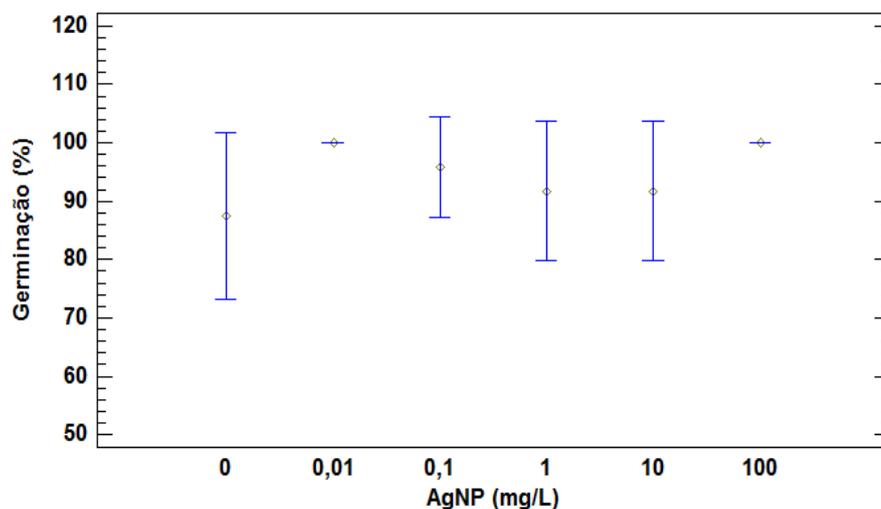


Figura 3. Valores médios (\pm intervalos de confiança 95%) das taxas de germinação das sementes de *Lactuca sativa* expostas a diferentes concentrações de AgNP.

O crescimento das raízes de sementes de *L. sativa* durante 96h de exposição a vários níveis de concentração das nanopartículas está representado pela Figura 4. Os dados expressam que nas exposições a 10 e 100 mg L⁻¹, o crescimento das raízes foi inferior quando comparado ao controle.

Assim como observado nas exposições das algas a baixas concentrações de AgNP, pode ter ocorrido uma bioestimulação no crescimento das raízes, em relação ao controle, após 96h de exposição. Este fenômeno pode estar associado às afirmações de Juarez-Maldonado et al. (2019) em que as nanopartículas de prata melhoraram a resposta germinativa devido à capacidade de aumentar o metabolismo em reservas de sementes e no transporte de água nos tecidos internos.

A porcentagem de germinação de sementes e comprimento de raízes diminuiu em concentrações de 10 mg L⁻¹ de AgNP em *Hordeum vulgare* e *Linum usitatissimum* (MISHRA et al., 2019). Ausência de efeito sobre a germinação de sementes de *L. sativa* e também sobre a alongação das raízes foram relatadas por Barrena et al. (2009).

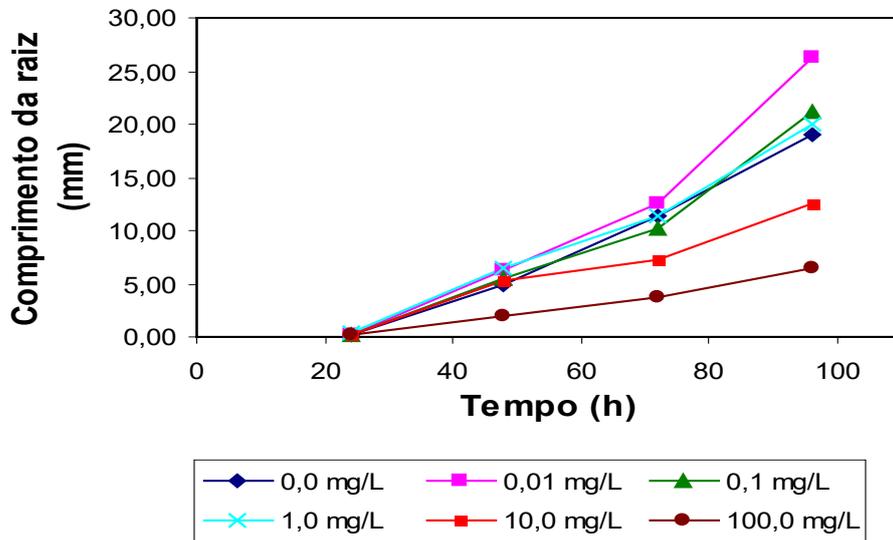


Figura 4. Curvas de crescimento de *Lactuca sativa* exposta a diferentes concentrações de AgNP.

Aplicando-se o teste de Kruskal-Wallis nas taxas de crescimento, constata-se que de modo semelhante ao observado com *P. subcapitata*, somente a maior concentração demonstrou ser significativamente diferente do controle. Estas taxas, quando plotadas em função do logaritmo da concentração, geraram uma curva com correlação negativa (Figura 5) que permitiu calcular uma CE50-96h equivalente a 35,31 (18,50 – 10,75) mg L⁻¹. A inibição em 10% do crescimento (CE10-96h) foi equivalente a 0,62 mg L⁻¹, enquanto que 1,45 mg L⁻¹ foi o valor correspondente à CENO.

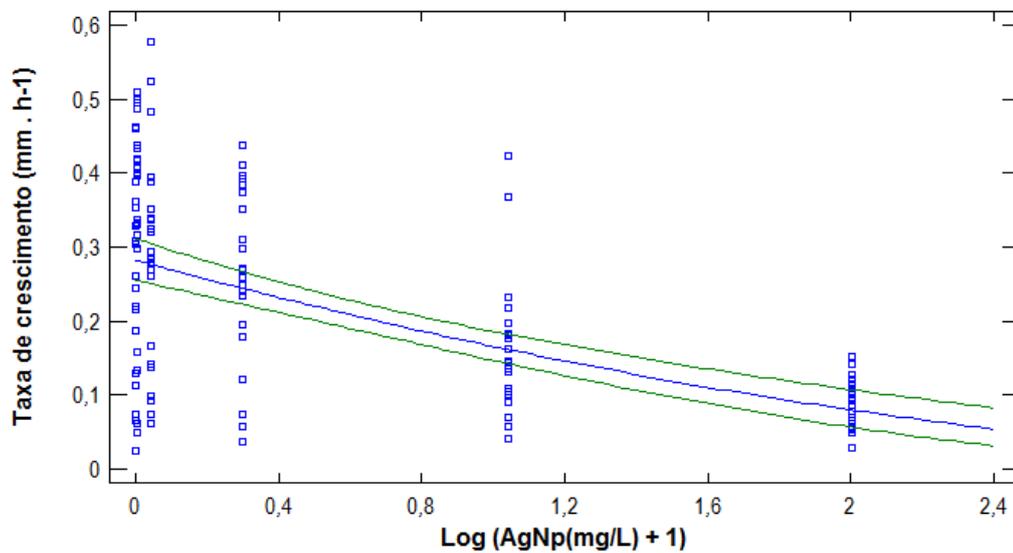


Figura 5. Curva de concentração-efeito de AgNP (—) na taxa de crescimento de *Lactuca sativa* exposta durante 96 horas ao material-teste. (—) Intervalo de confiança 95%.

4 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que, embora as nanopartículas do metal pesado em estudo demonstrem um efeito negativo na produção de biomassa e crescimento radicular nos organismos-teste em estudo, a bioestimulação ocorre em baixas concentrações. Com base nos valores de CE50, a ação fitotóxica de AgNP sobre a taxa de crescimento da microalga é aproximadamente 10 vezes maior que para sementes de alface. Esses valores indicam também que o material-teste seria classificado como “moderadamente tóxico” e “levemente tóxico” para os organismos bioindicadores *P. subcapitata* e *L. sativa*, respectivamente. Estas características auxiliam a justificar os diversos usos de produtos a base desse nanocomposto. Juntamente com resultados provenientes de estudos em outros organismos-teste, os valores de CENO gerados pelas curvas dose-efeito constituem uma ferramenta importante para o estabelecimento de limites máximos permissíveis em corpos de água e em áreas adjacentes a estes.



13º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2019
30 e 31 de julho de 2019 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-149-3

5 AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Marcos David Ferreira (Embrapa Instrumentação) pelo fornecimento do material-teste. 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 estudo.

6 REFERÊNCIAS

- AHT. Applications of nano silver in agriculture. Disponível em: < <https://ahtc.com.vn/en/applications-of-nano-silver-in-agriculture/>>. Acesso em: 21 maio 2019.
- BARRENA, R. et al. Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles. **Chemosphere**, Oxford, v. 75, p. 850–857, 2009.
- BASU, P.; PAL, A. Spatio-temporal analysis of development of basal roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Signaling & Behavior**, Delhi, Índia, v. 6, n. 7, p. 982-985; July 2011.
- BAUTISTA, O. V.; FISCHER, G.; CARDENAS, J. F. Cadmium and chromium effects on seed germination and root elongation in lettuce, spinach and Swiss chard. **Agronomía Colombiana**, Bogotá, v. 31, n. 1, p. 48-57. 2013.
- BERNI NETO, E.; RIBEIRO, C.; ZUCOLOTTI, V. Síntese de nanopartículas de prata para aplicação na sanitização de embalagens. São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2008. 4 p. (Embrapa Instrumentação Agropecuária. Comunicado Técnico, 99).
- CASTRO-RESTREPO, D. Nanotecnología en la agricultura. **Bionatura**, v. 2, n. 3, p.384-389, 2017.
- DUARTE, S. et al. Efeito in vitro de poluentes inorgânicos usados na agricultura sobre a atividade da catalase da alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Iheringia Série Botânica**, Porto Alegre, v. 69, p. 387-395, 2014.
- HAE-JUN, P. et al. A New Composition of Nanosized Silica-Silver for Control of Various Plant Diseases. **The Plant Pathology Journal**, v. 22, n. 3, p. 295-302, 2006
- HOEKSTRA J.A.; VAN EWIJK, P. H. The bounded effect concentration as an alternative to the NOEC. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v.134, p. 1, p.705- 711, 1993.
- JUAREZ-MALDONADO, A. et al. Nanoparticles and nanomaterials as plant biostimulants. **International Journal of Molecular Science**, Basel, Switzerland, v. 20, n.162, p. 1-19, 2019.
- MCLAUGHLIN, J., BONZONGO, J. C. Effects of natural water chemistry on nanosilver behavior and toxicity to *Ceriodaphnia dubia* and *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Elmsford-NY, v. 31, p. 168–175, 2012.
- MISHRA, V. K. et al. Plant: based fabrication of silver nanoparticles and their application. *In*: HUSEN, A.; IQBA, M. (ed.). **Nanomaterials and Plant Potential**. Berlin: Springer Nature Switzerland, 2019. p. 135-175.



13º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2019
30 e 31 de julho de 2019 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-149-3

OECD. **Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test**. Adopted: 23 March 2006. Annex 5 corrected: 28 July 2011 25 p. (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, 201).

OLDENBURG, S.J. Silver nanoparticles: properties and applications. Disponível em : <<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/materials-science/nanomaterials/silver-nanoparticles.html>>. Acesso em: 21 maio 2019.

RIBEIRO, F. et al. Silver nanoparticles and silver nitrate induce high toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 466, p. 232–241, 2014

SCHMITTSCHMITT, J. P.; SHAW, J. R.; BIRGE, W. J. The effects of silver on green algae and prospects for trophic transfer. *In*: The 4th international Conference Proceedings: Transport, Fate and Effects of Silver in the Environment, 4., 1996, Madison. **Anais...** Madison, WI: University of Wisconsin System, Sea Grant Institute, 1996. P. 245-249.

SIBI, G et al. Metal nanoparticle triggered growth and lipid production in *Chlorella vulgaris*. **International Journal of Science Research in Environmental Science and Toxicology**, Normal, IL, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2017.

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: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones**. Canadá: IDRC, IMTA, 2004. 202 p. p. 71-79.