



## TOXICIDADE DA NANOPRATA EM *Panagrolaimus* sp. E ESTABELECIMENTO DE UMA CONCENTRAÇÃO DE BAIXO RISCO PARA INVERTEBRADOS.

Rafaela Mendes Santos **Pereira**<sup>1</sup>; Fernanda Sana **Pertrini**<sup>2</sup>; Rodrigo Fernandes **Castanha**<sup>3</sup>; Vera Lucia S. S. de **Castro**<sup>4</sup>; Claudio Martin **Jonsson**<sup>5</sup>

Nº 20408

**RESUMO** – As nanopartículas de prata (AgNP) liberam continuamente um baixo nível de íons de prata para fornecerem proteção contra bactérias e têm sido empregadas em revestimentos antimicrobianos, tecidos, dispositivos biomédicos e outros materiais. No setor agrícola têm sido usadas na desinfecção de sementes e bulbos, assim como no controle de crescimento de fungos como *Podosphaera pannosa* em abóboras e *Pythium ultimum* e *Colletotrichum gloeosporioides* em outros vegetais. A produção de AgNP e o aumento do consumo de produtos que as contém pode levar à contaminação de compartimentos ambientais. Os nematoides de vida livre fazem parte da cadeia alimentar destes compartimentos. Este estudo teve como objetivo a avaliação da toxicidade aguda da AgNP sobre o nematoide *Panagrolaimus* sp e a utilização deste dado para estimar um nível de proteção para invertebrados do sistema aquático e sua zona de transição com o solo. Os organismos foram expostos à nanopartículas de prata estabilizada em álcool polivinílico (AgNP-PVA) em diferentes concentrações (0,0; 0,01; 0,1; 1; 10 and 100 mg/L). Foi registrada a imobilidade e determinada a concentração efetiva média por um período de 96 horas (CE50-96h) equivalente a 8,45 mg/L. O parâmetro de toxicidade obtido foi útil para estimar uma concentração de baixo risco ( $2,5 \times 10^{-6}$  mg/L) para invertebrados. Os resultados auxiliam no estabelecimento de concentrações máximas protetivas das comunidades, assim como no controle de lançamento de efluentes que possam conter o nanomaterial.

**Palavras-chaves:** Ecotoxicologia, Nanomaterial, Nematóide, Toxicidade, Avaliação de risco.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Ciências Biológicas, UNIP, Campinas-SP; rafaela.mendes.s.p@gmail.com

2 Colaborador, Bolsista Treinamento Técnico 3 Fapesp: Graduação em Ciências Biológicas, PUCC, Campinas-SP.

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

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

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



**ABSTRACT** – Silver nanoparticles (AgNP) continuously release a low level of silver ions to provide protection against bacteria and have been used in antimicrobial coatings, clothing fabrics, biomedical devices and other materials. In the agricultural sector it has been used to disinfect seeds and bulbs, as well as to control the growth of fungi such as *Podosphaera pannosa* in pumpkins, and *Pythium ultimum* and *Colletotrichum gloeosporioides* in other vegetables. The production of AgNP and the increased consumption of products that contain them can lead to contamination of environmental compartments. Free-living nematodes belong to the food chain in such compartments. This study aimed to evaluate the acute toxicity of AgNP particles stabilized in polyvinyl alcohol (AgNP-PVA) on the nematode *Panagrolaimus sp.* and the use this data to estimate a level of protection for inhabits the aquatic system and its transition zone with the soil. The organisms were exposed to AgNP particles stabilized in polyvinyl alcohol (AgNP-PVA) in different concentrations (0.0; 0.01; 0.1; 1; 10 and 100 mg/L). Immobility was recorded and the average effective concentration was determined for a period of 96 hours (EC50-96h) equivalent to 8.45 mg/L. The toxicity parameter obtained was useful to estimate a low risk concentration ( $2.5 \times 10^{-6}$  mg/L) for invertebrates. The results help to establish maximum protective concentrations for the communities, as well as to control the release of effluents that may contain the nanomaterial.

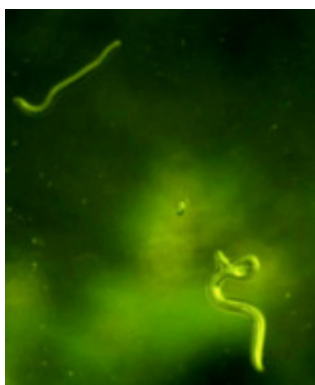
**Keywords:** Ecotoxicology, Nanomaterial, Nematode, Toxicity, Risk evaluation.

## 1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia tem possibilitado a produção de novos materiais no mercado global em diversas áreas. Estes materiais podem se tornar fontes de liberação de nanopartículas nos compartimentos ambientais, sendo que nestes o seu impacto ainda é pouco conhecido.

As nanopartículas de prata (AgNP) liberam continuamente um baixo nível de íons de prata para fornecerem proteção contra bactérias (OLDENBURG, 2019) e têm sido empregadas em revestimentos antimicrobianos, tecidos, dispositivos biomédicos e em outros materiais. No setor agrícola tem sido usada na desinfecção de sementes e bulbos, assim como no controle de crescimento de fungos como *Podosphaera pannosa* em abóboras, *Pythium ultimum* e *Colletotrichum gloeosporioides* em outros vegetais (CASTRO-RESTREPO, 2017; PARK *et al*, 2006) e também em embalagens (HOSEINNEJAD; JAFARI; KATOUZIAN, 2018). Dessa forma, a produção de AgNP e o aumento do consumo de produtos que as contém podem levar à contaminação de compartimentos ambientais.

O gênero *Panagrolaimus* (FIGURA 1) é representado por nematoides de vida livre, sendo organismos decompositores de matéria orgânica que desempenham importante função na mineralização do nitrogênio e reciclagem de matéria orgânica (ANDRASSY; TRAUNSPURGUER; EYUALEM-ABEBE, 2006; YADAV; PATIL; KANWAR, 2018). São considerados parcialmente aquáticos e têm sido utilizados como organismos-teste em ensaios de ecotoxicidade (CASTRO *et al.* 2018; DMOWSKA; KOZLOWSKA, 1990).



**Figura 1.** Detalhe microscópico do nematoide *Panagrolaimus sp.*

Fonte: Acervo do LEB.

Deve-se considerar que organismos do mesmo ou de diferentes níveis tróficos respondem de maneiras diferentes aos efeitos dos nanomateriais. Assim, a aplicação de ensaios em diferentes espécies torna-se importante na avaliação de risco dos nanomateriais.

No presente trabalho avaliou-se a toxicidade aguda de AgNP estabilizadas em polivinil álcool (AgNP-PVA) sobre o nematoide *Panagrolaimus sp.* e utilizou-se este dado para estimar um nível de proteção para invertebrados do sistema aquático e sua zona de transição com o solo.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material-teste:

As partículas de nanop prata (AgNP-PVA) foram fornecidas pelo Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio da Embrapa Instrumentação. Segundo BERNI NETO; RIBEIRO; ZUCOLOTTI, 2008, foram sintetizadas solubilizando-se polivinil álcool (PVA) em água deionizada, sob aquecimento, em seguida, adicionado o nitrato de prata em banho de gelo sob



agitação, e posteriormente, adicionado borohidreto de sódio por gotejamento até a obtenção de uma solução com coloração amarela.

## 2.2 Organismo-teste

As culturas dos nematoides *Panagrolaimus sp.* foram mantidas em meio de aveia (Lara *et al.* 2007) e os ensaios realizados por 96 h a  $20 \pm 1$  °C, no escuro. Os organismos foram separados por uso de peneiras sobrepostas de 65, 250 e 400 mesh, sendo separados para uso nos ensaios os nematoides na fase J2, que retidos na peneira de 400 mesh. Para liberação dos nematoides retidos nas peneiras usaram-se jatos de meio K (2.36 g KCl +3 g NaCl, em 1 L de água destilada; BOYD; SMITH; FREEDMAN, 2012) provenientes de uma pisseta. Os organismos foram expostos em placas de poliestireno de 24 poços, mantendo 10 nematoides em 1 mL de solução de teste por poço, com 3 repetições para cada concentração-teste: 0,0; 0,01; 0,1; 1, 10 e 100 mg/L. Os organismos foram observados usando um estereomicroscópio, registrando o número de organismos imóveis após um período de 96 horas de teste.

## 2.3 Análise dos dados

### 2.3.1 Determinação da CE50-96h e CENO:

A concentração efetiva média que causa efeito de imobilidade (mortalidade) em 50% dos organismos em 96 horas (CE50-96h) e os intervalos de confiança de 95%, foram determinados usando o módulo “Análise de Probit” do programa estatístico Statgraphics Centurion XVII, Version 1.17.04 (StatPoint Technologies). A maior concentração que não causaria efeito adverso no organismo-teste decorrente de uma exposição a longo prazo (concentração-de-efeito-não-observado – CENO) foi estimada com base na relação CE50 / 10 (OECD, 1995).

### 2.3.2 Determinação da dose de baixo risco

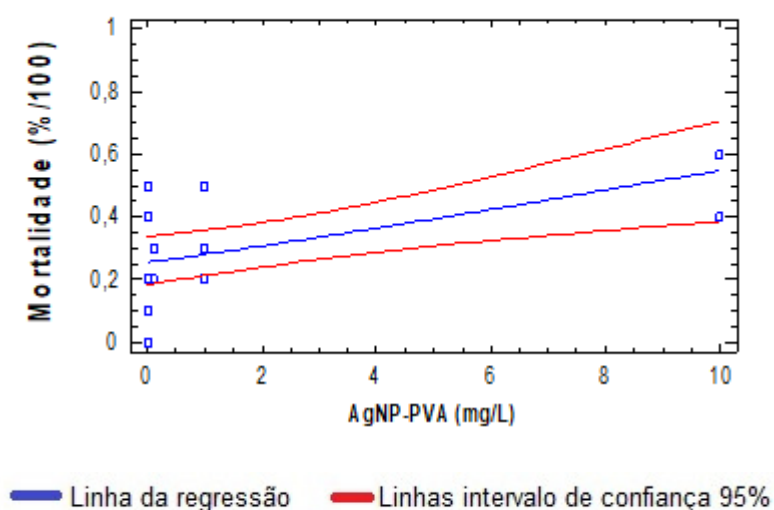
A concentração hipotética de risco para somente 5% das espécies de uma comunidade de invertebrados representantes do sistema aquático e sua zona de transição com o solo (HC5) é comumente usada como base para a avaliação de risco ambiental de produtos químicos como indicadora da concentração que protege suficientemente os ecossistemas. Além dos valores para o *Panagrolaimus sp.*, foram estimados os valores de CENO para outros invertebrados previamente

avaliados na Embrapa Meio Ambiente. Com base no critério da “Distribuição da Sensibilidade das Espécies”, a HC5 foi calculada numa distribuição log-logística dos valores de CENO (OECD, 1995) utilizando o programa Statgraphics Plus 5.1. A distribuição de normalidade dos valores de CENO foi previamente analisada através do teste Kolmogorov-Smirnov contido no mesmo programa.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Toxicidade aguda de AgNP-PVA em *Panagrolaimus sp.*

A FIGURA 2 apresenta mortalidade de *Panagrolaimus sp.* em função da concentração de AgNP-PVA, após 96 horas de exposição. Observa-se que a AgNP-PVA interfere na viabilidade do nematoide apresentando um valor de CE50-96h equivalente a 8,45 mg/L com intervalo de confiança 95% de 5,33 a 19,17 mg/L. O efeito observado pode ser devido à ação de íons Ag<sup>+</sup> na inibição do fluxo de íons Na<sup>+</sup>. Segundo Bianchini e Wood (2003) o bloqueio da enzima Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase em invertebrados aquáticos, leva a um distúrbio na regulação iônica caracterizada pelo decréscimo da concentração de íons Na<sup>+</sup> no organismo.



**Figura 2.** Mortalidade de *Panagrolaimus sp.* em função da concentração de AgNP-PVA, após 96 horas de exposição.

Na TABELA 1 é apresentado o parâmetro de toxicidade determinado para AgNP-PVA em *Panagrolaiumus sp.*, juntamente com os determinados em outras espécies de invertebrados. Também é demonstrado o grau de toxicidade associado à classificação da USEPA (2020) de acordo com os valores de concentração efetiva média (CE50) sendo que, os dados não publicados, apresentados na tabela, foram obtidos pelo pesquisador Claudio M. Jonsson, no Laboratório de Ecotoxicologia e Biossegurança (LEB), da Embrapa Meio Ambiente.

Observa-se uma alta variabilidade da sensibilidade dos organismos ao AgNP-PVA, apresentando-se como mais sensível aos efeitos adversos do nanocomposto, o microcrustaceo *Daphnia magna*.

A toxicidade do nanomaterial para o *Panagrolaiumus sp.* encontra-se num grau intermediário, classificando-o como moderadamente tóxico para este nematoide, entretanto, é altamente tóxico para o nematoide *Caenorhabditis elegans*.

**Tabela 1.** Toxicidade aguda de AgNP-PVA em diversos invertebrados e valores hipotéticos de concentração- de-efeito-não-observado.

Organismo-teste	CE50 (mg/L) e Tempo de exposição	Grau de toxicidade	CENO estimada (mg/L)
<i>Daphnia magna</i> (Microcrustaceo)	0,0021; 48h <sup>a</sup>	Extremamente tóxico	0,0002
<i>Caenorhabditis elegans</i> (Nematoide)	0,125; 24h <sup>a</sup>	Altamente tóxico	0,012
<i>Panagrolaimus sp.</i> (Nematoide)	8,45; 96h <sup>a</sup>	Moderadamente tóxico	0,84
<i>Eisenia fétida</i> (Anelídeo)	>100; 48h <sup>a</sup>	Praticamente não tóxico	10
<i>Chironomus sancticaroli</i> (Inseto Aquático)	186,02; 48h <sup>b</sup>	Praticamente não tóxico	18,60
<i>Artemia salina</i> (Microcrustaceo)	>260; 48h <sup>a</sup>	Praticamente não tóxico	26,00

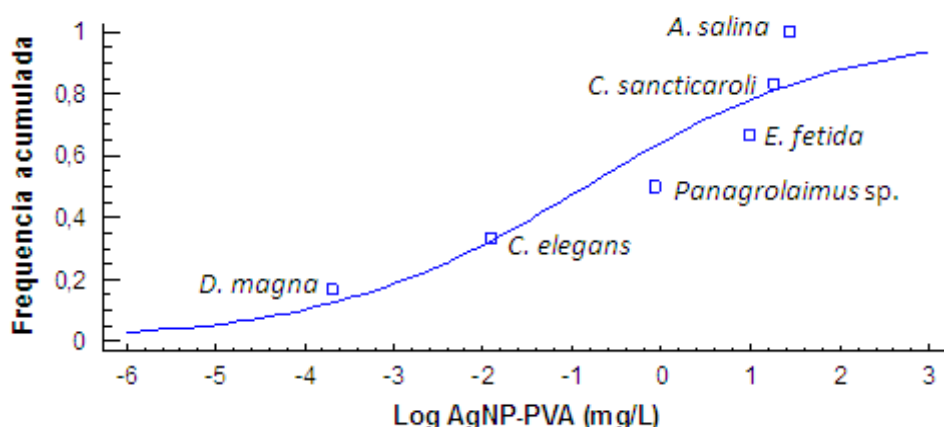
<sup>a</sup>JONSSON (comunicação pessoal, agosto 20, 2020)

<sup>b</sup>SILVA; JONSSON; SILVA . (2019)

### 3.2 Determinação de HC5:

Os valores da CENO estimados para cada organismo-teste são mostrados na TABELA 1. De acordo com a metodologia da OCDE (1995), a distribuição dos valores CENO deve seguir uma distribuição normal que pode ser avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Desta forma foi determinado um valor de  $p > 0,1$  por este teste, sendo não rejeitada a hipótese de que os valores de CENO seguem uma distribuição normal para um nível de confiança de 90% ou superior.

Na FIGURA 3 é representada a curva de distribuição da sensibilidade das espécies pela qual se determinou um valor de HC5 correspondente a  $2,5 \times 10^{-6}$  mg/L (a partir de 5% da frequência acumulada), valor extremamente baixo de concentração de AgNP-PVA resultante da alta susceptibilidade da *D. magna* e ampla faixa de sensibilidade entre as espécies.



**Figura 3.** Distribuição da sensibilidade em invertebrados de acordo com os valores de concentração-de-efeito-não-observado (CENO) de AgNP-PVA.

## 4 CONCLUSÃO

O nematoide *Panagrolaimus sp.* É moderadamente susceptível aos efeitos agudos do AgNP-PVA. Existe grande diferença no grau de toxicidade que os nanomateriais podem exercer nos sistemas biológicos, ainda em um mesmo Filo como o Nematoda.

A concentração máxima de AgNP-PVA no compartimento aquático e na sua zona de transição com o solo, que teoricamente não causaria efeito adverso a 95% das espécies de invertebrados, é de  $2,5 \times 10^{-6}$  mg/L. Este valor deve ser tomado como um valor arbitrário para a proteção de invertebrados dado ao número restrito de espécies avaliadas e da discrepância de padrões de susceptibilidade. A determinação de valores de HC5 proveniente de estudos com





organismos de diferentes níveis tróficos se faz necessária no estabelecimento de concentrações máximas protetivas das comunidades, assim como no controle de lançamento de efluentes que possam conter o nanomaterial.

## 5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPq por conceder a bolsa de Iniciação Científica para o estudo. À Embrapa Meio Ambiente pela oportunidade, incentivo e auxílio no desenvolvimento da pesquisa. Ao Dr. Marcos David Ferreira (Embrapa Instrumentação) pela disponibilização do nanomaterial para a realização dos testes.

## 6 REFERÊNCIAS

- ANDRASSY, I.; TRAUNSPURGUER, W.; EYUALEM-ABEBE. **Freshwater nematodes: ecology and taxonomy**. Oxford: Oxford University Press, 2006. 752 p.
- 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).
- BIANCHINI, A.; WOOD, C. M. Mechanism of acute silver toxicity in **Daphnia magna**. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 2003. 1361-1367 p.
- BOYD, W. A.; SMITH, M. V.; FREEDMAN, J. H. *Caenorhabditis elegans* as a model in developmental toxicology. **Methods in Molecular Biology**, v. 889, p. 15-24, 2012.
- CASTRO, V. L. *et al.* Nanoecotoxicity assessment of graphene oxide and its relationship with humic acid. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 37, n. 7, p. 1998-2012, 2018.
- CASTRO-RESTREPO, D. Nanotecnologia na agricultura. **Bionatura**, v. 2, n. 3, p.48-52, 2017.
- DMOWSKA, E.; KOZŁOWSKA, J. Toxicity of mixtures of some pyrethroids with organophosphate insecticides to saprobiotic nematodes. **Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych**, n. 391, p. 33-36, 1990.
- HOSEINNEJAD, M., JAFARI, S.M., KATOZIAN, I. Inorganic and metal nanoparticles and their antimicrobial activity in food packaging applications. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 44, n.2, p.161-181, 2018
- LARA, R. *et al.* Cultivo del nematodo *Panagrellus redivivus* (Goodey, 1945) en un medio de avena enriquecida con *Spirulina* sp. **Revista de Biología Marina y Oceanografía**, v. 42, n. 1, p. 29-36, abr. 2007. Disponível em: <[https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-19572007000100004&lng=es&nrm=iso](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-19572007000100004&lng=es&nrm=iso)>. Acesso em: 27 jul. 2020.
- OECD. **Guidance document for aquatic effects assessment**. 1995. 118 f. (OECD Environment Monographs, n. 92) Disponível em: <<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/34290206.pdf>>. Acesso em: 1 jun. 2020.





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.

PARK, H. J. *et al.* A new composition of nanosized silica-silver for control of various plant diseases. *Plant Pathology Journal*, v. 22, n. 3, p. 295-302, 2006.

SILVA, L. A. G. A. da; JONSSON, C. M.; SILVA, M. S. G. M. e Estudos preliminares sobre o efeito toxicológico de nanopartículas de prata sobre *Chironomus sancticaroli*. In: CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 13, 2019, Campinas. **Anais...** Campinas: Instituto Agrônomo, 2019.

USEPA. **Overview of ecological risk assessment - analysis phase: ecological effects characterization.** Disponível em: <<https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/technical-overview-ecological-risk-assessment-0>>. Acesso em: 22 jul. 2020.

YADAV, S.; PATIL, J.; KANWAR, R. S. The role of free living nematode population in the organic matter recycling. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 7, p. 2726-2734, 2018.