



**EFEITO DA NANOPRATA NO CRESCIMENTO E TEOR DE CLOROFILA DA MACRÓFITA  
AQUÁTICA *Lemna minor***

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 21415**

**RESUMO** – As nanopartículas de prata (AgNP) vêm despertando grande interesse no meio científico por possuírem propriedades importantes, tais como, condutividade elétrica e térmica, atividade catalítica, flexibilidade, estabilidade química, maleabilidade e o baixo custo de produção. Apesar do desempenho em diferentes função, estudos têm alertados sobre os possíveis efeitos que a AgNP pode causar ao meio ambiente decorrente do aumento de sua produção e utilização. A *Lemna minor* (Lentilha-de-água) é uma macrófita encontrada em água doce e normalmente utilizada em testes de ecotoxicidade de poluentes ambientais. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da AgNP estabilizada em polivinil álcool (PVA) sobre o crescimento, teor de clorofila e massa da matéria úmida da macrófita. As mudas foram expostas em 5 mL de solução teste, com 24 repetições para cada concentração-teste: 0,0; 0,01; 0,1; 1; 10 e 100 mg L<sup>-1</sup> de AgNP-PVA. Foi contabilizado diariamente o número de frondes, e ao final do período de exposição de 7 dias foi determinada a concentração efetiva média a 168 horas (CE50-168h) para cada indicador avaliado. A concentração de efeito não observado (CENO) associada à taxa de crescimento, teor de clorofila e peso úmido é respectivamente de 0,326; 0,370 e 0,261 mg L<sup>-1</sup>. Os resultados deste estudo em conjunto com o de outros organismos servem como parâmetros de ecotoxicidade para estabelecimento de concentração máximas de proteção das comunidades.

**Palavras-chaves:** Macrófita, ecotoxicologia, nanotoxicologia, nanoprata, toxicidade, nanomaterial.

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

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

<sup>3</sup> Colaborador: Técnico, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

<sup>4</sup> Colaborador: Pesquisadora, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

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



**ABSTRACT** – Silver nanoparticles (AgNP) have attracted great interest in the scientific community because they have important properties, such as electrical and thermal conductivity, catalytic activity, flexibility, chemical stability, malleability and low production cost. Despite the performance in different functions, studies have warned about the possible effects that AgNP can cause to the environment due to its increased production and use. *Lemna minor* (Duckweed) is a macrophyte found in fresh water and commonly used in ecotoxicity tests for environmental pollutants. This study aimed to evaluate the effects of AgNP stabilized in polyvinyl alcohol (PVA) on macrophyte growth, chlorophyll content and wet matter mass. The seedlings were exposed to 5 mL of test solution, with 24 repetitions for each test concentration: 0.0; 0.01; 0.1; 1; 10 and 100 mg L<sup>-1</sup> AgNP-PVA. The number of fronds was counted daily and the mean effective concentration at 168 hours (EC50-168 h) was evaluated for each end point at the end of the 7-day exposure period. The no observed effect concentration (CENO) related with the growth rate, chlorophyll content and wet weight is respectively of 0.326; 0.370 and 0.261 mg L<sup>-1</sup>. The results of this study serve as ecotoxicity parameters in conjunction with the parameters of other organisms in order to establish maximum concentrations for protection of the communities.

**Keywords:** Macrophyte, ecotoxicology, nanotoxicology, nanosilver, toxicity, nanomaterial.

## 1. INTRODUÇÃO

As nanopartículas (NPs) são utilizadas em diferentes áreas de produção: têxtil, alimentícia, tecnológica, biomédica e agrícola. Especificamente, as nanopartículas de Ag (AgNP) vêm despertando grande enfoque nas pesquisas por possuírem propriedades importantes, tais como, condutividade elétrica e térmica, atividade catalítica, flexibilidade, estabilidade química, maleabilidade e o baixo custo de produção (DURÁN, 2018; RAZA *et al.*, 2021).

Quanto à sua aplicação no setor agrícola, o crescimento de fungos fitopatogênicos como *Podosphaera pannosa* (em abóboras), *Pythium ultimum* e *Colletotrichum gloeosporioides* (em outros vegetais), foi inibido pela aplicação de AgNP. Essas nanopartículas também podem ser usadas na desinfecção de sementes e bulbos (PARK *et al.*, 2006; CASTRO-RESTREPO, 2017).



Apesar do desempenho em diferentes funções, estudos têm alertados sobre os possíveis efeitos que a AgNP pode causar ao meio ambiente decorrentes do aumento de sua produção e utilização. Sendo os íons metálicos agentes promotores de estresses oxidativos e a AgNP uma espécie coloidal, pode ser gerado esse efeito adverso que causa danos às células das plantas, consequentemente, de liberação de íons de  $\text{Ag}^{2+}$ . Assim, a germinação, crescimento e até mesmo a absorção de alguns nutrientes podem ser alterados (NOGUEIRA; PAINO; ZUCOLOTTI, 2013; DUARTE *et al.*, 2014; GALAZZI, 2017).

A *Lemna minor* (lentilha-de-água) é uma macrófita encontrada em água doce e normalmente utilizada em testes de ecotoxicidade de poluentes ambientes. A rápida reprodução, facilidade de cultura e tamanho reduzido tem facilitado seu uso em testes toxicológicos (BRAIN; SOLOMON, 2007; GUBBINS; BATTY; LEAD, 2011).

No presente trabalho avaliou-se os efeitos da AgNP estabilizada em polivinil álcool sobre o crescimento, teor de clorofila e biomassa (massa da matéria úmida) da macrófita *Lemna minor*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material-teste:

Foram utilizados nanopartículas de prata estabilizadas em polivil álcool (AgNP-PVA), fornecidas pelo Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio da Embrapa Instrumentação. Estas nanopartículas foram sintetizadas solubilizando-se polivinil álcool (PVA) em água deionizada, sob aquecimento, sendo adicionado, em seguida, 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 (BERNI NETO; RIBEIRO; ZUCOLOTTI, 2008).

### 2.2. Organismos-teste e delineamento experimental:

As culturas de *Lemna minor* usadas no experimento foram obtidas por cultivo em meio NPK ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5$ ,  $\text{K}_2\text{O}$ ) (SIPAÚBA-TAVARES; PEREIRA, 2008) e os ensaios foram realizados por 168 h a  $24 \pm 2$  °C, sob constante iluminação de aproximação ~700 lux.

As mudas foram expostas em placas de poliestireno de 12 poços, com delineamento inteiramente casualizado. Foram colocados 2 frondes em 5 mL de solução teste por poço, com 24 repetições para cada concentração-teste: 0,01; 0,1; 1; 10 e 100  $\text{mg L}^{-1}$  de AgNP-PVA, além da ausência de AgNP-PVA (0,0  $\text{mg L}^{-1}$ ). Para avaliar o crescimento das Lemnas foram feitas contagens



diárias do número de frondes. Ao final do período de exposição, cada fronde foi pesada e assim foi determinado o efeito sobre a alteração na biomassa (massa da matéria úmida).

Após a pesagem, as amostras foram colocadas em tubos de Eppendorf com 1 mL de etanol por 24 h a 4 °C para extração da clorofila (ZHANG *et al.*, 2018). Os extratos obtidos foram lidos em espectrofotômetro, em comprimentos de ondas de 649 a 665 nm, permitindo a quantificação das clorofilas “a” e “b” por equações descritas por Brain e Solomon (2007). O teor de clorofila foi calculado a partir da soma dos dois parâmetros.

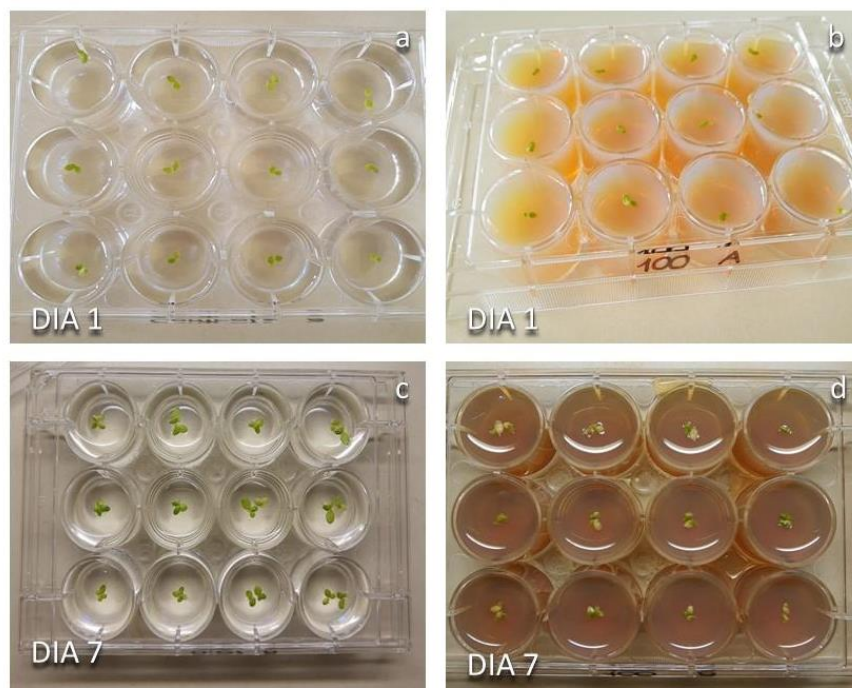
Após o período de exposição foram determinados os valores de CE50 – 168h (concentração efetiva média que causa efeito inibitório em 50% referente ao crescimento, massa da matéria úmida ou teor de clorofila), assim como os intervalos de confiança a nível de 95% de certeza. Para isto, utilizou-se o módulo de “Regressão Simples” do programa estatístico Statgraphics Centurion XVII, versão 1. 17. 04 (StatPoint Technologies). Os valores de concentração do material-teste foram transformados em “Log ( concentração + 1)”. Esta transformação é usada para um conjunto de dados de dose-resposta em que a dose está em escala exponencial com uma concentração de dose no controle equivalente a zero (ON BIOSTATISTICS AND CLINICAL TRIALS, 2012).

A concentração de efeito não observado (CENO) foi estimada através do calculo do efeito inibitório em 10% referente ao crescimento, massa da matéria úmida ou teor de clorofila (CE10-168h). Assim, o limite superior do intervalo de confiança 95% da CE10-168h foi considerado como CENO.

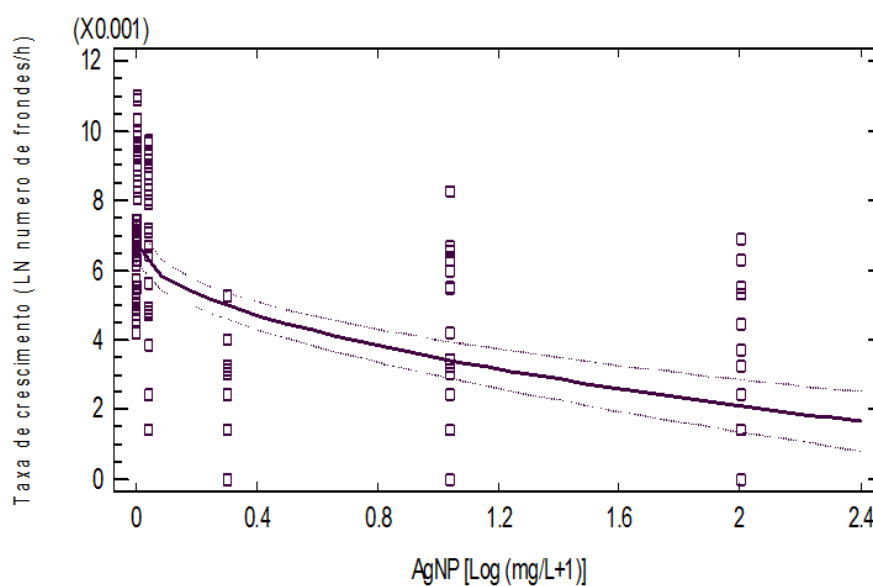
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Efeito na taxa de crescimento

O efeito da AgNP-PVA, sob a taxa de crescimento da planta *L. Minor*, foi avaliado ao longo de 7 dias, contando o número de frondes. Observou-se que em altas concentrações menos frondes foram produzidos em função do tempo (Figura 1). Este efeito também foi constatado por Lalau (2020) sugerindo que a redução de frondes em concentrações mais altas pode ter limitado elementos necessários para o metabolismo e desenvolvimento da planta (metabolismo fotossintético e uso de reservas energéticas). Foi estabelecido uma relação de dose-reposta que permitiu calcular o valor de CE50-168h (Figura 2), equivalente a 11,445 mg L<sup>-1</sup>, com intervalo de confiança 95% de 4,712 a 32,884 mg L<sup>-1</sup>. O valor de CENO calculado foi de 0,326 mg L<sup>-1</sup>.



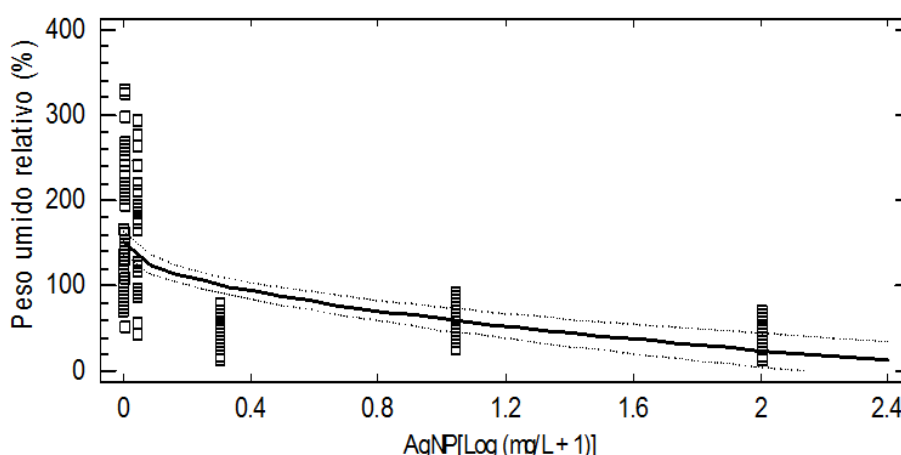
**Figura 1.** Influência da nanoprata estabilizada em polivinil álcool (AgNP-PVA) no crescimento de frondes da macrófita *Lemna minor*. Duas frondes foram expostas em placas de 12 poços nas correspondentes situações: ausência de AgNP-PVA ( $0,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) (a) e na concentração-teste de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  (b). Foi avaliado diariamente o número de frondes e após 7 dias foram contabilizadas o número total de frondes nas exposições de  $0,0 \text{ mg L}^{-1}$  (c) e  $100 \text{ mg L}^{-1}$  (d).



**Figura 2.** Inibição da taxa de crescimento de *Lemna minor* em função da concentração de nanoprata estabilizada em polivinil álcool (AgNP-PVA) decorrente da exposição por 168 h.

### 3.2. Efeito na massa de matéria úmida

Conforme os dados mostram na Figura 3, a biomassa sofreu um forte efeito do nanomaterial, apresentando um decréscimo da massa da matéria úmida após o período de exposição. A macrófita mostrou um potencial absorvivo incorporando o nanometal que produziu efeitos fitotóxicos que inibiram a produção de biomassa (RAI, 2009). O valor de CE50-168h calculado foi 4,011 mg L<sup>-1</sup>, com o intervalo de 2,505 a 9,046 mg L<sup>-1</sup>. Foi calculado um CENO equivalente a 0,261 mg L<sup>-1</sup>.



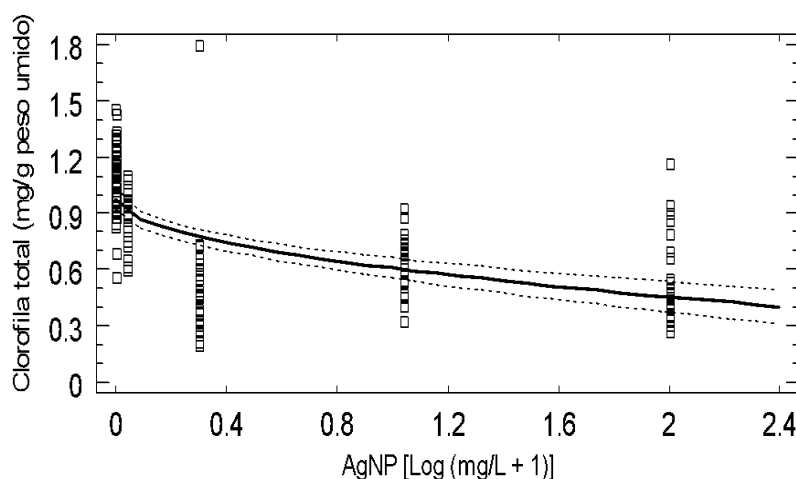
**Figura 3.** Decréscimo do peso úmido relativo ao controle em função da exposição de *Lemna minor* a nanoprata estabilizada em polivinil álcool (AgNP-PVA) após 168 h.

### 3.3. Efeito no teor de clorofila

Foi observado um decréscimo do teor de clorofila indicado na Figura 4. A clorose pode sugerir que a AgNP-PVA interferiu na replicação de cloroplastos e na divisão celular, além do estresse oxidativo provindo do aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs). A perda da coloração representa a perda da principal fonte de energia da planta, comprovando então as condições de estresse oxidativo citados anteriormente. Este efeito pode ser associado às afirmações de Lalau *et al* (2014).



A CE50-168h calculada para o decréscimo do teor de clorofila foi 53,576 mg L<sup>-1</sup>, com intervalo de confiança 95% de 19,188 a 254,270 mg L<sup>-1</sup>. A CENO estimada foi de 0,370 mg L<sup>-1</sup>.



**Figura 3.** Decréscimo no teor de clorofila total em função da exposição de *Lemna minor* a nanop prata estabilizada em polivinil álcool (AgNP-PVA) após 168 h.

De acordo com os valores de CE50 - 168h calculados, a alteração da massa da matéria úmida foi o parâmetro mais sensível aos efeitos do nanomaterial, o que o classificaria como “moderadamente tóxico” para macrófitas aquáticas.

Comparativamente aos nossos resultados, Lalau *et al.* (2020) descreveram o valor de CE50-168h para AgNP (estabilizada em PVA) equivalente a 6,84 mg L<sup>-1</sup>, quanto à redução do número de frondes. Este valor está associado a efeitos fitotóxicos para a macrófita aquática *Landoltia punctata*, sendo de semelhante ordem de grandeza dos nossos achados. Entretanto, os efeitos fitotóxicos desse mesmo nanomaterial (AgNP-PVA) vêm apresentando maior intensidade nas microalgas aquáticas. Assim, valores de CE50 de 0,09 e 0,1 mg L<sup>-1</sup> foram descritos para as microalgas *Scenedesmus sp.* e *Thalassiosira sp.* (PHAM, 2019a).

Conforme os valores de CENO determinados no presente trabalho, a concentração de 0,3 mg L<sup>-1</sup> AgNP em corpos de água não promoveria risco para macrófitas aquáticas. Este valor é bem superior ao CENO estimado para o invertebrado aquático *Daphnia magna* (CENO = 0,0002 mg L<sup>-1</sup>) (PEREIRA *et al.*, 2020) e ao determinado para *Daphnia lumholtzi* (CENO = 0,0001 mg L<sup>-1</sup>) (PHAM, 2019b). Também, é superior à concentração máxima permissível para a prata total em corpos de



água destinados à proteção das comunidades aquáticas ( $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ ), segundo a resolução vigente do Conama (CONAMA, 2005).

Os resultados deste estudo em conjunto com o de outros organismos servem como parâmetros de ecotoxicidade para estabelecimento de concentrações máximas de proteção das comunidades, visto que a AgNP pode ser considerada um risco para a biota dos compartimentos ambientais.

#### 4. CONCLUSÃO

As nanopartículas de prata estabilizadas em polivinil álcool (AgNP-PVA) manifestaram efeitos adversos no crescimento de *Lemna minor* e na produção de biomassa, bem como no decréscimo do teor de clorofila, sendo mais evidentes à medida que se aumenta a concentração.

Considerando que o efeito fitotóxico exercido no organismo-teste estudado foi de menor intensidade comparativamente ao demonstrado pela alta sensibilidade de organismos fitoplanctônicos e zooplanctônicos, a realização de ensaios com várias espécies indicadoras é relevante para uma avaliação de risco mais eficiente das AgNPs.

Os resultados do presente estudo ampliam a base dados ecotoxicológicos relacionados aos efeitos de nanopartículas de metais em macrófitas aquáticas, permitindo fazer considerações sobre os padrões de sensibilidade das diferentes espécies potencialmente expostas aos efeitos adversos de nanocompostos.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Embrapa Meio Ambiente, pelo auxílio e oportunidade de desenvolvimento da pesquisa, ao Dr. Marcos David Ferreira, da Embrapa Instrumentação, por disponibilizar o nanomaterial para execução dos testes, e ao CNPq por conceder a bolsa de Iniciação Científica para o estudo.





## 6. REFERÊNCIAS

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).

BRAIN, R. A.; SOLOMON, K. R. A protocol for conducting 7-day daily renewal tests with *Lemna gibba*. **Nature Protocols**, v. 2, n. 4, p. 979-987, 19 abr. 2007.

CASTRO-RESTREPO, D. Nanotecnologia na agricultura. **Bionatura**, v. 2, n. 3, p.48-52, 2017

CONAMA. Resolução n. 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 mar. 2005.

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*, v. 69, n. 2, p. 387-395, dez. 2014.

DURÁN, N. *et al.* Nanotoxicologia de nanopartículas de prata: toxicidade em animais e humanos. *Química Nova*, v. 42, n. 2, p. 206-213, 2018.

GALAZZI, R. M. Emprego de estratégias ômicas na avaliação de plantas de soja transgênica e não-transgênica após cultivo com nanopartículas de prata. 2017. 172 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.

GUBBINS, E. J.; BATTY, L. C.; LEAD, Jamie R. Phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor* L. *Environmental Pollution*, v. 159, n. 6, p. 1551-1559, jun. 2011.

LALAU, C. M. **Avaliação dos efeitos tóxicos de nanopartículas de prata (npag) sobre macrófita *Landoltia punctata***. 2020. 107 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

LALAU, C. M. *et al.* Toxicological effects of copper oxide nanoparticles on the growth rate, photosynthetic pigment content, and cell morphology of the duckweed *Landoltia punctata*. *Protoplasma*, v. 252, n. 1, p. 221-229, 9 jul. 2014.

LALAU C. M. *et al.* Toxicological effects of AgNPs on duckweed (*Landoltia punctata*). **Science of the Total Environment**, v. 710, p. 136318, mar. 2020.

NOGUEIRA, P. F. M.; PAINO, I. M. M.; ZUCOLOTTI, V. Nanosilver: propriedades, aplicações e impactos na saúde pública e meio ambiente. *Vigilância Sanitária em Debate*, v. 1, n. 4, p. 59-71, 2013.

ON BIOSTATISTICS AND CLINICAL TRIALS. **Log(X+1) data transformation**. May 2012. Disponível em: <http://onbiostatistics.blogspot.com/2012/05/logx1-data-transformation.html>. Acesso em: 15 jul. 2021.

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.

PHAM, T. Effect of silver nanoparticles on tropical freshwater and marine microalgae. **Journal Of Chemistry**, v. 2019a, p. 1-7, 30 maio 2019a.



PHAM, T. Toxicity of silver nanoparticles to tropical microalgae *Scenedesmus acuminatus*, *Chaetoceros gracilis* and Crustacean *Daphnia lumholtzi*. **Turkish Journal of Fisheries And Aquatic Sciences**, v. 19, n. 12, p. 1009-1016, 2019b.

PEREIRA, R. M. S. *et al.* Toxicidade da nanoprata em *Panagrolaimus sp.* estabelecimento de uma concentração de baixo risco para invertebrados. In: CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 14., 2020, Campinas. Anais... Campinas: Embrapa Informática Agropecuária, 2020. RE20408. p. 1-9.

RAI, P. K. Heavy Metal Phytoremediation from Aquatic Ecosystems with Special Reference to Macrophytes. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 39, n. 9, p. 697-753, 31 ago. 2009.

RAZA, S. *et al.* Biosynthesis of silver nanoparticles for the fabrication of non cytotoxic and antibacterial metallic polymer based nanocomposite system. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-2, 18 maio 2021.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; PEREIRA, A. M. L. Large scale laboratory cultures of *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) Korsikov (Chlorophyta) and *Diaphanosoma biergei* Korinek, 1981 (Cladocera). **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 4, p. 875-883, 2008.

ZHANG, Y. *et al.* Humic acid alleviates the ecotoxicity of graphene-family materials on the freshwater microalgae *Scenedesmus obliquus*. **Chemosphere**, v. 197, p. 749-758, abr. 2018.