

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA ESTABILIZADAS COM GOMA ARÁBICA

MAZIERO, J.S.¹, ROGERO, S.O.¹, DAMASCENO, K.C.¹, ORMENIO, M.B.¹, CAVALCANTE, A.K.¹, MARTINI G.A.¹, BATISTA J.G.S.², KATTI K.V.³, LUGÃO, A.B.¹, ROGERO, J.R.¹

¹ Laboratório de Ecotoxicologia, Centro de Química e Meio Ambiente, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN/CNEN-SP - Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 - Cidade Universitária, São Paulo, SP- Brasil.

² Laboratório de Biomateriais Poliméricos e Nanoteranóstica, Centro de Química e Meio Ambiente, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN/CNEN-SP - Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 - Cidade Universitária, São Paulo, SP- Brasil.

³ Director, University of Missouri Cancer Nanotechnology Platform - University of Missouri, Columbia, United States of America

E-mail: joana.maziero@gmail.com

Resumo. As nanopartículas de prata (NPAg), devido a seus diversos atributos (formato variado, elevada área superficial e alto poder bactericida), vem sendo amplamente utilizadas em diversos setores da indústria. Esta utilização abrangente, tem provocado grande preocupação, quanto aos impactos e riscos potenciais que as NPAg podem causar ao meio ambiente e à saúde humana. Este trabalho teve como objetivo verificar a toxicidade de uma amostra de NPAg estabilizada com Goma Arábica e reduzida com Tri-Alanina, utilizando ensaios *in vitro* e *in vivo*. O teste *in vitro* de citotoxicidade, foi realizado seguindo a norma ISO 10993 - 5, em células da linhagem NCTC-L929; os ensaios *in vivo* de ecotoxicidade aguda, de acordo com a norma brasileira ABNT NBR 12713, utilizando como organismo teste a *Daphnia similis*; e embriotoxicidade aguda de acordo com o protocolo da OECD 236, utilizando como organismo teste o *Danio rerio*. Os resultados obtidos foram: IC₅₀ de 2,61 mg L⁻¹, CE₅₀ de 6,55 µg L⁻¹ e CL₅₀ de 673 µg L⁻¹. Os organismos aquáticos apresentaram maior sensibilidade às NPAg do que as células em cultura, elevando a importância de se realizar mais estudos em várias espécies de interesse biológico. Além disso, mostra-se necessário verificar o descarte apropriado dessas nanopartículas, visto que no Brasil ainda não há legislações que quantifiquem os limites permissíveis para esse descarte.

Palavras-chave: Contaminantes emergentes. Nanopartículas de Prata. Citotoxicidade. Microcrustáceos aquáticos. Peixes.

1. INTRODUÇÃO

A Nanotecnologia compreende a investigação e o desenvolvimento de projetos e materiais em nível molecular e atômico, dentro da escala nanométrica de 1-100 nm (Miller, Serrato e Kundahl, 2005). A nanotecnologia verde é uma área específica da nanotecnologia, que busca o desenvolvimento de protocolos para gerar produtos e processos sustentáveis, a partir da utilização de produtos naturais. O objetivo é minimizar os impactos ambientais gerados, do processo de produção ao produto final (Karn e Bergeson, 2009; Mittal et al., 2013).

Na indústria brasileira a utilização de materiais nanoestruturados está cada vez mais difundida. As nanopartículas de prata (NPAg), devido as suas propriedades como: tamanho pequeno, formato variado, elevada área superficial e capacidade bactericida, podem ser incorporadas facilmente a diversos materiais: curativos, no interior de refrigeradores, em palmilhas antimicrobianas, em purificadores de ar, em instrumentos cirúrgicos e etc (Berni Neto et al., 2008; Nogueira et al., 2013; Souza et al., 2013).

As NPAg não são solúveis em água, portanto durante sua síntese é necessário a utilização de agentes estabilizantes, como por exemplo a goma arábica (GA). A GA é um exsudado de goma seco, comestível, proveniente dos caules e ramos de *Acacia senegal* e *A. seyal*, que é rico em fibra solúvel não viscosa (Ali, Ziada e Blunden, 2009).

As NPAg podem ser liberadas ao meio ambiente de diversas formas, durante sua síntese, fabricação, utilização e processo de reciclagem de materiais que contenham a mesma em sua composição. Desta forma, podem atingir o ecossistema aquático e apresentar riscos a biota,

podendo ser responsáveis por causar efeitos nocivos para seres humanos e outros organismos vivos. Estima-se que as NPAg estejam presentes entre 0,00003 e 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ em águas não tratadas, e seus efeitos nos organismos aquáticos são pouco elucidados (Mathias et al., 2014; Nogueira et al., 2013; Wal, 2010; Souza et al., 2013).

Na literatura há vários relatos sobre os possíveis mecanismos de ação das NPAg em sistemas biológicos. Uma questão importante quanto a toxicidade das NPAg, é se a mesma é ocasionada pelos Ag^+ (íons de prata), liberados da superfície das nanopartículas ou pelas próprias nanopartículas. Estudos demonstraram que a toxicidade aguda para organismos aquáticos é principalmente atribuída ao Ag^+ liberado (Newton et al., 2013; Kittler et al., 2010).

A toxicidade das NPAg pode ser verificada em testes tanto *in vitro* como *in vivo*. O teste *in vitro* de citotoxicidade minimiza a utilização de animais de laboratório. É a primeira etapa a ser realizada para avaliar o nível de toxicidade de qualquer material para utilização em dispositivos biomédicos, e após a comprovação da sua não toxicidade é que o estudo da biocompatibilidade do produto pode ter continuidade, realizando-se os ensaios necessários em animais de laboratório (Cruz et al., 1998; Rogero et al., 2003).

Os testes *in vivo* podem ser realizados utilizando ensaios ecotoxicológicos. No meio aquático a toxicidade de agentes químicos é avaliada por meio de ensaios ecotoxicológicos com organismos representativos da coluna d'água ou dos sedimentos de ambientes de água doce, estuarina ou marinha. O conhecimento da toxicidade desses agentes a diferentes organismos aquáticos permite averiguar o impacto temporário que esses poluentes causam a biota dos corpos hídricos, além da determinação dos limites permissíveis de várias substâncias químicas para proteção da vida aquática (Zagatto e Bertoletti, 2006).

A *Daphnia similis* (Crustacea, Cladocera), é um microcrustáceo planctônico, com comprimento máximo de 3,5 mm. Atuam como consumidores primários na cadeia alimentar aquática e se alimentam por filtração de material orgânico particulado em suspensão. Os organismos deste gênero são vulgarmente conhecidos como pulga d'água e tem larga distribuição no hemisfério norte (ABNT, 2009).

O *Danio rerio*, é popularmente conhecido como peixe-zebra (zebrafish) ou paulistinha, é uma espécie de peixe tropical, ovípara, omnívora, de comprimento médio de 4 a 5 centímetros. Atuam como consumidores secundários na cadeia alimentar aquática. Estes organismos são originários da Índia e Paquistão e foram introduzidos em diversas partes do mundo (ABNT, 2011). O modelo do *Danio rerio* é muito usado nos ensaios biológicos pois, seu DNA tem cerca de 70% de semelhança com o DNA humano (Zhang et al., 2003).

O aumento na produção e utilização das NPAg em diversas áreas tem provocado grande preocupação quanto aos impactos e riscos potenciais que estas podem causar ao meio ambiente e à saúde humana, o que eleva a importância da determinação da toxicidade em várias espécies de interesse biológico.

Este trabalho teve como objetivo verificar a toxicidade das NPAg em organismos aquáticos, utilizando *Daphnia similis* no teste de ecotoxicidade aguda e *Danio rerio* no teste de embriotoxicidade aguda.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A amostra de NPAg utilizada, na concentração de 174 ppm e tamanho aproximado de 75 nm, foi fornecida pelo Dr. Katti Kateshi da Universidade de Missouri - EUA. Na síntese desta amostra, foi utilizado como agente estabilizante a GA e como agente redutor, a Tri-Alanina.

2.1 Ensaio de Citotoxicidade

Os ensaios *in vitro* de citotoxicidade foram realizados baseados na norma ISO 10993-5, para determinação do índice de citotoxicidade, que é a concentração da substância que causa mortalidade a 50% das células expostas (IC50) (ISO, 1999).

Foram utilizadas células fibroblásticas da linhagem NCTC-clone 929 - CCIAL 020, de tecido conectivo de camundongo do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo - Brasil, e o meio de cultura foi o Meio de Eagle (MEM) com adição de 10% de soro fetal bovino, aminoácidos não essenciais e piruvato de sódio (MEM-uso).

As microplacas utilizadas para os ensaios foram preparadas pelo Núcleo de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz. O cultivo das células foi realizado em meio MEM-uso e após o crescimento, elas foram destacadas e a suspensão celular foi acertada para $3,5 \times 10^5$ células/mL. 200 μ L da suspensão foram distribuídos em cada poço da microplaca de 96 poços e a placa foi mantida em incubadora úmida a 37°C e atmosfera com 5% CO₂ por cerca de 24h, para atingir a confluência desejada.

Foi utilizado como controle negativo a alumina e como controle positivo o látex de borracha natural. Os extratos dos controles, assim como a solução das NPAg foram submetidos à diluição seriada com MEM-uso obtendo-se concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25%.

O controle negativo, material que não causa toxicidade, e o controle positivo, material que demonstra resposta citotóxica reprodutível, são utilizados com o propósito de demonstrar uma resposta apropriada do teste.

No ensaio propriamente dito foram depositados 200 μ L de cada diluição, em triplicata, tanto das nanopartículas como dos controles, em cada poço da microplaca.

A placa foi mantida em estufa úmida a 37°C e atmosfera com 5% CO₂ por 24h. Decorrido este período os meios foram trocados por solução de vermelho neutro em MEM e a placa incubada por mais 3h para a incorporação do corante. Após esta etapa a placa foi lavada duas vezes com tampão fosfato (PBS) pH 7,4, uma vez com a solução de lavagem (1% CaCl₂ em formaldeído 0,5%) e em seguida foram adicionadas em cada poço 200 μ L da solução de extração (50% etanol em ácido acético 1%). Após agitação por 10 min foi realizada a leitura da densidade óptica (DO) da microplaca em espectrofotômetro leitor de ELISA Sunrise da Tecan, em 540 nm e filtro de referência de 600 nm.

Com base nesse teste foram determinadas as concentrações das NPAg para a realização dos ensaios de ecotoxicidade aguda com *Daphnia similis*.

2.2 Ensaio de Ecotoxicidade Aguda

Os ensaios de ecotoxicidade aguda foram realizados baseados na norma ABNT NBR 12713 (2009), para determinação da concentração efetiva que causa imobilidade a 50% dos organismos expostos (CE50), das NPAg. Os organismos foram cultivados e mantidos no laboratório de Ecotoxicologia do CQMA, de acordo com a mesma norma.

Neste ensaio, as *Daphnia similis* foram expostas aos controles (Meio MS, GA e Tri-Alanina), e diferentes concentrações de NPAg: 3,125; 6,25; 12,50; 25 e 50 μ g L⁻¹, por um período de 48 horas. A solução estoque de NPAg utilizada foi de 174 μ g L⁻¹. Para o controle da GA foi utilizado 0,4 g em 200 mL de Meio MS e para o controle de Tri-Alanina, foi utilizado 0,001 g em 1000 mL de Meio MS. Os ensaios foram realizados de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 - Resumo dos requisitos para o ensaio de ecotoxicidade aguda.

Requisitos	Condições
Ensaio	Estático
Duração	48 horas
Idade do organismo	6 a 24 horas
Água de diluição	Água reconstituída (Meio MS)
Volume mínimo de solução-teste por organismo	2 mL
Número mínimo de diluições	5 concentrações + Controle
Número mínimo de organismos por diluição	20
Número mínimo de replicatas por diluição	4
Alimentação	Nenhuma
Temperatura	18°C a 22°C
Fotoperíodo	Escuro ou 12h a 16h de luz
Efeito observado	Imobilidade
Expressão dos resultados	CE50

Fonte: Adaptado de ABNT NBR 12713, 2009.

No final do período de exposição, com base no número de organismos imóveis em função da concentração das NPAg, foi calculada a CE50 usando o programa *Trimmed Spearman-Kärber* (Hamilton et al., 1977).

Para assegurar a adequada sensibilidade dos organismos, conforme prescrito pela ABNT NBR 12713, foram realizados mensalmente testes de sensibilidade. Esses ensaios foram feitos nas mesmas condições dos ensaios definitivos, utilizando como substância de referência o cloreto de sódio (NaCl) na concentração de 5 g L⁻¹. A partir desta solução, foram preparadas as diluições nas concentrações de 1; 2; 2,5; 3 e 4 g L⁻¹. Os resultados de CE50 obtidos, foram inseridos na carta-controle, que consiste em um gráfico contendo a média da CE50 ± 2 DP.

2.3 Ensaio de Embriotoxicidade Aguda

Os ensaios de embriotoxicidade aguda foram realizados baseados na norma OECD nº 236 (Guideline on Fish Embryo Toxicity Test-FET), para determinação da concentração letal que causa mortalidade a 50% dos organismos expostos (CL50), das NPAg. Os embriões do peixe *Danio rerio*, foram fornecidos pelo Laboratório de Ecotoxicologia da CETESB.

Neste ensaio, os ovos recém-fertilizados do *Danio rerio*, foram expostos aos controles (Meio MS, GA e Tri-Alanina), e diferentes concentrações de NPAg: 156; 312,5; 625; 1250; 2500 µg L⁻¹. As soluções-teste foram preparadas no momento da realização do ensaio, a partir da solução-estoque de 10000 µg L⁻¹. Para o controle da GA foi utilizado 0,4 g em 200 mL de Meio MS, e para o controle de Tri-Alanina foi utilizado 0,001 g em 1000 mL de Meio MS.

Foram utilizadas microplacas de 24 poços, e em cada poço foram inseridos 2 embriões com 2 mL de soluções-teste. Em cada microplaca, 4 poços foram utilizados como controle interno, contendo apenas água de diluição (Meio MS). As microplacas foram mantidas em incubadora, sob temperatura controlada de 25°C, por 96 horas.

A cada 24h foram analisados os indicadores de letalidade: coagulação de ovos fertilizados, ausência de formação de somitos, ausência de batimentos cardíacos e não desprendimento da cauda.

Ao término do ensaio, os valores positivos de letalidade, foram inseridos no programa *Trimmed Spearman-Kärber*, para obtenção da CL50. Na Tabela 2, estão descritas as condições gerais dos ensaios de embriotoxicidade aguda.

Tabela 2 - Resumo dos requisitos para o ensaio de embriotoxicidade aguda.

Requisitos	Condições
Ensaio	Estático
Duração	96 horas
Água de diluição	Água reconstituída (Meio MS)
Número de diluições	5 concentrações + Controles
Número de embriões por diluição	20
Ovos	≥ 70% dos ovos coletados devem ser fertilizados
Temperatura	26 ± 1°C
Efeitos observados	Coagulação de ovos fertilizados, ausência de formação de somitos, ausência de batimentos cardíacos e não desprendimento da cauda.
Expressão dos resultados	CL50

Fonte: Adaptado de OECD 236, 2013.

A utilização do *Danio rerio* no presente estudo foi autorizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/IPEN), sob coordenação do Centro de Biotecnologia (CB), do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP), sob o parecer N° 174/16/CEUA-IPEN/SP.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ensaio de Citotoxicidade

Os resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade das NPAg, apresentam-se na Tabela 3.

Tabela 3 - Porcentagens de viabilidade celular dos extratos dos controles negativo, positivo, e das NPAg.

Concentração		% Viabilidade celular ± cv*		
NPAg (mg.L ⁻¹)	Extrato (%)	Controle Negativo	Controle Positivo	NPAg
17,40	100	94±9	1±10	2±16
8,70	50	92±11	1±9	1±16
4,35	25	94±10	50±10	3±22
2,18	12,5	94±10	81±16	67±9
1,09	6,25	91±14	83±8	99±4

*Coeficiente de variação

Lançando em gráfico a % de viabilidade celular em função da concentração do extrato foram obtidas as curvas de viabilidade celular do ensaio, mostrado na Figura 1.

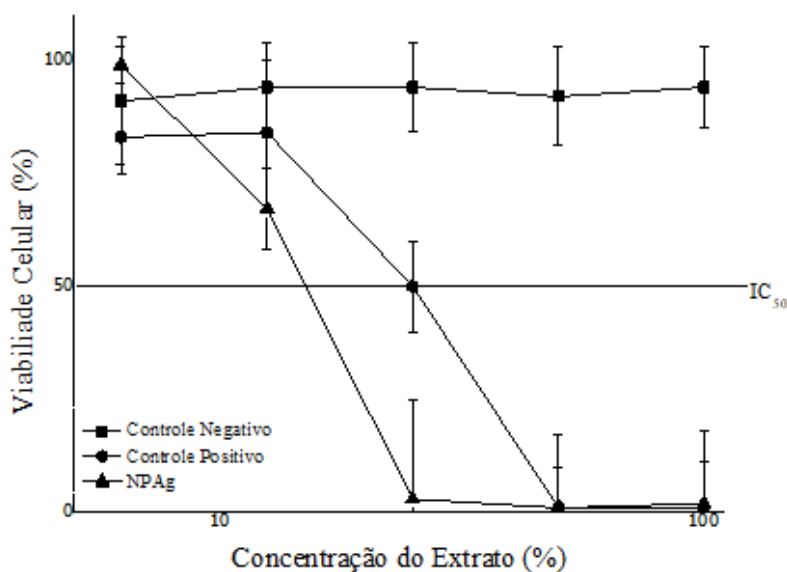


Figura 1 - Curvas de viabilidade celular das NPAG no ensaio *in vitro* de citotoxicidade.

O controle positivo apresentou IC_{50} de 25% e as NPAG, IC_{50} de 15%, equivalente ao valor de $2,61 \text{ mg L}^{-1}$, uma vez que as diluições foram feitas a partir da concentração de $17,40 \text{ mg L}^{-1}$ (100% do extrato). Os controles de GA e Tri-Alanina não apresentaram toxicidade.

Não foram encontrados dados na literatura referente a toxicidade em células de tecido conectivo de camundongo (NCTC-L929), para amostras de NPAG estabilizadas com GA e reduzidas por Tri-Alanina. Contudo, no estudo comparativo de Rogero *et al.* (2015), foram utilizadas soluções de NPAG obtidas por duas metodologias, e os valores de IC_{50} obtidos foram: $1,32 \text{ mg L}^{-1}$ para a solução na concentração de 22 ppm; e $3,40 \text{ mg L}^{-1}$ para a solução na concentração de 10.000 ppm. Leitch *et al.* (1993), reportou IC_{50} de $6,25 \text{ mg L}^{-1}$ para NPAG esféricas com tamanho entre 7 e 12 nm.

Os valores mencionados acima, demonstraram que as NPAG apresentaram IC_{50} na mesma ordem de grandeza que os resultados obtidos neste estudo.

3.2 Ensaio de Ecotoxicidade Aguda

Os organismos expostos aos controles de Ga e Tri-Alanina, apresentaram imobilidade inferior ou igual a 5%, nos 3 ensaios realizados. Sabe-se que o recomendado para a norma da ABNT 12713 (2016), é que a mortalidade no controle negativo (Meio MS), não ultrapasse 10% do valor total de organismos expostos. Com base nessa informação, pode-se inferir que o agente estabilizante (GA) e o agente redutor (Tri-Alanina), não influenciaram na toxicidade das NPAG.

Os resultados da % de imobilidade em relação às concentrações das NPAG foram lançados em gráfico (Figura 2), onde podemos visualizar o aumento da imobilidade dos organismos com o aumento da concentração das NPAG.

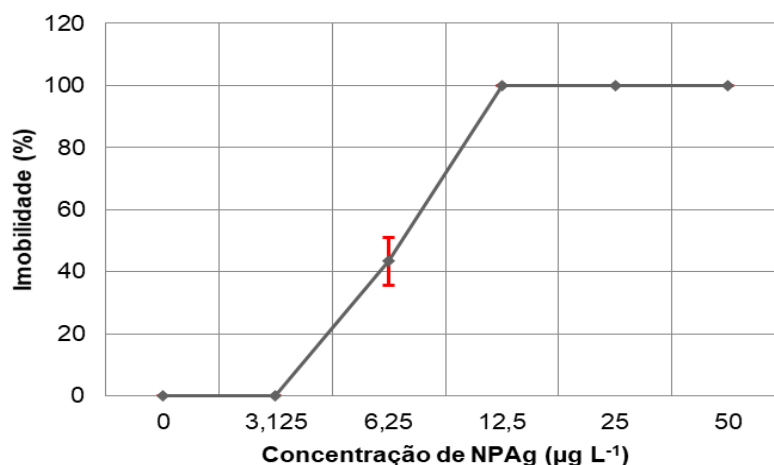


Figura 2 - Curva de imobilidade das neonatas de *Daphnia similis* em função das concentrações das NPAg.

O valor médio da CE_{50} foi de $6,55 \mu\text{g L}^{-1}$. A imobilidade na *Daphnia similis*, foi observada a partir da concentração de $6,25 \mu\text{g L}^{-1}$ de NPAg (35-50%), e atingiu 100% de imobilidade a partir da concentração de $12,50 \mu\text{g L}^{-1}$.

Não foram encontrados dados na literatura referente as alterações morfológicas e ecotoxicidade aguda em *Daphnia similis* para amostras de NPAg estabilizadas com GA e reduzidas por Tri-Alanina. Contudo, em publicações anteriores foram identificados valores de CE_{50} na mesma ordem de grandeza das obtidas no presente estudo, como: $4,70 \mu\text{g L}^{-1}$ (Maziero *et al.*, 2016); $6,90 \mu\text{g L}^{-1}$ e $13,93 \mu\text{g L}^{-1}$ (Rogerio *et al.*, 2015), apesar das NPAg terem sido sintetizadas por diferentes metodologias.

A *Daphnia magna*, também é um modelo experimental amplamente utilizado em ensaios de ecotoxicidade aguda, porém, estudos demonstraram que sua sensibilidade é menor que a da *Daphnia similis* (Costa *et al.*, 2008; Beatrici *et al.*, 2006).

Newton *et al.* (2013), obteve o valor de CE_{50} entre $2,14 \mu\text{g L}^{-1}$ e $3,48 \mu\text{g L}^{-1}$, para NPAg com tamanho aproximado entre 7,5 nm e 17,9 nm, estabilizadas com GA, em *Daphnia magna*, após 48h de exposição (Newton *et al.*, 2013). Neste trabalho, a sensibilidade da *Daphnia magna* não foi consideravelmente menor que a da *Daphnia similis*, comparadas a encontrada no presente estudo para as amostras: 1 (CE_{50} de $4,40 \mu\text{g L}^{-1}$ para NPAg de 25 nm), e 2 (CE_{50} de $6,55 \mu\text{g L}^{-1}$ para NPAg de 75 nm).

Volker *et al.* (2013), obteve o valor de CE_{50} de 121mg L^{-1} , para NPAg com tamanho aproximado de 15 nm, estabilizadas com Polivinilpirrolidona (PVP) em *Daphnia magna*, após 48h de exposição (Volker *et al.*, 2013). Entretanto, Li *et al.* (2010), obteve o valor de CE_{50} entre $3 \mu\text{g L}^{-1}$ e $4 \mu\text{g L}^{-1}$, para NPAg com tamanho aproximado de 36 nm, estabilizadas com citrato de sódio (Li *et al.*, 2010). Estes resultados corroboram ao fato de que a utilização do agente estabilizante, pode interferir na toxicidade da amostra. Porém, vale ressaltar que outros fatores também influenciam nessa toxicidade, como a utilização do agente redutor e o tamanho da nanopartícula.

3.3 Ensaio de Embriotoxicidade Aguda

Os organismos expostos aos controles de Ga e Tri-Alanina, apresentaram letalidade inferior ou igual a 5%, nos 3 ensaios realizados. Sabe-se que o recomendado para a norma da OECD, é que a mortalidade no controle de placa e no controle do meio não ultrapassem 10% do valor total de organismos expostos. Com base nessa informação, pode-se inferir que o

agente estabilizante (GA) e o agente redutor (Tri-Alanina), não influenciaram na toxicidade das NPAg.

Os resultados da % de letalidade em relação às concentrações de NPAg foram lançados em gráfico (Figura 3), onde podemos visualizar o aumento da letalidade dos organismos com o aumento da concentração das NPAg.

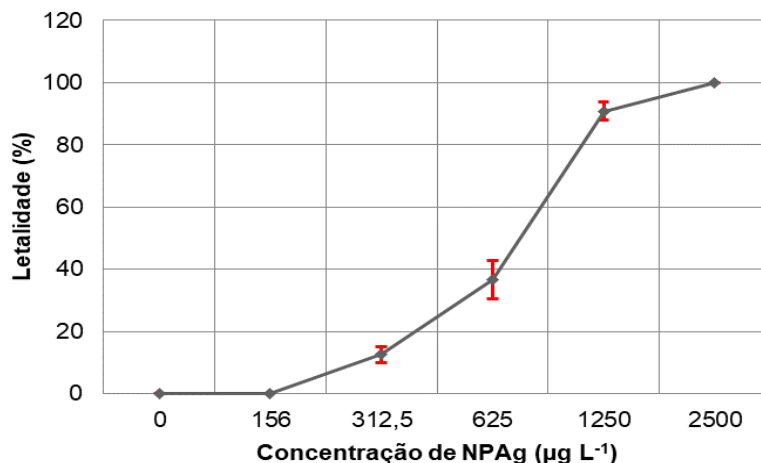


Figura 3 - Curva de letalidade dos embriões de *Danio rerio* em função das concentrações de NPAg.

O valor médio da CL₅₀ foi de 673 µg L⁻¹. As taxas de alterações morfológicas observadas nos organismos durante os ensaios, foram avaliadas pelo Teste t de *Student*, para verificar se as amostras de NPAg apresentaram diferenças estatisticamente significativas nos organismos em comparação com o controle, com nível de significância de p < 0,05. Com base nos resultados obtidos neste teste, as alterações morfológicas não foram estatisticamente significativas comparadas ao controle.

A letalidade no *Danio rerio*, foi observada a partir da concentração de 312,5 µg L⁻¹ de NPAg (10-15%), e cresceu de acordo com o aumento da concentração de NPAg, atingindo 100% de letalidade na concentração de 2500 µg L⁻¹.

Uma questão importante quanto a toxicidade das NPAg, é se a mesma é ocasionada pelos Ag⁺ liberados da superfície das nanopartículas. Estudos demonstraram que a toxicidade aguda para organismos aquáticos é principalmente atribuída ao Ag⁺ liberado (Newton *et al.*, 2013; Kittler *et al.*, 2010).

Em organismos aquáticos o mecanismo de toxicidade para Ag são o distúrbio ionorregulatório ou a falha associada à inibição competitiva ou não competitiva da atividade da trifosfatase de adenosina (Na⁺, K⁺ -ATPase), dependente de íons sódio ou potássio. Isso resulta na inibição da absorção de Na⁺ nas brânquias, o que acarreta a uma sequência de eventos que culminam em parada cardíaca e morte (Hogstrand e Wood, 1998; Bianchini e Wood, 2003).

No entanto, outras pesquisas sugerem que a toxicidade é ocasionada pelas próprias NPAg, em que o provável mecanismo de toxicidade é a produção de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo. Isso resulta em dano mitocondrial, peroxidação lipídica da membrana e danos no DNA e nos lipídios, os quais levam à apoptose celular (Asharani *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2010).

Não foram encontrados dados na literatura referente a alterações morfológicas e embriotoxicidade aguda em *Danio rerio*, decorrentes de amostras de NPAg estabilizadas com GA e reduzidas por Tri-Alanina. Entretanto, em trabalhos anteriores como o de Asharani *et al* (2008), foram estudadas NPAg estabilizadas com Amido de batata e Albumina de soro bovino (BSA), com tamanho aproximado de 5 nm a 20 nm, cujo o valor de CL₅₀ obtido, para

embriões de *Danio rerio*, após 72h de exposição, foi de 25 mg L⁻¹ e 50 mg L⁻¹ (Asharani *et al.*, 2008).

O trabalho de Xin *et al* (2015), realizado também com embriões de *Danio rerio*, mostrou o valor de CL₅₀ de 4,120 mg L⁻¹, após 96h de exposição, para NPAg (neste trabalho não há informações quanto ao agente estabilizante), com tamanho aproximado de 3 nm a 6 nm; e CL₅₀ de 5,909 mg L⁻¹ para NPAg com tamanho aproximado de 8 nm a 10 nm (Xin *et al.*, 2015). Nesses estudos foi possível observar que quanto menor o tamanho da nanopartícula, maior pode ser o seu efeito tóxico. Contudo, é importante ressaltar que outros fatores também podem influenciar na toxicidade das amostras, como a utilização do agente estabilizante e do agente redutor.

Griffitt *et al.* (2008), obteve o valor de CL₅₀ de 7,07 mg L⁻¹, em adultos de *Danio rerio*, para NPAg (neste trabalho não há informações quanto ao agente estabilizante), com tamanho aproximado entre 20 nm e 30 nm, após 48h de exposição. No estudo de Azevedo *et al.* (2019), o valor de CL₅₀ obtido foi de 8,18 µg L⁻¹, em adultos de *Danio rerio*, para NPAg (neste trabalho, também não há informações quanto ao agente estabilizante), com tamanho aproximado de 89 nm, após 48h de exposição.

No trabalho de Bilberg *et al* (2011), foram estudadas a toxicidade de NPAg estabilizadas com Polivinilpirrolidona (PVP), com tamanho aproximado de 81 nm, e também a toxicidade de íons de Ag, em adultos de *Danio rerio*, após 48h de exposição. Os valores de CL₅₀ obtidos para as NPAg, foi de 84 µg L⁻¹ e para os íons de Ag, foi de 25 µg L⁻¹ (Bilberg *et al.*, 2011). Estes resultados corroboram aos estudos de Newton *et al.*, 2013 e Kittler *et al.*, 2010, sobre os íons de Ag apresentarem maior toxicidade que as NPAg em si.

4 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, nota-se que os organismos aquáticos são aproximadamente 1.000x mais sensíveis que células em cultura. É necessário a realização de mais estudos relacionados às adversidades que as NPAg podem causar ao meio ambiente e a saúde humana. Assim como a importância da determinação da toxicidade em várias espécies de interesse biológico, como algas, bactérias, microcrustáceos, peixes, entre outros. Além disso, mostra-se necessário verificar o descarte das NPAg no meio ambiente, visto que no Brasil ainda não há legislações que quantifiquem os limites permissíveis para esse descarte. Este trabalho poderá contribuir para as informações sobre a ecotoxicidade aguda das NPAg, amplamente utilizadas atualmente.

AGRADECIMENTOS

Ao IPEN pela infraestrutura disponibilizada para realização deste trabalho.

Ao CNPq pela bolsa de Mestrado.

Ao Dr Katti Kateshi, por fornecer gentilmente a amostra de NPAg.

REFERÊNCIAS

- MILLER, J. C.; SERRATO, R; KUNDAHL, G. The handbook of nanotechnology: business, policy and intellectual property law. Wiley, 1 Ed., New Jersey. 2005.
- KARN, B. P.; BERGESON, L. L. Green nanotechnology: straddling promise and uncertainty. Natural Resources & Environment, v. 24, n. 2, p. 9-23, 2009.
- MITTAL, A. K.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. Biotechnology advances, v. 31, n. 2, p. 346-356, 2013.
- BERNI NETO, E. A.; RIBEIRO, C; ZUCOLOTO, V. Síntese de nanopartículas de prata para aplicação na sanitização de embalagens. Embrapa Instrumentação-Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2008.

- NOGUEIRA, P. F. M.; PAINO, I. M. M.; ZUCOLOTTI, V. Nanosilver: properties, applications and impacts on health and environment. *Revista Vigilância Sanitária em Debate. Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia. Instituto de Física de São Carlos*, v. 1, n. 4, p. 57-68. São Carlos. 2013.
- SOUZA, G. D.; RODRIGUES, M. A.; SILVA, P. P.; GUERRA, W. Prata: breve histórico, propriedades e aplicações. *Educação Química. Universidade Federal Autônoma do México*, v. 24, n. 1, p.14-16. 2013.
- ALI, B. H.; ZIADA, A.; BLUNDEN, G. Biological effects of gum arabic: A review of some recent research. *Elsevier, Food and Chemical Toxicology*. v. 47, n. 1, p. 1-8, 2009.
- MATHIAS, F. T.; ROMANO, R. M.; ROMANO, M. A. Avaliação dos efeitos toxicológicos e ambientais de nanopartículas de sais de prata. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 35, n. 2, p. 187-193. 2014.
- WAL, R. Prata nanoparticulada: avaliação das potencialidades de aplicação e dos riscos associados na desinfecção de água em comparação com sistemas convencionais de cloração. *Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental) - Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo*. 133p. 2010.
- NEWTON, K. M.; PUPPALA, H. L.; KITCHENS, C. L.; COLVIN, V. L.; KLAINE, S. J. Silver nanoparticle toxicity to *Daphnia magna* is a function of dissolved silver concentration. *Environmental toxicology and chemistry*, v. 32, n. 10, p. 2356-2364, 2013.
- KITTLER, S.; GREULICH, C.; DIENDORF, J.; KOLLER, M.; EPPLE, M. Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions. *Chemistry of Materials*, v. 22, n. 16, p. 4548-4554, 2010.
- CRUZ, A. S.; FIGUEIREDO, C. A.; IKEDA, T. I.; VASCONCELOS, A. C. E.; CARDOSO, J. B.; SALLES-GOMES, L. F. D. Comparação de métodos para testar a citotoxicidade “in vitro” de materiais biocompatíveis. *Revista de Saúde Pública*, v. 32, n. 2, p. 153-159. São Paulo. 1998.
- ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, Á. S. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials Research*, v. 6, n. 3, p. 317-320. São Paulo. 2003.
- ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia aquática - princípios e aplicações*. Rima, 1 Ed., 478p, São Carlos. 2006.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *Ecotoxicidade aquática - toxicidade aguda - método de ensaio com Daphnia spp (Crustacea, Cladocera)*. ABNT, 2009. (NBR 12713).
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *Ecotoxicologia aquática - toxicidade aguda - método de ensaio com peixes*. ABNT, 2011. (NBR 15088).
- ZHANG, C.; WILLETT, C.; FREMGEN, T. Zebrafish: an animal model for toxicological studies. *Current Protocols in Toxicology*, v. 17, n. 1, p. 1.7. 1-1.7. 18, 2003.
- International Organization for Standardization. *Biological evaluation of medical devices—Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*. ISSO, 2009. (ISO 10993-5).
- HAMILTON, M. A; Russo, R. C.; Thurston, R. V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science & Technology*, v. 11, n. 7, p. 714-719, 1977.
- Organisation for Economic Co-operation and Development. *Guideline for the testing of chemicals: Fish embryo acute toxicity (FET) test*. (OECD 236). 2013.
- ROGERO, S. O.; QUINTINO, M. T.; ALMEIDA, P. R. D.; DIAS, R. R.; LUGÃO, A. B.; & ROGERO, J. R. Toxicidade da nanopartícula de prata (NPAg): estudo comparativo entre suspensões de NPAg obtidas por diferentes métodos. In: *Anais da 4.ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais: 2015; Campina Grande, PB: Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais; 2015*.
- LEITCH, I. O.; KUCUKCELEBI, A.; ROBSON, M. C. Inhibition of wound contraction by topical antimicrobials. *Aust. N. Z. J. Surg.*, 63(4), 289-293. 1993.
- COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M.; ESPINDOLA, E. L. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*, v. 31, n. 7, p. 1820-1830. 2008.
- BEATRICI, A. C.; ARENZON, A.; COIMBRA, N. J.; RAYA-RODRIGUEZ, M. T. Fertilidade e sensibilidade de *Daphnia similis* e *Daphnia magna* submetidas a diferentes cultivos. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol*, v. 1, n. 2, p. 123-126, 2006.
- HOGSTRAND, C.; WOOD, C. M. Toward a better understanding of the bioavailability, physiology, and toxicity of silver in fish: implications for water quality criteria. *Environmental toxicology and chemistry*, v. 17, n. 4, p. 547-561, 1998.
- VÖLKER, C.; BOEDICKER, C.; DAUBENTHALER, J.; OETKEN, M.; OEHLMANN, J. Comparative toxicity assessment of nanosilver on three *Daphnia* species in acute, chronic and multi-generation experiments. *PloS one*, v. 8, n. 10, p. e75026, 2013.
- LI, T.; ALBEE, B.; ALEMAYEHU, M.; DIAZ, R.; INGHAM, L.; KAMAL, S.; BISHNOI, S. W. Comparative toxicity study of Ag, Au, and Ag–Au bimetallic nanoparticles on *Daphnia magna*. *Analytical and bioanalytical chemistry*, v. 398, n. 2, p. 689-700, 2010.

- BIANCHINI, A; WOOD, C. M. Mechanism of acute silver toxicity in *Daphnia magna*. *Environmental toxicology and chemistry*, v. 22, n. 6, p. 1361-1367, 2003.
- CHOI, J. E.; KIM, S.; AHN, J. H.; YOUN, P.; KANG, J. S.; PARK, K.; RYU, D. Y. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. *Aquatic Toxicology*, v. 100, n. 2, p. 151-159, 2010.
- ASHARANI, P. V.; WU, Y. L., GONG, Z.; VALIYAVEETIL, S. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *IOP Science. Nanotechnology*, v. 19, n. 25, p. 255102, 2008.
- XIN, Q.; ROTCHELL, J. M.; CHENG, J.; YI, J.; ZHANG, Q. Silver nanoparticles affect the neural development of zebrafish embryos. *Journal of Applied Toxicology*, 35. 11p. 2015.
- GRIFFITT, R, J.; LUO, J.; GAO, J.; BONZONGO, J. C.; BARBER, D. S. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 27, n. 9, p. 1972-1978, 2008.
- BILBERG, K.; HOVGAARD, M. B.; BESENBACHER, F.; & BAATRUP, E. In vivo toxicity of silver nanoparticles and silver ions in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of toxicology*, v. 2012, 2012.