INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Avaliação da toxicidade de nanopartículas de prata em microcrustáceos aquáticos e em embriões de *Danio rerio*

JOANA DA SILVA MAZIERO

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientador:
Prof. Dr. José Roberto Rogero

São Paulo
2019

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Avaliação da toxicidade de nanopartículas de prata em microcrustáceos aquáticos e em embriões de *Danio rerio*

Versão Corrigida

Versão Original disponível no IPEN

JOANA DA SILVA MAZIERO

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientador:
Prof. Dr. José Roberto Rogero

São Paulo
2019

Fonte de Financiamento: CNPq

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho,
para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Como citar:

MAZIERO, J. S. ***Avaliação da toxicidade de nanopartículas de prata em microcrustáceos aquáticos e em embriões de Danio rerio***. 2019. 92 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Maziero, Joana Silva
Avaliação da toxicidade de nanopartículas de prata em microcrustáceos aquáticos e em embriões de Danio rerio / Joana Silva Maziero; orientador José Roberto Rogero. -- São Paulo, 2019.
92 p.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Materiais) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2019.

1. Contaminantes emergentes. 2. Nanopartículas de Prata. 3. Citotoxicidade. 4. Microcrustáceos aquáticos. 5. Peixes. I. Rogero, José Roberto, orient. II. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais Iolanda da Silva e Wagner Maziero.
Toda minha gratidão e carinho!
Amo vocês além da vida!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha existência e pela oportunidade de vencer meus limites com força e determinação, buscando sempre a evolução profissional, acadêmica e espiritual.

Aos meus pais, por acreditarem em mim e sempre me incentivarem a perseguir meus ideais com honra e generosidade. Agradeço principalmente pela parceria, pelos momentos de descontração e por fazerem meus dias difíceis mais leves e esperançosos. Vocês sempre serão um exemplo para mim! Muito obrigada por tudo!

Ao meu orientador Dr. José Roberto Rogero pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pela orientação, confiança, paciência e pelos conselhos.

À Ms. Sizue Ota Rogero, pela paciência, acolhimento, ensinamentos, por sempre estar ao meu lado nos momentos turbulentos, me apoiando e aconselhando.

Ao Dr. Ademar Benévolo Lugão pelo apoio, acolhimento, atenção e por proporcionar condições laboratoriais para conclusão deste trabalho.

Ao Ms. William Viveiros da CETESB, pela parceria, pela ajuda na parte experimental e pelos ensinamentos.

Ao Dr. Kattesh V. Katti pelo apoio, confiança e suporte.

Ao meu namorado, parceiro, e amigo Luiz Antônio Feitosa, pelo incentivo, paciência, apoio e carinho. Muito obrigada por sempre estar ao meu lado.

Aos meus amigos do Laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Química e Meio Ambiente: Gisela, Adriana, Kelme, Fernanda, Matheus e Isabelle por todo suporte durante o desenvolvimento do trabalho, pelas risadas, parceria e amizade. Cada um de vocês tem um lugar muito especial guardado em meu coração, e sempre vou recordar de nossos momentos com muito carinho.

À todos os meus amigos do Centro de Química e Meio Ambiente: Mainara, Giovana, Tati, Joyce, Camila Tanzillo, Maíse, Camila Bassetti, Gabriela, Mariana, Tamires, Jorge e Vinícius, pelo apoio, conversas, risadas e amizade.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), em especial ao Centro de Química e Meio Ambiente (CQMA) pela oportunidade de desenvolver esse projeto.

Á empresa Dhanvantari Nano Ayushadi Private Limited (DNA), por

disponibilizar a amostra estudada no presente trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Suba o primeiro degrau com fé
Não é necessário que você veja toda a escada
Apenas dê o primeiro passo.

Martin Luther King

RESUMO

MAZIERO, Joana S. **Avaliação da toxicidade de nanopartículas de prata em microcrustáceos aquáticos e em embriões de *Danio rerio*.** 2019. 91 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN - CNEN/SP. São Paulo.

Devido aos seus diversos atributos como tamanho, elevada área superficial, formato variado e alto poder bactericida, as nanopartículas de prata (NPAg) vem sendo amplamente utilizadas em diversos setores da indústria: curativos, devido a sua capacidade bactericida; no interior de refrigeradores de alimentos, para retardar a deterioração; em palmilhas antimicrobianas, para evitar odores; em purificadores de ar; em instrumentos cirúrgicos e etc. A utilização abrangente das NPAg tem provocado grande preocupação na área acadêmica, principalmente ecotoxicológica, quanto aos impactos e riscos potenciais que estas podem causar ao meio ambiente e à saúde humana. Baseado nessas considerações, este trabalho teve como objetivo verificar e comparar o nível de toxicidade de duas amostras de NPAg, estabilizadas com goma arábica (GA) e reduzidas com Tri-Alanina (Amostra 1: NPAg com tamanho aproximado de 25 nm e Amostra 2: NPAg com tamanho aproximado de 75 nm), utilizando ensaios *in vitro* e *in vivo*. O teste *in vitro* de citotoxicidade, foi realizado seguindo a norma ISO 10993 - 5 pelo método de incorporação do corante vermelho neutro, em células da linhagem NCTC-L929, para obtenção do IC_{50} (índice de citotoxicidade, concentração da amostra que induz 50% de lise ou morte celular); os ensaios *in vivo* de ecotoxicidade aguda, de acordo com a norma brasileira ABNT NBR 12713, utilizando como organismo teste a *Daphnia similis*, para obtenção da CE_{50} (concentração efetiva da amostra que causa imobilidade em 50% dos organismos expostos); e embriotoxicidade aguda de acordo com o protocolo da OECD 236, utilizando como organismo teste o *Danio rerio*, para obtenção da CL_{50} (concentração letal da amostra que causa mortalidade em 50% dos organismos expostos). Os resultados obtidos para a Amostra 1: foram IC_{50} de 2,57 mg L^{-1}, CE_{50} de 4,40 µg L^{-1}, e CL_{50} de 177 µg L^{-1}; Amostra 2: IC_{50} de 2,61 mg L^{-1}, CE_{50} de 6,55 µg L^{-1} e CL_{50} de 673 µg L^{-1}. Estes resultados mostram que os organismos aquáticos são mais sensíveis às NPAg do que as células em cultura, elevando a importância de se realizar mais estudos relacionados às adversidades que essas nanopartículas podem causar. Além disso, mostra-se

necessário verificar o descarte das mesmas no meio ambiente, 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.

ABSTRACT

MAZIERO, Joana S. **Evaluation of the toxicity of silver nanoparticles in aquatic microcrustaceans and *Danio rerio* embryos***.* 2019. 91 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN - CNEN/SP. São Paulo.

Due to its diverse attributes such as size, high surface area, varied shape and high bactericidal power, silver nanoparticles (NPAg) have been widely used in several sectors of the industry: dressings due to their bactericidal capacity; inside food coolers, to retard spoilage; in antimicrobial insoles to prevent odors; in air purifiers; surgical instruments and so on. The comprehensive use of NPAg has caused great concern in the academic field, mainly ecotoxicological, regarding the potential impacts and risks that these can cause to the environment and human health. Based on these considerations, this work aimed to verify and compare the toxicity level of two GA-stabilized and reduced with Tri-Alanine (NPAg samples (Sample 1: NPAg with an approximate size of 25 nm and Sample 2: NPAg with an approximate size of 75 nm) using *in vitro* and *in vivo* assays. The *in vitro* cytotoxicity test was performed according to ISO 10993-5 by the method of incorporation of the neutral red dye in cells of the NCTC-L929 line, to obtain the IC_{50} (cytotoxicity index, sample concentration inducing 50% lysis or cell death); the *in vivo* tests of acute ecotoxicity, according to Brazilian standard ABNT NBR 12713, using *Daphnia similis* as the test organism to obtain EC_{50} (effective concentration of the sample causing immobility in 50% of the exposed organisms); and acute embryotoxicity according to the protocol of OECD 236, using *Danio rerio* as the test organ to obtain LC_{50} (lethal concentration of the sample causing mortality in 50% of the exposed organisms). The results obtained for Sample 1 were IC_{50} of 2.57 mg L^{-1}, EC_{50} of 4.40 µg L^{-1}, and LC_{50} of 177 µg L^{-1}; Sample 2: IC_{50} of 2.61 mg L^{-1}, EC_{50} of 6.55 µg L^{-1} and LC_{50} of 673 µg L^{-1}. These results show that aquatic organisms are more sensitive to NPAg than cells in culture, raising the importance of conducting further studies related to the adversities that these nanoparticles can cause. In addition, it is necessary to verify the disposal of the same in the environment, since in Brazil there is still no legislation that quantifies the permissible limits for this disposal.

Keywords: Emerging contaminants. Silver nanoparticles. Cytotoxicity. Aquatic microcrustaceans. Fish.

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 - Resumo dos requisitos para o ensaio de ecotoxicidade aguda com *Daphnia similis*..... **44**

Tabela 2 - Resumo dos requisitos para o ensaio de embriotoxicidade aguda com *Danio rerio*..... **48**

Tabela 3 - Valores obtidos pela técnica de DLS para as amostras 1 e 2..... **51**

Tabela 4 - Valores obtidos pela técnica de Potencial Zeta para as amostras 1 e 2..... **52**

Tabela 5 - Porcentagens de viabilidade celular dos extratos dos controles negativo e positivo, e dos Controles de GA e Tri-Alanina..... **53**

Tabela 6 - Porcentagens de viabilidade celular dos extratos dos controles negativo e positivo, e da Amostra 1..... **54**

Tabela 7 - Porcentagens de viabilidade celular dos extratos dos controles negativo e positivo, e da Amostra 2..... **56**

Tabela 8 - Percentual de imobilidade obtido nos ensaios de ecotoxicidade aguda dos controles de Ga e Tri-Alanina em neonatas de *Daphnia similis*..... **58**

Tabela 9 - Percentual de imobilidade obtido nos ensaios de ecotoxicidade aguda da Amostra 1 em neonatas de *Daphnia similis*..... **59**

Tabela 10 - Valores das CE50, intervalos de confiança, média e desvio padrão para os ensaios de ecotoxicidade aguda da Amostra 1..... **60**

Tabela 11 - Percentual de imobilidade obtido nos ensaios de ecotoxicidade aguda da Amostra 2 em neonatas de *Daphnia similis*..... **62**

Tabela 12 - Valores das CE50, intervalos de confiança, média e desvio padrão para os ensaios de ecotoxicidade aguda da Amostra 2..... **63**

Tabela 13 - Percentual de letalidade obtido nos ensaios de embriotoxicidade aguda dos controles de Ga e Tri-Alanina em embriões de *Danio rerio*..... **66**

Tabela 14 - Percentual de letalidade obtido nos ensaios de embriotoxicidade aguda da Amostra 1 em embriões de *Danio rerio*..... **67**

Tabela 15 - Valores das CL50, intervalos de confiança, média e desvio padrão para os ensaios de embriotoxicidade aguda da Amostra 1..... **68**

Tabela 16 - Percentual de letalidade obtido nos ensaios de embriotoxicidade aguda da Amostra 2 em embriões de *Danio rerio*..... **71**

Tabela 17 - Valores das CL50, intervalos de confiança, média e desvio padrão para os ensaios de embriotoxicidade aguda da Amostra 2..... **72**

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1 - (A) Árvore de *Acácia senegal* e (B) Exsudação seca proveniente das hastes de *Acácia senegal*..... **22**

Figura 2 - Estrutura química da GA e os principais grupos terminais e formadores da cadeia principal..... **23**

Figura 3 - Estrutura química da Tri-Alanina **24**

Figura 4 - *Daphnia similis*..... **32**

Figura 5 - *Danio rerio* adulto: (A) Fêmea e (B) Macho..... **33**

Figura 6 - Ciclo de vida do *Danio rerio*. O desenvolvimento do *Danio rerio* ocorre de forma rápida: a clivagem, gastrulação e organogênese ocorrem em 24 hpf. Após 48 e 72 hpf, as larvas eclodem apresentando células de pigmentação. Posteriormente a fase juvenil, torna-se adulto 90 dias hpf..... **35**

Figura 7 - Amostras de NPAg..... **36**

Figura 8 - Amostras do agente estabilizante (GA), e do agente redutor (Tri-Alanina) **36**

Figura 9 - Leitura de UV-Vis em espectrofotômetro Spectramax i3..... **37**

Figura 10 - Microplacas de 96 poços..... **41**

Figura 11 - Leitura das DOs em espectrofotômetro leitor tipo *ELISA*..... **42**

Figura 12 - Ensaio de ecotoxicidade aguda com *Daphnia similis*..... **43**

Figura 13 - Modelo esquemático da disposição das microplacas de 24 poços **46**

Figura 14 - Ensaio de embriotoxicidade aguda com *Danio rerio*..... **46**

Figura 15 - Indicadores de letalidade: (A) Ovo coagulado; (B) Não desprendimento da cauda; (C) Ausência de formação de somitos; (D) Ausência de batimentos cardíacos..... **47**

Figura 16 - Gráfico dos espectros de extinção óptico das 2 Amostras de NPAg obtidos em espectrofotômetro na faixa de 230 a 900 nm..... **49**

Figura 17 - Imagens obtidas por MET da Amostra 1. (A): magnificância de 29.000x (Escala de 200nm); (B): magnificância de 280.000x (Escala de 20nm); (C): magnificância de 700.000x (Escala de 10nm) **50**

Figura 18 - Imagens obtidas por MET da Amostra 2. (A): magnificância de 29.000x (Escala de 200nm); (B): magnificância de 280.000x (Escala de 20nm); (C): magnificância de 700.000x (Escala de 10nm) **50**

Figura 19 - Curvas de viabilidade celular dos Controles de GA e Tri-Alanina, no ensaio *in vitro* de citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro..... **53**

Figura 20 - Curvas de viabilidade celular da Amostra 1 no ensaio *in vitro* de citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro..... **55**

Figura 21 - Curvas de viabilidade celular da Amostra 2 no ensaio *in vitro* de citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro..... **56**

Figura 22 - Carta controle de sensibilidade da *Daphnia similis* ao NaCl após 48 h de exposição..... **57**

Figura 23 - Curva de imobilidade das neonatas de *Daphnia similis* em função das concentrações dos controles de Ga e Tri-Alanina no ensaio de ecotoxicidade aguda..... **58**

Figura 24 - Curva de imobilidade das neonatas de *Daphnia similis* em função das concentrações da Amostra 1 no ensaio de ecotoxicidade aguda. **60**

Figura 25 - *Daphnia similis* no ensaio de ecotoxicidade aguda de NPAg: (A) Controle; *Daphnia similis* em diferentes concentrações de NPAg: (B) 1 µg L^{-1}, (C) 2 µg L^{-1}, (D) 4 µg L^{-1}, (E) 8 µg L^{-1} e (F) 16 µg L^{-1}..... **61**

Figura 26 - Curva de imobilidade das neonatas de *Daphnia similis* em função das concentrações da Amostra 2 no ensaio de ecotoxicidade aguda. **62**

Figura 27 - *Daphnia similis* no ensaio de ecotoxicidade aguda de NPAg: (A) Controle; *Daphnia similis* em diferentes concentrações de NPAg: (B) 3,125 µg L^{-1}, (C) 6,25 µg L^{-1}, (D) 12,50 µg L^{-1}, (E) 25 µg L^{-1} e (F) 50 µg L^{-1}..... **63**

Figura 28 - Curva de letalidade dos embriões de *Danio rerio* em função das concentrações dos controles de Ga e Tri-Alanina no ensaio de embriotoxicidade aguda..... **66**

Figura 29 - Curva de letalidade dos embriões de *Danio rerio* em função das concentrações da Amostra 1 no ensaio de embriotoxicidade aguda. **67**

Figura 30 - *Danio rerio* no ensaio de embriotoxicidade aguda, sendo os controles (A) 24 hpf e (B) 96 hpf; e concentrações da Amostra 1, 96 hpf: (C) 78 µg L^{-1}, (D) e (E) 156 µg L^{-1}, (F) 312,5 µg L^{-1}, (G) e (H) 625 µg L^{-1} e (I) e (J) 1250 µg L^{-1}. **69**

Figura 31 - Curva de letalidade dos embriões de *Danio rerio* em função das concentrações da Amostra 2 no ensaio de embriotoxicidade aguda. **72**

Figura 32 - *Danio rerio* no ensaio de embriotoxicidade aguda, sendo os controles (A) 24 hpf e (B) 96 hpf; e concentrações da Amostra 2, 96 hpf: (C) 156 µg L^{-1}, (D) e (E) 312,5 µg L^{-1}, (F) 625 µg L^{-1}, (G) e (H) 1250 µg L^{-1} e (I) 2500 µg L^{-1}..... **73**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas.

Amostra 1 - Amostra de NPAg na concentração de 147 ppm e tamanho aproximado de 25 nm.

Amostra 2 - Amostra de NPAg na concentração de 174 ppm e tamanho aproximado de 75 nm.

CE50 - Concentração efetiva que causa imobilidade a 50% dos organismos expostos.

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo.

CL50 - Concentração letal que causa mortalidade a 50% dos organismos expostos.

CNEN - Comissão Nacional de Energia Nuclear.

CQMA - Centro de Química e Meio Ambiente.

cv - Coeficiente de variação.

DLS - Espalhamento de Luz Dinâmico.

DO - Densidade Ótica.

DP - Desvio Padrão.

dpf - Dias pós fertilização.

FETT - Fish Embryo Toxicity Test.

GA - Goma Arábica.

hpf - Horas pós fertilização.

IC50 - Índice de citotoxicidade (concentração da amostra que induz 50% de lise ou morte celular).

IPd - Índice de Polidispersão.

IPEN - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.

ISO - International Organization for Standardization.

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão.

NPAg - Nanopartículas de prata.

OECD - Organisation for Economic Cooperation and Development.

UV-Vis - Ultravioleta visível.

SUMÁRIO

		Página
1.	**INTRODUÇÃO**	**17**
2.	**OBJETIVOS**	**19**
2.1.	**Objetivos específicos**	**19**
3.	**REVISÃO DA LITERATURA**	**20**
3.1.	**Nanotecnologia**	**20**
3.1.1.	Nanotecnologia verde	**21**
3.1.1.1.	Goma Arábica (GA)	**22**
3.1.1.2.	Tri-Alanina	**24**
3.2.	**Nanopartículas de prata**	**24**
3.2.1.	Mecanismos de ação das NPAg	**25**
3.3.	**Ecotoxicologia**	**26**
3.3.1.	Ecotoxicologia aquática	**28**
3.3.2.	Ensaios Ecotoxicológicos	**29**
3.4.	**Organismos-teste**	**31**
3.4.1.	*Daphnia similis*	**31**
3.4.2.	*Danio rerio* (Zebrafish)	**33**
4.	**MATERIAIS E MÉTODOS**	**36**
4.1.	**Caracterização das NPAg**	**37**
4.1.1.	Caracterização por Espectroscopia de UV-Vis	**37**
4.1.2.	Caracterização por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	**38**
4.1.3.	Caracterização por Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)	**39**
4.1.4.	Caracterização por medidas do Potencial Zeta	**39**
4.2.	**Ensaio de citotoxicidade**	**40**
4.3.	**Ensaio de ecotoxicidade aguda com *Daphnia similis***	**42**
4.4.	**Ensaio de embriotoxicidade aguda com *Danio rerio***	**45**
5.	**RESULTADOS E DISCUSSÃO**	**49**
5.1.	**Caracterização da amostra**	**49**
5.1.1.	Caracterização por Espectroscopia de UV-Vis	**49**
5.1.2.	Caracterização por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	**50**
5.1.3.	Caracterização por Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)	**51**
5.1.4.	Caracterização por medidas do Potencial Zeta	**52**

5.2. **Ensaio de citotoxicidade**..... ..... **52**
5.2.1. Controles de Ga e Tri-Alanina..... **53**
5.2.2. Amostra 1 - 147 ppm - 25 nm..... **54**
5.2.3. Amostra 2 - 174 ppm - 75 nm..... **55**
5.3. **Ensaio de ecotoxicidade aguda com *Daphnia similis***..... **57**
5.3.1. Ensaio de sensibilidade..... **57**
5.3.2. Controles Ga e Tri-Alanina..... **58**
5.3.3. Amostra 1 - 147 ppm - 25 nm..... **59**
5.3.4. Amostra 2 - 174 ppm - 75 nm..... **62**
5.4. **Ensaio de embriotoxicidade aguda com *Danio rerio***..... **65**
5.4.1. Controles Ga e Tri-Alanina..... **65**
5.4.2. Amostra 1 - 147 ppm - 25 nm..... **67**
5.4.3. Amostra 2 - 174 ppm - 75 nm..... **71**
6. **CONCLUSÕES**..... **77**
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... **79**

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 µg 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 microscrustáceo 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, 2016).

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.

2. OBJETIVOS

Este estudo 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.

2.1. Objetivos específicos:

- Realizar o ensaio de citotoxicidade das NPAg para a obtenção da IC_{50};
- Realizar o ensaio de ecotoxicidade aguda para obter a CE_{50} das NPAg em *Daphnia similis*;
- Realizar o ensaio de embriotoxicidade aguda para obter a CL_{50} das NPAg em *Danio rerio*.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Nanotecnologia

O termo nanotecnologia foi proferido inicialmente em 1974 por Norio Taniguchi, pesquisador da Universidade de Tóquio no Japão, para descrever as tecnologias que permitem a construção de materiais na escala nanométrica (Borm *et al.*, 2006).

Para Miller *et al* (2005), a nanotecnologia compreende a investigação e desenvolvimento de materiais em nível molecular e atômico, dentro da escala nanométrica, de um a cem nanômetros. Porém, ainda há algumas divergências quanto a sua definição.

De acordo com a *Royal Society e Royal Academy of Engineering* (2004), a nanociência pode ser definida como: o estudo de fenômenos e manipulação de materiais em escalas atômicas, moleculares e macromoleculares, onde as propriedades diferem significativamente daquelas em escala maior; e a nanotecnologia pode ser definida como: o design, caracterização, produção e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas controlando forma e tamanho em escala nanométrica.

De modo geral, a nanotecnologia engloba um conjunto de técnicas com aplicações potenciais na maioria dos setores industriais existentes na atualidade (Bastos, 2006). É considerada uma ciência multidisciplinar e é muito utilizada por inúmeras áreas: biotecnologia, biologia molecular, medicina, eletrônica, indústria química, farmacêutica, entre outras (Lines, 2008). Acredita-se que a nanotecnologia tenha um profundo impacto na economia e na sociedade durante o século 21, talvez comparável à tecnologia da informação ou aos avanços na biologia celular e molecular (Bastos, 2006).

Uma das descobertas mais importantes da nanotecnologia foi o fato de que, em cada tamanho, um mesmo material pode apresentar características muito diferentes (Antunes *et al.*, 2013).

3.1.1. Nanotecnologia verde

Catástrofes ambientais frequentes, perda de biodiversidade ecológica e impactos a saúde humana incitaram a comunidade científica a avançar em direção a uma nova visão para o desenvolvimento de novas tecnologias (Kanchi e Ahmed, 2018).

A nanotecnologia verde é a vertente da nanotecnologia que tem como objetivo o desenvolvimento de protocolos para gerar produtos e processos de produção sustentáveis, a fim de minimizar a utilização de compostos tóxicos, bem como a diminuição de custos e o descarte apropriado dessas substâncias químicas. O intuito é diminuir os impactos ambientais gerados do processo de produção ao produto final, principalmente de nanopartículas metálicas, amplamente utilizadas atualmente. A essência da nanotecnologia verde tem como objetivo não causar, ou pelo menos minimizar os danos causados ao meio ambiente (Karn e Bergeson, 2009; Kanchi e Ahmed, 2018).

A síntese de nanopartículas metálicas é realizada por redução de um íon metálico. As metodologias convencionais empregadas para a síntese dessas nanopartículas, geralmente são métodos químicos em que há utilização de solventes tóxicos (hidrato de hidrazina, hidróxido de sódio, borohidreto de sódio, dimetilformamida e etilenoglicol), que podem ser adsorvidos na superfície das nanopartículas. Além disso, pode resultar na geração de subprodutos tóxicos e envolver elevado consumo de energia (Silva, 2014).

Devido a esses fatores, o príncípio da Nanotecnologia verde, parte da utilização de meios não perigosos e do desenvolvimento de novas técnicas de solubilização ambientalmente aceitáveis. Sendo assim, o uso de extratos vegetais é amplamente difundido nesse segmento (Mittal *et al.*, 2013; Thakkar *et al.*, 2010).

A utilização de extratos vegetais para a fabricação de nanopartículas metálicas é barato, reprodutível, facilmente escalável e ambientalmente seguro. Essas sínteses, conhecidas também como “Síntese Verde” ou “Biossíntese”, resultam em nanopartículas estáveis, com boa durabilidade e livres de contaminantes tóxicos, conforme necessário para cada área de aplicação. A síntese baseada em extratos de plantas pode fornecer nanopartículas de tamanho e morfologia controlados (Mittal *et al.*, 2013; Iravani, 2011).

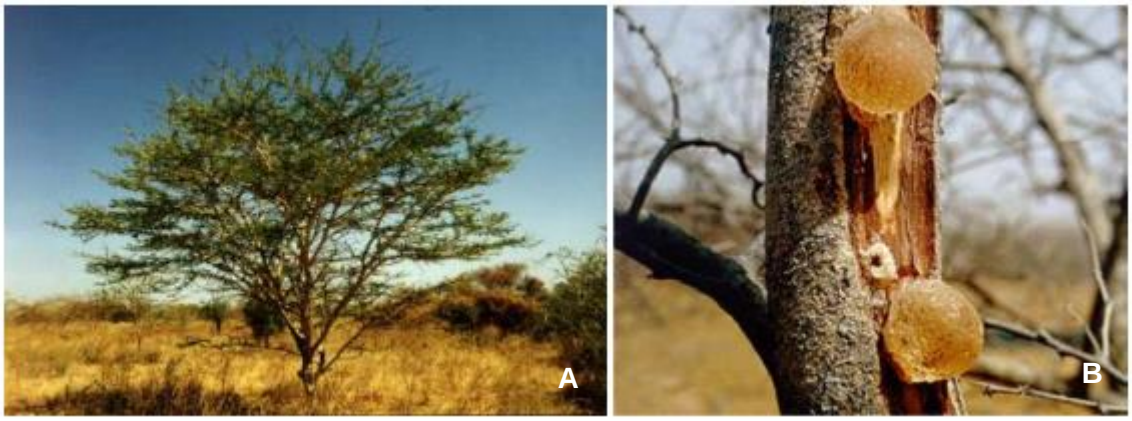
3.1.1.1. Goma Arábica (GA)

As gomas de plantas e árvores são produzidas por um processo conhecido como gomose, que consiste no produto da decomposição da celulose. Na área da nanotecnologia, as gomas vegetais são usadas como agentes redutores, estabilizadores, moldes, precursores, formadores de filme, encapsuladores, e durante a síntese e modificações pós-síntese, de nanopartículas e nanocompósitos. Também tem amplo uso industrial na área alimentícia e da saúde (Kanchi e Ahmed, 2018).

Dentre as gomas vegetais existe a Goma Arábica (GA), que é a mais antiga e conhecida de todas as gomas naturais. Seu uso pode ser rastreado até o terceiro milênio a.C., o tempo dos antigos egípcios. As primeiras frotas egípcias vendiam GA como um artigo de comércio, amplamente utilizado como aglutinante de pigmentos e adesivo em tintas para fazer hieróglifos. Em inscrições antigas se referem a GA como *kami* (Verbeken *et al.*, 2003).

De acordo com o *Joint Expert Committee for Food Additives* (JECFA), a GA é definida como: uma exsudação seca obtida das hastes de *Acácia senegal* ou espécies de acácia da família Leguminosae (Figura 1) (Ali *et al.,* 2008). É comumente cultivada nas regiões subsaarianas da África, Austrália, Índia e América do Sul (Mariod, 2018).

Figura 1 – (A) Árvore de *Acácia senegal* e (B) Exsudação seca proveniente das hastes de *Acácia senegal*.

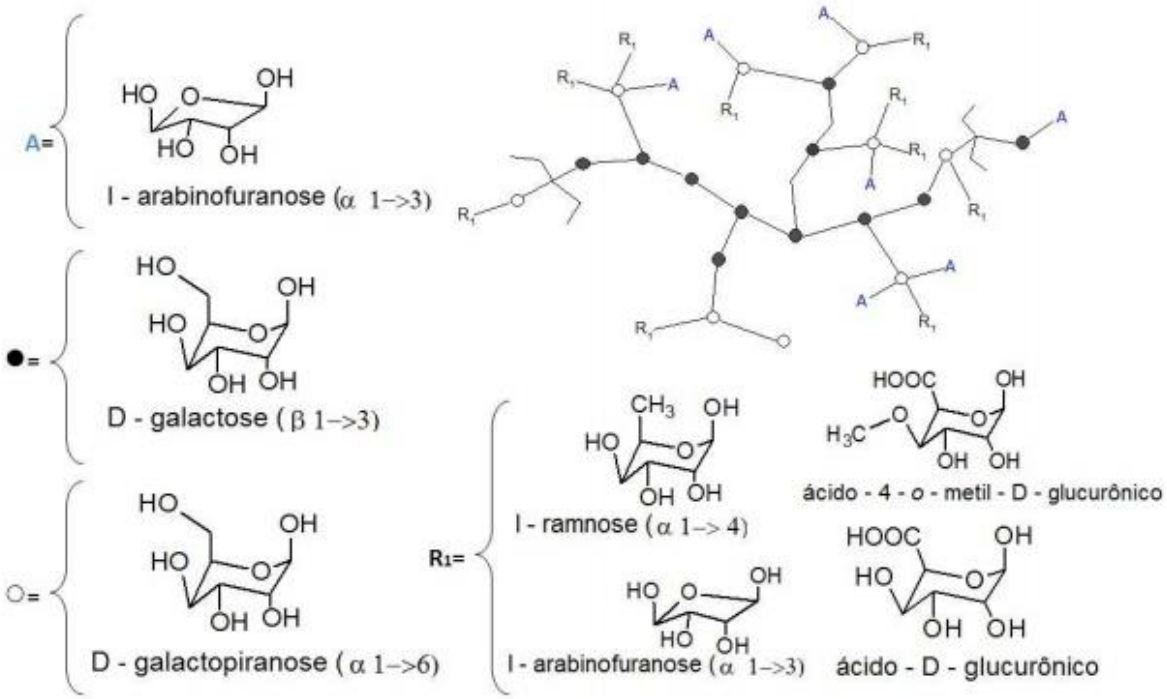


Fonte: Quintanilha, 2015.

A GA é um material altamente heterogêneo e de estrutura complexa. Quimicamente é descrita como uma combinação de sais de cálcio, potássio,

magnésio, oligômeros e polissacarídeos ramificados que contém arabinose, galactose, ramnose e ácidos urônicos e uma pequena fração de glico-proteínas. A composição química, bem como a estrutura da GA pode variar de acordo com a espécie de origem, idade da árvore, tempo de exsudação, tempo de armazenamento e condições climática. Contudo, de modo geral, em sua estrutura química (Figura 2), há três frações com diferentes teores protéicos e massas moleculares distintas: arabinogalactana (AG), complexo proteína-arabinogalactana (AGP) e glicoproteínas (GP) (Kattumuri *et al.*, 2007; Kanchi e Ahmed, 2018; Quintanilha, 2015).

Figura 2 - Estrutura química da GA e os principais grupos terminais e formadores da cadeia principal.



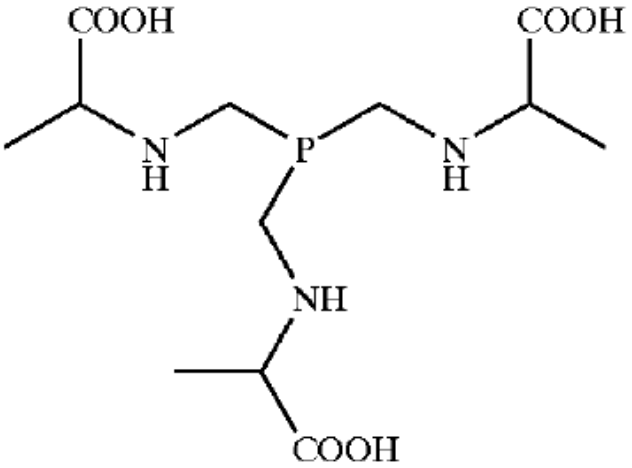
Fonte: Quintanilha, 2015.

As propriedades presentes na estrutura da GA, determinam sua capacidade de solubilidade, viscosidade e microencapsulação. Além de todos os atributos sensoriais e texturizantes, a GA possui excelente ação antioxidante, como por exemplo, a capacidade de eliminação de radicais livres, o que justifica sua ampla utilização na área da saúde (Mariod, 2018; Ali *et al.,* 2008).

3.1.1.2. Tri-Alanina

A Tri-Alanina ou Alanina Trimérica, é um composto desenvolvido pelos inventores Kattesh V. Katti, Douglas E. Volkert, Alan R. Ketring e Robert Churchill (Columbia - EUA), cuja patente está registrada no número 5,948,386 de 1999. A estrutura química da Tri-Alanina está representada na Figura 3.

Figura 3 - Estrutura química da Tri-Alanina.



Fonte: US 2006/004.5916A1.

Não foram encontrados dados na literatura quanto as propriedades e aplicações da Tri-Alanina. Mas os inventores Kannan Raghuraman e Kattesh K. Katti (Columbia - EUA), patentearam uma metodologia em que a Tri-Alanina é utilizada como agente redutor para a síntese de nanopartículas de prata (US 2006/004.5916A1).

3.2. Nanopartículas de prata

Os elementos metálicos (puros ou em combinação), possuem elétrons deslocalizados em sua estrutura e caracterizam-se pela alta condutividade elétrica e térmica, brilho, maleabilidade, ductibilidade e resistência mecânica (Zarbin, 2007).

As nanopartículas são formadas a partir de um determinado tamanho crítico, abaixo do qual, ao menos uma das propriedades do sólido *bulk* (sólido

macroscópico) passa a ser modificada. As nanopartículas metálicas destacam-se dentre os nanomateriais, pois abaixo desse tamanho crítico, suas propriedades (dentre elas, as propriedades ópticas) podem ser drasticamente modificadas, sendo que tais modificações são dependentes do seu tamanho, sua forma e ainda do meio em que se encontram (Kaucz, 2017).

As nanopartículas são diferentes de substâncias químicas tradicionais, ainda que apresentem a mesma composição, diferem devido ao tamanho da partícula, seu metabolismo e interação com o sítio de ação (Miller *et al.*, 2005). Estudos demonstraram que as partículas ultrafinas podem causar mais danos que as partículas maiores, na mesma concentração (Asharani *et al.*, 2008).

Dentre as nanopartículas, encontram-se as NPAg que possuem excelente atividade antimicrobiana, boa condutividade, elevado efeito catalítico e alta área superficial. Podem ser empregadas para reduzir infecções, prevenir a colonização bacteriana em superfícies de prótese, em cateteres e em materiais odontológicos (Berni Neto, Ribeiro e Zucolotto, 2008). Devido a todas essas propriedades as NPAg são utilizadas em diversos setores da indústria, porém pouco sabe-se sobre sua bioatividade, biodistribuição e seus impactos ao meio ambiente e a saúde humana (Asharani *et al.*, 2008).

As NPAg podem ser liberadas ao meio ambiente de diversas formas, durante sua síntese, fabricação, utilização e processo de reciclagem de materiais que as contenham em sua composição (Mathias *et al.*, 2014). 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 µg L^{-1} em águas não tratadas, e seus efeitos nos organismos aquáticos são pouco elucidados (Nogueira *et al.*, 2013; Wal, 2010; Souza *et al.*, 2013).

3.2.1. Mecanismos de ação das NPAg

Na literatura há vários relatos sobre os possíveis mecanismos de ação das NPAg em sistemas biológicos. De acordo com Asharani *et al.* (2009), que avaliou a toxicidade das NPAg utilizando fibroblastos de pulmão humano e células de glioblastoma humano, a presença de NPAg no núcleo e na mitocôndria indicou a

ruptura da cadeia respiratória mitocondrial originando espécies reativas de oxigênio (ROS) e bloqueio da síntese de ATP causando dano ao DNA. Huh e Kwon (2011), sugerem que quando as NPAg entram em contato com microorganismos, ocorre a produção de ROS, ruptura da membrana celular, dano mitocondrial e dano ao DNA.

Estudos realizados indicaram que as nanopartículas podem causar efeitos adversos a saúde humana, como efeitos tóxicos no tecido celular, subcelular e níveis biomoleculares, como genes e proteínas, contudo as relações diretas de causa-efeito ainda estão pouco elucidadas (Pan *et al.*, 2007).

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).

3.3. Ecotoxicologia

A toxicologia é o estudo dos efeitos adversos de agentes químicos ou físicos em organismos vivos, e é capaz de examinar e comunicar a natureza desses efeitos na saúde humana, animal e ambiental (Casarret e Doll's, 2008). A ecotoxicologia é considerada uma subdivisão da toxicologia ambiental (Costa *et al.*, 2008).

O termo ecotoxicologia foi sugerido pela primeira vez por René Truhaut, em junho de 1969, na reunião do Committe of the International Council of Scientific Unions (ICSU), em Estocolmo (Truhaut, 1977). Agrupando a designação eco (do

grego *oikos*, elemento de composição com o significado de casa, domicílio, habitat: ecologia) e a palavra toxicologia (ciência dos agentes tóxicos, dos venenos e da intoxicação) (Azevedo e Chasin, 2003).

A partir deste evento, o conceito foi muito discutido, e em 1976 definiu-se ecotoxicologia como sendo: a ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem num contexto integrado (Plaa, 1982; Cairns e Niederlehner, 1995).

Segundo SCOPE (1978), a ecotoxicologia é a ciência que estuda os efeitos ocasionados por agentes químicos e físicos nos organismos vivos, principalmente sobre a dinâmica de populações e comunidades, integrantes de ecossistemas definidos. É considerada multidisciplinar, envolvendo as áreas da física, química e biologia (Costa *et al.*, 2008).

O estudo da ecotoxicologia parte do princípio que a sobrevivência humana depende do bem estar de outras espécies, e que os agentes químicos podem causar efeitos nocivos em organismos vivos e em processos ecológicos (Yu *et al.*, 2005).

De acordo com Brentano (2006), os objetivos da ecotoxicologia são: avaliar a toxicidade de poluentes "*in situ*" e "*ex situ*", compreender os mecanismos de ação de substâncias tóxicas e avaliar o risco que os agentes químicos apresentam para os ecossistemas.

Consideram-se os pilares da ecotoxicologia, a regulamentação e a pesquisa. A regulamentação garante testes padronizados que são rápidos e econômicos, com resultados que podem ter inúmeras aplicações. Por outro lado, a pesquisa revela a importância de se obter mais informações sobre as interações entre organismos, processos fisiológicos, fatores ambientais e múltiplas substâncias químicas antropogênicas (Yu *et al.*, 2005).

Na Década de 70, a pressão da opinião pública sobre as indústrias potencialmente poluidoras permitiu o avanço na área da ecotoxicologia, pois as agências de proteção ambiental, principalmente na Europa e nos Estados Unidos começaram a desenvolver os primeiros protocolos padronizados de testes de toxicidade, utilizando espécies nativas daquelas regiões (Magalhães e Ferrão Filho, 2008).

Nas décadas de 70 e 80, testes de ecotoxicidade foram desenvolvidos no Brasil, contudo, essa área de estudo se consolidou na década de 90 com a elaboração de procedimentos e normas técnicas (Abessa, 2002). Em 1975 ocorreu a primeira tentativa em termos de metodologia, em um programa de padronização de testes de toxicidade aguda com peixes, conduzido pelo Comitê Técnico de Qualidade das Águas da International Organization for Standarctization (ISO), com a participação da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), a convite da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) (Veiga e Vital, 2002; Zagatto e Bertoletti, 2006).

Atualmente, os ensaios de toxicidade e estudos de monitoramento são utilizados com a finalidade de avaliar e conhecer os efeitos da introdução direta e/ou indireta de compostos químicos no meio ambiente (Martini, 2013).

3.3.1. Ecotoxicologia aquática

A água é um elemento essencial para a sobrevivência, porém os ecossistemas aquáticos tem sofrido alterações significativas em função de diversos impactos ambientais advindos de atividades antrópicas, tais como derrames acidentais de lixos químicos; lançamentos de efluentes domésticos e industriais não tratados; construção de barragens e represas; mineração; retilinização e desvio do curso natural de rios; desmatamento e uso inadequado do solo em regiões ripárias e planícies de inundação; superexploração de recursos pesqueiros; introdução de espécies exóticas, entre outros (Goulart e Callisto, 2003).

O ambiente aquático compreende vários tipos de ecossistemas: rios, lagos, estuários, mares e oceanos; tais ecossistemas são altamente complexos, abertos e dinâmicos, portanto sofrem modificações contínuas na sua composição química. Esses ambientes são produtos dinâmicos de interações complexas entre os componentes bióticos e abióticos característicos de cada um deles (Costa *et al.*, 2008).

A toxicidade de uma substância química depende das propriedades (fisico-químicas), concentração e tempo de exposição à que o organismo é submetido. Os efeitos tóxicos causados pela exposição à diversos contaminantes pode se manifestar em diferentes níveis de organização biológica, desde estruturas

celulares até populações e comunidades. Deste modo, a vulnerabilidade do ambiente aquático depende das propriedades físicas e químicas do composto, de sua concentração e das características físicas e químicas do ecossistema (Rand *et al.*, 1995).

Os organismos aquáticos podem ser expostos aos agentes químicos presentes na água e nos sedimentos. A bioacumulação, resultante do acúmulo dos poluentes nos tecidos dos organismos vivos, quando não metabolizados ou excretados, pode contribuir para o processo de biomagnificação, onde este acúmulo é transmitido para o nível superior da cadeia trófica (Baptista *et al.*, 2001).

A ecotoxicologia aquática avalia os efeitos de substâncias químicas sobre os organismos representativos do ecossistema aquático. Engloba o transporte, a distribuição, a transformação e o destino final dos contaminantes no ambiente aquático (Costa *et al.*, 2008).

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).

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 (Costa *et al.*, 2008; Zagatto e Bertoletti, 2006).

3.3.2. Ensaios Ecotoxicológicos

A utilização de ensaios ecotoxicológicos integra os conceitos da ecologia, na diversidade e representatividade dos organismos e seu significado ecológico, e da toxicologia, em relação aos efeitos adversos dos poluentes sobre comunidades biológicas (Plaa, 1982).

De acordo com Abessa (2002), a utilização dos ensaios ecotoxicológicos apresenta diversas finalidades, dentre as quais destacam-se:

- O conhecimento da qualidade de águas, sedimentos, solo e ar;
- Os fins de regulação e a definição de limites máximos permissíveis para o lançamento de efluentes e substâncias químicas;
- As estimativas do efeito de descargas de contaminantes sobre as populações naturais;
- A definição de áreas críticas;
- Análises de risco ecológico;
- Como integrantes em programas de monitoramento ambiental;
- A detecção dos primeiros sinais de impacto devido a compostos químicos ("early warning");
- O fornecimento do significado biológico para dados de contaminação.

Atualmente, os ensaios de toxicidade e estudos de monitoramento ambiental tem sido amplamente utilizados com a finalidade de se avaliar e conhecer os efeitos da introdução direta e/ou indireta de compostos químicos emergentes no meio ambiente.

Os ensaios ecotoxicológicos podem ser classificados de acordo com o método de adicionar a solução-teste (sistema estático, semi-estático e de fluxo contínuo), propósito (teste de composto isolado; monitoramento da qualidade de efluente; toxicidade relativa; sabor ou odor; taxa de crescimento; entre outros) e duração (agudo, sub-crônico ou crônico) (Rubinger, 2009).

O ensaio de toxicidade aguda pode ser esclarecido como aquele que avalia as respostas rápidas e severas dos organismos aquáticos a um estímulo que se manifesta geralmente por agentes químicos ou amostras ambientais num intervalo de 0 a 96 horas, o efeito observado na maioria dos casos, para peixes é a letalidade e para invertebrados a imobilidade, ou outras manifestações do organismo que as anteceda (Zagatto e Bertoletti, 2006).

3.4. Organismos-teste

Para a escolha do organismo-teste é indispensável que o mesmo apresente sensibilidade a diversos agentes químicos, e que sua sensibilidade seja constante. É de extrema importância entender sobre a biologia da espécie a ser utilizada, como hábitos alimentares, reprodução, fisiologia e comportamento. Os organismos de pequeno porte e ciclo de vida não muito longo, são ideais aos ensaios ecotoxicológicos (Domingues e Bertoletti, 2006; Rand e Petroceli, 1985).

Para Zagatto e Bertoletti (2006), os critérios mais importantes para a escolha do organismo-teste, é sobre tudo, as boas experiências de seu manuseio e a sua relevância na cadeia alimentar, bem como a sua ampla disseminação e fácil disponibilidade.

Os organismos utilizados em ensaios de toxicidade podem ser obtidos através de produtores especializados, coletados em ambientes naturais ou cultivados em laboratório (Domingues e Bertoletti, 2006).

Nos ensaios de toxicidade é recomendado a utilização de organismos de três níveis tróficos diferentes, porém, por razões práticas e econômicas, em grande parte os ensaios de ecotoxicidade são realizados com uma única espécie de organismo-teste (Ribo, 1997).

3.4.1. *Daphnia similis*

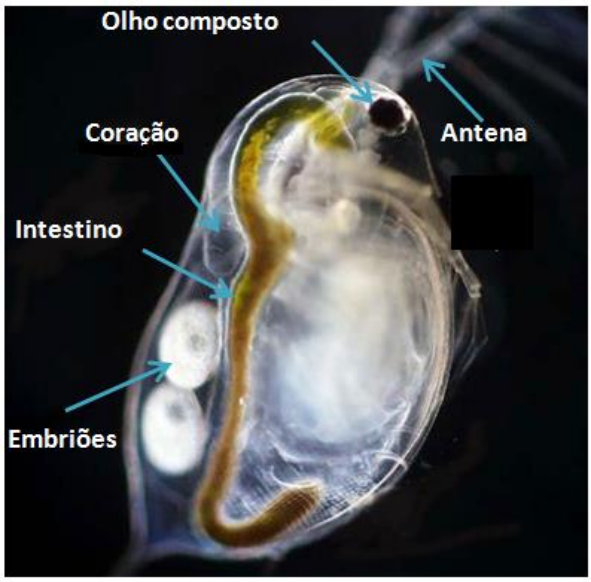
A importância da utilização de invertebrados em estudos de monitoramento ambiental se dá pelo fato de que essas espécies constituem 95% do total de espécies viventes no planeta. Estão presentes em praticamente todos os ecossistemas e encontram-se em grande abundância populacional (Fossi *et al.*, 1998).

Os cladóceros são microcrustáceos planctônicos que pertencem à Ordem Cladocera, do Filo Crustacea e são vulgarmente conhecidos como pulgas d'água. Atuam como consumidor primário na cadeia alimentar aquática e se alimentam por filtração de material orgânico particulado em suspensão e microalgas. Apresentam em sua morfologia, pernas torácicas compostas por cerdas que agem como

peneiras, retendo algas, bactérias e pequenas partículas de matéria orgânica provenientes da água (Buikema e Sherberger, 1977).

Dentre os organismos de água doce, estão os cladóceros do gênero Daphnia: *D. magna*, *D. pulex* e *D. similis*. A *Daphnia similis* (Figura 4), apresenta comprimento máximo de 3,5mm e possuem ampla distribuição na América do Norte (Burton *et al.*, 2002; ABNT, 2016).

Figura 4 - *Daphnia similis*



Fonte: Adaptado de http://petecologiaufrpe.blogspot.com.br./2013/02/artigo-o-uso-do-bioindicador-daphnia.

Os Daphnídeos se reproduzem por partenogênese (reprodução assexuada), dando origem a populações constituídas inteiramente por fêmeas. O que garante a obtenção de indivíduos geneticamente idênticos, resultando em organismos-teste com sensibilidade constante. Estes organismos encontram-se amplamente distribuídos nos corpos d'água doce, sendo fonte significativa de alimento para peixes e importantes em muitas cadeias alimentares. São organismos facilmente cultivados em laboratório, sensíveis a vários contaminantes do ambiente aquático e devido ao seu tamanho reduzido, necessitam de menores volumes de amostras-teste e água de diluição (Domingues e Bertoletti, 2006; Costa *et al.*, 2008).

3.4.2. *Danio rerio* (Zebrafish)

Os peixes são utilizados como bioindicadores por terem um bom desenvolvimento em cultivos laboratoriais e por serem de fácil observação. Os ensaios que utilizam peixes, tem por objetivo compreender como um agente tóxico afeta organismos de maior grau de estruturação como os vertebrados (Zagatto e Bertoletti, 2006; Rubinger, 2009).

Os peixes são animais muito sensíveis a alterações ambientais. A espécie *Danio rerio* (Figura 5), apresenta grande sensibilidade quando exposta a produtos químicos, por absorver rapidamente os compostos que são diretamente adicionados na água e acumulá-los em vários tecidos (Albinati *et al.*, 2009; Sant'anna, 2009).

Figura 5 - *Danio rerio* adulto: (A) Fêmea e (B) Macho.

Fonte: https://green-chapter-shop.myshopify.com/products/danio-rerio-zebra-danio

O *Danio rerio* é popularmente conhecido como *zebrafish* ou paulistinha. Originário ao redor das bacias dos rios Ganges e Brahmaputra no nordeste da Índia, Bangladesh e Nepal. Foi inicialmente descrito como habitando corpos d'água lóticos, córregos e valas, particularmente adjacente aos campos de arroz (Sterba, 1962; Jayaram, 1999).

Trata-se de um peixe teleósteo pertencente à classe dos ciprinídeos. É omnívoro, consome diversos crustáceos bentônicos e plânctônicos e é resistente a uma grande variação de temperatura, porém, em laboratório é recomendado que seja mantido em temperaturas entre 24°C e 30°C (Santos, 2012). Não é necessário um grande espaço para o manejo e criação, e já que vivem em cardumes na

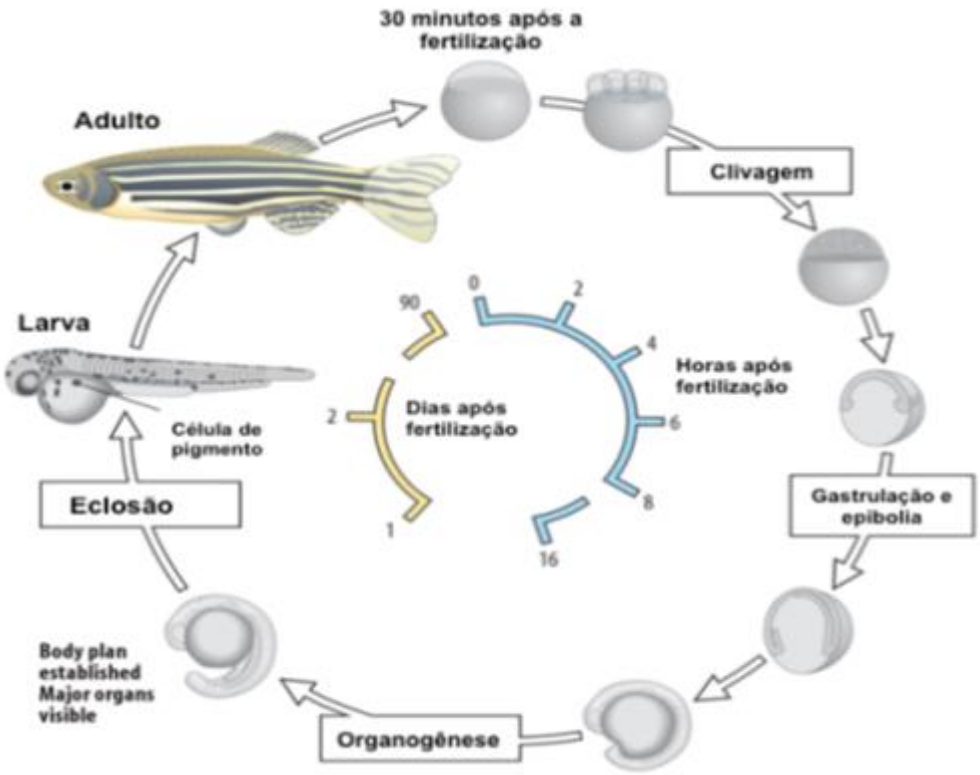
natureza, em condições laboratoriais podem ser cultivados em grande número em um mesmo aquário (Schneider *et al.*, 2009).

Dentre os diversos atributos do *zebrafish* que o torna uma espécie modelo para utilização em pesquisas científicas, inclui-se sua natureza robusta e social, taxas de crescimento rápidas, alta reprodutividade durante o ano todo, embriões transparentes e genoma estabelecido (Lawrence, 2007; Spence e Smith, 2005).

De acordo com Grunwald e Eisen (2002), o Danio rerio é um importante modelo animal nas áreas de genética, biologia de desenvolvimento e biomedicina (Grunwald e Eisen, 2002). Este modelo pode ser utilizado para prever efeitos de toxicidade em humanos, já que apresenta 70% de homologia ao nosso DNA, bem como semelhanças fisiológicas e anatômicas, incluindo células endoteliais, presença de barreira hematoencefálica e respostas imunogênicas (Zhang et al., 2003; Hill et al., 2005; Bar-llan et al., 2009).

Em comparação com outras espécies de peixe, o *Danio rerio* atinge a maturidade sexual em três meses de vida e podem produzir de 200 a 300 ovos por desova. Como a fecundação é externa, o córion transparente e relativamente grande (0,5mm - 0,7mm), é possível acompanhar o desenvolvimento do embrião utilizando um estereomicroscópio simples. Os precursores de todos os órgãos já estão presentes 36 horas após a fertilização (hpf). As larvas eclodem entre 48 e 72 hpf e no quinto dia após a fertilização (dpf), a maioria dos tecidos já estão desenvolvidos (Kimmel *et al.*, 1995; Silveira, 2012). Na Figura 6, apresenta-se o ciclo de vida do *Danio rerio*.

Figura 6 - Ciclo de vida do *Danio rerio*. O desenvolvimento do *Danio rerio* ocorre de forma rápida: a clivagem, gastrulação e organogênese ocorrem em 24 hpf. Após 48 e 72 hpf, as larvas eclodem apresentando células de pigmentação. Posteriormente a fase juvenil, torna-se adulto 90 dias hpf.

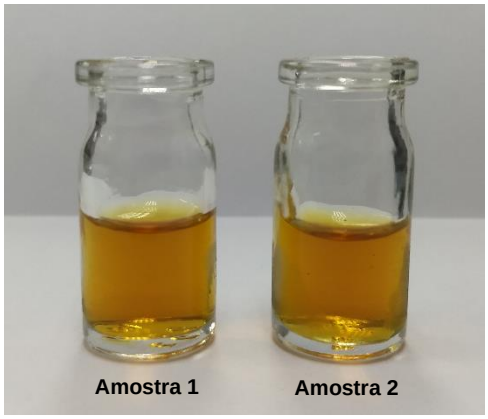


Fonte: Rezende, 2013.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

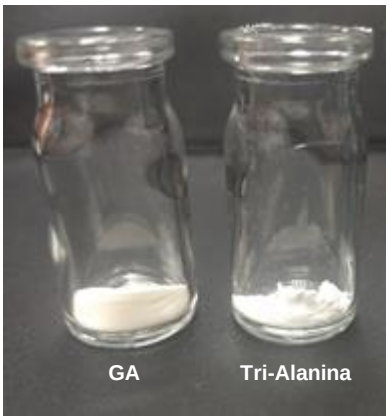
Foram estudadas duas amostras de NPAg (Figura 7), sendo a Amostra 1: NPAg na concentração de 147 ppm, com tamanho aproximado de 25 nm; e Amostra 2: NPAg na concentração de 174 ppm com tamanho aproximado de 75 nm, ambas estabilizadas com GA e reduzidas com Tri-Alanina (Figura 8).

Figura 7 - Amostras de NPAg.



Fonte: Joana da S. Maziero

Figura 8 - Amostras do agente estabilizante (GA), e do agente redutor (Tri-Alanina).



Fonte: Joana da S. Maziero

As soluções de NPAg e os controles da GA e Tri-Alanina foram fornecidas pela empresa indiana *Dhanvantari Nano Ayushadi Private Limited (DNA)*.

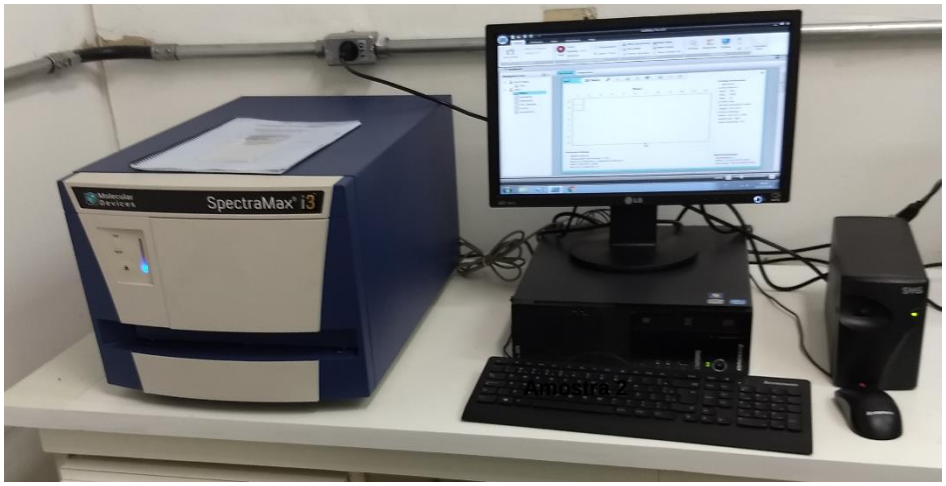
4.1. Caracterização das NPAg

A caracterização das nanopartículas metálicas, nos fornecem informações quanto a estrutura, tamanho, dispersão, estado de oxidação e estabilidade dos elementos contidos na amostra (WHITE *et al*, 2009). Os esclarecimentos dessas informações foram fundamentais para uma análise mais efetiva dos resultados de toxicidade das amostras estudadas.

4.1.1. Caracterização por Espectroscopia de UV-Vis

As análises por espectrofotometria de UV-Vis das soluções de NPAg, foram realizadas no Laboratório de Biomateriais Poliméricos e Nanotécnicos do Centro de Química e Meio Ambiente (CQMA), do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP), espectrofotômetro modelo Spectramax i3 (Molecular Devices, EUA), (Figura 9), comprimento de onda entre 230 e 900 nm.

Figura 9 - Leitura de UV-Vis em espectrofotômetro Spectramax i3.



Fonte: Joana da S. Maziero

Nos elementos metálicos, a oscilação do plasma é a excitação coletiva de um gás formado pelos elétrons de condução. Ao propagar-se em estruturas nanométricas, esta onda de excitação possui uma frequência que depende da geometria e do tamanho destas partículas, sendo denominada de superfície *plasmon*. Medidas de absorção de luz pelo *plasmon* de nanopartículas metálicas

podem ser obtidas nas regiões do ultravioleta visível e infravermelho próximo. Alterações no tamanho das partículas, resultam no deslocamento da banda *plasmon* de superfície do metal, ou seja, se o tamanho das nanopartículas aumenta, o *plasmon* se desloca para a região espectral de maior comprimento de onda (Bechtold, 2011; Perkampus, 2013).

Com base nessas informações, esta análise foi realizada para verificar a presença de nanopartículas de prata nas amostras, e também para acompanhar sua estabilidade.

4.1.2. Caracterização por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para analisar a morfologia e determinar o tamanho das nanopartículas, as amostras foram analisadas por Microscopia de Transmissão Eletrônica (MET), no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Ciências Biomédicas (USP-SP), utilizando o microscópio FEI modelo Tecnai G20 200 kV.

Para a preparação das amostras foram utilizadas grades de cobre de 400 *mesh,* cobertas por uma fina camada de filme de carbono contínuo (Ted Pella, Inc., EUA). Nas quais, foram aplicadas uma carga negativa de 15 mA, durante 25 s, utilizando o equipamento Glow-descharge (PELCO easiGlow^{TM}). Após aplicado a carga, foi depositado 3 µL de cada amostra. Decorrido 1 min, foi retirado o excesso de amostra utilizando um papel filtro e a grade foi lavada 3 vezes com água de osmose reversa.

O princípio da técnica utilizada no MET, consiste na irradiação de um feixe de elétrons de densidade de corrente uniforme, na superfície de uma amostra fina. O feixe de elétrons é gerado por um canhão de elétrons através da emissão termiônica (aquecimento de um filamento, que pode ser de tungstênio ou hexaboreto de lantânio) ou emissão de campo (pontas de filamento de tungstênio). Os elétrons interagem fortemente com os átomos através de espelhamentos elásticos e inelásticos. Por forças coulômbicas, ocorrem os espelhamentos elásticos, que são os mais importantes dentre as interações que criam o contraste na imagem do MET. Por fim, as lentes produzem uma imagem ampliada ou um padrão de eletrodifração da amostra em uma tela de visualização, ou sistema de

câmera. A resolução espacial da imagem depende muito da qualidade e do design dessas lentes (Otubo, 2005; Egerton, 2005).

4.1.3. Caracterização por Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

Como análise complementar, foi realizado o Espalhamento de Luz Dinâmico (*Dynamic Light Scattering - DSL*), para determinar o tamanho médio das nanopartículas. Esta análise foi realizada no Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, utilizando o equipamento Zetasizer, Nano - ZS (Malvern Intruments, EUA).

Esta análise é realizada com base na taxa de difusão das partículas através do fluido. A amostra é iluminada por um feixe de luz a 90° com comprimento de onda igual a 532 nm, que se espalha pelas partículas e então é captada por um cabo de fibra ótica que se encontra em um determinado ângulo, desta forma é transmitida para o tubo fotomultiplicador e pulso amplificador /discriminador, onde ocorre a transformação para um sinal elétrico (Bechtold, 2011; Berne e Pecora, 2000).

A intensidade da dispersão da luz é proporcional ao tamanho da partícula. O equipamento calcula o diâmetro da nanopartícula de acordo com o movimento browniano, que é o movimento aleatório de partículas suspensas em um fluido, resultante de sua colisão com átomos ou moléculas rápidas no líquido.

4.1.4. Caracterização por medidas do Potencial Zeta

Essa análise também foi realizada no Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, utilizando o equipamento Zetasizer, Nano - ZS (Malvern Intruments, EUA).

Muitas das propriedades importantes dos sistemas coloidais são determinadas direta ou indiretamente pela carga elétrica (ou potencial) das partículas. O potencial zeta é uma propriedade física característica de partículas em suspensão. O esclarecimento de sua magnitude, permite determinar a estabilidade de suspensões ou emulsões coloidais. A estabilidade do colóide

depende do seu potencial total, que é a soma do potencial do solvente, da atração e do potencial repulsivo, ou seja, da adsorção de íons. Sendo assim, a medição do potencial zeta se dá, pela aplicação de um campo elétrico na dispersão (Hunter, 2013; Bechtold, 2011).

4.2. Ensaio de citotoxicidade

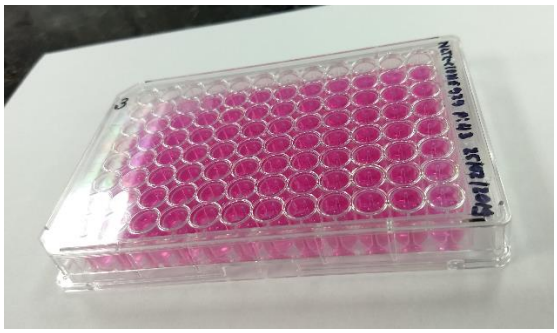
Com o propósito de minimizar a utilização de organismos nos testes *in vivo*, os ensaios de citotoxicidade (*in vitro)* foram realizados como ferramenta auxiliar para verificação da toxicidade.

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados com base na norma ISO 10993-5 (1999), para determinação do índice de citotoxicidade, que é a concentração da amostra que induz 50% de lise ou morte celular (IC_{50}). As microplacas utilizadas para os ensaios foram preparadas e cedidas pelo Núcleo de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz e os ensaios foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Química e Meio Ambiente (CQMA), do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP).

Foram utilizadas células fibroblásticas da linhagem NCTC-clone 929 (CCIAL 020), de tecido conectivo de camundongo, 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).

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 μL da suspensão foram distribuídos em cada poço da microplaca de 96 poços (Figura 10), e a placa foi mantida em incubadora úmida a 37ºC e atmosfera com 5% CO_2 por cerca de 24h, para atingir a confluência desejada.

Figura 10 - Microplacas de 96 poços.

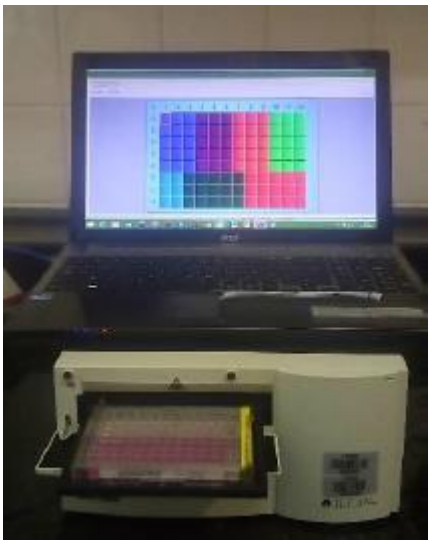


Fonte: Joana da S. Maziero

Foi utilizada a alumina como controle negativo e o látex de borracha natural como controle positivo. Os extratos dos controles, assim como as soluções das NPAg foram submetidos à diluição seriada com MEM-uso obtendo-se concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25%. No ensaio propriamente dito, foram depositados 200 μL de cada diluição, em triplicata, tanto das nanopartículas como dos controles, em cada poço da microplaca.

A placa foi mantida em estufa úmida a 37ºC e atmosfera com 5% CO_2 por 24h. Decorrido este período os meios foram trocados por solução de vermelho neutro em MEM-uso 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% $CaCl_2$ em formaldeído 0,5%) e em seguida foram adicionadas em cada poço 200 μL 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 (Figura 11).

Figura 11 - Leitura das DOs em espectrofotômetro leitor tipo *ELISA*.



Fonte: Cavalcante, 2017.

Este ensaio serviu como base para a determinação das concentrações das NPAg para a realização dos ensaios de ecotoxicidade aguda com *Daphnia similis*. Considerando que este organismo é aproximadamente 1000x mais sensível que as células em cultura (Maziero *et al*, 2016).

4.3. Ensaio de ecotoxicidade aguda com *Daphnia similis*

Os ensaios de ecotoxicidade aguda foram realizados baseados na norma ABNT NBR 12713 (2016), para determinação da concentração efetiva que causa imobilidade a 50% dos organismos expostos (CE_{50}), das NPAg. Os organismos foram cultivados e mantidos no Laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Química e Meio Ambiente (CQMA), do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP), de acordo com a mesma norma.

Os organismos foram cultivados em béqueres de 500 mL, em incubadora com temperatura controlada de 20 ± 2ºC, com fotoperíodo de 16 horas-luz e luminosidade difusa. A água utilizada tanto para os cultivos quanto para as diluições nos testes, foi o Meio MS, com dureza ajustada entre 40 e 48 mg L^{-1} de $CaCO_3$ e pH na faixa de 7,0 - 7,6. A alga utilizada como alimento foi a *Pseudokirchneriella subcapitata*, uma alga clorofícea, unicelular, administrada diariamente na concentração de 1 a 5 x 10^6 células por organismo. Para a alimentação

complementar foi utilizado uma solução à base de ração para peixe da marca *Tetramin*, fornecida 3 vezes por semana na concentração de 0,02 mL de alimento por organismo.

Nos ensaios definitivos, conforme sugerido pela ABNT NBR 12713, optou-se pelo fator de diluição de 2, tendo as seguintes concentrações: Amostra 1: 1; 2; 4; 8 e 16 µg L^{-1}; e Amostra 2: 3,125; 6,25; 12,50; 25 e 50 µg L^{-1}.

As soluções-teste foram preparadas no momento da realização do ensaio, a partir da solução-estoque de 100 µg L^{-1} para Amostra 1 e 174 µg L^{-1} para Amostra 2. 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 em triplicata, e os organismos na fase neonatal (de 6 a 24 horas), foram expostos aos controles (Meio MS, GA, KP1 e KP2) e as concentrações de NPAg, por 48 horas. A exposição (Figura 12), ocorreu em 4 réplicas para cada concentração, contendo 10 mL de solução, com 5 organismos por réplica, totalizando 20 organismos por concentração.

Figura 12 - Ensaio de ecotoxicidade aguda com *Daphnia similis*.

Fonte: Joana da S. Maziero

Os organismos foram mantidos a temperatura de 20 ± 2ºC, com luminosidade difusa e fotoperíodo de 16 horas de luz. Os parâmetros como condutividade (Condut.), concentração de oxigênio dissolvido (OD) e pH foram verificados previamente e ao término dos ensaios.

Na Tabela 1 estão descritas as condições gerais dos ensaios de ecotoxicidade aguda com *Daphnia similis*.

Tabela 1 - Resumo dos requisitos para o ensaio de ecotoxicidade aguda com *Daphnia similis*.

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	CE_{50}

Fonte: Adaptado de ABNT NBR 12713, 2016.

No final do período de exposição, com base no número de organismos imóveis em função da concentração das NPAg, foi calculada a CE_{50} usando o programa *Trimmed Spearman-Karber* (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 diluiçoes nas concentraçoes de 1; 2; 2,5; 3 e 4 g L^{-1}. Os resultados de CE_{50} obtidos, foram inseridos na carta-controle, que consiste em um gráfico contendo a média da CE50 ± 2 DP.

4.4. Ensaio de embriotoxicidade aguda com *Danio rerio*

Os ensaios de embriotoxicidade aguda foram realizados baseados na norma OECD nº 236, 2013 (Guideline on Fish Embryo Toxicity Test - FETT), para determinação da concentração letal que causa mortalidade a 50% dos organismos expostos (CL_{50}), das NPAg. Os embriões do peixe *Danio rerio*, foram cedidos pelo Laboratório de Ecotoxicologia da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) e depois transportados para o Laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Química e Meio Ambiente (CQMA), do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP), onde os ensaios foram realizados.

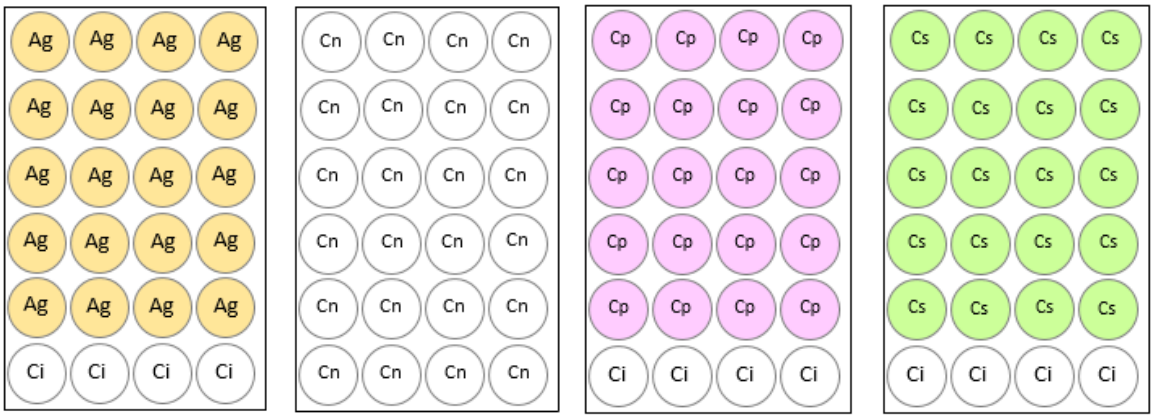
Neste ensaio, os ovos recém-fertilizados do *Danio rerio* foram expostos a diferentes concentrações das amostras de NPAg e aos controles negativo (Meio MS), positivo ($ZnCl_2$), GA e Tri-Alanina. Primeiramente foram realizados 2 ensaios preliminares, onde constatou-se que a concentração que causou mortalidade a 100% dos organismos, para Amostra 1 foi 1250 µg L^{-1} e para Amostra 2, foi 2500 µg L^{-1}.

Com base nesses resultados, para os ensaios definitivos foram utilizadas as seguintes concentrações: para a Amostra 1: 78; 156; 312,5; 625 e 1250 µg L^{-1}; e para Amostra 2: 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 as Amostras 1 e 2. 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 (Figura 13). 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 25ºC, por 96 horas.

Figura 13 - Modelo esquemático da disposição das microplacas de 24 poços.



Ag = Concentrações das NPAg (5); Ci = Controle interno da placa (Meio MS); Cn = Controle negativo (Meio MS); Cp = Controle positivo ($ZnCl_2$); Cs = Controle solvente (GA e Tri-Alanina).
Fonte: Adaptado de OECD 236, 2013.

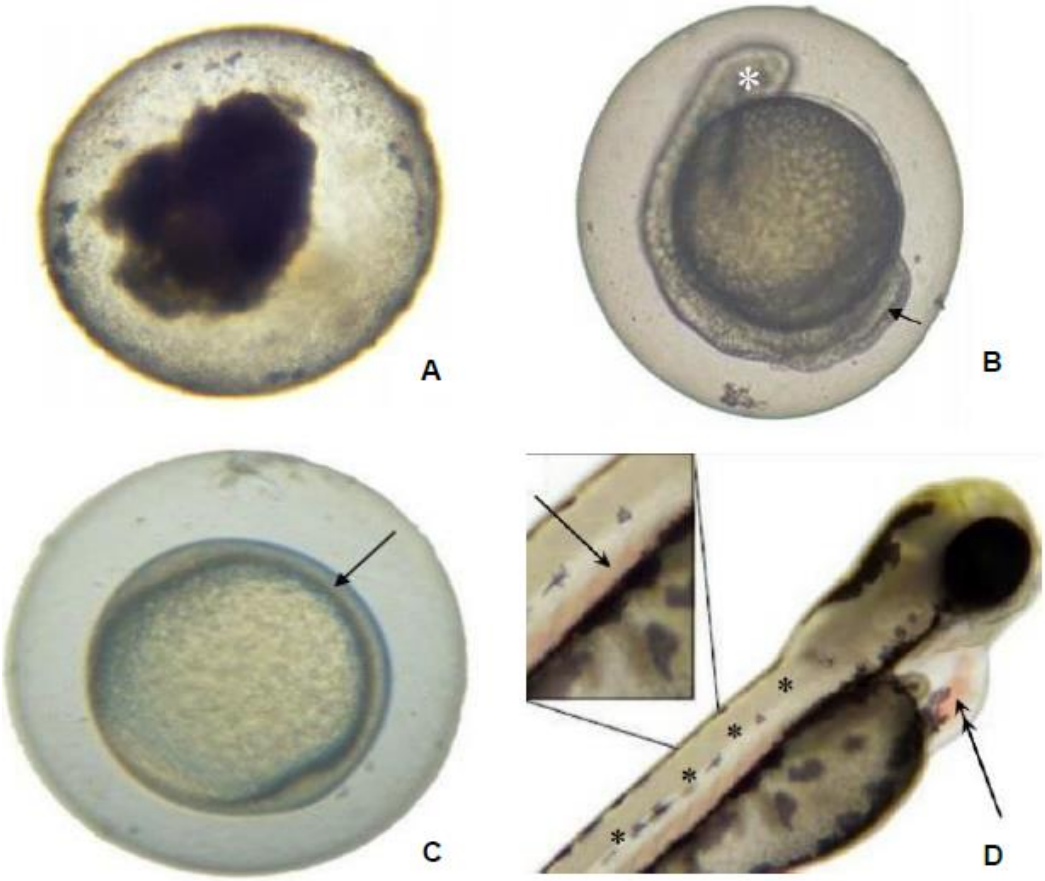
Os ensaios foram realizados em triplicata para cada amostra, com 40 organismos por concentração (Figura 14).

Figura 14 - Ensaio de embriotoxicidade aguda com *Danio rerio*.

Fonte: Joana da S. Maziero

A leitura das microplacas foi realizada em microscópio invertido Olympus CK40. 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 (Figura 15).

Figura 15 - Indicadores de letalidade: (A) Ovo coagulado; (B) Não desprendimento da cauda; (C) Ausência de formação de somitos; (D) Ausência de batimentos cardíacos.



Fonte: Adaptado de OECD 236, 2013.

Ao término do ensaio, os valores positivos de letalidade, foram inseridos no programa *Trimmed Spearman-Karber*, para obtençao da CL_{50}. Na Tabela 2, estão descritas as condições gerais dos ensaios de embriotoxicidade aguda.

Tabela 2 - Resumo dos requisitos para o ensaio de embriotoxicidade aguda com *Danio rerio*.

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	40
Ovos	≥ 70% dos ovos coletados devem ser fertilizados
Temperatura	26 ± 1ºC
Efeitos observados	Coagulação de ovos fertilizados, ausência de formação de somitos, ausência de batimentos cardíacos e não desprendimento da cauda.
Expressão dos resultados	CL_{50}

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 Nº 174/16/CEUA-IPEN/SP.

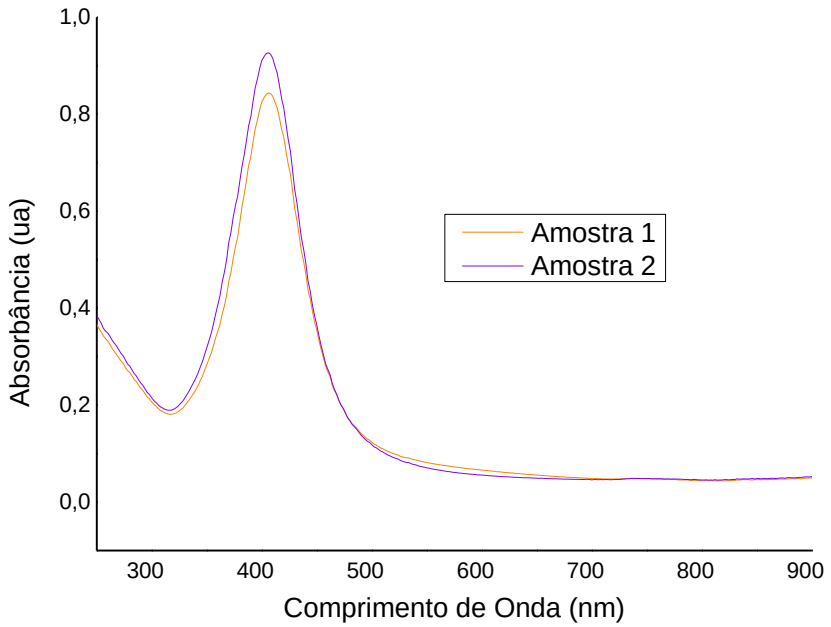
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização da amostra

5.1.1. Caracterização por Espectroscopia de UV-Vis

Na Figura 16 estão apresentados os espectros UV-Vis das Amostras 1 e 2.

Figura 16 - Gráfico dos espectros de extinção óptico das 2 Amostras de NPAg obtidos em espectrofotômetro na faixa de 230 a 900 nm.



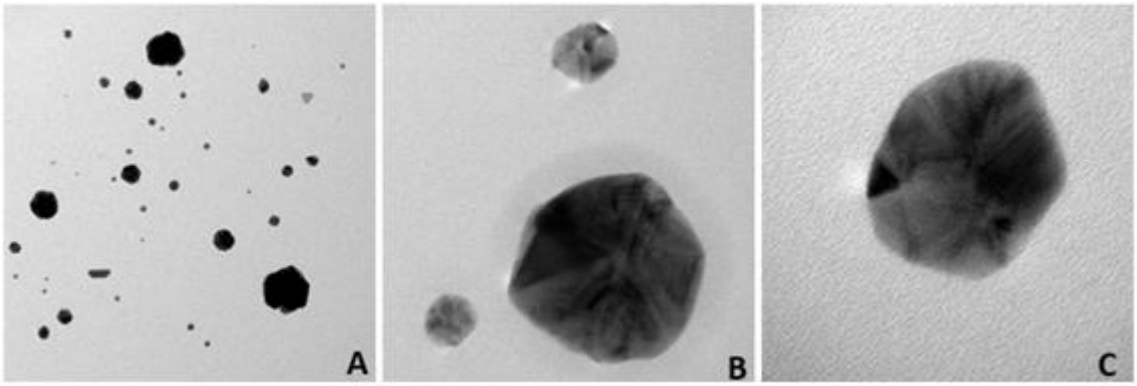
Fonte: Joana da S. Maziero.

Na espectrofotometria na região do UV-vis, a absorbância máxima ocorreu no comprimento de onda de 406 nm para ambas as amostras, o que indica a presença de nanopartículas de prata esféricas (Noguez, 2007). Para verificar a estabilidade das amostras foi realizado esta análise trimestralmente, e não foi observado deslocamento no comprimento de onda, o que evidencia a estabilidade das amostras.

5.1.2. Caracterização por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As imagens obtidas por MET da Amostra 1, estão apresentadas na Figura 17.

Figura 17 - Imagens obtidas por MET da Amostra 1. (A): magnificância de 29.000x (Escala de 200nm); (B): magnificância de 280.000x (Escala de 20nm); (C): magnificância de 700.000x (Escala de 10nm).

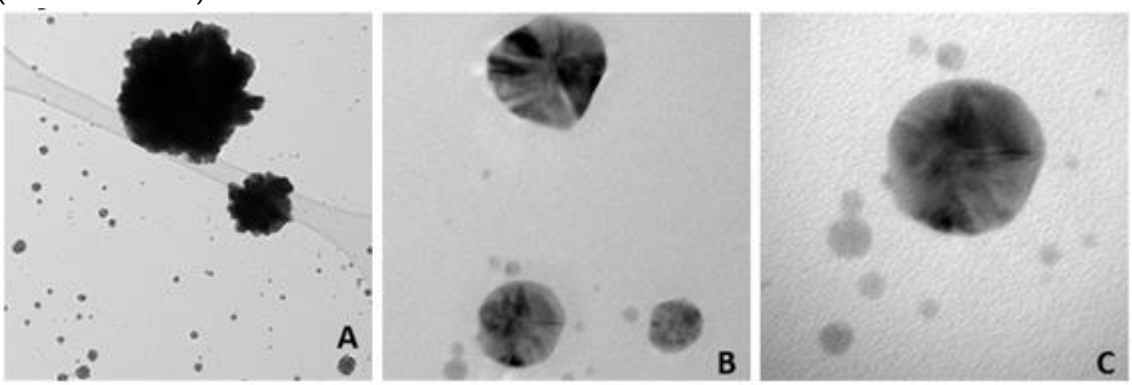


200 nm **20 nm** **10 nm**

Fonte: Joana da S. Maziero.

As imagens obtidas por MET da Amostra 2, estão apresentadas na Figura 18.

Figura 18 - Imagens obtidas por MET da Amostra 2. (A): magnificância de 29.000x (Escala de 200nm); (B): magnificância de 280.000x (Escala de 20nm); (C): magnificância de 700.000x (Escala de 10nm).



200 nm **20 nm** **10 nm**

Fonte: Joana da S. Maziero.

As imagens obtidas por MET de ambas as amostras, mostraram nanopartículas de prata de tamanho e morfologia variados. As partículas com tamanho inferior a 20 nm apresentaram morfologia predominantemente esféricas, nanopartículas com tamanho entre 20 e 40 nm apresentaram morfologia cristalina pentagonal e hexagonal. E por fim, partículas com tamanho superior a 40 nm, apresentaram morfologia cristalina irregular.

Em ambos os sistemas foram encontradas nanopartículas com tamanhos variados, entre 5 e 200 nm, propriedade característica de sistemas polidispersos. Contudo, a Amostra 1 possui partículas menores em comparação com a Amostra 2.

5.1.3. Caracterização por Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

Na Tabela 3 estão apresentados os valores obtidos pela técnica de DLS, para as Amostras 1 e 2.

Tabela 3 - Valores obtidos pela técnica de DLS para as amostras 1 e 2.

Amostras	**Tamanho Ø (nm)**			**Z-Average**	**IPd**
	Intensidade	**Volume**	**Número**		
Amostra 1	32,85 ± 22,06	10,20 ± 6,19	6,36 ± 2,21	24,51	0,372
Amostra 2	87,53 ± 16,18	12,39 ± 6,64	8,51 ± 2,76	25,33	0,457

Fonte: Joana da S. Maziero.

A mediana (Z-Average), do tamanho hidrodinâmico pela técnica de DLS para Amostra 1 foi de 24,51 e para Amostra 2 foi de 25,33, ou seja, em termos de populações de nanopartículas, ambos os sistemas não apresentaram diferença. No entanto, os valores de intensidade da Amostra 1 (32,85 ± 22,06) demonstraram que esse sistema possui nanopartículas de prata menores comparadas com a Amostra 2 (87,53 ± 16,18). Para ambos os sistemas, os valores de número evidenciam que há presença significativa de nanopartículas menores que 10 nm.

5.1.4. Caracterização por medidas do Potencial Zeta

Na Tabela 4 estão apresentados os valores obtidos pela técnica de Potencial Zeta, para as Amostras 1 e 2.

Tabela 4 - Valores obtidos pela técnica de Potencial Zeta para as amostras 1 e 2.

Amostras	Potencial Zeta (mV)
Amostra 1	- 17,5 ± 3,61
Amostra 2	- 17,0 ± 2,96

Fonte: Joana da S. Maziero.

Os resultados obtidos pela técnica de potencial zeta para Amostra 1 foi de - 17,5 ± 3,61, e para Amostra 2 foi de 17,0 ± 2,96, esses valores garantem a repulsão eletrostática entre as nanopartículas de prata, impedindo a colisão e a precipitação da suspensão coloidal, o que garante sua estabilidade.

5.2. Ensaio de citotoxicidade

Neste ensaio *in vitro* de citotoxicidade das Amostras 1 e 2 de NPAg, com base na DO resultante de cada poço da microplaca, foram calculados os valores médio das DO e seus respectivos desvios padrão, que representam os efeitos celulares provocados durante o período de contato direto das amostras e dos extratos dos controles negativo e positivo com a cultura celular.

A porcentagem de viabilidade celular, foi calculada em relação ao controle de células do ensaio, que correspondem a 100% de viabilidade, de acordo com a equação:

$$\textbf{\% Viabilidade Celular} = (DO_{SL} \times 100) / DO_{CC}$$

Onde, DO_{SL} corresponde ao valor médio das DO de cada concentração das amostras de NPAg e dos extratos dos controles negativo e positivo, e DO_{CC} o valor médio das DO do controle de células.

5.2.1. Controles de Ga e Tri-Alanina

Os resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade dos Controles de GA e Tri-Alanina, apresentam-se na Tabela 5.

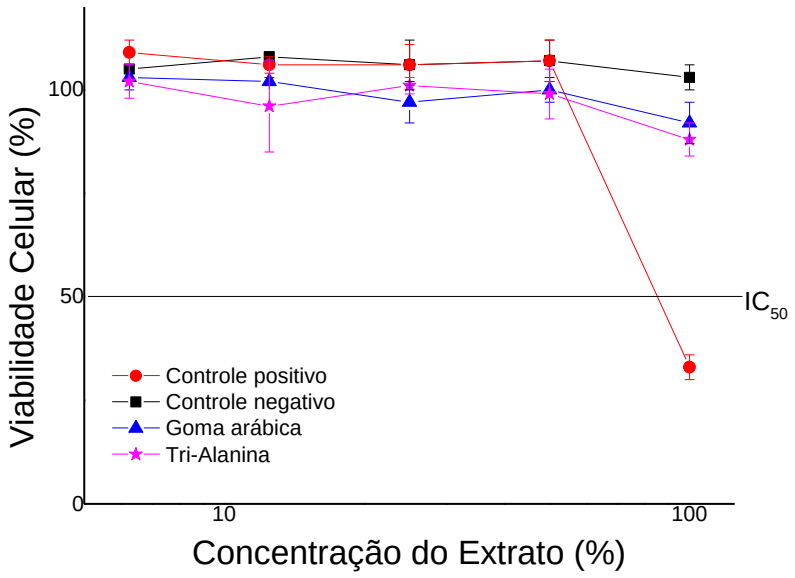
Tabela 5 - Porcentagens de viabilidade celular dos extratos dos controles negativo e positivo, e dos Controles de GA e Tri-Alanina.

Concentração Extrato (%)	% Viabilidade celular ± cv*			
	Controle negativo	Controle positivo	GA	Tri-Alanina
100	103±3	33±3	92±5	88±4
50	107±5	107±5	100±3	99±6
25	106±6	105±5	97±5	101±2
12,5	108±1	108±2	102±1	96±11
6,25	105±1	109±3	103±3	102±4

*Coeficiente de variação
Fonte: Joana da S. Maziero.

Lançando em gráfico a % de viabilidade celular em função da concentração do extrato foram obtidas as curvas de viabilidade celular do ensaio, apresentado na Figura 19.

Figura 19 - Curvas de viabilidade celular dos Controles de GA e Tri-Alanina, no ensaio *in vitro* de citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro.



Fonte: Joana da S. Maziero.

A utilização dos controles, garante a eficiência do ensaio. As amostras que apresentam curva de viabilidade celular acima da linha IC_{50} são consideradas não citotóxicas, como observado no controle negativo e nos controles de GA e Tri-Alanina. No entanto, as amostras cujo as curvas de viabilidade celular cruzem ou se projetem abaixo da linha IC_{50} são consideradas citotóxicas, como observado no controle positivo

A estimativa do IC_{50}, é obtida da intersecção entre a curva de viabilidade celular e a linha de 50% de viabilidade no gáfico. O controle positivo apresentou IC_{50} de 85%.

5.2.2. Amostra 1 - 147 ppm - 25 nm

Os resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade da Amostra 1, apresentam-se na Tabela 6.

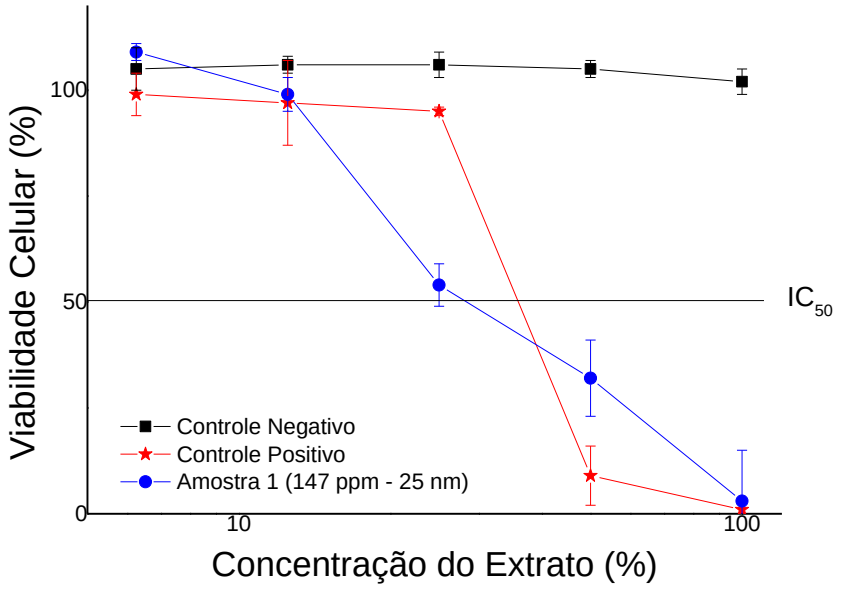
Tabela 6 - Porcentagens de viabilidade celular dos extratos dos controles negativo e positivo, e da Amostra 1.

Concentração		**% Viabilidade celular ± cv***		
NPAg ($mg.L^{-1}$)	**Extrato (%)**	**Controle negativo**	**Controle positivo**	**Amostra 1**
9,19	100	102±3	1±0	3±12
4,59	50	105±2	9±7	32±9
2,29	25	106±3	95±1	54±5
1,15	12,5	106±2	97±10	99±4
0,58	6,25	105±5	99±5	109±2

*Coeficiente de variação
Fonte: Joana da S. Maziero.

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 20.

Figura 20 - Curvas de viabilidade celular da Amostra 1 no ensaio *in vitro* de citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro.



Fonte: Joana da S. Maziero.

O controle positivo apresentou IC_{50} de 36% e a Amostra 1, IC_{50} de 28%, equivalente ao valor de 2,57 mg L^{-1}, uma vez que as diluições foram feitas a partir da concentração de 9,19 mg L^{-1} (100% do extrato).

5.2.3. Amostra 2 - 174 ppm - 75 nm

Os resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade da Amostra 2, apresentam-se na Tabela 7.

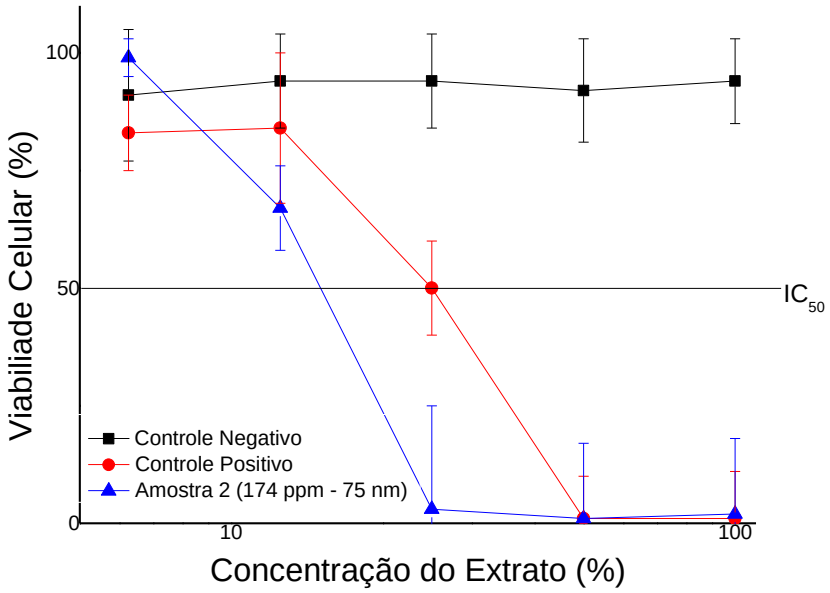
Tabela 7 - Porcentagens de viabilidade celular dos extratos dos controles negativo e positivo, e da Amostra 2.

Concentração		% Viabilidade celular ± cv*		
NPAg ($mg.L^{-1}$)	Extrato (%)	Controle negativo	Controle positivo	Amostra 2
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
Fonte: Joana da S. Maziero.

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 21.

Figura 21 - Curvas de viabilidade celular da Amostra 2 no ensaio *in vitro* de citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro.



Fonte: Joana da S. Maziero.

O controle positivo apresentou IC_{50} de 25% e a Amostra 2, IC_{50} de 15%, equivalente ao valor de 2,61 mg L^{-1}, uma vez que as diluições foram feitas a partir da concentração de 17,40 mg L^{-1} (100% do extrato).

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 mg L^{-1} para a solução na concentração de 22 ppm; e 3,40 mg L^{-1} para a solução na concentração de 10.000 ppm. Leitch *et al.* (1993), reportou IC_{50} de 6,25 mg L^{-1} para NPAg esféricas com tamanho entre 7 e 12 nm.

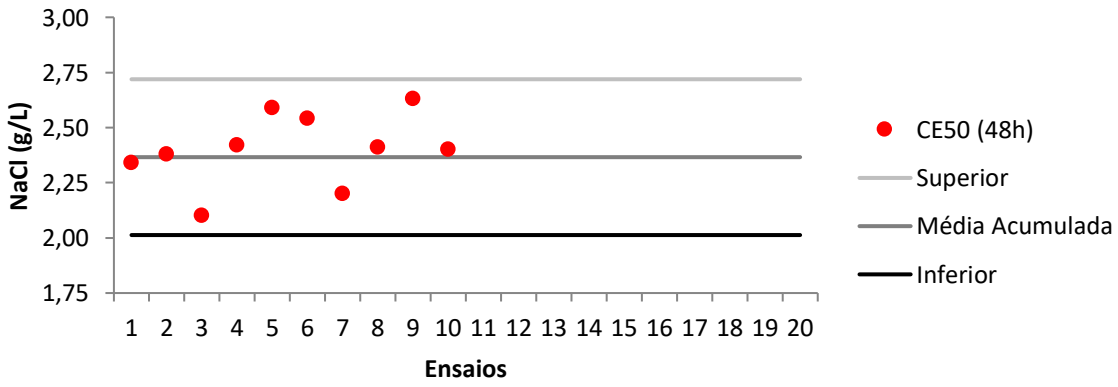
Os valores mencionados acima, demonstraram que as NPAg apresentaram IC_{50} na mesma ordem de grandeza que os resultados obtidos neste estudo, sendo o resultado da Amostra 1, IC_{50} = 2,57 mg L^{-1}, e Amostra 2, IC_{50} = 2,61 mg L^{-1}, independente da concentração da amostra e do processo utilizado para o preparo da síntese.

5.3. Ensaio de ecotoxicidade aguda com *Daphnia similis*

5.3.1. Ensaio de sensibilidade

Os resultados da CE_{50} dos ensaios de sensibilidade da *Daphnia similis*, foram inseridos no gráfico para elaboração da carta-controle, que esta apresentada na Figura 22. A média acumulada e os limites superiores e inferiores também foram estabelecidos.

Figura 22 - Carta controle de sensibilidade da *Daphnia similis* ao NaCl após 48 h de exposição.



Fonte: Joana da S. Maziero.

Os lotes dos organismos utilizados nos ensaios definitivos foram considerados qualificados apenas aqueles que apresentaram sensibilidade dentro dos limites estabelecidos (limites superior e inferior). Os resultados de CE_{50} encontrados nos ensaios de sensibilidade variaram de 2,00 a 2,75 g L^{-1} de NaCl.

5.3.2. Controles Ga e Tri-Alanina

Os resultados obtidos nos ensaios de ecotoxicidade aguda dos controles de Ga e Tri-Alanina, apresentam-se na Tabela 8.

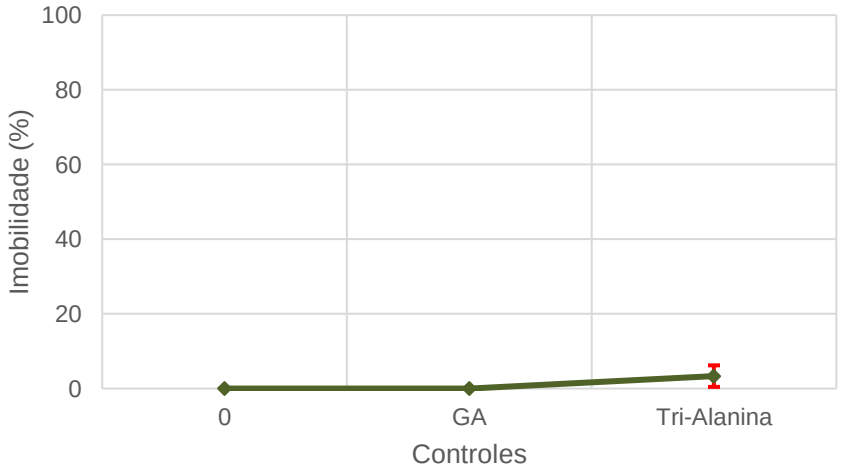
Tabela 8 - Percentual de imobilidade obtido nos ensaios de ecotoxicidade aguda dos controles de Ga e Tri-Alanina em neonatas de *Daphnia similis*.

Controles	Imobilidade (%)		
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
0	0	0	0
GA	0	0	0
Tri-Alanina	5	5	0

Fonte: Joana da S. Maziero.

Os resultados da % de imobilidade em relação às concentrações dos controles de Ga e Tri-Alanina, foram lançados em gráfico, apresentado na Figura 23.

Figura 23 - Curva de imobilidade das neonatas de *Daphnia similis* em função das concentrações dos controles de Ga e Tri-Alanina no ensaio de ecotoxicidade aguda.



Fonte: Joana da S. Maziero.

Conforme apresentado na Tabela 5 e na Figura 7, 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.

5.3.3. Amostra 1 - 147 ppm - 25 nm

Os resultados obtidos nos ensaios de ecotoxicidade aguda da Amostra 1, apresentam-se na Tabela 9.

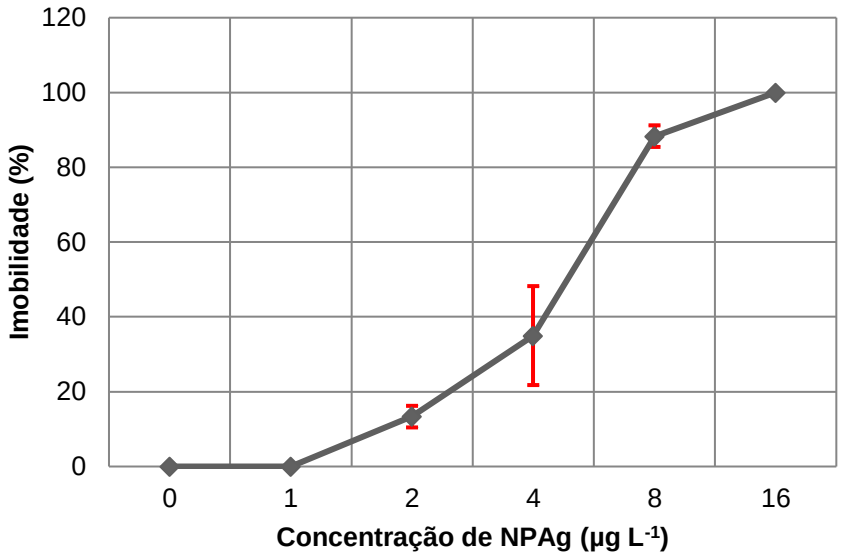
Tabela 9 - Percentual de imobilidade obtido nos ensaios de ecotoxicidade aguda da Amostra 1 em neonatas de *Daphnia similis*.

Concentração NPAg ($\mu g\ L^{-1}$)	**Imobilidade (%)**		
	Ensaio 1	**Ensaio 2**	**Ensaio 3**
0	0	0	0
1	0	0	0
2	15	10	15
4	20	45	40
8	85	90	90
16	100	100	100

Fonte: Joana da S. Maziero.

Os resultados da % de imobilidade em relação às concentrações da Amostra 1, foram lançados em gráfico (Figura 24), onde podemos visualizar o aumento da imobilidade dos organismos com o aumento da concentração das NPAg.

Figura 24 - Curva de imobilidade das neonatas de *Daphnia similis* em função das concentrações da Amostra 1 no ensaio de ecotoxicidade aguda.



Fonte: Joana da S. Maziero.

Os valores das CE_{50} e os intervalos de confiança dos ensaios de ecotoxicidade aguda da Amostra 1 foram obtidos pelo software *Trimmed Spearman-Karber*. Na Tabela 10 são apresentados os valores das CE_{50}, os intervalos de confiança, a média e o desvio padrão (DP).

Tabela 10 - Valores das CE_{50}, intervalos de confiança, média e desvio padrão para os ensaios de ecotoxicidade aguda da Amostra 1.

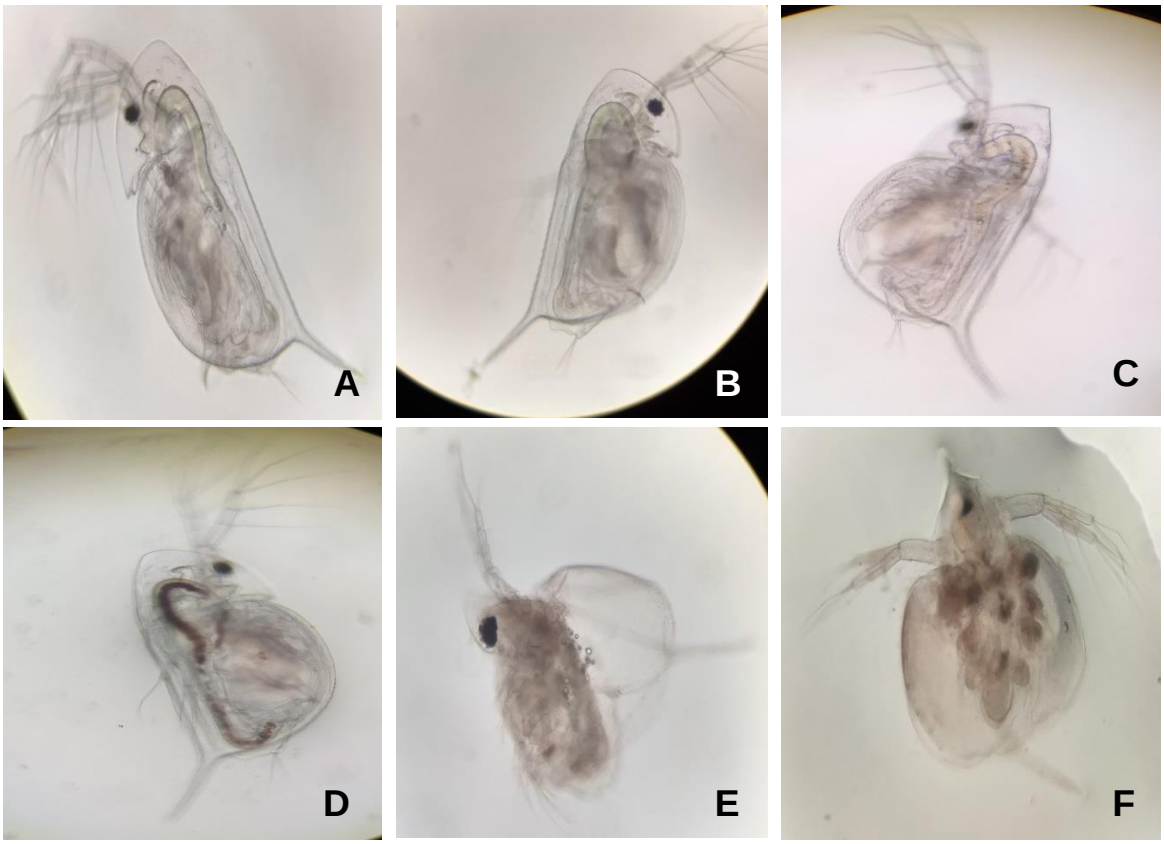
Ensaio	**CE_{50} (µg L^{-1})**	**Limite de Confiabilidade**	
		Inferior	**Superior**
1	4,92	4,03	6,01
2	4,14	3,38	5,07
3	4,14	3,36	5,11
Média	4,40	3,59	5,40
Desvio Padrão	0,45	0,38	0,53

Fonte: Joana da S. Maziero.

O valor médio da CE_{50} da Amostra 1 obtido nos ensaios de ecotoxicidade aguda realizado em neonatas de *Daphnia similis*, após 48h de exposição foi de 4,40 µg L^{-1}.

Na Figura 25 estão apresentados exemplares de *Daphnias similis* expostas a diferentes concentrações de NPAg da Amostra 1, após 48h de exposição.

Figura 25 - *Daphnia similis* no ensaio de ecotoxicidade aguda de NPAg: (A) Controle; *Daphnia similis* em diferentes concentrações de NPAg: (B) 1 µg L^{-1}, (C) 2 µg L^{-1}, (D) 4 µg L^{-1}, (E) 8 µg L^{-1} e (F) 16 µg L^{-1}.



Fonte: Joana da S. Maziero.

Na Figura 25 (A), temos um organismo exposto ao Meio MS (Controle); Figura 10 (B) e (C): organismos expostos à concentrações de NPAg de 1 e 2 µg L^{-1} respectivamente. Nestas concentrações os organismos ainda mostravam mobilidade; Figura 25 (D), apresenta um organismo exposto a concentração de 4 µg L^{-1}, que mostrou mobilidade restrita e foi observado em seu trato digestivo uma coloração escura, possivelmente de NPAg; Figura 25 (E) e (F), são organismos nas concentrações de 8 e 16 µg L^{-1} de NPAg respectivamente. Os organismos estavam imóveis e apresentaram mudanças em suas estruturas morfológicas.

A imobilidade na *Daphnia similis*, para a Amostra 1 foi observada a partir da concentração de 2 µg L^{-1} de NPAg (10-15%), e cresceu de acordo com o aumento da concentração de NPAg, atingindo 100% de imobilidade na concentração de 16 µg L^{-1}.

5.3.4. Amostra 2 - 174 ppm - 75 nm

Os resultados obtidos nos ensaios de ecotoxicidade aguda da Amostra 2, apresentam-se na Tabela 11.

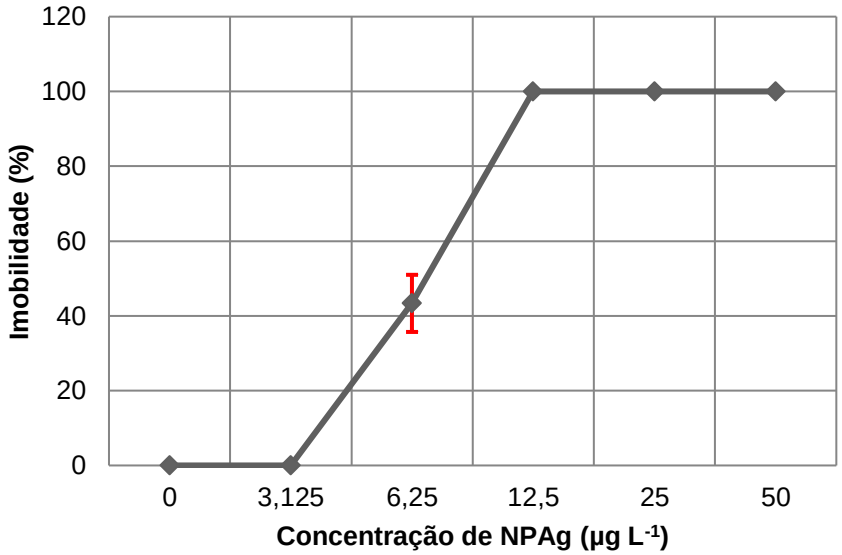
Tabela 11- Percentual de imobilidade obtido nos ensaios de ecotoxicidade aguda da Amostra 2 em neonatas de *Daphnia similis*.

Concentração NPAg ($\mu g\ L^{-1}$)	Imobilidade (%)		
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
0	0	0	0
3,125	0	0	0
6,25	45	50	35
12,50	100	100	100
25	100	100	100
50	100	100	100

Fonte: Joana da S. Maziero.

Os resultados da % de imobilidade em relação às concentrações da Amostra 2 foram lançados em gráfico (Figura 26), onde podemos visualizar o aumento da imobilidade dos organismos com o aumento da concentração das NPAg.

Figura 26 - Curva de imobilidade das neonatas de *Daphnia similis* em função das concentrações da Amostra 2 no ensaio de ecotoxicidade aguda.



Fonte: Joana da S. Maziero.

Os valores das CE_{50} e os intervalos de confiança dos ensaios de ecotoxicidade aguda da Amostra 2, foram obtidos pelo software *Trimmed Spearman-Karber*. Na Tabela 12 são apresentados os valores das CE_{50}, os intervalos de confiança, a média e o desvio padrão (DP).

Tabela 12 - Valores das CE_{50}, intervalos de confiança, média e desvio padrão para os ensaios de ecotoxicidade aguda da Amostra 2.

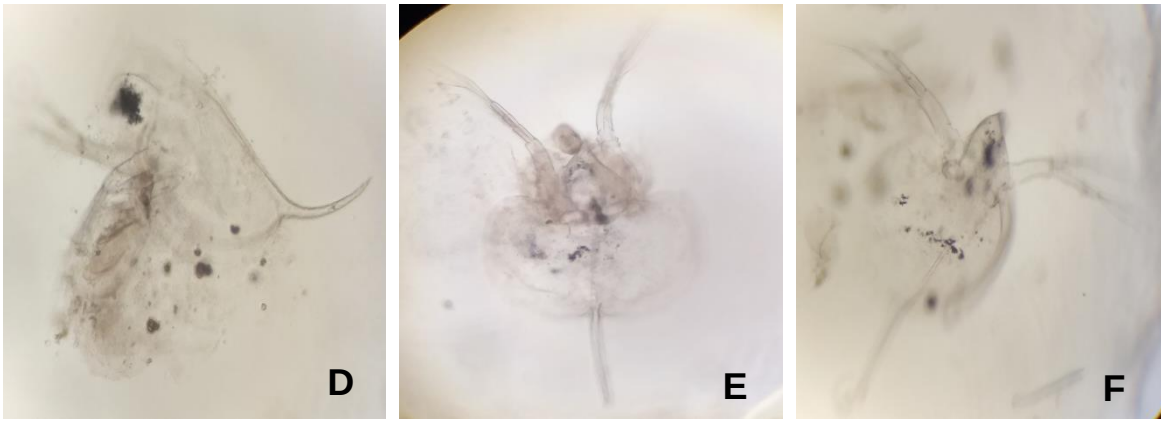
Ensaio	**CE_{50} (µg L^{-1})**	**Limite de Confiabilidade**	
		Inferior	**Superior**
1	6,47	5,55	7,55
2	6,25	5,35	7,30
3	6,93	5,98	8,04
Média	6,55	5,63	7,63
Desvio Padrão	0,35	0,32	0,38

Fonte: Joana da S. Maziero.

O valor médio da CE_{50} da Amostra 2 obtido nos ensaios de ecotoxicidade aguda realizado em neonatas de *Daphnia similis*, após 48h de exposição foi de 6,55 µg L^{-1}.

Na Figura 27 estão apresentados exemplares de *Daphnias similis* submetidas a diferentes concentrações de NPAg da Amostra 2, após 48h de exposição.

Figura 27 - *Daphnia similis* no ensaio de ecotoxicidade aguda de NPAg: (A) Controle; *Daphnia similis* em diferentes concentrações de NPAg: (B) 3,125 µg L^{-1}, (C) 6,25 µg L^{-1}, (D) 12,50 µg L^{-1}, (E) 25 µg L^{-1} e (F) 50 µg L^{-1}.



Fonte: Joana da S. Maziero.

Na Figura 27 (A) temos um organismo exposto ao Meio MS (Controle); Figura 27 (B): organismo exposto a concentração de NPAg de 3,125 µg L^{-1}. Nesta concentração todos os organismos estavam móveis; Figura 27 (C) apresenta um organismo exposto a concentração de 6,25 µg L^{-1}, a partir desta concentração os organismos começaram a apresentar imobilidade; Figura 27 (D), (E) e (F) são organismos nas concentrações de 12,50, 25 µg L^{-1} e 50 µg L^{-1} de NPAg respectivamente. Os organismos estavam imóveis e apresentaram mudanças em suas estruturas morfológicas.

A imobilidade na *Daphnia similis,* para a Amostra 2 foi observada a partir da concentração de 6,25 µg L^{-1} de NPAg (35-50%), e atingiu 100% de imobilidade a partir da concentração de 12,50 µg 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 µg L^{-1} (Maziero *et al.*, 2016); 6,90 µg L^{-1} e 13,93 µg L^{-1} (Rogero *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 senbilidade 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 µg L^{-1} e 3,48 µg 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 µg L^{-1} para NPAg de 25 nm), e 2 (CE_{50} de 6,55 µg L^{-1} para NPAg de 75 nm).

Volker *et al.* (2013), obteve o valor de CE_{50} de 121 mg 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 µg L^{-1} e 4 µg 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.

5.4. Ensaio de embriotoxicidade aguda com *Danio rerio*

Como controle positivo foi utilizado a substância de referência $ZnCl_2$ na concentração de 100 mg L^{-1}, que causou a coagulação de 100% dos embriões expostos. Além disso, também foi utilizado o controle somente com o meio MS, que não causou mortalidade. 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.

5.4.1. Controles Ga e Tri-Alanina

Os resultados obtidos nos ensaios de embriotoxicidade aguda dos controles de Ga e Tri-Alanina, apresentam-se na Tabela 13.

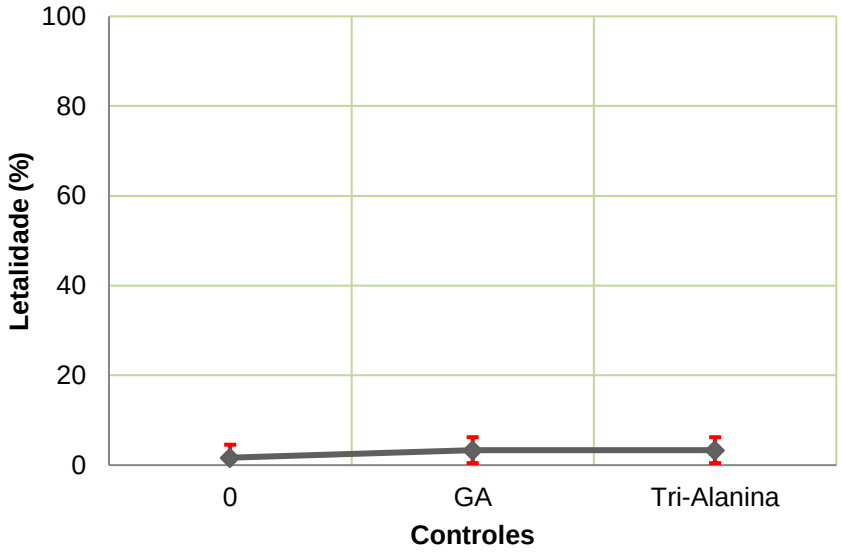
Tabela 13 - Percentual de letalidade obtido nos ensaios de embriotoxicidade aguda dos controles de Ga e Tri-Alanina em embriões de *Danio rerio*.

Controles	Imobilidade (%)		
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
0	0	0	5
GA	5	5	0
Tri-Alanina	0	5	5

Fonte: Joana da S. Maziero.

Os resultados da % de letalidade em relação às concentrações dos controles de Ga e Tri-Alanina, foram lançados em gráfico, apresentado na Figura 28.

Figura 28 - Curva de letalidade dos embriões de *Danio rerio* em função das concentrações dos controles de Ga e Tri-Alanina no ensaio de embriotoxicidade aguda.



Fonte: Joana da S. Maziero.

Conforme apresentado na Tabela 5 e na Figura 7, 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.

5.4.2. Amostra 1 - 147 ppm - 25 nm

Os resultados obtidos nos ensaios de embriotoxicidade aguda da Amostra 1, apresentam-se na Tabela 14.

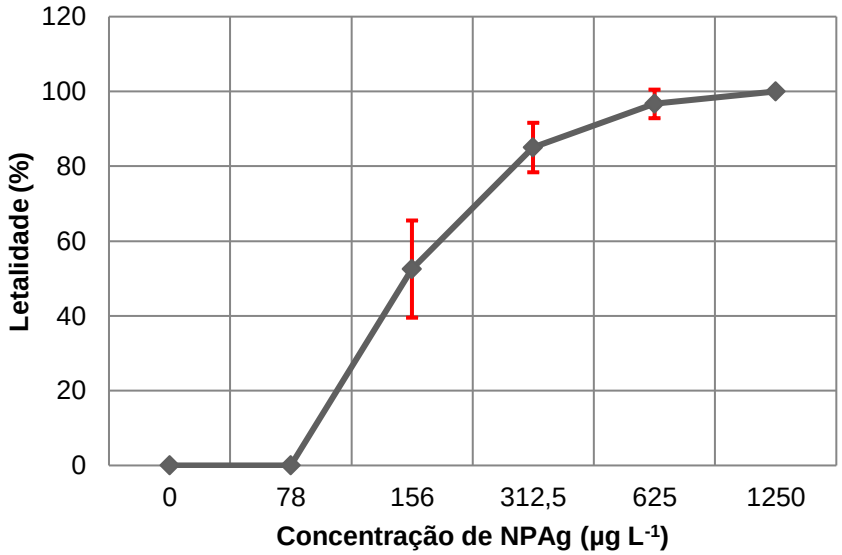
Tabela 14 - Percentual de letalidade obtido nos ensaios de embriotoxicidade aguda da Amostra 1 em embriões de *Danio rerio*.

Concentração NPAg ($\mu g\ L^{-1}$)	Letalidade (%)		
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
0	0	0	0
78	0	0	0
156	68	45	45
312,5	90	77,5	87,5
625	100	97,5	92,5
1250	100	100	100

Fonte: Joana da S. Maziero.

Os resultados da % de letalidade em relação às concentrações da Amostra 1 foram lançados em gráfico (Figura 29), onde podemos visualizar o aumento da letalidade dos organismos com o aumento da concentração das NPAg.

Figura 29 - Curva de letalidade dos embriões de *Danio rerio* em função das concentrações da Amostra 1 no ensaio de embriotoxicidade aguda.



Fonte: Joana da S. Maziero.

Os valores das CL_{50} e os intervalos de confiança dos ensaios de embriotoxicidade aguda da Amostra 1, foram obtidos pelo software *Trimmed Spearman-Karber*. Na Tabela 15 são apresentados os valores das CL_{50}, os intervalos de confiança, a média e o desvio padrão (DP).

Tabela 15 - Valores das CL_{50}, intervalos de confiança, média e desvio padrão para os ensaios de embriotoxicidade aguda da Amostra 1.

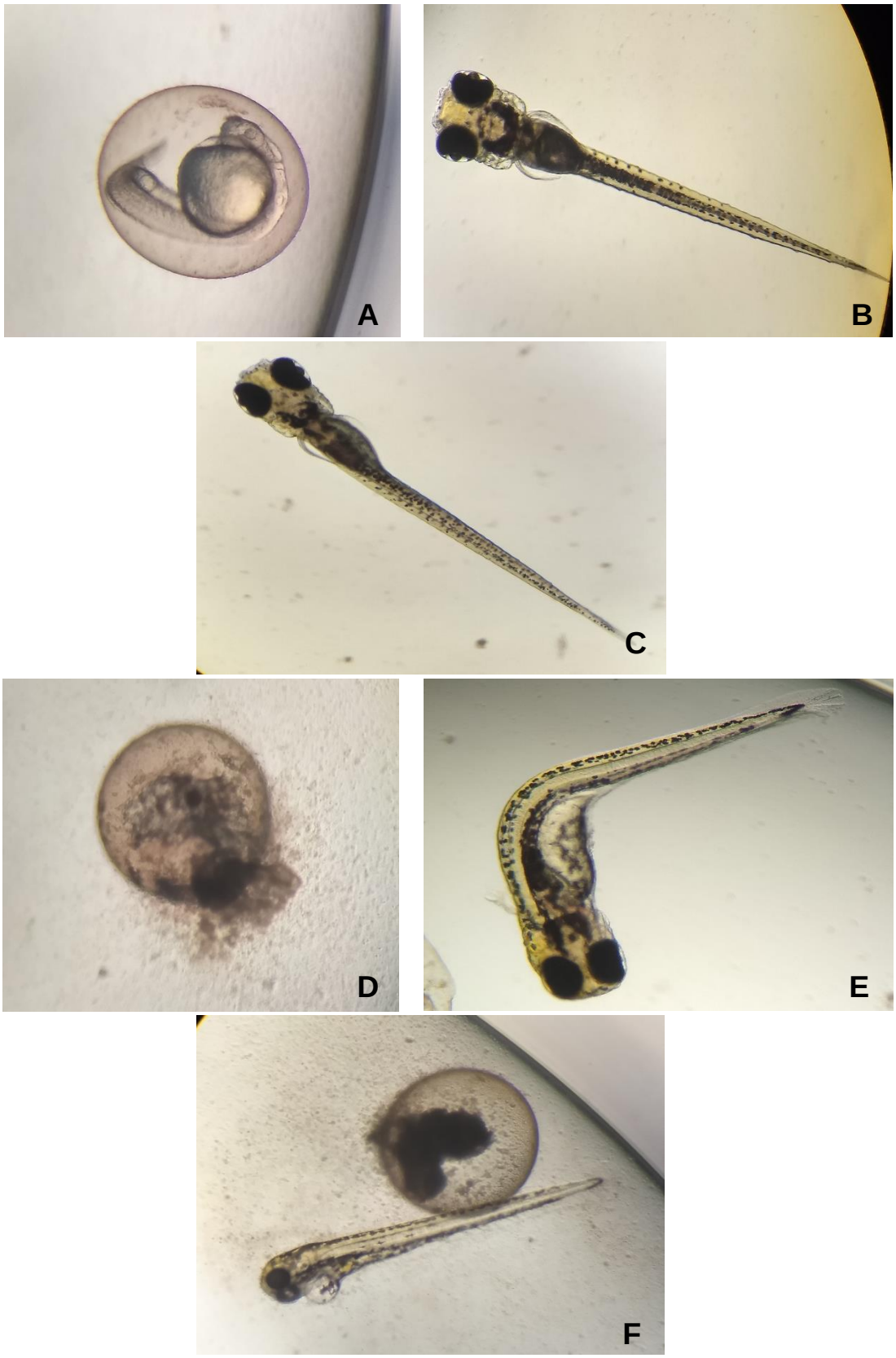
Ensaio	**CL_{50} ($\mu g\ L^{-1}$)**	**Limites de confiança**	
		Inferior	**Superior**
1	150	130	170
2	190	170	220
3	190	160	210
Média	177	153	200
Desvio Padrão	23,09	20,82	26,46

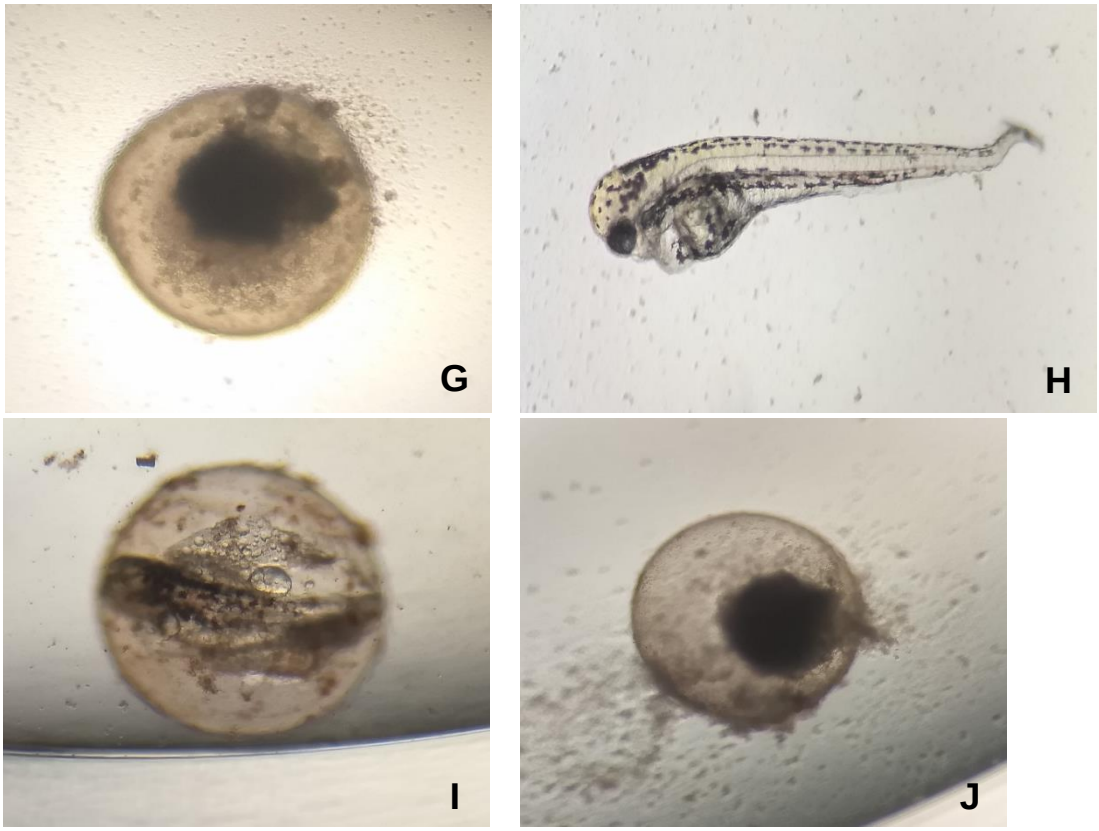
Fonte: Joana da S. Maziero.

O valor médio da CL_{50} da Amostra 1 obtido nos ensaios de embriotoxicidade aguda realizado em embriões de *Danio rerio*, após 96h de exposição foi de 177 $\mu g\ L^{-1}$.

Na Figura 30 estão apresentados exemplares de *Danio rerio* expostos a diferentes concentrações de NPAg da Amostra 1, após 96h de exposição. Onde é possível observar algumas alterações morfológicas: tamanho reduzido da cabeça, tamanho reduzido do organismo, curvatura da coluna vertebral, edema cardíaco e/ou vitelínico.

Figura 30 - *Danio rerio* no ensaio de embriotoxicidade aguda, sendo os controles (A) 24 hpf e (B) 96 hpf; e concentrações da Amostra 1, 96 hpf: (C) 78 µg L^{-1}, (D) e (E) 156 µg L^{-1}, (F) 312,5 µg L^{-1}, (G) e (H) 625 µg L^{-1} e (I) e (J) 1250 µg L^{-1}.





Fonte: Joana da S. Maziero.

Na Figura 30 (A) observa-se um embrião após 24h de exposição e na Figura 30 (B) uma larva após 96h de exposição. Ambos os organismos foram expostos somente ao Meio MS (controle) e em todos os estágios apresentaram desenvolvimento normal; na Figura 30 (C): organismo exposto a concentração de 78 µg L^{-1} de NPAg, nesta concentração todos os organismos estavam vivos e sem anomalias; na Figura 30 (D) e (E) apresentam-se organismos expostos a concentração de 156 µg L^{-1} de NPAg, sendo (D), ovo coagulado e (E), larva, onde foram observados alterações na curvatura da coluna vertebral, edema cardíaco e vitelínico; na Figura 30 (F) são organismos expostos a concentração de 312,5 µg L^{-1} de NPAg, apresenta-se um ovo coagulado e uma larva, onde é possível observar o tamanho reduzido da cabeça, tamanho reduzido do organismo e edema cardíaco; na Figura 30 (G) e (H) apresentam-se organismos expostos a concentração de 625 µg L^{-1} de NPAg, sendo (G), ovo coagulado e (H), larva, onde observa-se o tamanho reduzido da cabeça, tamanho reduzido do organismo, curvatura da coluna vertebral, edema cardíaco e vitelínico; na Figura 30 (I) e (J) são ovos coagulados na concentração de 1250 µg L^{-1} de NPAg.

A letalidade no *Danio rerio*, para a Amostra 1 foi observada a partir da concentração de 156 µg L^{-1} de NPAg (45-68%), e cresceu de acordo com o aumento da concentração de NPAg, atingindo 100% de letalidade na concentração de 1250 µg L^{-1}.

5.4.3. Amostra 2 - 174 ppm - 75 nm

Os resultados obtidos nos ensaios de embriotoxicidade aguda da Amostra 2, apresentam-se na Tabela 16.

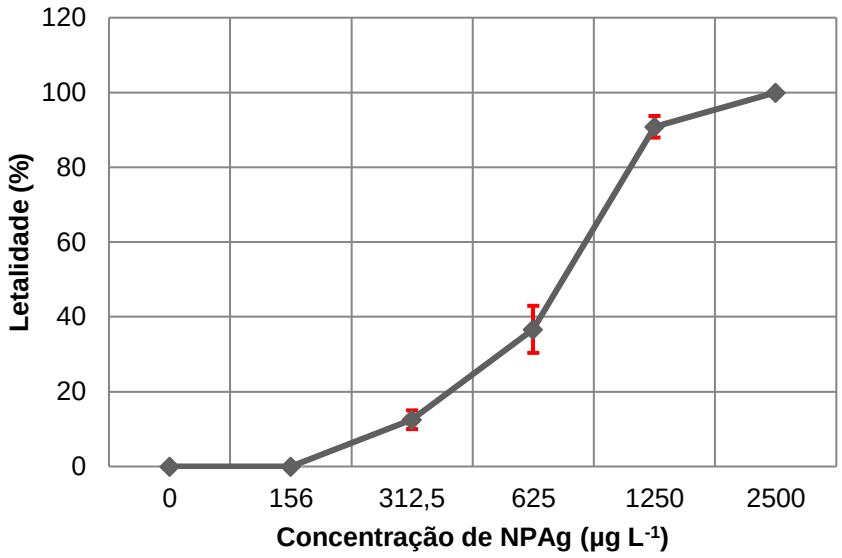
Tabela 16 - Percentual de letalidade obtido nos ensaios de embriotoxicidade aguda da Amostra 2 em embriões de *Danio rerio*.

Concentração NPAg (µg L^{-1})	**Letalidade (%)**		
	Ensaio 1	**Ensaio 2**	**Ensaio 3**
0	0	0	0
156	0	0	0
312,5	10	12,5	15
625	30	37,5	42,5
1250	92,5	92,5	87,5
2500	100	100	100

Fonte: Joana da S. Maziero.

Os resultados da % de letalidade em relação às concentrações da Amostra 2 foram lançados em gráfico (Figura 31), onde podemos visualizar o aumento da letalidade dos organismos com o aumento da concentração das NPAg.

Figura 31 - Curva de letalidade dos embriões de *Danio rerio* em função das concentrações da Amostra 2 no ensaio de embriotoxicidade aguda.



Fonte: Joana da S. Maziero.

Os valores das CL_{50} e os intervalos de confiança dos ensaios de embriotoxicidade aguda da Amostra 2, foram obtidos pelo software *Trimmed Spearman-Karber*. Na Tabela 10 são apresentados os valores das CL_{50}, os intervalos de confiança, a média e o desvio padrão (DP).

Tabela 17 - Valores das CL_{50}, intervalos de confiança, média e desvio padrão para os ensaios de embriotoxicidade aguda da Amostra 2.

Ensaio	**CL_{50} (μgL^{-1})**	**Limites de confiança**	
		Inferior	**Superior**
1	710	620	810
2	660	570	760
3	650	560	750
Média	673	583	773
Desvio Padrão	32,15	32,15	32,15

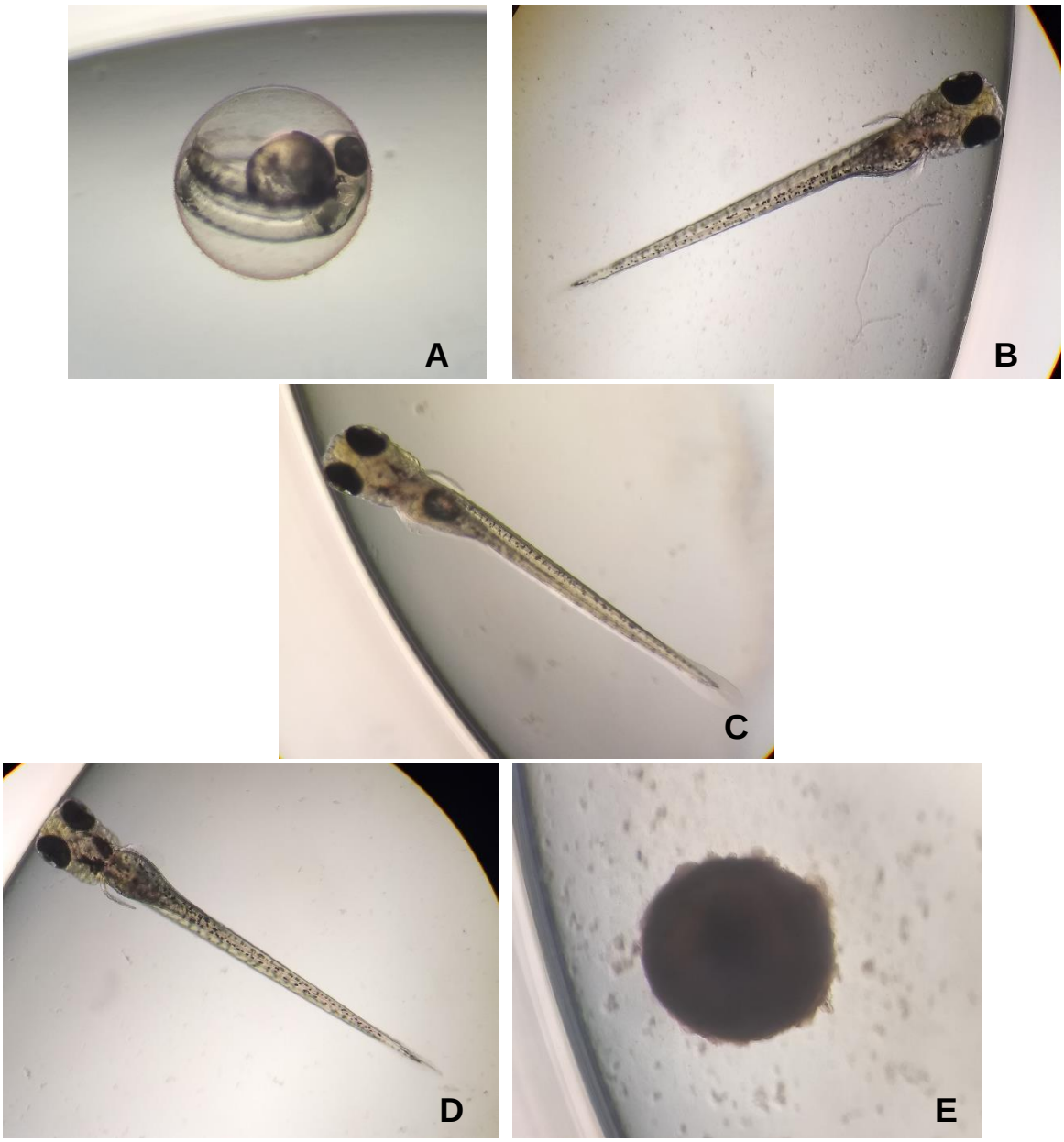
Fonte: Joana da S. Maziero.

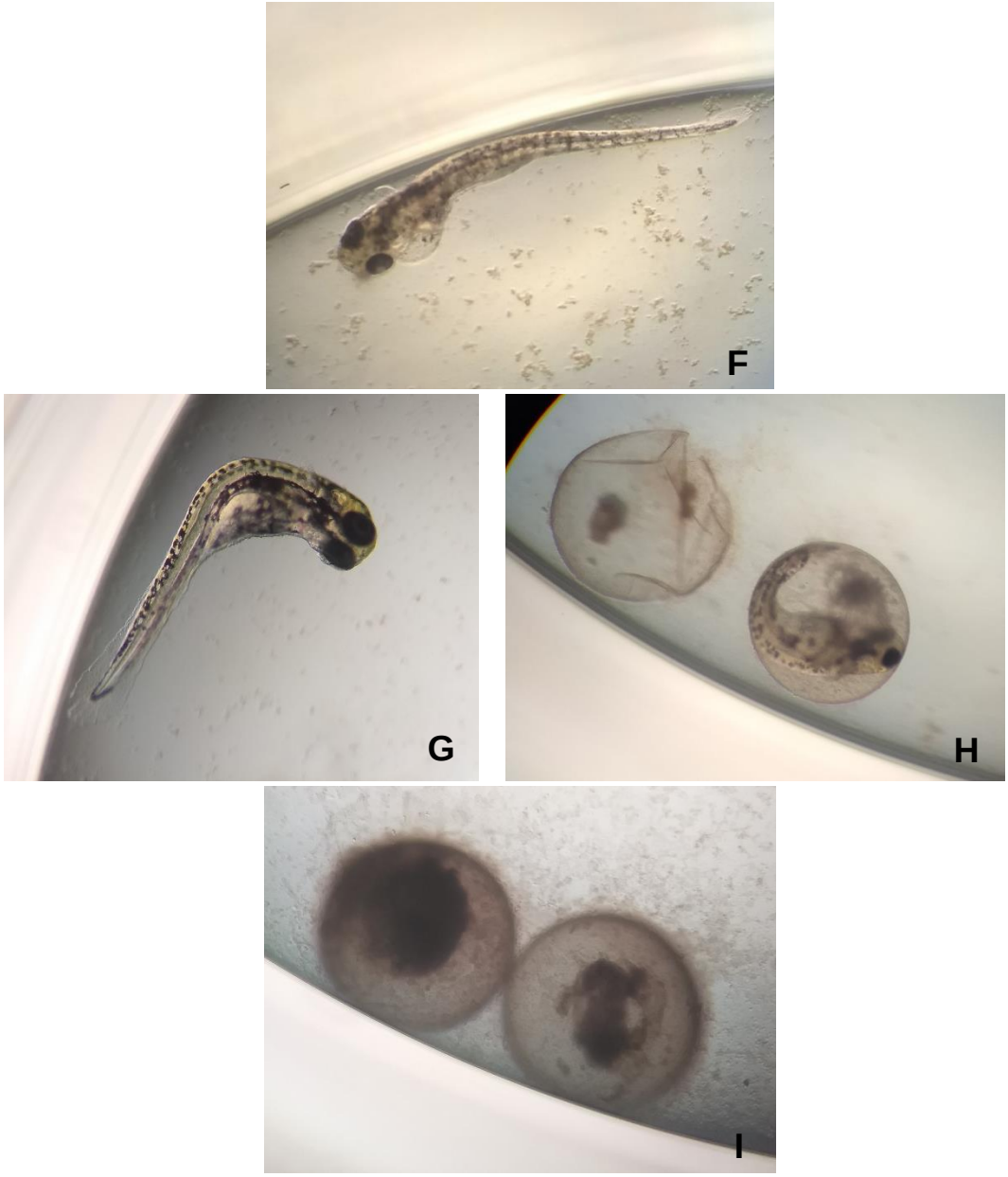
O valor médio da CL_{50} da Amostra 2 obtido nos ensaios de embriotoxicidade aguda realizado em embriões de *Danio rerio*, após 96h de exposição foi de 673 µg L^{-1}.

Na Figura 32 estão apresentados exemplares de *Danio rerio* submetidos a diferentes concentrações de NPAg da Amostra 2, após 96h de exposição. Onde é

possível observar algumas alterações morfológicas: tamanho reduzido da cabeça, tamanho reduzido do organismo, curvatura da coluna vertebral, edema cardíaco e/ou vitelínico.

Figura 32 - *Danio rerio* no ensaio de embriotoxicidade aguda, sendo os controles (A) 24 hpf e (B) 96 hpf; e concentrações da Amostra 2, 96 hpf: (C) 156 µg L^{-1}, (D) e (E) 312,5 µg L^{-1}, (F) 625 µg L^{-1}, (G) e (H) 1250 µg L^{-1} e (I) 2500 µg L^{-1}.





Fonte: Joana da S. Maziero.

Na Figura 32 (A) observa-se um embrião após 24h de exposição e na Figura 32 (B) uma larva após 96h de exposição. Ambos os organismos foram expostos somente ao Meio MS (controle) e em todos os estágios apresentaram desenvolvimento normal; na Figura 32 (C): organismo exposto a concentração de 156 µg L^{-1} de NPAg, nesta concentração todos os organismos estavam vivos e sem alterações morfológicas; na Figura 32 (D) e (E) apresentam-se organismos expostos a concentração de 312,5 µg L^{-1} de NPAg sendo (D), larva sem alterações morfológicas e (E) ovo coagulado; na Figura 32 (F): organismo exposto a concentração de 625 µg L^{-1} de NPAg, onde é possível observar curvatura da coluna

vertebral, edema cardíaco e vitelínico; na Figura 32 (G) e (H) apresentam-se organismos expostos a concentração de 1250 µg L^{-1} de NPAg, sendo (G), larva onde observa-se o tamanho reduzido da cabeça, tamanho reduzido do organismo, curvatura da coluna vertebral, edema cardíaco e vitelínico e (H) organismo com ausência de batimentos cardíacos; na Figura 32 (I) são ovos coagulados na concentração de 2500 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*, para a Amostra 2 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 CL_{50} 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 CL_{50} 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 CL_{50} 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 CL_{50} 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 CL_{50} 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 CL_{50} 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.

No presente estudo, os organismos aquáticos demonstraram grande sensibilidade as amostras de NPAg estudadas, aproximadamente 1.000 vezes maior que a sensibilidade de células em cultura, no teste de citotoxicidade. Isso evidencia a grande necessidade de atenção quanto ao descarte de NPAg pelas empresas que as utilizam, visando evitar danos aos ecossistemas aquáticos.

6. CONCLUSÕES

- Os resultados das análises de caracterização, mostraram que ambas as amostras são parecidas, contudo a Amostra 1 possui nanopartículas menores em comparação a Amostra 2;

- Os controles de GA e Tri-alanina não apresentaram toxicidade, ou seja, a toxicidade é atribuída as NPAg;

- O IC_{50} obtido nos ensaios de citotoxicidade para as duas amostras foram semelhantes (Amostra 1 = 2,57 mg L^{-1} e Amostra 2 = 2,61 mg L^{-1});

- A CE_{50} obtida nos ensaios de ecotoxicidade aguda em *Daphnia similis*, para as duas amostras foram semelhantes (Amostra 1 = 4,40 µg L^{-1} e Amostra 2 = 6,55 µg L^{-1});

- A CL_{50} obtida nos ensaios de embriotoxicidade aguda em *Danio rerio*, para a Amostra 1 foi de 177 µg L^{-1} e para a Amostra 2 foi de 673 µg L^{-1};

- A sensibilidade dos organismos aquáticos mostrou-se aproximadamente 1000x maior que as células de mamífero em cultura;

- A sensibilidade da *Daphnia similis* é maior que a do *Danio rerio*;

- A Amostra 1 mostrou-se mais tóxica do que a Amostra 2, o que corrobora ao fato de que nanopartículas menores tendem a ser mais tóxicas;

- Este trabalho proporcionou dados inéditos sobre a toxicidade das NPAg estabilizadas com GA e reduzidas com Tri-alanina;

- Os valores te toxicidade obtidos, revelaram a importância de se realizar mais estudos relacionados as adversidades que as NPAg podem causar ao meio ambiente. Além disso, mostra-se necessário verificar o descarte dessas

nanopartículas no meio ambiente, visto que no Brasil ainda não há legislações que quantifiquem os limites permissíveis para esse descarte.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABESSA, D. M.S. **Avaliação da qualidade de sedimentos do sistema estuarino de Santos, SP, Brasil**. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo. 2002.

2. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Ecotoxicidade aquática - toxicidade aguda - método de ensaio com Daphnia spp (Crustacea, Cladocera)**. ABNT, 2009. (NBR 12713).

3. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Ecotoxicologia aquática - toxicidade aguda - método de ensaio com peixes**. ABNT, 2011. (NBR 15088).

4. ALBINATI, A. C. L.; MOREIRA, E. L. T.; ALBINATI, R. C. B.; CARVALHO, L. V.; DE LIRA, A.D.; SANTOS, G. B.; VIDAL, L. V. O. Biomarcadores histológicos - toxicidade crônica pelo Roundup em piaçu (*Leporinus macrocephalus*). **Arq Bras Med Vet e Zootec.**, v. 61, p. 621-267, 2009.

5. 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.

6. ANTUNES, F. S.; DAL'ACQUA, N.; BERGMANN, C. P.; GIOVANELA, M. Síntese, caracterização e aplicação de nanopartículas de prata como agentes antimicrobianos. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**. v. 9, n. 1, p. 20-26. 2013.

7. ASHARANI, P. V.; WU, Y. L., GONG, Z.; VALIYAVEETTIL, S. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. **IOP Sciense. Nanotechnology**, v. 19, n. 25, p. 255102, 2008.

8. ASHARANI, P. V.; LOW KAH MUN, G.; HANDE, M. P.; VALIYAVEETTIL, S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. **ACS nano**, v. 3, n. 2, p. 279-290, 2008.

9. AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. da M. (Org.). **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: RIMa, 2003. 340p.

10. BAPTISTA, D. F.; DORVILLÉ, L. F. M.; BUSS, D. F.; NESSIAMIAN, J. L. Spatial and temporal organization of aquatic insects assemblages in the longitudinal gradient of a tropical river. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 61, n. 2, p. 295-304. 2001.

11. BAR-ILAN, O.; ALBRECHT, R.M.; FAKO, V.E.; FURGESON, D.Y. Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos. **Small**, v. 5, n. 16, p. 1897-1910, 2009.

12. BASTOS, R. M. P. **Nanotecnologia: Uma revolução no desenvolvimento de novos produtos**. Monografia (Engenharia de Produção) - Universidade Federal de Juiz de fora, Minas Gerais. 28p. 2006.

13. 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.

14. BECHTOLD, M. **Síntese e caracterização de nanopartículas de prata e aplicação como agente biocida em tinta poliuretânica hidrossolúvel**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2011.

15. BERNI NETO, E. A.; RIBEIRO, C; ZUCOLOTTO, V. Síntese de nanopartículas de prata para aplicação na sanitização de embalagens. **Embrapa Instrumentação-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2008.

16. BERNE, B, J.; PECORA, R. **Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics**. Courier Corporation, 2000.

17. 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.

18. 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.

19. BORM, P.J.A.; ROBBINS, D.; HAUBOLD, S.; KUHLBUSCH, T.; FISSAN, H.; DONALDSON, K.; SCHINS, R.; STONE, V.; KREYLING, W.; LADEMANN, J.; KRUTMANN, J.; WARHEIT, D.; OBERDÖRSTER, E. The potential risks nanomaterials: a review carried out for ECETOC. **Particle and Fibre Toxicology**. v. 3, n. 1, p. 11, 2006.

20. BRENTANO, D. M. **Desenvolvimento e aplicação do teste de toxicidade crônica com Daphnia magna: avaliação de efluentes tratados de um aterro sanitário**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2006.

21. BUIKEMA, A. L.; SHERBERGUER, S. R. *Daphnia*. **Carolina Tips**. 15 (10):1-5. 1977.

22. BURTON JR, G. A.; DENTON, D. L.; HO, K.; IRELAND, D. S. **Sediment toxicity testing: issues and methods. In: Handbook of Ecotoxicology**, Second Edition. CRC Press, p. 135-174. 2002.

23. CAIRNS JR. J. **Ecological toxicity testing: scale, complexity, and relevance**. Boca Raton, Lewis Publishers, 1995.

24. CASARRET; DOULL'S. **Toxicology - The Basic Science of Poisons**. Kansas City, 7 Ed., Kansas. 2008.

25. CAVALCANTE, A. K. **Avaliação da ecotoxicidade do resveratrol no estágio embriolarval de peixes da espécie *Danio rerio*. 2017**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear - Materiais) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

26. 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.

27. 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.

28. 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.

29. DOMINGUES, D, F.; BERTOLETTI, E. Seleção, manutenção e cultivo de organismos aquáticos. **Ecotoxicologia Aquática-princípios e aplicações**. 1ª ed. São Carlos: Editora Rima, p. 153-184, 2006. 2.

30. EGERTON, Ray F. **Physical principles of electron microscopy**. New York: Springer, 2005.

31. FOSSI, M. C.; SAVELLI, C.; CASINI, S. Mixed function oxidase induction in Carcinus aestuarii.: Field and experimental studies for the evaluation of toxicological risk due to Mediterranean contaminants. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: **Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 121, n. 1-3, p. 321-331, 1998.

32. GOULART, M.; CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Revista da FAPAM**, v. 2, p. 1-3, 2003.

33. 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.

34. GRUNWALD, D. J.; EISEN, J. S. Headwater of the zebrafish-emergence of a new model vertebrate. **Nat Ver Genet.** v. 3, p. 717-724, 2002.

35. HAMILTON, M. A; Russo, R. C.; Thurston, R. V. Trimmed Spearman-Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science & Technology**, v. 11, n. 7, p. 714-719, 1977.

36. HILL, A. J.; TERAOKA, H.; HEIDEMAN, W.; PETERSON, R. E. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. **Toxicological sciences**, v. 86, n. 1, p. 6-19, 2005.

37. 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.

38. HUH, A. J.; KWON, Y. J. "Nanoantibiotics": a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. **Journal of controlled release**, v. 156, n. 2, p. 128-145, 2011.

39. HUNTER, R. J. **Zeta potential in colloid science: principles and applications**. *Academic press*, 2013.

40. IRAVANI, S. **Green synthesis of metal nanoparticles using plants. Green Chemistry**, v. 13, n. 10, p. 2638-2650, 2011.

41. International Organization for Standardization. **Biological evaluation of medical devices–Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity**. ISSO, 2009. (ISO 10993-5).

42. JAYARAM K. C., **The Freshwater Fishes of the Indian Region**. Narendra Publishing House; Delhi. 1999.

43. KANCHI, S.; AHMED, S. Green Metal Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Their Applications. **John Wiley & Sons**, 2018.

44. KARN, B. P.; BERGESON, L. L. Green nanotechnology: straddling promise and uncertainty. **Natural Resources & Environment**, v. 24, n. 2, p. 9-23, 2009.

45. KATTUMURI, V.; KATTI, K.; BHASKARAN, S.; BOOTE, E. J.; CASTEEL, S. W.; FENT, G. M.; KATTI, K. V. Gum arabic as a phytochemical construct for the stabilization of gold nanoparticles: in vivo pharmacokinetics and X-ray-contrast-imaging studies**. Small**, v. 3, n. 2, p. 333-341, 2007.

46. KAUCZ, A. P. **Síntese e caracterização de nanoparticulas metálicas e nanotubos de carbono ancorados em superfície de sílica com potencial utilização em sensores baseados em fibras ópticas**. Dissertação (Engenharia e Ciência dos Materiais) - Universidade Federal do Paraná, Paraná. 97p. 2017.

47. KIMMEL, C. B.; BALLARD, W. W.; KIMMEL, S. R.; ULLMANN, B.; SCHILLING, T, F. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental dynamics**, v. 203, n. 3, p. 253-310, 1995.

48. 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.

49. LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (Danio rerio): a review. **Aquaculture**, v. 269, n. 1-4, p. 1-20, 2007.

50. 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.

51. LINES, M. G. Nanomaterials for practical functional uses. **Journal of Alloys and Compounds.** 449, 242-245, 2008.

52. 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.

53. MAGALHÃES, D. P; FERRÃO FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 355-381. 2008.

54. MARIOD, A. A. Gum Arabic: Structure, Properties, Application and Economics. (Ed.). **Academic Press**, 2018.

55. MARTINI, G. A. **Avaliação da citotoxicidade do dietiltoluamida (DEET) em mexilhões Perna perna (Linnaeus, 1758) irradiados e não irradiados com radiação gama de ^{60}CO**. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo. 2013.

56. 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.

57. MAZIERO, J. S.; ROGERO, S.; ALEMANY, A. Estudo ecotoxicológico da nanopartícula de prata em *Daphnia similis*. **Journal of the Health Sciences Institute (JHSI)**, v. 34, n. 3, p. 133-139. 2016.

58. 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.

59. MILLER, J. C; SERRATO, R; KUNDAHL, G. The handbook of nanotechnology: business, policy and intellectual property law. **Weley**, 1 Ed., New Jersey. 2005.

60. NARDONE, R. M. Toxicity testing *in vitro*. In: ROTBBLAT, G.H.; CRISTOFALO, V.J. (Ed.). **Growth, nutrition and metabolism of cells in culture**. New York: Academic, p.471-495, 1977.

61. 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.

62. NOGUEIRA, P. F. M.; PAINO, I. M. M.; ZUCOLOTTO, 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.

63. NOGUEZ, C. Surface plasmons on metal nanoparticles: the influence of shape and physical environment. **The Journal of Physical Chemistry** C, v. 111, n. 10, p. 3806-3819, 2007.

64. Organisation for Economic Co-operation and Development. **Guideline for the testing of chemicals: Fish embryo acute toxicity (FET) test.** (OECD 236). 2013.

65. PAN, Y., NEUSS, S.; LEIFERT, A.; FISCHLER, M.; WEN, F.; SIMON, U.; SCHMID, G.; BRANDAU, W.; JAHNEN-DECHENT, W. Size-dependet cytotoxicity of gold nanoparticles. **Small**. 3, 1941-1949. 2007.

66. PERKAMPUS, Heinz-Helmut. UV-VIS Spectroscopy and its Applications. **Springer Science & Business Media**, 2013.

67. PLAA, G. L. Present status: toxic substances in the environment. **Canadian Journal of physiology and Pharmacology**, v. 60, n. 7, p. 1010-1016, 1982.

68. QUINTANILHA, R. C. **A utilização de goma arábica como agente estabilizante de nanocompósitos de poli (anilina)**. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Paraná. 2015.

69. RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications.** FMC Corp., Princeton, NJ, 1985.

70. RAND, G. M.; WELLS, P. G.; MACCARTY, L. S. **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, environmental fate and risk assessment**. 2. ed. Washington, DC, Taylor e Francis, 1125p. 1995.

71. REZENDE, V. B. **Desenvolvimento de modelos animais alternativos para avaliação dos efeitos comportamentais e metabólicos de antipsicóticos.** Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais. 89p. 2013.

72. RIBO, J. M. Interlaboratory comparison studies of the luminescent bacteria toxicity bioassay. **Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal**, v. 12, n. 4, p. 283-294, 1997.

73. 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.

74. 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 Orgãos Artificiais: 2015; Campina Grande, PB: Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Orgãos Artificiais; 2015.

75. RUBINGER, C. F. **Seleção de métodos biológicos para a avaliação toxicologia de efluentes industriais**. Tese (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais. 89p. 2009.

76. SANT'ANNA, M. C. B. **Zebrafish (Danio rerio) como modelo para estudo da toxicidade induzida pelo ferro**. 2009. Dissertação (Mestado) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

77. SANTOS, D.C. **Disrupção endócrina em embriões de peixe-zebra (Danio rerio), análises de expressão génica e do desenvolvimento embrionário.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal, 2012.

78. SCHNEIDER, H.; FRITZKY, L.; WILLIAMS, J.; HEUMANN, C.; YOCHUM, M.; PATTAR, K.; NOPPERT, G.; MOCK, V.; HAWLEY, E. Cloning and expression of a zebrafish 5-HT2C receptor gene. **Gene**, v. 502, n. 2, p. 108-117, 2012.

79. SCOPE - SCIENTIFIC COMMITTEE ON PROBLEMS OF THE ENVIRONMENT. **Report 12: Principles of Ecotoxicology**. 1978. Edited by G.C. Butler, published on behalf of the Scientific Comitte on Problems of the Environment (SCOPE) of the International Council of Scientific Unions (ICSU) by John Wiley e Sons. Chichester, New York, Brisbane, Toronto. Disponível em: <https://www-legacy.dge.carnegiescience.edu/SCOPE/SCOPE_12/SCOPE_12.html> em 19 de março de 2019.

80. SILVA, L. D. **Síntese verde, caracterização e atividade biológica de nanopartículas de prata obtidas utilizando extratos de *Hancornia speciosa Gomes-Apocynaceae* (mangabeira).** Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia) - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. 101p. 2014.

81. SILVEIRA, T. R; SCHNEIDER, A. C; HAMMES, T. O. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 2. São Paulo. 2012.

82. 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.

83. SPENCE, R; SMITH, C. Male territoriality mediates density and sex ratio effects on oviposition in the zebrafish, *Danio rerio*. **Animal Behaviour**, v. 69, n. 6, p. 1317-1323, 2005.

84. STERBA G., **Freshwater Fishes of the World**. Vista Books; London. 1962.

85. THAKKAR, K. N.; MHATRE, S. S.; PARIKH, R. Y. Biological synthesis of metallic nanoparticles. **Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine**, v. 6, n. 2, p. 257-262, 2010.

86. THE ROYAL SOCIETY AND THE ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING: **Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties**. R 2004.

87. TRUHAUT, R. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 1, n. 2, p. 151-173, 1977.

88. UNITED STATES PATENT. Kattesh V. Katti; Douglas E. Berning; Wynn A. Volkert; Alan R. Ketring; Robert Churchill. **Conjugate And Method For Forming Aminomethyl Phosphorus Conjugates**. USOO5948.386A, 7 de setembro de 1999.

89. UNITED STATES PATENT APPLICATION PUBLICATION. Kannan Raghuraman; Kattesh K. Katti. **Methods For Producing Silver Nanoparticles**. US 2006/004.5916A1, 2 de março de 2006.

90. VEIGA, L. F.; VITAL, N. **Testes de toxicidade aguda com o microcrustáceo Artemia sp**. In: NASCIMENTO, I. A.; SOUSA, E. C. P. M.; NIPPER, M. Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações no Brasil. São Paulo, Artes Gráficas e Indústria, p. 111-112. 2002.

91. VERBEKEN, D.; DIERCKX, S.; DEWETTINCK, K. Exudate gums: occurrence, production, and applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 63, n. 1, p. 10-21, 2003.

92. 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.

93. 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.

94. WHITE, J. R.; LUQUE, R.; BUDARIN, V. L.; CLARK, J. H.; MACQUARRIE, D. J. Supported metal nanoparticles on porous materials. Methods and applications. **The Royal Society of Chemistry**, v. 38, p. 481-494. 2009.

95. 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.

96. YU, M. H.; TSUNODA, H.; TSUNODA, M. **Environmental toxicology: biological and health effects of pollutants**. 2.ed. Boca Raton, Florida, 2005.

97. ZAGATTO, P. A; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática - princípios e aplicações**. Rima, 1 Ed., 478p, São Carlos. 2006.

98. ZARBIN, A. J. G. Química de (nano) materiais. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1469-1479. 2007.

99. 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.

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
http://www.ipen.br

O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.