

4ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais (4ª OBI) no período de 19 a 22 de Agosto de 2015, em Campina Grande - PB – Brasil.

TOXICIDADE DA NANOPARTÍCULA DE PRATA (NPAg): ESTUDO COMPARATIVO ENTRE SUSPENSÕES DE NPAG OBTIDAS POR DIFERENTES MÉTODOS

Sizue O. Rogero¹, Marília T.A. Quintino¹, Paola R. de Almeida¹, Ricardo R. Dias¹, Ademar B. Lugão¹, José R. Rogero¹

¹Centro de Química e Meio Ambiente, IPEN/CNEN-SP, São Paulo (SP), Brasil
sorogero@ipen.br

Resumo. As nanopartículas fazem parte do nosso cotidiano, sendo utilizados em fármacos, cosméticos, roupas, biosensores etc. Concentrações críticas letais de NPAG podem ser identificadas e precauções devem ser tomadas em aplicações especialmente na área biomédica. Atualmente há uma grande preocupação sobre a toxicidade da NPAG principalmente quanto a sua exposição em organismos vivos e liberação no meio ambiente aquático. O objetivo deste trabalho foi verificar e comparar a toxicidade de diferentes soluções de NPAG assim como, o impacto no meio ambiente. O nível de toxicidade encontrado nas duas soluções testadas foi da mesma ordem de grandeza no ensaio *in vitro* de citotoxicidade e no teste de ecotoxicidade aguda sendo que o nível de toxicidade em organismo aquático foi cerca de 1.000 vezes maior do que em cultura de células. Estes resultados indicam que cuidados devem ser tomados no descarte das indústrias que utilizam soluções de NPAG no sentido de preservar a biota ambiental.

Palavras-chave: Nanopartículas prata, Citotoxicidade, Ecotoxicidade

1. INTRODUÇÃO

As nanopartículas têm atraído grande atenção nas suas aplicações na área médica. O maior interesse está relacionado às nanopartículas de prata (NPAG), também referidas como prata coloidal. A prata coloidal apresenta ação contra uma ampla faixa de microorganismos como bactérias Gram positivas, Gram negativas, fungos etc. Apesar do efeito bactericida/antimicrobiano dos compostos de prata ser bem conhecido, seu mecanismo de ação ainda não está bem definido. Estudos para avaliar a toxicidade das NPAG têm sido desenvolvidos devido a ampla utilização destas em produtos para controlar infecções bacterianas (Leitch *et al.*, 1993).

Também tem sido estudada em ensaios *in vivo* usando como modelo biológico embriões do peixe *Danio rerio* demonstrando que NPAG entre 5-46 nm são carregadas por transporte passivo através dos poros de canal do córion interferindo no desenvolvimento embrionário desses organismos (concentrações >0,08 nM) (Lee *et al.*, 2007).

Preocupações com a toxicidade aos seres humanos e ao meio ambiente têm sido discutidas, em função do incremento indiscriminado do seu uso. Entretanto estudos sobre os efeitos das NPAG na saúde humana e implicações no meio ambiente estão no estágio inicial (Park *et al.*, 2010, Asharani *et al.*, 2008).

Neste trabalho foi realizada comparação de suspensões de NPAG obtidas por diferentes processos quanto à toxicidade utilizando ensaios *in vitro* de citotoxicidade e *in vivo* de ecotoxicidade com a possibilidade de aplicação de ensaios ecotoxicológicos para toxicidade *in vivo* em biomateriais, levando em conta a preocupação com o meio ambiente.

2. METODOLOGIA

Foram realizados ensaio *in vitro* de citotoxicidade em cultura de células e ensaio *in vivo* de ecotoxicidade aguda em organismo aquático, utilizando soluções de NPAg obtidos por diferentes metodologias, cedidos pela Empresa Khemia (solução de 22 ppm) e pelo Instituto de Química da USP (IQUSP) (solução de 10.000 ppm).

As diferentes soluções de NPAg na concentração de 22 ppm foram incorporadas em membranas curativas de hidrogel de PVP e as membranas obtidas foram também submetidas ao teste de citotoxicidade.

2.1 Ensaio de citotoxicidade

O teste *in vitro* de citotoxicidade seguiu normas da Organização Internacional de Padronização (ISO 10993-5, 2009), utilizando o método de incorporação do vermelho neutro. A linhagem celular utilizada foi de células de tecido conectivo de camundongo NCTC L929 da ATCC (American Type Culture Collection). As microplacas de 96 poços contendo 7×10^5 células por poço foram fornecidas pelo Instituto Adolfo Lutz.

Preparo das soluções de NPAg. As diluições foram realizadas em meio de cultura MEM-uso (MEM da Sigma Aldrich com adição de 5% SFB (soro fetal bovino)), obtendo-se a solução de 4 mg L^{-1} da Khemia e 10 mg L^{-1} do IQUSP. Destas soluções foram feitas diluições seriadas (100, 50, 25, 12,5 e 6,25%) com MEM-uso.

Preparo dos extratos das amostras. As membranas de hidrogel contendo NPAg foram colocadas em frascos contendo MEM-uso, na proporção de 1 cm^2 por mL e incubadas em estufa úmida e atmosfera contendo 5% CO_2 em temperatura de 37°C por 24 h. No momento do ensaio foram feitas diluições seriadas como as soluções de NPAg.

Este mesmo procedimento foi aplicado para os controles positivo e negativo.

Ensaio propriamente dito. 0,2 mL das soluções diluídas de NPAg foram depositadas nos respectivos poços da microplaca contendo as células, em triplicata. As microplacas foram colocadas por 24 h a 37°C numa incubadora de CO_2 úmida. Os poços de controle de células receberam somente MEM-uso. Em todas as microplacas foram adicionados os controles positivo e negativo.

A solução foi substituída por uma solução de vermelho neutro em meio MEM ($50 \mu\text{g/mL}$) e incubadas por 3h em 37°C . Decorrido este tempo as microplacas foram lavadas 2x com tampão fosfato pH 7.4 e uma vez com 1% CaCl_2 em formaldeído 0,5%. A liberação do corante das células foi obtida pela adição de 0,2 mL de solução de extração (50% etanol em ácido acético 1%).

A leitura da densidade óptica (DO) foi realizada num espectrofotômetro leitor de placa ELISA Sunrise da Tecan em filtro 540 nm. Com as DO obtidas foram calculadas as porcentagens de viabilidade celular em relação ao controle de células, consideradas 100%.

2.2 Ensaio Agudo de Ecotoxicologia

Foram utilizados como organismos-teste o microcrustáceo *Daphnia similis* conhecido como pulga d'água, colocados em diferentes concentrações da NPAg (nanopartícula de prata) diluídas em meio MS, de acordo com a USEPA (2002) e norma ABNT NBR 12713 (2009).

A manutenção e cultivo dos organismos foram realizados em câmara de cultivo na temperatura entre 18°C e 22°C, luminosidade difusa e fotoperíodo de 16 horas de luz. A alimentação foi feita com alga (*Pseudokirchneriella subcapitata*) e composto fermentado diariamente, no Laboratório de Ecotoxicologia e Citotoxicidade do IPEN/CNEN-SP, Brasil. O meio MS previamente ajustados em pH 7,0-7,6 e dureza 40-48 mg CaCO₃ L⁻¹, foi mantido sob aeração.

Preparo de solução de NPAg. As soluções estoque de NPAg utilizadas nos testes foram preparadas na concentração de 0,1 mg L⁻¹ tanto a solução da empresa Khemia como a do IQUSP. As diluições utilizadas nos ensaios foram: 2; 3; 4,5; 6,75 e 10,13 µg L⁻¹ da NPAg Khemia e do IQUSP 2, 4, 8, 16 e 32 µg L⁻¹.

Na Tabela 1 estão apresentadas as condições do ensaio, utilizando neonatas com idade entre 6 a 24 h.

Tabela 1. Ensaio agudo de ecotoxicologia de NPAg em *Daphnia similis*

PARÂMETROS	CONDIÇÕES
Tipo de ensaio	Estático
Duração do ensaio	48 h
Substâncias-teste	NPAg
Temperatura	20 ± 2° C (<i>D. similis</i>);
Fotoperíodo	16 h luz; 8 h escuro
Recipiente-teste	Tubos de ensaio
Volume solução-teste	10 mL
Nº concentrações-teste	5 e controles
Nº neonatas/recipiente	5
Nº réplicas/concentração	4
Alimentação no ensaio	Não
Água de diluição	Meio MS
Avaliação de efeito	Imobilidade
Expressão resultados	Quantitativo: CL50
Validação dos ensaios	Controle: Mortalidade <10%

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Ensaio de Citotoxicidade

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados do ensaio *in vitro* de citotoxicidade das soluções de NPAg em estudo e colocando em gráfico a % de viabilidade celular em relação a concentração do extrato (%) são obtidas as curvas de viabilidade celular do ensaio (Fig.1). As

amostras que apresentarem a curva acima da linha de 50% de viabilidade são consideradas não citotóxicas, como o controle negativo (poli etileno de alta densidade). As que apresentarem as curvas cruzando a linha de 50% demonstram citotoxicidade e o índice de citotoxicidade IC_{50} pode ser obtido na intersecção da curva. IC_{50} significa a concentração do extrato que causa dano à 50% da população celular no ensaio. No caso do controle positivo o IC_{50} foi de 33%, isto é, a concentração de 33% do extrato do controle positivo (látex de borracha natural) causou dano à metade das células no ensaio.

Tabela 2. Resultados do ensaio de citotoxicidade das NPAg IQUSP e Khemia

Concentração Extrato (%)	% Viabilidade celular			
	Controle Negativo	Controle Positivo	NPAg IQUSP	NPAg Khemia
100	97±4	0±0	2±18	3±9
50	103±4	11±5	6±7	2±0
25	105±6	76±3	84±9	83±4
12,5	107±5	97±5	102±4	94±2
6,25	105±9	101±11	105±4	90±0

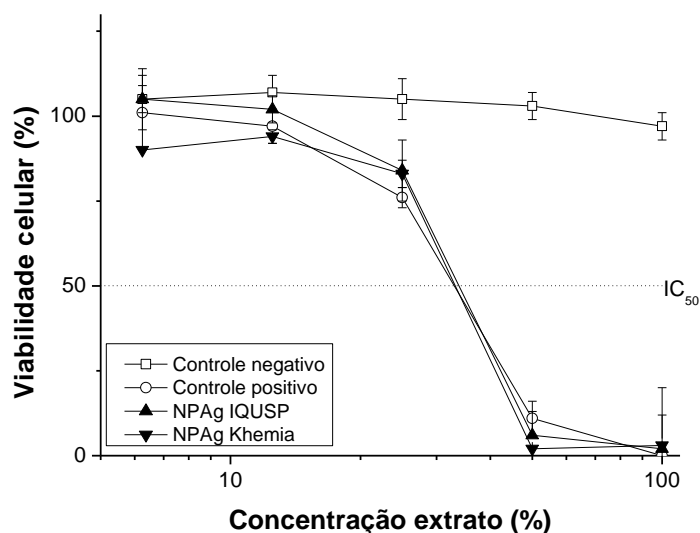


Figura 1. Curvas de viabilidade celular das NPAg (IQUSP e Khemia) no ensaio de citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro

O Índice de Citotoxicidade (IC_{50}) para a solução de NPAg IQUSP foi de 34% e da Khemia 33%. Como a solução 100% do IQUSP = 10 mg L⁻¹ e da Khemia = 4 mg L⁻¹, os IC_{50} foram de 3,40 e 1,32 mg L⁻¹, respectivamente. Estes resultados estão na mesma ordem de grandeza, sendo que neste teste de citotoxicidade as NPAg da Khemia mostrou ser quase 3 vezes mais tóxica que a do IQUSP.

Leitch *et al.* (1993) reportam a citotoxicidade em fibroblastos de ratos após exposição *in vitro* em presença de AgNP esféricas, de tamanho entre 7-12 nm, em concentração de 6,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (6,25 mg L^{-1}), corroborando com nossos resultados, estão na mesma ordem de grandeza.

Na Tabela 3 e Fig.2 estão apresentados os resultados do ensaio de citotoxicidade das membranas de hidrogel contendo NPAg.

Tabela 3. Resultados do ensaio de citotoxicidade das membranas de hidrogel contendo NPAg IQUSP e Khemia

Concentração Extrato (%)	% Viabilidade celular			
	Controle Nnegativo	Controle Positivo	Hidrogel + NPAg IQUSP	Hidrogel + NPAg Khemia
100	73 \pm 4	0 \pm 0	122 \pm 8	8 \pm 24
50	101 \pm 3	10 \pm 0	113 \pm 9	101 \pm 4
25	106 \pm 2	102 \pm 3	109 \pm 17	112 \pm 7
12,5	103 \pm 3	110 \pm 4	105 \pm 10	108 \pm 4
6,25	103 \pm 4	109 \pm 5	97 \pm 10	107 \pm 2

Projetando-se os resultados em gráfico obtivemos as curvas de viabilidade celular dos controles negativo e positivo assim como das membranas de hidrogel contendo 22 mg L^{-1} de NPAg, como mostra a Fig.1.

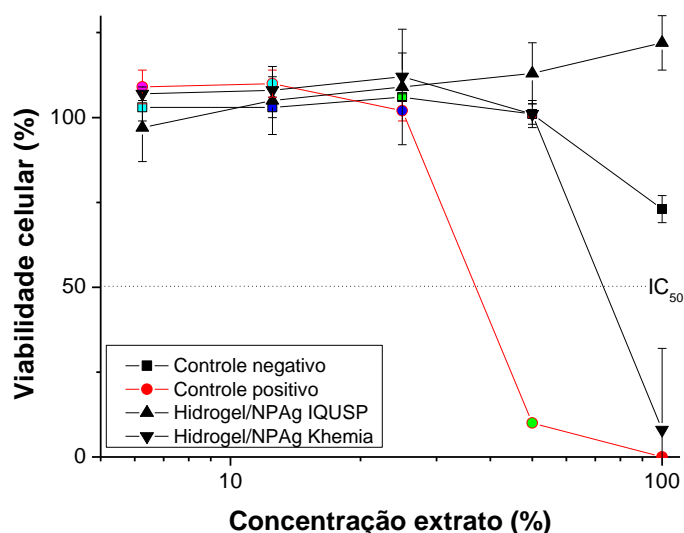


Figura 2. Curvas de viabilidade celular das membranas de hidrogel contendo NPAg (IQUSP e Khemia) no ensaio de citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro

Os resultados de IC_{50} obtidos neste gráfico foram de 37% para controle positivo e 73% para o hidrogel Khemia. As concentrações de Ag encontradas nos extratos 100% dos hidrogéis foram: 0,41 mg L^{-1} para IQUSP e 2,89 mg L^{-1} para Khemia. Portanto o IC_{50} da membrana de hidrogel contendo NPAg Khemia foi de 2,11 mg L^{-1} .

No caso do hidrogel com NPAg IQUSP o IC₅₀ foi maior de 100% significando não citotoxicidade, como pode ser observado no gráfico da Fig.2, apresentando curva de viabilidade celular acima de 50% de viabilidade, como o controle negativo.

No ensaio de citotoxicidade com as nanopartículas em solução obtivemos IC₅₀ da solução de NPAg IQUSP de 3,40 mg L⁻¹ e no extrato 100% foi encontrada concentração de 0,41 mg L⁻¹, isso explica o resultado da membrana IQUSP mostrando que não houve liberação de Ag suficiente para causar toxicidade no ensaio.

3.2. Ensaio de Ecotoxicidade

Este teste tem por finalidade verificar a toxicidade da NPAg na espécie aquática *Daphnia similis*, no sentido de conhecer seus efeitos toxicológicos no ambiente aquático. Os dados obtidos poderão ser utilizados posteriormente para definir suas limitações quanto à concentração permissível em meios aquáticos para preservação do meio ambiente.

A captação de NP através das brânquias nos organismos aquáticos não é bem esclarecida e não é aceita como a rota mais provável, devido a presença de camada de muco envolvendo o epitélio das brânquias, podendo impedir a entrada das NPs no organismo (Handy *et al.*, 2008, Scown *et al.*, 2010). Outro tipo de exposição seria pela via oral, pela ingestão de alimento contaminado ou pelo poluente dissolvido na água. Este tipo de exposição permite o contato direto das NP com os tecidos onde se realizaria a entrada direta por endocitoses (Volker *et al.*, 2013).

Table 4. Ensaio Agudo de Ecotoxicidade de NPAg Khemia em *Daphnia similis*: resultados de organismos imóveis em dois ensaios realizados.

Concentração NPAg ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Organismos imóveis			
	Ensaio 01		Ensaio 02	
	Total	%	Total	%
0.00	1	5	0	0
2.00	2	10	2	10
3.00	3	15	2	10
4.50	4	20	4	20
6.75	10	50	6	30
10.13	16	80	18	90
15.19	-	-	20	100

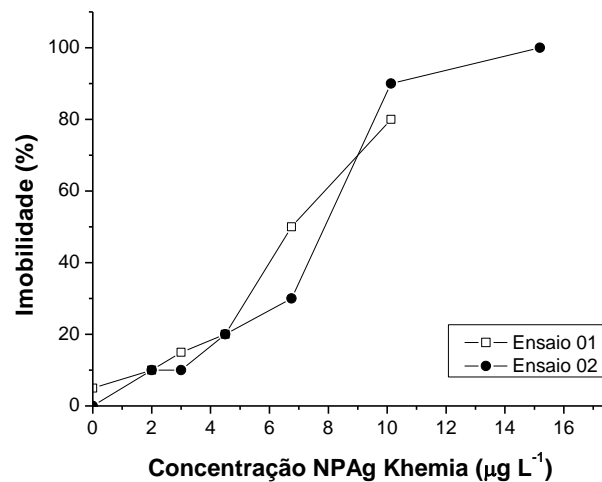


Figura 3. Teste de Ecotoxicidade Aguda de NPAG em *Daphnia similis*. Curvas de imobilidade dos organismos em função da concentração da NPAG.

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados do ensaio de ecotoxicidade das NPAG Khemia e na Fig.3 o gráfico obtido pela projeção dos resultados de % de imobilidade dos organismos em relação às concentrações das NPAG.

Os resultados do teste de ecotoxicidade das NPAG IQUSP estão mostrados na Tabela 5 e gráfico na Fig. 4.

Tabela 5. Ensaio Agudo de Ecotoxicidade de NPAG IQUSP em *Daphnia similis*: resultados de organismos imóveis em três ensaios realizados.

Concentração NPAG (µg L ⁻¹)	Organismos imóveis					
	Ensaio 01		Ensaio 02		Ensaio 03	
	Total	%	Total	%	Total	%
0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
16	20	100	16	80	6	30
32	20	100	20	100	20	100

A média dos resultados de CL₅₀ das NPAG IQUSP obtida utilizando o método de Trimmed Spearman-Kärber foi de 13,93 µg L⁻¹.

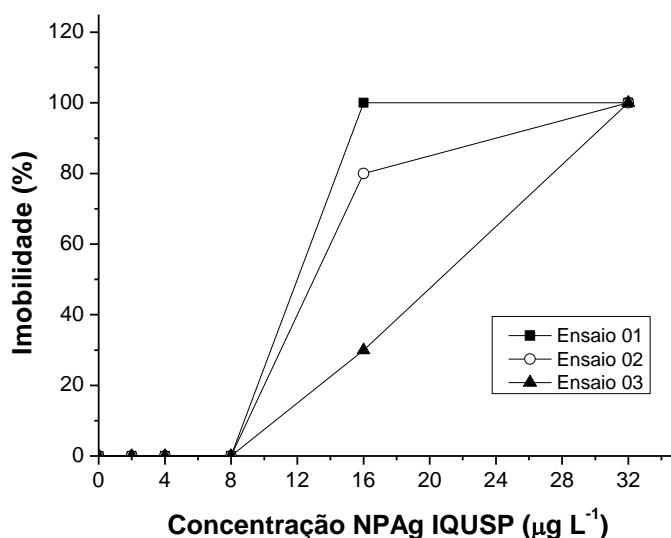


Figura 4. Teste de Ecotoxicidade Aguda de NPAg em *Daphnia similis*. Curvas de imobilidade dos organismos em função da concentração da NPAg.

Na Tabela 6 apresentamos os resultados para comparação entre duas soluções de NPAg produzidas por diferentes métodos e utilizadas neste trabalho.

Tabela 6. Comparação dos resultados obtidos nos testes *in vitro* de Citotoxicidade e *in vivo* de Ecotoxicidade de NPAg Khemia e IQUSP.

Ensaio	Material	NPAg Khemia 22 mg L ⁻¹	NPAg IQUSP 10.000 mg L ⁻¹
Citotoxicidade	Suspensão NPAg	IC ₅₀ = 1,32 mg L ⁻¹	IC ₅₀ = 3,40 mg L ⁻¹
	Membrana hidrogel + NPAg	IC ₅₀ = 2,11 mg L ⁻¹	Não tóxico
Ecotoxicidade aguda	Suspensão NPAg	CL ₅₀ = 6,90 µg L ⁻¹	CL ₅₀ = 13,93 µg L ⁻¹
Dosagem de Ag	Extrato Membrana	2,89 mg L ⁻¹	0,41 mg L ⁻¹

Podemos observar que a NPAg Khemia apresentou toxicidade maior que a NPAg IQUSP, principalmente quando incorporada na membrana de hidrogel (Tabela 6). Este fato foi devido a pouca liberação da prata no meio de cultura celular, verificado pela quantificação no extrato por Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma de Argônio (ICP OES).

Analisando os resultados obtidos podemos afirmar que os organismos aquáticos são muito sensíveis às nanopartículas de prata, sendo a concentração letal da ordem de µg L⁻¹, cerca de 1.000 vezes maior que a toxicidade em células em cultura (mg L⁻¹).

4. CONCLUSÃO

As suspensões de NPAg comparadas apresentaram toxicidade nos ensaios *in vitro* e *in vivo* na mesma ordem de grandeza, sendo que a NPAg Khemia mostrou ser cerca de duas vezes maior que a NPAg IQUSP nos ensaios de citotoxicidade e de ecotoxicidade aguda.

A NPAg IQUSP quando incorporada em membrana curativa de hidrogel mostrou-se não citotóxica no teste de citotoxicidade, provavelmente pela não liberação de prata no meio de extração do ensaio.

Os organismos aquáticos mostraram alta sensibilidade às NPAg testadas, da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$, 1.000 vezes maior que em cultura de células. Isso evidencia a grande necessidade de atenção quanto ao descarte de NPAg pelas empresas que as utilizam, visando evitar danos à biota aquática do corpo hídrico ambiental.

Podemos visualizar a aplicação de ensaios ecotoxicológicos no estudo de toxicidade *in vivo* de biomateriais, utilizando *Daphnia* ou peixes *zebrafish*.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq pelas bolsas PIBIC, ao Instituto Adolfo Lutz pela preparação das microplacas no Núcleo de Culturas Celulares, ao Jonny Ross da empresa Khemia e ao Dr. Koiti Araki do Instituto de Química da USP pelo fornecimento das soluções de NPAg.

REFERÊNCIAS

- ABNT - Associação Brasileira de Normas técnicas. Ecotoxicologia aquática -Toxicidade aguda -Método de ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera,). Rio de Janeiro: ABNT, 2009. (NBR – 12713).
- Asharani, P.V., Wu, Y.L., Gong, Z., Valiyaveetil, (2008), “Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models” *Nanotechnology*, 19 (25): 1-8.
- Hamilton, M.A., Russo, R.C., Thurston, R.V., (1977) “Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays”, *Environmental Science & Technology*, 714-719.
- Handy, R. D., Owen, R., Valsami-Jones, E. (2008), “The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs”, *Ecotoxicology*, 17, 315–325.
- International Standard Organization: “Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5 – Tests for Cytotoxicity *in vitro* methods.” ISO 10993-5, 2009.
- Lee, K.J., Nallathamby, P.D., Browning, L.M., Osgood, C.J., Xu, X.H. (2007), *In vivo* imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of zebrafish embryos”, *ACS Nano*, 1,133–143
- Leitch, I. O., Kucukcelebi, A., Robson, M. C. (1993), “Inhibition of wound contraction by topical antimicrobials”, *Aust. N. Z. J. Surg.*, 63(4), 289-293
- Park, E.-J.^a, Yi, J.^b, Kim, Y.^c, Choi, K.^d, Park, K.^a (2010), “Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism”, *Toxicology in vitro*, 27 (3), 872-878.
- Scown, T. M.; Santos, E. M.; Johnston, B. D.; Gaiser, B.; Baalousha, M.; Mitov, S.; Lead, J. R.; Stone, V.; Fernandes, T. F.; Jepson, M.; Van Aerle, R.; Tyler, C. R. (2010), “Effects of aqueous exposure to silver nanoparticles of different sizes in rainbow trout”, *Toxicological Sciences*, 115, 521-534.
- Stackelberg, P.E.; Furlong, E.T.; Meyer, M.T.; Zaugg, S.D.; Henderson, A.K.; Reissman, D.B. (2004), “Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant”. *Science of the Total Environment*. 113, 329-399.
- USEPA - Environmental Protection Agency. EPA-821-R-02-1: Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms 2002. Washington, U.S.A.
- Völker, C., Oetken, M., Oehlmann, J. (2013), “The Biological effects and possible modes of action of nanosilver”, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 223, 81-106.

SILVER NANOPARTICLE TOXICITY (AgNP): COMPARISON OF AgNP SUSPENSIONS OBTAINED BY DIFFERENT METHODS

Sizue O. Rogero¹, Marília T.A. Quintino¹, Paola R. de Almeida¹, Ricardo R. Dias¹, Ademar B. Lugão¹, José R. Rogero¹

¹Centro de Química e Meio Ambiente, IPEN/CNEN-SP, São Paulo (SP), Brasil
sorogero@ipen.br

Abstract. *The nanoparticles are part of our daily lives, been used in pharmaceuticals, cosmetics, clothes, biosensors etc. Silver is easily recycled, can be obtained in particles of various sizes from physic-chemical processes. AgNP critical lethal concentrations can be identified and precautions must be taken to eliminate it especially in biomedical applications. There is a great concern about AgNP toxicity on living organisms and their release into the environment. The aim of this work was to verify and compare two kinds of AgNP solution toxicity obtained by different methods, and the impact of AgNP in the aquatic environment. The two tested solutions showed in the same order of magnitude toxicity in the cytotoxicity and acute ecotoxicity assays. The toxicity level in the aquatic organisms was about 1,000 times higher than on cell culture. These results indicated that some care must be taken in the disposal of industries using NPAg to preserve the environmental biota.*

Keywords: *Silver nanoparticles, Cytotoxicity, Ecotoxicological test*