

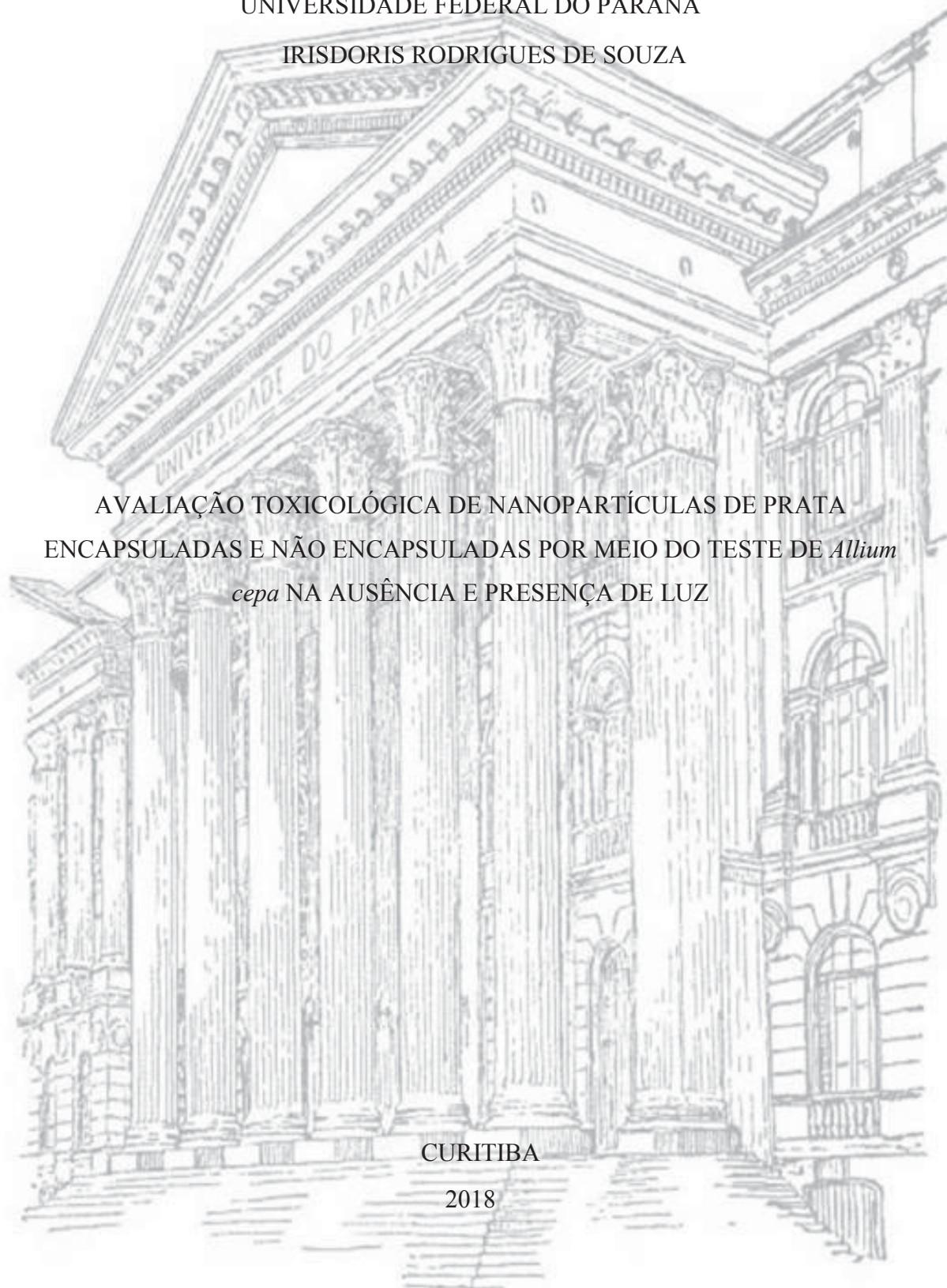
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

IRISDORIS RODRIGUES DE SOUZA

AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
ENCAPSULADAS E NÃO ENCAPSULADAS POR MEIO DO TESTE DE *Allium*
cepa NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE LUZ

CURITIBA

2018



IRISDORIS RODRIGUES DE SOUZA

AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
ENCAPSULADAS E NÃO ENCAPSULADAS POR MEIO DO TESTE DE *Allium*
cepa NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE LUZ

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética,
Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como
requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Daniela Morais Leme

Coorientador: Prof. Dr. Bruno Francisco Sant'Anna dos Santos

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Dulce Maria Bieniara – CRB/9-931)

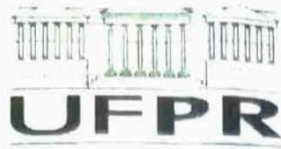
Souza, Irisdoris Rodrigues de
Avaliação toxicológica de nanopartículas de prata encapsuladas e não encapsuladas por meio do teste de *Allium cepa* na ausência e presença de luz. / Irisdoris Rodrigues de Souza. – Curitiba, 2018.
92 p.: il.

Orientadora: Daniela Morais Leme
Coorientador: Bruno Francisco Sant'Anna dos Santos

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Nanopartículas metálicas 2. Toxicidade 3. Genotoxicidade 4. *Allium cepa* I. Título II. Leme, Daniela Morais III. Santos, Bruno Francisco Sant'Anna dos IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (22. ed.) 615.907



TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **IRISDORIS RODRIGUES DE SOUZA** intitulada: **AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA ENCAPSULADAS E NÃO ENCAPSULADAS POR MEIO DO TESTE DE Allium cepa NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE LUZ**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 27 de Março de 2018.

DANIELA MORAIS LEME

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

HELENA C. DA SILVA DE ASSIS

Avaliador Externo (UFPR)

MARTA MARGARETE CESTARI

Avaliador Interno (UFPR)

AGRADECIMENTOS

Nestes dois anos de mestrado, tive experiências muito valiosas que me permitiram crescimento profissional e pessoal. As pessoas citadas nestes agradecimentos, são como degraus que me ajudaram a chegar aonde estou hoje e que guardarei com muito carinho.

Agradeço primeiro a Deus, por ter me permitido nascer em uma família que sempre deu todo o amor e apoio para meu crescimento, em todos os aspectos. Aos meus pais, Moisés e Marleida, e irmãs Izabele, Gabrielle e especialmente à minha irmã gêmea Isidoris, por estar sempre comigo nesta jornada, juntas e nos apoiando frente às dificuldades. Ao meu namorado Christian Colina, que também é minha família e que me ajudou com os trabalhos no computador e sempre me deu apoio emocional.

Agradeço à minha orientadora Prof^ª Dra. Daniela Morais Leme, por ter me acolhido no laboratório, pela paciência em me escutar quando estava com saudade da família e pelos ensinamentos das técnicas, correções e apoio em todos os trabalhos realizados. E ao coorientador Prof. Dr. Bruno Francisco Sant'Anna dos Santos que contribuiu com seus conhecimentos em botânica e análises morfológicas das raízes de *A. cepa*.

Às parcerias da UFPR realizadas neste trabalho, Leticia e Prof^ª Dr^a Helena Cristina da Silva de Assis, da Farmacologia, à Daniele, Larissa e Prof. Dr. Patrício Peralta Zamorra, da Química, e Ariana da Botânica. E de fora da UFPR, Prof. Dr. Francisco André Ossamu Tanaka (ESALQ-USP) e Profa. Dra. Carmen Lúcia Voigt (UEPG), sem elas a realização deste trabalho não seria possível.

Aos amigos queridos, do laboratório, Lucas, Gustavo, Jaqueline e Ronaldo, pelas boas risadas e ajuda na realização de alguns trabalhos. E ao professor Dr. Daniel Pacheco Bruschi, por ter um coração tão bom e ajudar com as caronas de carro, e conversas bem-humoradas.

E às professoras que participaram da minha banca de qualificação e apresentação de projeto, Prof^ª Dr^a Luciane Viater Tureck e Marta Margarete Cestari.

À técnica Amanda, pela ajuda nos experimentos realizados e a quem desejo tudo de bom. E à Tatiane, por me dar boas ideias e ajudar com gráficos e Excel.

E a todos que de alguma forma me ajudaram a me situar no laboratório, como saber aonde estavam os materiais, ajustar equipamentos, etc., pois estas pequenas coisas, fazem diferença para um recém-chegado no laboratório, obrigada Laís, Taynah e Antônio.

RESUMO

Nanopartículas de prata (AgNPs), produzidas em sua forma não estabilizada (sem cápsula) e estabilizada contra agregação (com uma cápsula orgânica), são amplamente usadas em produtos de consumo devido seu potencial antibacteriano, e têm se tornado uma preocupação ambiental, dado seu crescente uso e liberação no meio ambiente. Sendo a cápsula de polivinilpirrolidona (PVP), uma das mais utilizadas. Devido à pouca compreensão sobre o comportamento de AgNPs em diferentes condições, e sua sensibilidade à luz, este estudo objetivou investigar a toxicidade de baixas concentrações de AgNP e AgNP-PVP nas condições de escuro e exposição à luz visível, considerando especificamente suas tendências a aglomerar diferenciadas – um importante determinante da internalização das NPs. Sementes de *A. cepa* expostas às NPs no escuro e claro, foram avaliadas quanto a inibição da germinação e desenvolvimento das raízes (toxicidade) (0,5; 1; 5; 10 e 100 ng/mL), alterações do ciclo celular (citotoxicidade) e danos no DNA (genotoxicidade) (5; 10 e 100 ng/mL), alterações celulares morfológicas e bioquímicas (atividade de enzimas envolvidas no estresse oxidativo) (100 ng/mL). Os resultados foram relacionados com a caracterização química das NPs. Não houve alteração na germinação e desenvolvimento das raízes para ambas AgNPs testadas nas duas condições. Contudo, elas foram genotóxicas, pelo aumento significativo de aberrações cromossômicas (AC) e micronúcleos (MN), no escuro e no claro. Ademais, houve diminuição da atividade de Superóxido dismutase (SOD) e aumento de lipoperoxidação (LPO) em AgNP-PVP no claro e no escuro, respectivamente, indicando estresse oxidativo. Apesar de estabilizada, AgNP-PVP se mostrou menos genotóxica que AgNP, indicando que a toxicidade de NPs pode ir muito além de seu estado de agregação. A comparação dos efeitos adversos promovidos pelas NPs em estudo, mostrou que a luz visível diminuiu as AC em até 5,60x em AgNP e 2,01x em AgNP-PVP. Alterações no índice mitótico (IM) e alterações morfoanatômicas nas raízes, verificadas para as maiores concentrações na condição escuro, não foram observadas na condição clara, mostrando que a luz promove alterações que impedem que as NPs exerçam sua ação citotóxica. Nosso estudo sugere que a luz visível poderia ser utilizada como ferramenta em tratamentos de resíduos, diminuindo sua toxicidade e os riscos ambientais, para isso, mais estudos com luz e NPs devem ser realizados.

Palavras-chave: nanopartículas de prata; citotoxicidade; polivinilpirrolidona; genotoxicidade; toxicidade, vegetal superior.

ABSTRACT

AgNPs, produced in non stabilized form (without coating) and stabilized against aggregation (with an organic coating), are widely used in consumer products due to their antibacterial potential. Among the existing capping agents, Polyvinylpyrrolidone (PVP) is one of the most used. Due to the limited understanding of AgNPs behavior in different conditions, and their sensitivity to light, this study aimed to investigate the toxicity of low concentrations of AgNP and AgNP-PVP under dark and visible light exposure conditions, considering specifically their differentiated tendencies to agglomerate – an important determinant of cellular internalization of NPs. *A. cepa* seeds exposed to NPs under dark and light conditions, were evaluated for inhibition of germination and root development (toxicity) (0,5;1;5;10 and 100 ng/mL), cell cycle alterations (cytotoxicity) and DNA damage (genotoxicity) (5; 10 and 100 ng/mL), morphological and biochemical cell alterations (activity of enzymes involved in oxidative stress) (100 ng/mL). The results were related to the characterization of NPs. There were no alterations in germination and root development for both AgNPs tested in both conditions. However, they were genotoxic, with significant increase in chromosomal abnormalities (AC) and micronuclei (MN), under dark and light. In addition, AgNP-PVP caused a decrease of Superoxide dismutase (SOD) and increase of lipoperoxidation (LPO) under light and dark conditions, respectively, indicating oxidative stress. Despite being stabilized, AgNP-PVP showed to be less genotoxic than AgNP, indicating that the toxicity of NPs can go far beyond its state of aggregation. The comparison of the adverse effects promoted by NPs in study showed that the visible light decreased AC by up to 5.60x in AgNP and 2.01x in AgNP-PVP. Alterations in the mitotic index (IM) and morphoanatomic alterations in the roots, verified for the highest concentrations under dark condition, were not observed in the light condition, showing that light promotes alterations that "prevent" the NPs from exerting their cytotoxicity. We believe that the visible light can be used as an important tool to treat AgNPs in wastewaters, reducing its toxicity and environmental risks.

Keywords: Silver nanoparticles; Polyvinylpyrrolidone; toxicity, cytotoxicity; genotoxicity; vascular plants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organograma dos experimentos realizados.....	29
Figura 2. Desagregação de AgNP em lavadora ultrassônica antes da exposição às sementes de <i>A. cepa</i>	31
Figura 3. Incubadora equipada com lâmpada de luz fluorescente para realização dos experimentos na luz visível.....	33
Figura 4. Sementes de <i>Allium cepa</i> germinando em placa de Petri recoberta com papel alumínio (experimento no escuro) e sem papel alumínio (experimento no claro).....	34
Figura 5. Confeção das lâminas para análise de citotoxicidade e genotoxicidade.....	35

ARTIGO

Figura 1. AgNP e AgNP-PVP visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	49
Figura 2. Distribuição de tamanho de AgNP e AgNP-PVP nas condições de claro e escuro.....	50
Figura 3. Índice de germinação e desenvolvimento da raiz de sementes de <i>A. cepa</i> expostas à AgNP nas condições claro e escuro.....	51
Figura 4. Índice de germinação e desenvolvimento da raiz de sementes de <i>A. cepa</i> expostas à AgNP-PVP nas condições claro e escuro.....	52
Figura 5. Citotoxicidade e genotoxicidade de AgNP e AgNP-PVP na condição de escuro.....	54
Figura 6. Citotoxicidade e genotoxicidade de AgNP e AgNP-PVP na condição de claro.....	55
Figura 7. Alterações encontradas em diferentes fases da mitose de células meristemáticas de <i>A. cepa</i> expostas à AgNP e AgNP-PVP.....	56
Figura 8. Comparação, por fold change, da genotoxicidade no claro e escuro de cada NP (AgNP e AgNP-PVP).....	59
Figura 9. Comparação da genotoxicidade de AgNP e AgNP-PVP em cada condição (claro e escuro).....	60
Figura 10. Análise estrutural, em microscopia de luz, das raízes de <i>A. cepa</i> expostas à 100 ng/mL de AgNP e AgNP-PVP em condições de claro e escuro.....	61

Figura 11. Análise ultraestrutural, em microscopia eletrônica de transmissão, de raízes de *A. cepa* expostas ao CN (água ultrapura) e à 100 ng/ mL de AgNP-PVP no escuro.....62

Figura 12. Quantificação de enzimas envolvidas com o estresse oxidativo e lipoperoxidação das regiões meristemáticas de raízes de *A. cepa* expostas ao CN (água ultrapura), e à 100 ng/mL de AgNP e AgNP-PVP no claro e no escuro.....63

MATERIAL SUPLEMENTAR

Figura 1S. Radiômetro de luz UVC, com sensor posicionado no interior da incubadora equipada com lâmpada, indicando 0 mW/cm² de radiação UVC.....74

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Tabela 1. Tipos de aberrações cromossômicas observados em células meristemáticas de *A. cepa* expostas à AgNP e AgNP-PVP na condição de escuro.....57

Tabela 2. Tipos de aberrações cromossômicas observados em células meristemáticas de *A. cepa* expostas à AgNP e AgNP-PVP na condição de claro.....58

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela 1S. Tamanhos das AgNP no escuro e no claro.....74

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

<i>A. cepa</i>	-	<i>Allium cepa</i>
AC	-	Aberrações cromossômicas
Ag	-	Prata
Ag ⁺	-	Íons de prata
AgNP	-	Nanopartícula de prata
AgNP-PVP	-	Nanopartículas de prata encapsuladas com polivinilpirrolidona
BOD	-	Incubadora <i>Biochemical Oxygen Demand</i>
CAT	-	Catalase
CM	-	Comprimento médio da raiz
CN	-	Controle negativo
CP	-	Controle positivo
EC ₅₀	-	Concentração que causa efeito em 50% dos indivíduos
GPX	-	Glutathione peroxidase
GST	-	Glutathione S-transferase
IG	-	Índice de germinação
IM	-	Índice mitótico
LPO	-	Lipoperoxidação/ peroxidação lipídica
MET	-	Microscopia eletrônica de transmissão
ML	-	Microscopia de luz
MMS	-	Metil metanossulfonato
MN	-	Micronúcleo
MoA	-	Modo de ação
NPs	-	Nanopartículas
PVP	-	Polivinilpirrolidona
SOD	-	Superóxido dismutase
ZnONP	-	Nanopartícula de dióxido de zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1. Nanopartículas como contaminantes ambientais emergentes.....	16
2.2. Nanopartículas de Prata (AgNPs) no meio ambiente e suas implicações.....	18
2.3. Influência dos fatores ambientais na toxicidade das AgNPs	20
2.4. AgNPs não encapsuladas e encapsuladas	22
2.5. Plantas terrestres – um importante organismo para a avaliação de risco de contaminação ambiental	23
2.6. Avaliação toxicológica em <i>Allium cepa</i>	25
3. OBJETIVOS	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1. Material	30
4.2. Preparo e determinação das concentrações das suspensões teste das NPs	30
4.3. Caracterização das suspensões teste de NPs.....	31
4.4. Caracterização da luz utilizada nos experimentos no claro	32
4.5. Bioensaios com sementes de <i>A. cepa</i>	32
4.5.1. Teste de Toxicidade.....	33
4.5.2. Teste de Aberrações Cromossômicas e Micronúcleos em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i>	34

4.5.3.	Atividade de enzimas envolvidas no sistema antioxidante e lipoperoxidação	36
4.5.3.1.	Preparação das amostras.....	36
4.5.3.2.	Quantificação de proteínas totais	37
4.5.3.3.	Superóxido-dismutase (SOD)	37
4.5.3.4.	Catalase (CAT).....	37
4.5.3.5.	Glutathione S-transferase (GST).....	37
4.5.3.6.	Lipoperoxidação (LPO).....	38
4.5.4.	Avaliação de alterações morfoanatômicas	38
4.5.4.1.	Análise em microscopia de luz (ML).....	38
4.5.4.2.	Análise em microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	39
4.6.	Análises estatísticas e comparações dos resultados	39
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
	Artigo 1: Luz visível induziu redução de citotoxicidade e genotoxicidade de nanopartículas de prata não encapsuladas e encapsuladas com PVP em teste de <i>Allium cepa</i>	40
	Resumo	43
5.1.	Introdução	44
5.2.	Material e Métodos	46
5.2.1.	Preparo e caracterização das suspensões de AgNPs.....	46
5.2.2.	Caracterização da luz utilizada nos experimentos no claro	46

5.2.3.	Bioensaios com <i>Allium cepa</i>	47
5.2.3.1.	Teste de toxicidade por índice de germinação e desenvolvimento da raiz.....	47
5.2.3.2.	Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade.....	47
5.2.3.3.	Atividade de enzimas envolvidas no sistema antioxidante e lipoperoxidação	48
5.2.3.4.	Análise morfoanatômica	48
5.2.4.	Análise estatística	49
5.3.	Resultados.....	49
5.3.1.	Caracterização da luz utilizada nos experimentos no claro.....	49
5.3.2.	Caracterização química das nanopartículas de prata (AgNP e AgNP-PVP).....	50
5.3.3.	Avaliação toxicológica das nanopartículas de prata (AgNP e AgNP-PVP).....	53
5.3.3.1.	Teste de toxicidade.....	53
5.3.3.2.	Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade.....	55
5.3.3.3.	Análise morfoanatômica	64
5.3.3.4.	Enzimas envolvidas no sistema antioxidante e lipoperoxidação	67
5.4.	Discussão	67
5.4.1.	AgNPs não foram capazes de induzir efeitos tóxicos no sistema vegetal <i>Allium cepa</i>	68

5.4.2. Citotoxicidade e genotoxicidade mediada pelas AgNPs em baixas concentrações.....	68
5.4.3. Alterações de enzimas envolvidas no estresse oxidativo como indicativo de ROS e Lipoperoxidação	70
5.4.4. Efeitos adversos dependentes do tamanho das partículas em suspensão, composição química das AgNPs e ausência e presença de luz visível	71
5.5. Conclusão.....	74
5.6. Referências.....	74
5.7. Material Suplementar.....	83
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
REFERÊNCIAS	85

1. INTRODUÇÃO

Durante décadas, toneladas de substâncias biologicamente ativas sintetizadas para utilização na agricultura, indústria, medicina, etc., foram descarregadas no meio ambiente sem se preocupar com suas possíveis consequências (BARCELÓ; LÓPEZ, 2007). Medidas legislativas foram adotadas gradualmente para evitar a poluição química do meio ambiente e os riscos decorrentes desta, ajudando a aliviar parcialmente esta situação (BARCELÓ; LÓPEZ, 2007). No entanto, a descoberta contínua de novos contaminantes potencialmente prejudiciais deixa uma clara necessidade de mais pesquisas, em todas as áreas, que possam contribuir com a proteção da saúde humana e do meio ambiente (BARCELÓ; LÓPEZ, 2007). Dentre estas novas substâncias sintéticas, estão os nanomateriais ou nanopartículas (NPs), dos quais ainda se têm poucas informações sobre seu potencial perigo/risco e, conseqüentemente, medidas legislativas quanto ao seu uso e descarte são escassas.

NPs são definidas como partículas que têm um tamanho entre 1 e 100 nm em uma ou mais dimensões (BARNES et al., 2008). Quando estas se encontram em tamanho nanométrico, podem adquirir uma variedade de propriedades únicas que são valiosas a aplicações comerciais, industriais e/ou biomédicas (BOYES et al., 2017). Por isso, houve um rápido aumento em sua produção e uso, tornando provável que o aumento da exposição ambiental a elas ocorra (GOTTSCHALK; NOWACK, 2011). De fato, a liberação destas no meio ambiente pode ocorrer durante todo o seu ciclo de vida: da sua produção à fabricação de produtos contendo NPs, ao uso e à fase final da vida dos mesmos (PACHOALINO; MARCONE; JARDIM, 2010). Suas propriedades em nanoescala (tais como taxas elevadas de reatividade causadas por alta superfície de contato) podem oferecer propriedades tóxicas não observadas em materiais de tamanho convencional (BOYES et al., 2017). Portanto, as emissões de NPs podem oferecer riscos ao meio ambiente (ASCHBERGER et al., 2011), causando efeitos adversos em espécies de seres vivos e levantando uma nova preocupação acerca de sua liberação na água, solo e atmosfera (LOWRY et al., 2012).

Entre os diversos tipos de NPs fabricadas em larga escala, estão as nanopartículas de prata (AgNPs). A prata (Ag) e AgNPs são amplamente utilizadas por sua atividade

antibacteriana. Em cuidados médicos, por exemplo, a nanop prata tem sido usada como um agente bactericida em curativos (WIJNHOVEN et al., 2009) e em cateteres para impedir a formação de biofilmes infecciosos (SILVER; PHUNG; SILVER, 2006). Também são utilizadas em saneamento de água potável, corpos d'água de recreação, têxteis, plásticos, filtros solares e diversos cosméticos, alimentos e suplementos dietéticos, superfícies antimicrobianas (SILVER; PHUNG; SILVER, 2006; SILVESTRY-RODRIGUEZ et al., 2007), na eletrônica, ótica, biossensores e catálise (AHAMED; ALSALHI; SIDDIQUI, 2010). Além disso, AgNPs têm sido usadas na agricultura, em fertilizantes e nanopraguicidas, e sua atividade antimicrobiana e antifúngica tem sido utilizada contra uma variedade de fitopatógenos (MISHRA; SINGH, 2014) sendo aplicadas diretamente nas plantas e no ambiente.

Devido ao crescente uso de AgNPs no consumo e aplicações industriais, implica-se que elas serão liberadas no meio ambiente (SWEET; SINGLETON, 2011) propositalmente (pelo uso na agricultura) ou não (por efluentes domésticos). Portanto, dado a necessidade de assegurar que nanomateriais não causem efeitos adversos na saúde humana e ambiental (BOYES et al., 2017), AgNPs têm sido foco de intensa pesquisa devido ao potencial de efeitos nocivos que podem conferir a seres humanos e outros organismos biológicos (LEVARD et al., 2012).

Uma vez que as AgNPs se encontrem no meio ambiente, sua atividade antimicrobiana poderia representar uma ameaça para as comunidades microbianas do ambiente (SWEET; SINGLETON, 2011). Além disso, salienta-se que já foi relatado que certos níveis de AgNPs podem causar efeitos tóxicos em organismos aquáticos e terrestres, porém, o atual entendimento dos perigos deste material é ainda muito limitado e não é possível tirar conclusões gerais (FABREGA et al., 2011).

Ademais, em uma perspectiva molecular e celular, alguns estudos têm mostrado que as AgNPs têm o potencial de causar citotoxicidade e genotoxicidade. AgNPs foram demonstradas como genotóxicas em testes *in vivo* com ratos (TAVARES; BALBINOT; MARTINS, 2012) e camundongos (LI et al., 2014), em testes *in vitro* com células sanguíneas humanas (TAVARES; BALBINOT; MARTINS, 2012), em plantas (KUMARI; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2009), entre outros. Esses achados sugerem potencial risco a longo prazo aos ecossistemas e seres humanos (WANG et al., 2013).

Entre os diversos organismos utilizados para estudos de toxicidade ambiental, plantas merecem uma atenção especial, visto que interagem com o ar, o solo e a água, sendo facilmente expostas aos poluentes químicos dispersos no meio ambiente (MIRALLES; CHURCH; HARRIS, 2012), justificando-se assim, a importância de sua utilização em estudos ambientais. Além disso, constituem uma das principais vias de exposição e contaminação a outros seres vivos, já que são a base da cadeia alimentar (ASLANI et al., 2014). No entanto, há poucos estudos com efeitos fitotóxicos de NPs e estes certamente poderiam servir de alerta para a contaminação de outros seres vivos.

Diante da escassez de dados quanto à genotoxicidade das AgNPs, torna-se necessária a utilização de organismos modelos capazes de detectar efeitos citotóxicos e mutações no DNA. Plantas superiores apresentam características que as tornam excelentes modelos genéticos para avaliar poluentes ambientais, sendo frequentemente utilizadas em estudos de monitoramento (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Este recurso não é apenas devido à sensibilidade para detectar agentes mutagênicos em diferentes ambientes, mas também à possibilidade de avaliar vários mecanismos genéticos, que variam de mutações pontuais para aberrações cromossômicas (AC) em células de diferentes órgãos e tecidos, tais como raízes, folhas e pólen (GRANT, 1994).

Dentre os organismos vegetais modelos utilizados em estudos de toxicidade e genotoxicidade, destaca-se a *Allium cepa* (popularmente conhecida como cebola-de-cabeça). O teste de *A. cepa* é considerado favorável para avaliar os danos cromossômicos e perturbações no ciclo mitótico, devido à presença de boas condições de cromossomos, tais como cromossomos grandes e em reduzido número ($2n = 16$) (FISKESJO, 1985). Além disso, este sistema de teste mostra alta sensibilidade na detecção da toxicidade de substâncias químicas ambientais (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Ao tratar-se de substâncias químicas que estarão no meio ambiente e de seus possíveis efeitos a organismos vivos, torna-se importante ressaltar que estes estarão sujeitos a diferentes variáveis abióticas – tais como luz, umidade, temperatura, entre outras. Portanto, NPs no meio ambiente, também estarão em contato com diferentes condições ambientais, que podem influenciar drasticamente seus efeitos, devendo ser consideradas durante avaliações toxicológicas de NPs (GEORGE et al., 2014).

Trabalhos da literatura já apontam que AgNPs possuem diferentes modos de ação na ausência e presença de diferentes tipos de luz em sistemas biológicos (GEORGE et al., 2014; ZHAO; TOYOOKA; IBUKI, 2013; ZOU; SHI; ZHANG, 2014). Desta forma, a avaliação toxicológica de AgNPs na ausência e presença de luz, pode vir a fornecer informações importantes, que certamente contribuiriam para melhor entendimento de como estas NPs podem afetar seres vivos e como agentes abióticos podem influenciar seus efeitos.

Levando em consideração a potencial toxicidade de AgNPs em organismos e os fatores ambientais como moduladores de interações de NPs, o presente estudo avaliou o potencial tóxico de suspensões de dois tipos diferentes de AgNPs (encapsuladas e não encapsuladas) na ausência e presença de luz visível. Dado a importância de estudos que abordem a toxicidade em plantas para prever riscos de produtos químicos ao meio ambiente, utilizou-se o teste de *A. cepa*, avaliando danos ao DNA, efeitos citotóxicos, alterações morfológicas e bioquímicas em sementes expostas às AgNPs. Tais conhecimentos são essenciais para a implantação responsável da nanotecnologia.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Nanopartículas como contaminantes ambientais emergentes

Os contaminantes emergentes, ou de preocupação emergente, são compostos previamente desconhecidos ou não reconhecidos como contaminantes – e seu estudo se encontra entre as linhas de investigação prioritárias dos principais órgãos dedicados à proteção da saúde pública e do meio ambiente, como a Organização Mundial de Saúde (OMS), a Agência de Proteção do Meio Ambiente (EPA) e órgãos governamentais da Comunidade Europeia (BARCELÓ; LÓPEZ, 2007; SAUVÉ; DESROSIERS, 2014).

Além de não haver uma regulamentação na legislação quanto ao seu uso, a disponibilidade de métodos para análise de compostos emergentes é nula ou limitada (PETROVIC; GONZALEZ; BARCELÓ, 2003; SAUVÉ; DESROSIERS, 2014), o que explica não só a escassez de dados acerca da presença dos contaminantes emergentes no meio ambiente, mas também sobre seu impacto nos distintos compartimentos ambientais. Além disso, a elevada produção e consumo e a conseqüente introdução contínua destes compostos no ambiente, faz com que não haja necessidade de serem compostos químicos persistentes para ocasionarem efeitos adversos aos seres vivos (PETROVIC; GONZALEZ; BARCELÓ, 2003). São considerados contaminantes emergentes uma ampla variedade de produtos de uso diário com aplicações tanto industriais como domésticas, como os nanomateriais ou nanopartículas (NPs).

Partículas na escala nanométrica, comumente consideradas como materiais que têm um tamanho entre 1 e 100 nm em uma ou mais dimensões (BARNES et al., 2008), são naturalmente encontradas no meio ambiente (NOWACK; BUCHELI, 2011). No entanto, a crescente capacidade de síntese e manipulação de NPs pelo ser humano tem atraído a atenção de pesquisadores (NOWACK; BUCHELI, 2011). Devido suas propriedades únicas, conferidas pelo seu tamanho reduzido e grande superfície de contato, é provável que cada importante área de atividade humana seja profundamente afetada pela nova tecnologia (DAVIES, 2007).

Como exemplo, cita-se os nanotubos de carbono que são cerca de 100 vezes mais fortes que o aço, mas pesam apenas cerca de um décimo deste; janelas nano que nunca precisam de lavagem e que já estão sendo comercializadas; baterias nano e painéis solares que são muito mais eficientes; filtros que filtram quase tudo (portanto, reduzindo

drasticamente o custo e o consumo de energia da água dessalinizada); sensores que detectam quase qualquer coisa (melhorando muito a segurança dos aeroportos); nano drogas que aumentam consideravelmente o alcance e eficácia das intervenções médicas, e “nano foods” mais nutritivas e mais saborosas e menos sujeitas à deterioração (DAVIES, 2007). A lista poderia continuar e continuar. No entanto, quais seriam as possíveis consequências das maravilhas trazidas pela nanotecnologia?

As NPs têm utilidade e aplicações em uma variedade de diferentes setores industriais, como eletrônica, biomedicina, farmacêutica, cosmética, energética e ambiental (GUZMÁN; TAYLOR; BANFIELD, 2006). Devido ao grande potencial desta tecnologia houve um aumento mundial no investimento de pesquisas e desenvolvimento da nanotecnologia (GUZMÁN; TAYLOR; BANFIELD, 2006).

Indubitavelmente, a nanotecnologia é um dos ramos da ciência que mais se desenvolve atualmente, fruto dos altos investimentos em pesquisa. Sendo os maiores investidores China, Estados Unidos, Índia, Japão e Alemanha (STATNANO, 2017). O rápido crescimento da demanda por investimento em pesquisa nesta área pode ser ilustrado pelo significativo aumento das verbas destinadas pelo governo norte-americano que, em 2001, disponibilizava recursos da ordem de US\$ 464 milhões e, em 2007, investiu cerca de US\$ 1,5 bilhões (DAVIES, 2007). No entanto, pesquisas voltadas a estudos de avaliação de toxicidade de NPs ainda são escassas. Do total investido, em 2007, apenas 3% se destinou a estudos de avaliação de risco dos mesmos, pelos EUA (DAVIES, 2007).

Atualmente, o Brasil é o maior investidor em pesquisas em nanotecnologia da América Latina (STATNANO, 2016). No entanto, diferentemente dos Estados Unidos, Europa e Japão, em que questões de ordem ética, jurídica, ambiental e outras preocupações societárias adequadas no desenvolvimento da nanotecnologia são exigidas pela legislação (FOGELBERG; SANDÉN, 2008; ISHIZU et al., 2008) na América Latina a fraqueza dos sistemas regulatórios faz com que os riscos associados à aplicação da nanotecnologia sejam muito maiores (INVERNIZZI; FOLADORI, 2005).

Dados do atual uso e produção de NPs são muitas vezes contraditórios. Estima-se que o aumento do uso de nanomateriais sintéticos em produtos de consumo foi de 54 produtos em 2005 para 1814 produtos em 2014, sendo a AgNP a mais frequentemente usada (435 produtos, ou 24% dos produtos contendo nanomateriais) (VANCE et al.,

2015). Este crescente aumento na produção de NPs pode acarretar em uma exposição humana e ambiental mais acentuada (NOWACK; BUCHELI, 2011) durante todo o ciclo de vida destes produtos de consumo, que incluem a fabricação, uso e descarte dos produtos contendo nanomateriais (BOYES et al., 2017). Como resultado, a discussão sobre os potenciais efeitos adversos das NPs tem aumentado nos últimos anos (HELLAND et al., 2006).

As NPs podem entrar, não intencionalmente, no meio ambiente através de emissões atmosféricas, efluentes domésticos e agricultura; por liberação acidental durante a fabricação e transporte de produtos contendo NPs; ou por liberação intencional, como na sua utilização para remediação do solo (ZHANG; ELLIOTT, 2006). No entanto, a pouca compreensão sobre as propriedades destas pequenas partículas limita a nossa capacidade de compreender, prever e controlar suas aplicações e impactos na saúde humana e no meio ambiente (MASCANGIOLI; ALPER, 2012).

2.2. Nanopartículas de Prata (AgNPs) no meio ambiente e suas implicações

NPs podem ser divididas em naturais e sintéticas e também podem ser separadas quanto à sua composição química – contendo carbono ou inorgânicas (NOWACK; BUCHELI, 2011). NPs inorgânicas sintéticas cobrem uma ampla gama de substâncias, incluindo metais elementares, óxidos de metais e sais de metais (NOWACK; BUCHELI, 2011). Entre estas, as NPs de prata (AgNPs) são as mais amplamente usadas em produtos de consumo, com uma estimativa anual de produção de 2.8-20 toneladas, nos Estados Unidos (HENDREN et al., 2011).

AgNPs são comumente usadas tanto em produtos de consumo diários quanto em aplicações médicas e industriais (VANACE et al., 2015), sendo umas das mais utilizadas em muitos setores industriais. A prata tem sido usada como um largo espectro antibacteriano, antifúngico e como agente antiviral (VANACE et al., 2015). Sendo que, NP-Ag tem sido reconhecida como um antimicrobiano mais potente que a prata maciça (AGARWAL et al., 2010). Sua ação antibacteriana, é aplicada em produtos de consumo como roupas, cosméticos, recipientes de armazenamento de alimentos, eletrodomésticos e brinquedos para crianças (VANACE et al., 2015). Consequentemente, a liberação de NP-Ag no ambiente por lavagem de roupas e produtos infantis já foi relatada (BENN; WESTERHOFF, 2008; GERANIO; HEUBERGER, 2009; QUADROS et al., 2013).

Ecossistemas de água doce e ecótonos associados são, portanto, alvos principais de contaminação por nanopartículas (SCHAUMANN et al., 2014).

A liberação das AgNPs no meio ambiente pode causar um potencial de efeitos adversos sobre as espécies de seres vivos (LEVARD et al., 2012). Assim, estas têm sido foco de intensa pesquisa (LEVARD et al., 2012). De fato, a toxicidade de AgNPs foi demonstrada em uma variedade de organismos em estudos recentes. Por exemplo, a toxicidade destas NPs foi observada em vertebrados aquáticos (*Danio rerio*/zebrafish) (ASHARANI et al., 2008), plantas terrestres (*Allium cepa*, *Lolium multiflorum*) (KUMARI; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2009; YIN et al., 2011) e aquáticas (*Lemna minor*) (GUBBINS; BATTY; LEAD, 2011), algas (*Chlamydomonas reinhardtii*) (NAVARRO et al., 2008a), invertebrados terrestres (*Caenorhabditis elegans*) (MEYER et al., 2010), microrganismos (*Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*) (DROR-EHRE et al., 2009; FABREGA; RENSHAW; LEAD, 2009), e células humanas (queratinócitos, fibroblastos da pele, células do pulmão, e células de glioblastoma) (ASHARANI et al., 2009; LU et al., 2010).

Além disso, evidências crescentes mostram que a exposição às NPs pode induzir genotoxicidade (WANG et al., 2013). AgNPs foram demonstradas como genotóxicas em testes *in vivo* com ratos (TAVARES; BALBINOT; MARTINS, 2012) e camundongos (LI et al., 2014), em testes *in vitro* com células sanguíneas humanas (TAVARES; BALBINOT; MARTINS, 2012), em plantas (KUMARI; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2009), entre outros. Esses achados sugerem potencial risco a longo prazo e danos aos ecossistemas e aos seres humanos (WANG et al., 2013) já que os danos ao DNA podem ser herdados de geração em geração na forma de mutações.

Os danos ao DNA relatados em organismos e células tratadas com AgNPs, são muitas vezes relacionados com sua capacidade de induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e, conseqüentemente, causar estresse oxidativo – a qual é considerada a maior fonte de geração de danos espontâneos ao DNA (LI et al., 2014; TAVARES; BALBINOT; MARTINS, 2012). Em corroboração com estes resultados, estudos de expressão gênica em *E. coli* exposta a NP-Ag relataram um aumento da expressão de genes-chave em redes reguladoras de estresse oxidativo, assim como um aumento da expressão de genes relacionados com a membrana celular, complexo oxidase e ATPase, sugerindo alteração nas propriedades da membrana celular e na cadeia de transferência

de elétrons, as quais possuem grande importância no funcionamento adequado das células e do organismo como um todo (GOU; ONNIS-HAYDEN; GU, 2010).

No entanto, os resultados de genotoxicidade das AgNPs, obtidos em diversos estudos, estão longe de seguir um padrão. Os resultados mostraram variações entre testes *in vitro* e *in vivo* (LI et al., 2014; TAVARES; BALBINOT; MARTINS, 2012), tipos de AgNPs utilizadas (como, por exemplo, AgNPs revestidas com PVP sendo mais genotóxicas que as revestidas com silicone) (LI et al., 2014), tecidos observados (demonstrando que AgNPs podem apresentar genotoxicidade tecido-específica) (LI et al., 2014), e diferentes tipos de células em cultura (que variam com a forma como cada tipo de célula internaliza as NPs) (TAVARES; BALBINOT; MARTINS, 2012). Dado as evidências de toxicidade/genotoxicidade já relatadas e a inconsistência de resultados, destaca-se a importância de avaliar a toxicidade de AgNPs.

2.3. Influência dos fatores ambientais na toxicidade das AgNPs

A toxicidade de NPs deve, em parte, ser determinada por suas propriedades funcionais, que, por sua vez, afetam a forma como elas são dispersas no ambiente (WARHEIT, 2008). Transformações ambientais de AgNPs (mudanças no estado de agregação, estado de oxidação, precipitação de fases secundárias, sorção de espécies orgânicas e inorgânicas) afetam significativamente a estabilidade destas e, conseqüentemente, a sua biodisponibilidade e toxicidade (LEVARD et al., 2012). Devido a seu tamanho pequeno, a corrosão de AgNPs é mais rápida que a de prata maciça, reduzindo o seu tempo de vida na natureza (LEVARD et al., 2012). Os agentes corrosivos de prata (como oxigênio, luz, umidade e compostos sulfatados) são abundantes na natureza e causam transformações ambientais que podem afetar fortemente as suas propriedades de superfície, o seu transporte, reatividade e toxicidade em solos e sistemas aquáticos (LIU et al., 2010). Assim, agentes abióticos, tais como a luz, podem influenciar nas transformações ambientais de NPs e conseqüentemente em sua toxicidade, aumentando ou diminuindo seus efeitos em organismos.

Devido à fotossensibilidade das AgNPs, estudos relatam mudanças em sua toxicidade quando expostas a diferentes tipos de luz, em comparação com o escuro. Como, o aumento de citotoxicidade em embriões de zebrafish (*Danio rerio*) e linhagens de células de peixes BF2 quando expostas a um simulador de luz solar (SSL) (GEORGE

et al., 2014), diminuição de toxicidade em *T. pyriformis* quando expostas a luz natural e luz contínua (ZOU; SHI; ZHANG, 2014) e aumento de toxicidade em bactérias *E.coli* quando expostas à luz UVA (ZHAO; TOYOOKA; IBUKI, 2013).

Os mecanismos do seu efeito nos diferentes tipos de luz e no escuro ainda não são totalmente compreendidos. No entanto, a liberação de íon de prata (Ag^+) é considerada a causa principal de sua toxicidade, reagindo com proteínas funcionais ou moléculas de defesa antioxidante das células (ZHAO; TOYOOKA; IBUKI, 2013). Em *E. coli*, os íons Ag^+ interagem com enzimas da reação em cadeia respiratória, como a NADH desidrogenases, resultando no desacoplamento da respiração da síntese de ATP (LOK et al., 2007). A interação com proteínas respiratórias e de transporte deve-se à alta afinidade de Ag^+ para grupos -SH presentes nos resíduos de cisteína dessas proteínas (HOLT; BARD, 2005). Além disso, ao mediar a perturbação da cadeia respiratória bacteriana, Ag^+ aumenta a possibilidade da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (PARK et al., 2009). ROS induzem ambos danos na membrana celular e danos ao DNA. Em alguns estudos, a luz foi demonstrada como um agente indutor de liberação de íons Ag^+ pela AgNP, podendo assim, aumentar sua toxicidade em diversos organismos (ZHAO; TOYOOKA; IBUKI, 2013; GEORGE, et al., 2014).

Contudo, a toxicidade de NPs pode ser definida por muitos outros fatores além da liberação de íons, tais como propriedades inerentes às próprias NPs. Transformações fotoquímicas, como alterações na superfície de tamanho e agregação foram demonstradas quando AgNPs foram expostas à luz UV (GORHAM et al., 2012), e estas transformações podem influenciar sua captação e transporte nos organismos, influenciando diretamente sua toxicidade. Shi et al. (2013) relataram aumento do tamanho e agregação de AgNPs expostas à luz, diminuindo a toxicidade em *T. pyriformis* comparada com exposição no escuro. Além disso, Zou et al. (2014), demonstraram que nem sempre a luz influenciará maior liberação de Ag^+ pelas AgNPs, havendo menor liberação de Ag^+ na luz natural e luz contínua, em relação ao escuro.

A que se devem todos esses resultados contraditórios? A forma de ação de AgNPs e suas interações com o meio dependem de uma série de fatores complexos e que dificilmente podem ser generalizadas. O tipo de luz e o tempo de exposição a ela, o tipo de NP e o organismo biológico utilizado, são importantes aspectos que devem ser considerados e que podem ter influenciado os diferentes resultados de estudos

envolvendo toxicidade de AgNPs na luz. Diferentes tipos de luzes causarão diferentes efeitos nas AgNPs dependendo de seu formato, que desempenha um importante papel em sua ressonância plasmática, e seu tamanho, que determina o espectro magnético absorvido por estas (MOCK et al., 2002). Alterando, assim, suas propriedades ópticas e consequentemente sua ação e toxicidade na luz (MOCK et al., 2002).

Portanto, são necessários mais estudos que incluam a avaliação da toxicidade de xenobióticos submetidos a diferentes fatores ambientais, como a luz, levando em consideração os diferentes tipos de AgNPs.

2.4. AgNPs não encapsuladas e encapsuladas

AgNPs são produzidas nas formas não encapsulada e encapsulada. A maioria das AgNPs industriais constituem um núcleo Ag^0 com tamanho e forma variados e um revestimento orgânico (cápsula) com peso molecular e grupos funcionais variáveis (PILLAI; KAMAT, 2004; WILEY et al., 2005). Dependendo de condições ambientais, estes revestimentos afetam fortemente a carga de superfície, agregação e toxicidade das AgNPs, pois estas moléculas na superfície das NPs oferecem forças de repulsão eletrostática, estérica, ou eletrostéricas entre as partículas, permitindo-lhes resistir à agregação (HOTZE; PHENRAT; LOWRY, 2010). Estas moléculas, se aplicadas durante a síntese da NP, também agem como “agentes de proteção” e permitem o controle de tamanho e forma, desta (WILEY et al., 2005).

Badawy et al. (2011) sugeriu que a carga superficial de AgNPs, controladas por agentes de cobertura diferentes (PVP, citrato e polietilenoimina), é responsável pela diferença de toxicidade em PolySeed (uma espécie de *Bacillus* gram-positiva), com uma carga de superfície mais positiva resultando em maior toxicidade. Além disso, há evidências de que a atividade antibacteriana da NP-Ag depende do seu tamanho. Quando estas são pequenas (<10 nm) há maior liberação de Ag^+ e isso determina sua atividade antibacteriana. No entanto, quando estas são > 10 nm, a liberação de Ag^+ sozinha não pode explicar completamente a atividade antimicrobiana, e existem evidências de efeitos específicos de AgNPs como antibacteriano (LEVARD et al., 2011). Agentes de cobertura, sendo protetores de tamanho, forma e agregação, e possuindo diferentes cargas de superfície, constituem um importante fator determinante na toxicidade destas NPs, já que impedindo sua agregação, partículas menores serão mantidas, e quanto menores, maior

liberação de Ag^+ e consequentemente maior toxicidade, visto que os íons Ag^+ foram demonstrados como sendo até 4 vezes mais tóxicos que as NP-Ag em si (FOLDBJERG et al., 2009).

Além de impactos na liberação de Ag^+ , sabe-se que é importante avaliar o estado de agregação e tamanho de NPs porque estes possuem impacto no transporte (captação) e toxicidade destas em seres vivos, sendo um parâmetro importante de determinação de toxicidade (LEVARD et al., 2012). Quanto menos agregada uma NP mais facilmente ela será captada por organismos podendo oferecer riscos a estes (LEVARD et al., 2012). Portanto, para compreender como AgNPs agem de acordo com a composição química de sua superfície, torna-se importante a realização de estudos que comparem a toxicidade de AgNPs não encapsuladas e encapsuladas.

Entre os agentes de cobertura de AgNPs mais utilizados atualmente, está a polivinilpirrolidona (PVP), que estabiliza estereoquimicamente as NPs e está fortemente ligado ao núcleo Ag^0 , sendo potencialmente permeável a solutos e solventes (TEJAMAYA; MERRIFIELD; LEAD, 2012). Segundo Tejamaya, Merrifield e Lead (2012), em comparação com outros agentes de cobertura, tais como citrato e polieteno glicol (PEG), AgNPs encapsuladas com PVP foram verificadas como as mais estáveis, com apenas pequenas perdas em concentração total em 21 dias, e não sendo observada nenhuma alteração na forma, tamanho, agregação ou dissolução. Sendo assim, são as mais recomendadas para exposição e estudos de efeitos ecotoxicológicos de AgNPs estabilizadas (TEJAMAYA; MERRIFIELD; LEAD, 2012).

Neste contexto, é importante notar que o termo "nanopartículas de prata" por si só não é suficiente para descrever um sistema específico, porque os sistemas em questão podem diferir em propriedades como tamanho, forma ou funcionalidades de superfície (KITTLER et al., 2009). Estudos comparando os efeitos de AgNPs encapsuladas com PVP (AgNP-PVP) e não encapsuladas (AgNP), poderiam contribuir com o melhor entendimento de como os agentes de cobertura podem afetar sua toxicidade.

2.5. Plantas terrestres – um importante organismo para a avaliação de risco de contaminação ambiental

A nanotoxicologia – o estudo dos efeitos adversos de nanomateriais sintéticos em organismos vivos e ecossistemas, incluindo a prevenção e melhoria de tais efeitos

adversos– tem acelerado nos últimos anos (OBERDÖRSTER, 2010). No entanto, a maioria dos estudos nanotoxicológicos focou em modelos *in vitro* simplificados que não conseguem representar condições ambientais, ou somente em organismos específicos em condições definidas (MIRALLES; CHURCH; HARRIS, 2012). Revisões de nanotoxicologia em humanos, organismos aquáticos, pequenos mamíferos e invertebrados estão disponíveis; dados nanotoxicológicos para espécies como anfíbios e plantas terrestres são mais limitados (MIRALLES; CHURCH; HARRIS, 2012).

As interações entre NPs e plantas vasculares são uma preocupação particular, já que as plantas interagem com o solo, a água e a atmosfera, os quais podem ser vias de exposição de NPs (MIRALLES; CHURCH; HARRIS, 2012). NPs na atmosfera podem se depositar sobre as folhas ou outras partes aéreas das plantas, agregando em tecidos superficiais e penetrando via estômato (EICHERT et al., 2008; NAVARRO et al., 2008b), e aquelas adsorvidas no solo e sedimentos podem interagir com as raízes das plantas (MUDGE, 2008).

As plantas também podem interagir com solo ou água contendo NPs que são aplicadas intencionalmente para fins de remediação, que estão presentes nas lamas de águas residuais usadas para enriquecer campos de agricultura ou que são introduzidas em águas naturais pelo descarte de efluentes pobremente tratados, por lixiviação de aterros ou águas subterrâneas (ANDY et al., 2008). NPs destinadas a aplicações na biotecnologia ou nanoagricultura podem ser absorvidas por plantas, e seu transporte e bioacumulação através da cadeia alimentar são plausíveis, constituindo uma das principais vias de exposição a espécies superiores, já que são a base da cadeia alimentar (MIRALLES; CHURCH; HARRIS, 2012).

A transferência de elementos tóxicos de plantas contaminadas para seus consumidores não é impossível. Estudos descobriram que plantas expostas à selênio podem ser usadas para suplementar ruminantes e outros animais com deficiência para este mineral e o mesmo poderia ocorrer com substâncias nocivas absorvidas por plantas, afetando, assim, seus consumidores (ASLANI et al., 2014). Apesar disso, estudos com efeitos fitotóxicos de NPs são escassos e poderiam servir de alerta para a contaminação de outros seres vivos.

Assim, estudos toxicológicos em plantas superiores podem fornecer informações importantes sobre riscos da contaminação do meio ambiente e conseqüentemente à saúde do ecossistema como um todo.

2.6. Avaliação toxicológica em *Allium cepa*

Com a crescente preocupação com a poluição ambiental, o teste de *Allium cepa* emergiu como uma ferramenta confiável para a previsão de impacto ambiental de drogas descartadas, herbicidas e também de nanomateriais (PAKRASHI et al., 2014). Devido à alta sensibilidade e a ampla disponibilidade, abundância, e distribuição geográfica das espécies de teste, a *A. cepa* tornou-se uma candidata adequada para análise de exposição em plantas (PAKRASHI et al., 2014). Portanto, o teste de *A. cepa* tem sido o sistema de ensaio de plantas mais bem estabelecido avaliado pela US-EPA GeneTox- Programa de monitoramento ambiental de toxicantes (GRANT, 1994).

Entre os danos causados por agentes químicos aos organismos expostos, efeitos genotóxicos e mutagênicos têm se mostrado preocupantes e recebido atenção especial devido à sua capacidade de induzir danos genéticos; havendo a necessidade de identificar compostos que reagem com o DNA, a fim de assegurar a qualidade do ambiente (LEME; MARIN-MORALES, 2009). O teste em raízes de *Allium cepa* é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química, e o Programa Ambiental das Nações Unidas como um eficiente teste padrão para triagem química e monitoramento de genotoxicidade de substâncias ambientais (GRANT, 1994).

A avaliação do índice mitótico (IM), teste de Aberrações cromossômicas (AC) e teste de micronúcleo (MN) em células do meristema apical da raiz de *A. cepa* é um indicador apropriado para a detecção de alterações no ciclo celular e efeitos clastogênicos e aneugênicos causados por poluentes ambientais, fornecendo importantes informações sobre o potencial citotóxico e genotóxico do agente químico testado (MA et al., 1995).

O IM, caracterizado pelo número total de células em divisão no ciclo celular, tem sido usado como parâmetro para avaliar a citotoxicidade de vários agentes químicos pela diminuição de células em divisão. Sendo utilizado como um indicador de proliferação adequada das células (GADANO et al., 2002).

Aberrações cromossômicas (ACs) são mudanças na estrutura ou número cromossômico que podem ocorrer espontaneamente ou como resultado de tratamento

químico (RUSSELL, 2002). A análise de AC em *A. cepa* tem mostrado eficiência para investigar os mecanismos de ação no DNA dos agentes testados, o que permite uma melhor compreensão dos efeitos promovidos por esses agentes (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Micronúcleos são pequenos corpos extranucleares (com a forma de um pequeno núcleo, muito menor que o núcleo principal) que surgem em células em divisão por fragmentos cromossômicos acrométricos, cromátides ou cromossomos inteiros que ficam para trás na anáfase e que não são incluídos nos núcleos da célula-filha na telófase (FENECH; MORLEY, 1985).

Atualmente, AC e MN em células meristemáticas de *A. cepa*, têm sido relatados na literatura como indicadores eficientes de ação direta no DNA (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Outra vantagem deste sistema de teste é a presença de um sistema enzimático oxidase, que é essencial em avaliações de promutágenos (FISKESJO, 1985). Assim, enquanto outros testes, por exemplo o teste de Ames, requerem adição de mistura de S9 (fração de S9 de fígado de rato), o *A. cepa* apresenta capacidade metabólica para ativar promutágenos em mutágenos sem adição de sistema metabólico exógeno para avaliar essa classe de contaminantes (FATIMA; AHMAD, 2006). Este sistema enzimático, também permite a utilização de um importante *endpoint* na avaliação de tóxicos: alterações enzimáticas causadas por agentes químicos. Consistindo em uma forma eficaz de averiguar como o agente químico age pelo aumento ou diminuição de enzimas envolvidas em diferentes processos de equilíbrio celular em resposta a efeitos tóxicos.

A atividade de enzimas envolvidas em processos oxidativos já foi abordada em alguns estudos de toxicidade em *A. cepa*, tais como a superóxido dismutase (SOD) na avaliação da toxicidade NPs de alumínio (RAJESHWARI et al., 2015) e a glutathione-S-transferase (GST), glutathione redutase (GR), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), glutathione peroxidase (GPX), monodehydroascorbato redutase (MDHAR) e dehydroascorbate redutase (DHAR) como biomarcadores de poluição de metais pesados em *A. cepa* (FATIMA; AHMAD, 2005). O sistema-teste de *A. cepa* pode ser usado com sucesso para monitoramento de alterações na atividade de enzimas antioxidantes (FATIMA; AHMAD, 2005), caracterizando assim, uma abordagem válida para obter mais informações de como o toxicante atua no organismo.

Além de todos os *endpoints* já citados, danos morfoanatômicos em raízes de plantas, também podem ser um importante indicador de toxicidade de substâncias químicas no ambiente. Danos morfoanatômicos e alterações em células e no crescimento de raízes de plantas foram reportados como indicadores de toxicidade a plantas expostas a nanopartículas de óxido de zinco (ZnONP) (KUMARI et al., 2011). Sendo a raiz, a principal via de internalização de poluentes ambientais em plantas (NAVARRO et al., 2008), torna-se importante a avaliação de danos celulares e morfoanatômicos de raízes na avaliação de fitotoxicidade de NPs.

Em síntese, o teste de *A. cepa* apresenta grande versatilidade quando se trata de respostas em relação à uma substância química estudada, podendo fornecer uma ampla variedade de informações sobre os efeitos causados pelo toxicante, tais como: toxicidade, determinada pela germinação e crescimento de sementes; alterações no ciclo celular, determinadas pelo aumento ou diminuição do IM ; genotoxicidade, verificada pelo aumento da incidência de AC, podendo também fornecem informações quanto ao modo de ação (MoA) genotóxico (aneugênico, clastogênico); mutagenicidade, determinada pela presença de MN; alterações enzimáticas e morfoanatômicas). Consistindo em uma importante ferramenta para a avaliação toxicológica de poluentes ambientais tais como nanopartículas de prata, de óxido de zinco, de óxido de alumínio e de dióxido de titânio (CVJETKO et al., 2017; KUMARI et al., 2011; KUMARI; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2009; PITTOL et al., 2017; RAJESHWARI et al., 2015), petróleo (LEME; ANGELIS; MARIN-MORALES, 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2008), herbicidas (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2009), metais pesados (FATIMA; AHMAD, 2005), corantes azoicos (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008), entre outros.

Portanto, sendo o teste de *A. cepa* um dos mais bem padronizados para diversos parâmetros de toxicidade, este tem sido utilizado na avaliação toxicológica de diversos contaminantes, com sucesso.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo avaliar e comparar AgNPs não encapsulada e encapsuladas com PVP (AgNP-PVP), na ausência e presença de luz visível, quanto à capacidade de induzir efeitos tóxicos em no sistema teste vegetal *Allium cepa*.

Desta forma, os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Avaliar os efeitos tóxicos de AgNP e AgNP-PVP quanto a capacidade de inibição da germinação e desenvolvimento da raiz no sistema-teste de *A. cepa*;
- Avaliar os efeitos citotóxicos de AgNP e AgNP-PVP por avaliação do índice mitótico (IM) em células meristemáticas de *A. cepa*;
- Avaliar o potencial de indução de danos no DNA [aberrações cromossômicas (AC) e micronúcleos (MN)] de AgNP e AgNP-PVP em células meristemáticas de *A. cepa*;
- Identificar possíveis alterações morfoanatômicas em raízes de *A. cepa* expostas à AgNP e AgNP-PVP por meio de análise visual, estrutural [microscopia de luz (M.L)] e ultra-estrutural [microscopia eletrônica transmissão (M.E.T)];
- Identificar alterações de enzimas antioxidantes [Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione peroxidase (GPX), Glutathione S-transferase (GST)] e Peroxidação lipídica (LPO) em raízes de *A. cepa* expostas à AgNP e AgNP-PVP.
- Investigar se AgNP e AgNP-PVP sofrem alguma alteração de seu potencial tóxico na luz visível, por meio de comparação entre resultados do teste de *A. cepa* no escuro e na presença de luz visível.
- Caracterizar quimicamente AgNP e AgNP-PVP no escuro e na luz visível, a fim de determinar alterações químicas destas NPs nas duas condições e relacioná-las com os efeitos biológicos encontrados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O esquema abaixo (Fig. 1) demonstra o delineamento experimental empregado no presente trabalho.

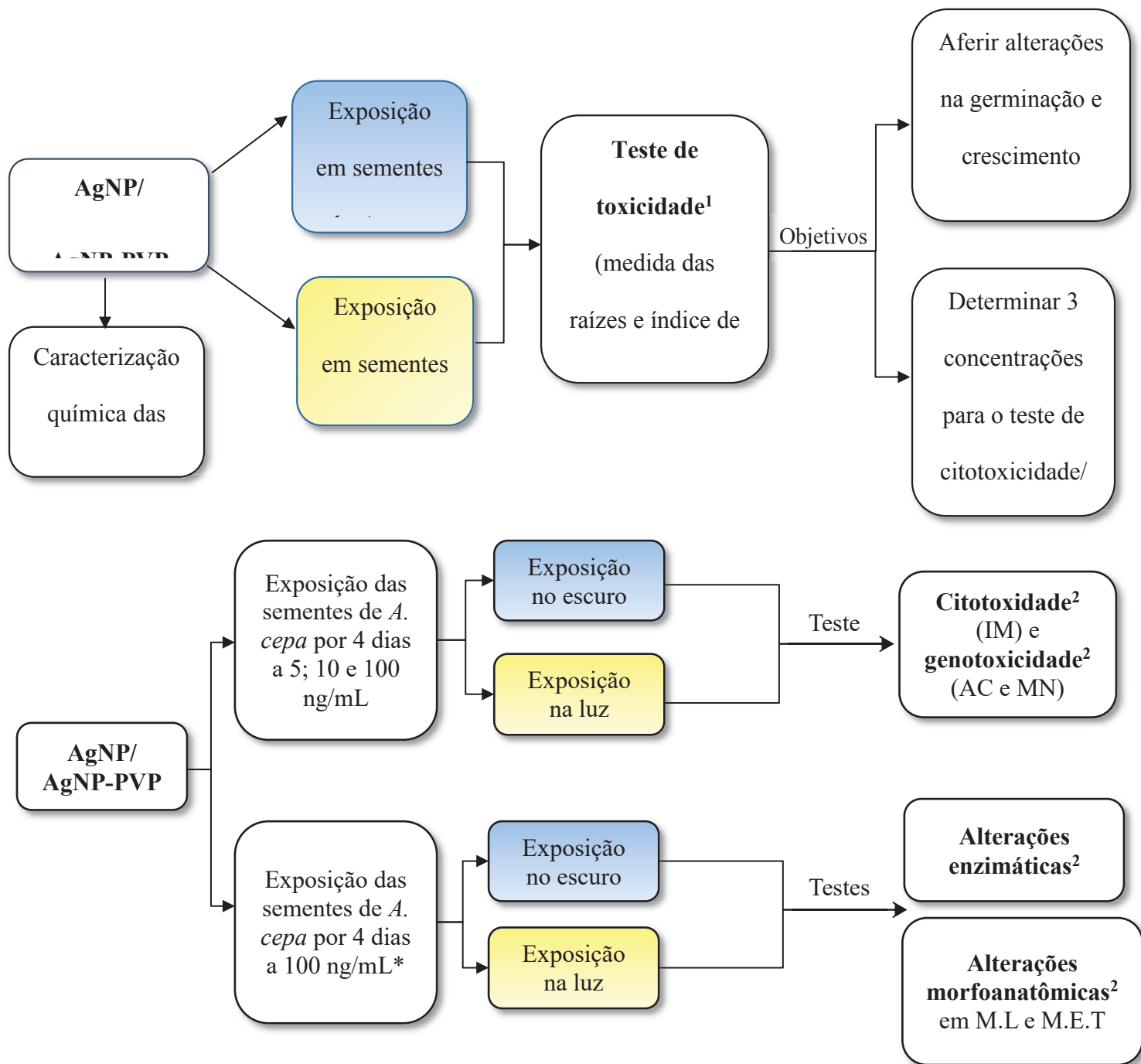


Figura 1. Organograma dos experimentos realizados. ¹Realizado com a raiz inteira, ²Realizado com as regiões meristemáticas das raízes. *foi escolhida a maior concentração das utilizadas nos demais testes, para realização dos testes bioquímicos e morfoanatômicos.

As análises do potencial tóxico das NPs em estudo foram realizadas no Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental, do Departamento de Genética, da Universidade Federal do Paraná (UFPR) em cooperação com o Laboratório de Anatomia e Biomecânica Vegetal, do Departamento de Botânica/UFPR; o Laboratório de Toxicologia Ambiental, do Departamento de Farmacologia/UFPR e o Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/Universidade de São Paulo (ESALQ/USP). Adicionalmente, a caracterização química das suspensões de NPs foram realizadas em parceria com o Grupo de Desenvolvimento de Técnicas Avançadas para Tratamento de Resíduos (TECNOTRATER) do Departamento de Química/UFPR e com a Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

4.1.Material

Os agentes teste utilizados neste trabalho foram:

- AgNPs não encapsuladas (Silver nanoparticle, <100 nm particle size, 99,5% trace metals basis, Sigma-Aldrich®);
- AgNPs encapsuladas com PVP (AgNP-PVP) (Silver nanospheres, 20 nm particle size, 0.02 mg/mL in water, PVP functionalized, Sigma-Aldrich®);

Como organismo biológico utilizou-se sementes de *A. cepa* da variedade baia periforme, sem defensivos, obtidas diretamente do fornecedor da marca Isla®.

4.2.Preparo e determinação das concentrações das suspensões teste das NPs

As concentrações das suspensões de NPs usadas para o teste de toxicidade, foram determinadas como baixas concentrações, pois partem da concentração mais baixa

determinada pelo guideline de fitotoxicidade do EPA (1996) para avaliação de toxicantes (100 ng/mL), e quatro concentrações abaixo desta, sendo assim: 0,5; 1; 5; 10 e 100 ng/mL.

A partir dos resultados do teste de toxicidade foi calculada a EC_{50} (concentração da substância para qual 50% do efeito é observado), sendo posteriormente a EC_{50} e mais duas concentrações inferiores a ela testadas quanto a citotoxicidade (IM) e genotoxicidade (AC e MN).

Para a análise bioquímica e morfoanatômica, as sementes foram expostas à maior concentração de AgNPs utilizada nos demais testes (100 ng/mL).

Devido à sua tendência a agregação, as suspensões teste de AgNP foram preparadas em água ultrapura e desagregadas em lavadora ultrassônica por 30 min (Fig. 2), na frequência de 42 Hz, antes da realização de cada experimento com *A. cepa* (SANTOS-FILHO, 2016). As AgNP-PVP também foram preparadas em água ultrapura, porém, não foram desagregadas, pois já possuem agentes estabilizantes contra agregação. As suspensões de NPs foram substituídas a cada 24 h, em todos os experimentos realizados, para evitar agregação das NPs às placas e redes de nylon foram utilizadas como substrato para o crescimento das sementes para garantir a biodisponibilidade das mesmas ao sistema teste (SANTOS-FILHO, 2016).



Figura 2. Desagregação de AgNP em lavadora ultrassônica antes da exposição às sementes de *A. cepa*.

4.3. Caracterização das suspensões teste de NPs

A caracterização das suspensões teste de NPs foi realizada com as suspensões no escuro e após exposição à luz visível por 8 h, pela Profa. Dra. Carmen Lúcia Voigt (UEPG). A caracterização foi realizada pelo aparelho Zetasizer[®] Nano Series ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK), no qual se verifica o tamanho médio das partículas, o índice de polidispersão e o potencial zeta. As medidas foram realizadas a 28°C. Para análise de tamanho das partículas e índice de polidispersão foi utilizada cubeta de poliestireno. Cada análise teve duração média de 105s e foi obtida com um ângulo de detecção de 90° e laser vermelho de 633 nm. Para determinar o potencial zeta, as amostras foram colocadas em célula eletroforética, onde um potencial de ± 150 mV foi estabelecido, realizando em média 12 corridas para cada amostra. Por meio do índice de polidispersão foi possível calcular a % de polidispersão [% Polidispersão (%Pd) = $(PdI)^{\frac{1}{2}} \times 100$], para verificar a homogeneidade de tamanhos de partículas presentes na suspensão coloidal, sendo considerada como suspensão homogênea quando %Pd < 20 (MALVERN, 2015). Além disso, imagens em microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram realizadas, para observação das NPs.

4.4. Caracterização da luz utilizada nos experimentos no claro

Para certificação de que o tipo de lâmpada utilizada compreendia somente ondas eletromagnéticas no espectro visível, a actinometria química (CURCÓ et al., 1996; DEMAS; CROSBY, 1971) foi utilizada para a determinação total de quantum absorvido em 1 hora de radiação da lâmpada utilizada nos testes. A reação foi realizada com ácido oxálico em presença de íon uranil, para avaliar a presença de ondas eletromagnéticas na faixa de 208 a 436 nm (comprimentos de onda que compreendem UVA e UVB). A absorção de quantum de luz ativa o íon uranilo, fazendo com que este transfira sua energia ao ácido oxálico, que se decompõe. A medida da radiação de luz UV é realizada, então, por titulação, quantificando a degradação de ácido oxálico. Acetato de uranila a 0,02 mol/L e ácido oxálico a 0,1 mol/L foram expostos a 0, 15, 30, 45 e 60 min à luz, e a titulação foi realizada com permanganato de potássio a 0,01706 mol/L. A quantificação de ondas eletromagnéticas de 100 a 200 nm (UVC) foi realizada com radiômetro de luz ultravioleta.

4.5. Bioensaios com sementes de *A. cepa*

Todos os experimentos descritos a seguir foram realizados em duas condições diferentes: ausência e presença de luz visível. Os ensaios na ausência de luz foram realizados em incubadora *Biochemical Oxygen Demand* (BOD), com temperatura constante (25°C). Para o teste na presença de luz, as sementes foram germinadas em incubadora equipada com lâmpada fluorescente FLC® eletrônica circular com reator de 32w (Fig. 3.), com temperatura constante de 25°C. As sementes foram expostas à luz branca durante 8 h por dia.

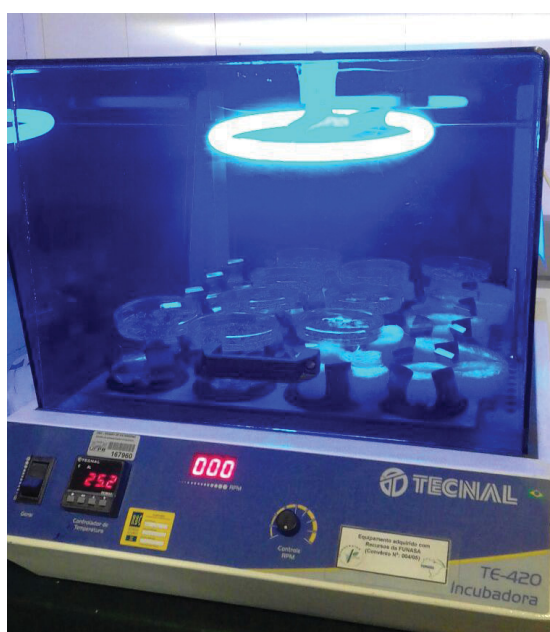


Figura 3. Incubadora equipada com lâmpada de luz fluorescente para realização dos experimentos na luz visível.

4.5.1. Teste de Toxicidade

Sementes de *A. cepa* foram dispostas em placas de Petri de plástico (100 sementes/placa), forradas com rede de nylon e submetidas à germinação em 5 concentrações teste de AgNP e AgNP-PVP (0,5; 1; 5; 10 e 100 ng/mL). No teste no escuro, todas as placas de Petri contendo as sementes expostas às NPs foram recobertas com papel alumínio, assim como os controles negativo (CN – água ultrapura) e positivo (CP – Sulfato de zinco heptahidratado a 6 mg/mL, CAS 7446-20-0, Sigma-Aldrich®), de forma a garantir as condições de ausência de luz durante todo o experimento (Fig. 4). Após 5 dias de exposição, o índice de germinação (IG) e o comprimento médio (CM) das raízes foram determinados para todos os tratamentos realizados. A EC₅₀ (concentração de

efeito em 50% dos indivíduos) foi calculada pela análise de regressão linear adotando curva dose-reposta inibitória.



Figura 4. Sementes de *Allium cepa* germinando em placa de Petri recoberta com papel alumínio (experimento no escuro) e sem papel alumínio (experimento no claro).

4.5.2. Teste de Aberrações Cromossômicas e Micronúcleos em células meristemáticas de *Allium cepa*

O teste de AC e MN em células meristemáticas de *A. cepa* foi realizado de acordo com o protocolo estabelecido por Grant (1982) e Leme; Marin-Morales (2008).

Sementes de *A. cepa* foram submetidas a germinação, como descrito no item 4.4.1, por 4 dias, em três suspensões teste das NPs (5, 10 e 100 ng/mL) as quais foram definidas conforme o item 4.2. Como CN e CP foram utilizados água ultrapura e Metil metanossulfonato (MMS, CAS 66-27-3, Sigma-Aldrich) a 10 mg/L, respectivamente. No teste no claro, apenas a placa de Petri contendo sementes expostas ao MMS (CP) foi recoberta com papel alumínio, para evitar possíveis interferências da luz na ação mutagênica do MMS.

Quando as raízes atingiram cerca de 2 cm de comprimento (4 dias de germinação), estas foram coletadas e fixadas em álcool e ácido-acético (3:1–v/v) por 6 h à temperatura ambiente. Após este tempo, foi realizada a troca por fixador recém-preparado, para o armazenamento das raízes à 4°C, até a sua utilização na confecção das lâminas.

As raízes fixadas passaram por processo de remoção do fixador (3 banhos de 5 min cada em água destilada) e, posteriormente, passaram por hidrólise ácida em HCl 1N

em banho maria à 60°C por 9 min. As raízes foram então submetidas a lavagem com água destilada (3 banhos de 5 min) para interrupção da hidrólise ácida e incubadas em reativo de Schiff por 2 h. Para o preparo das lâminas, os meristemas foram recobertos com lamínulas e, suavemente, esmagados em uma gota de carmim acético (2%). As lamínulas foram retiradas em nitrogênio líquido e as lâminas montadas com resina sintética, para serem, posteriormente, analisadas (Fig. 5).

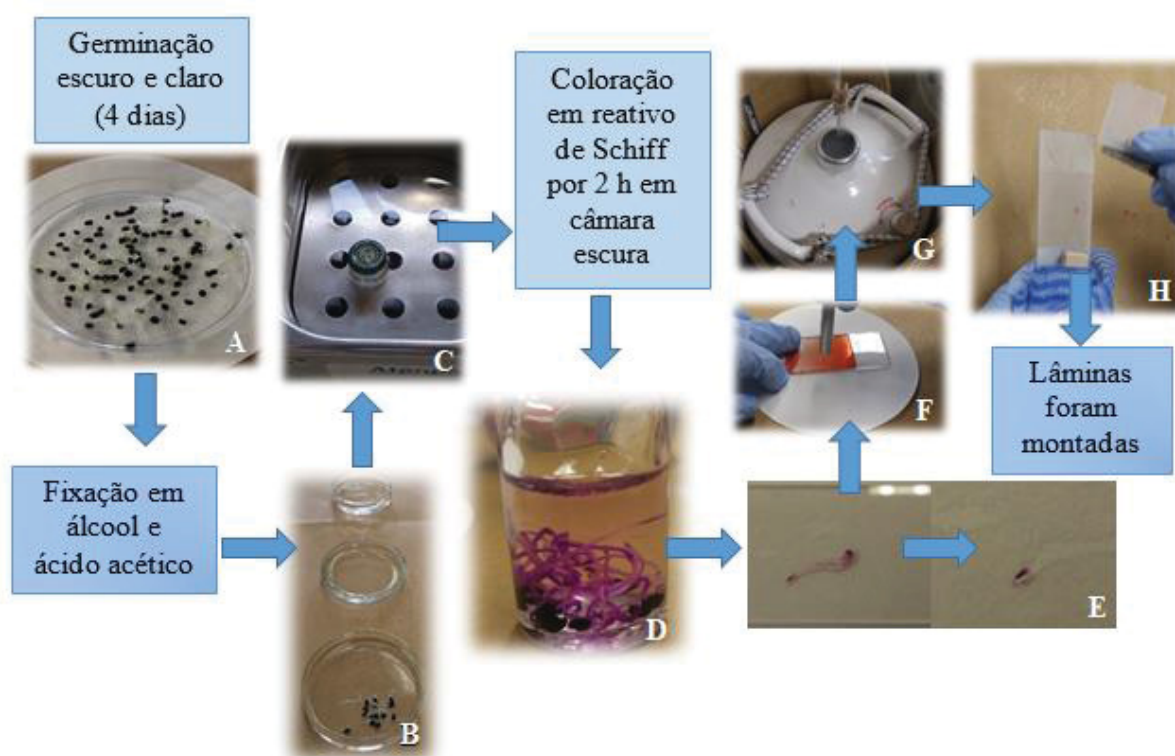


Figura 5. Confeção das lâminas para análise de citotoxicidade e genotoxicidade. **A.** Germinação das sementes de *A. cepa*; **B.** Retirada do fixador em 3 banhos de água destilada; **C.** Raízes submetidas a hidrólise ácida (HCl 1N a 60°C). **D.** Raízes coradas em reativo de Schiff; **E.** Corte de região meristemática da raiz. **F.** Esmagamento do meristema em carmim acético. **G e H.** Retirada da lamínula em nitrogênio líquido.

As lâminas foram analisadas quanto a incidência de células em divisão celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase) (IM) e presença de AC, anormalidade nucleares (AN) e micronúcleo (MN).

Para a análise das AC, diferentes tipos de anormalidades foram considerados (perdas, fragmentos, pontes, atrasos, aderências cromossômicas, entre outros) nas

diferentes fases da divisão celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase). No entanto, para a avaliação das AC como um único *endpoint*, todas as diferentes anormalidades encontradas foram reunidas em um só grupo (independente da fase celular), levando em consideração as AC aneugênicas e clastogênicas.

A análise de MN, se deu pela contagem dos MN nas células meristemáticas das lâminas de cada tratamento, considerando micronúcleos como corpos morfológicamente idênticos ao núcleo, de formato redondo ou oval, sem conexão e sobreposição com o núcleo principal, com mesma intensidade de cor e não apresentando refringências (FENECH et al., 2003).

A análise de todos estes parâmetros foi realizada pela contagem de 5000 células por tratamento, sendo 500 células por lâmina, para um total de 10 lâminas analisadas por tratamento (10 indivíduos/tratamento).

4.5.3. Atividade de enzimas envolvidas no estresse oxidativo

Foi realizada a medição da atividade das enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutaciona peroxidase (GPX), Glutaciona S-transferase (GST) e a medição da peroxidação lipídica (LPO). Todas as análises foram realizadas com um pool de 400 ápices radiculares de *A. cepa* por tratamento e a análise bioquímica foi realizada pela aluna de doutorado Letícia da Silva Pereira Fernandes, pela parceria estabelecida com a Profa. Dra. Helena Cristina da Silva de Assis, do Laboratório de Toxicologia Ambiental/Departamento de Farmacologia (UFPR).

4.5.3.1. Preparação das amostras

Sementes de *A. cepa* (n= 400) foram germinadas para cada tratamento (CN, AgNP e AgNP-PVP a 100 ng/mL) por 4 dias, nas duas diferentes condições (claro e escuro). Decorrido o tempo de exposição, os ápices radiculares foram coletados (~400 ápices radiculares/tratamento) e armazenados a -80°C em tubos de microcentrífuga, para posterior análise bioquímica. As amostras foram descongeladas em gelo moído e homogeneizadas numa proporção de 1:10 (w/v) em tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7 com auxílio de micro-homogeneizador PotterElvehjem. O homogeneizado foi centrifugado por 30 min a 15.000xg a 4°C. O sobrenadante foi aliquoteado para as análises das atividades enzimáticas e concentração de proteína.

4.5.3.2. Quantificação de proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi quantificada de acordo com o método descrito por Bradford (1976). Em microplaca foram adicionados 10 μL de cada amostra diluída em tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7 na proporção de 1:20 (v/v), seguidos de 250 μL do reativo Bradford diluído na proporção de 1:5. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 595 nm. Como curva padrão foi utilizado BSA (albumina do soro bovino), nas concentrações de 0, 125, 250, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$.

4.5.3.3. Superóxido-dismutase (SOD)

Para a análise da atividade da SOD, foi utilizado o método proposto por Gao et al. (1998) que se baseia na capacidade da SOD em inibir a auto oxidação do pirogalol. As amostras foram diluídas na proporção 1:10 (v/v) em tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7. Em microtubos foram adicionados 40 μL de amostra diluída, 885 μL de tampão Tris/EDTA (1 M/5mM pH 8) e 50 μL de pirogalol (15 mM). A solução foi incubada no escuro por 30 min. A reação foi interrompida com 25 μL de HCl 1N. Na microplaca foram adicionadas 300 μL da solução reação, e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 440 nm.

4.5.3.4. Catalase (CAT)

A cinética da catalase foi avaliada pelo método de Aebi (1984) que se baseia no consumo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) exógeno pela CAT, gerando água e oxigênio com decréscimo gradual na absorbância que foi medido por espectrofotometria com comprimento de onda de 240 nm. As amostras foram diluídas em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7. Na microplaca foram pipetados 5 μL de amostra seguido de 295 μL de solução reação (Tampão Tris-base 1M/EDTA 5 mM, pH 8, H_2O_2 20 mM e água ultrapura). A absorbância foi medida em comprimento de onda de 240 nm no espectrofotômetro Ultrospec 2000, UV/Visible - Pharmacia Biotec.

4.5.3.5. Glutathione S-transferase (GST)

A atividade da GST foi medida segundo o método descrito por Keen, Habig e Jakoby (1976), baseado na catalisação da reação de conjugação do substrato 1- 26 cloro-

2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com a glutathiona reduzida (GSH) pela GST, formando um tio éter. As amostras foram diluídas na proporção 1:5 (v/v) em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7. Na microplaca foram adicionados 20 µL de amostra diluída, seguido de 180 µL de solução reação – composta por GSH (3 mM), CDNB (3 mM) em tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 6,5. A leitura foi realizada a cada 15 s durante 3 min em espectrofotômetro a 340 nm.

4.5.3.6. Lipoperoxidação (LPO)

A análise da LPO foi realizada através da avaliação da concentração de hidroperóxidos pelo ensaio FOX (Ferrous Oxidation/ Xylenol Orange Method), proposto por Jiang, Hunt e Wolff (1992). O método consiste na oxidação do ferro, mediada pela presença de peróxidos em meio ácido. Para tanto, as amostras foram diluídas em metanol na proporção 1:1(v/v), e centrifugadas por 5 min a 10.000xg a 4°C. Em seguida 100 µL do sobrenadante foi pipetado em microtubos e incubados por 30 min em 900 µL da solução reação (contendo laranja de xilenol (0,1 mM), H₂SO₄ (25 mM), BHT (4 mM), sulfato ferroso amoniacal (2,5 mM) em metanol P.A.). A leitura foi realizada a 570 nm em espectrofotômetro.

4.5.4. Avaliação de alterações morfoanatômicas

Raízes de *A. cepa* foram obtidas pela exposição das sementes a 100 ng/mL de AgNP e AgNP-PVP, assim como o descrito no item 4.4.1. Amostras do ápice radicular de *A. cepa* foram coletadas e fixadas em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965). Para melhor penetração da solução fixadora, as amostras foram colocadas em dessecador, sendo o ar retirado com bomba de vácuo (0,1 mm Hg) por 20 min. Parte delas foram destinadas para análise em microscopia de luz (ML) e outra parte para análise em microscopia eletrônica de transmissão (MET).

4.5.4.1. Análise em microscopia de luz (ML)

Para análise em ML, as amostras foram desidratadas em série crescente de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%) e incluídas em resina acrílica tipo metacrilato. Cortes longitudinais com 5 µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo manual Reichert, corados em azul de toluidina pH 4 (O'BRIEN & MCCULLY, 1981) e montados

em lâmina e lamínula, utilizando como meio de montagem o Entellan[®]. Após observação, foi realizada documentação fotográfica, utilizando microscópio de luz (modelo Zeiss Axioskop 2) com câmera digital acoplada (modelo MRC3).

Este procedimento foi realizado no Laboratório de Anatomia e Biomecânica Vegetal, Departamento de Botânica/UFPR.

4.5.4.2. Análise em microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para análise em MET, as amostras foram retiradas da solução de Karnovsky, lavadas por três sessões (10 min cada) em tampão cacodilato a 0,05 M e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% por 1 h. Em seguida, contrastadas em acetato de uranila a 0,5% (pernoite), desidratadas em acetona (30, 50, 70, 90 e 100%) e incluídas em resina (SPURR), permanecendo em estufa a 60°C por período de 2 dias. Após obtenção dos blocos (material polimerizado), foram realizados cortes ultrafinos (70 nm de espessura), que foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963), sendo observados ao microscópio eletrônico de transmissão.

As análises em MET foram realizadas pelo Prof. Dr. Francisco André Ossamu Tanaka (ESALQ-USP).

4.6. Análises estatísticas e comparações dos resultados

O teste de toxicidade por IG e CM da raiz foi analisado estatisticamente por regressão linear com uma significância de $p < 0,05$.

Os valores de IM, AC e MN obtidos foram inicialmente verificados quanto a normalidade dos dados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Após a definição da normalidade dos dados, testes estatísticos não paramétricos (Mann-Whitney) ou paramétricos (t de Student) foram utilizados para comparar as diferenças dos tratamentos (AgNP, AgNP-PVP, ambas condições escuro e presença de luz; CP) com o CN. De acordo com Hothorn (2014), múltiplos testes t caracterizam uma abordagem que compreende menor taxa de falsos negativos, um critério importante em avaliações de risco, sendo recomendado dentro desta perspectiva. Resultados significativos foram considerados quando obtido nível de significância de $p < 0,05$.

Comparações entre os resultados no escuro e no claro de AgNP e AgNP-PVP, e alterações de enzimas oxidativas foram realizadas pelo método de Fold-change, sendo considerada diferenças significativas $2 < \text{Fold-change} < 0.5$.

Os resultados das análises morfoanatômicas foram analisados qualitativamente, conforme as imagens obtidas pelas técnicas de ML e MET, comparando as imagens dos tratamentos de NPs no claro e no escuro com as imagens de seus respectivos CN.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seção resultados e discussão foi estruturada na forma de artigo, como segue:

Artigo 1: Exposição a luz visível reduziu a toxicidade de nanopartículas de prata não encapsuladas e encapsuladas com PVP em teste de *Allium cepa*

**EXPOSIÇÃO A LUZ VISÍVEL REDUZIU A TOXICIDADE DE
NANOPARTÍCULAS DE PRATA NÃO ENCAPSULADAS E ENCAPSULADAS
COM PVP EM TESTE DE *Allium cepa***

SOUZA, I.R.¹; SILVA, L. R.¹; FERNANDES, L.S.P.²; FIRAK, D.S.³; BACH, L.³;
FILHO, R.S.¹; VOIGT, C.L.⁴; BARROS, A.C.⁵; ZAMORRA, P.P.³; SILVA DE ASSIS
H.C.²; SANT'ANNA-SANTOS, B.F.⁵; TANAKA, F. A. O⁶; CESTARI, M.M.¹; LEME,
D.M.^{1*}

¹Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba-PR,
Brasil.

²Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba-PR,
Brasil.

³Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba-PR,
Brasil.

⁴Departamento de Botânica, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba-PR,
Brasil.

⁵Departamento de Química, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa-PR,
Brasil.

⁶Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/Universidade de São Paulo
(ESALQ/USP).

*Autor de correspondência: Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciência Biológica
- Departamento de Genética. Rua Francisco H. dos Santos, s/n, Jardim das Américas,
81531-990, Curitiba/PR-Brasil. Tel.: +55 41 3361-1740. E-mail:
danielamoraisleme@gmail.com ou daniela.leme@ufpr.br.

Artigo em elaboração para submissão

Resumo

Nanopartículas de prata (AgNPs) são amplamente usadas como potente antibacteriano, tornando-se uma preocupação ambiental devido sua liberação no meio ambiente. AgNPs são produzidas em suas formas não estabilizada e estabilizada contra agregação (*i.e.*, com cápsula orgânica). Sendo a polivinilpirrolidona (PVP) um de seus agentes estabilizantes mais fabricados. Estudos prévios relatam alterações na superfície de AgNPs expostas à luz, alterando sua toxicidade em organismos. Frente a necessidade de prover conhecimento do potencial tóxico de AgNPs em diferentes condições, este estudo objetivou investigar a toxicidade de AgNP e AgNP-PVP, em baixas concentrações na ausência e presença de luz visível, utilizando o sistema teste vegetal *Allium cepa*. Sementes de *A. cepa* expostas às NPs no escuro e claro, foram avaliadas quanto a inibição da germinação e desenvolvimento das raízes (toxicidade) (0,5; 1; 5; 10 e 100 ng/mL), alterações do ciclo celular (citotoxicidade) e danos no DNA (genotoxicidade) (5; 10 e 100 ng/mL) e alterações celulares morfológicas e bioquímicas (quantificação de enzimas envolvidas no estresse oxidativo) (100 ng/mL). Alterações na germinação e desenvolvimento das raízes não foram visualizados para ambas AgNPs testadas no escuro e no claro. Contudo, elas se mostraram genotóxicas, pelo aumento significativo de aberrações cromossômicas (AC) e micronúcleos (MN), em ambas situações de exposição (escuro e claro). Adicionalmente, verificou-se diminuição de Superóxido dismutase (SOD) e aumento de lipoperoxidação (LPO) em AgNP-PVP no claro e no escuro, respectivamente, a qual é um indicativo de estresse oxidativo. Apesar de estabilizada, AgNP-PVP se mostrou menos genotóxica que AgNP indicando que a toxicidade de NPs pode ir muito além de seu estado de agregação. A comparação dos efeitos adversos promovidos pelas NPs em estudo, mostrou que a luz visível diminuiu as AC em até 5,60x em AgNP e 2,01x em AgNP-PVP. Alterações no índice mitótico (IM) e alterações morfoanatômicas nas raízes, verificadas para as maiores concentrações das NPs na condição escuro, não foram observados no claro, demonstrando que a luz promove alterações que impedem que as NPs exerçam sua ação citotóxica. Acreditamos que a luz visível pode ser utilizada como uma importante ferramenta de tratamento de resíduos de AgNPs, de forma a reduzir sua toxicidade e riscos ambientais.

Palavras-chave: nanopartículas de prata; polivinilpirrolidona; toxicidade, citotoxicidade; genotoxicidade; vegetal superior.

5.1. Introdução

Atualmente, nanopartículas de prata (AgNPs) estão entre as mais utilizadas em produtos de consumo e aplicações nanotecnológicas. A prata tem sido usada como um potente antibacteriano, antifúngico e agente antiviral (VANCE et al., 2015), sendo aplicada em produtos de consumo como roupas, cosméticos, recipientes de armazenamento de alimentos, eletrodomésticos e brinquedos para crianças (VANCE et al., 2015). Na agricultura, AgNPs têm sido usadas em fertilizantes e nanopruguicidas, e sua atividade antimicrobiana e antifúngica tem sido aplicada contra uma variedade de fitopatógenos (MISHRA; SINGH, 2014). Consequentemente, a liberação de nanoprata no ambiente já foi relatada (BENN; WESTERHOFF, 2008; GERANIO; HEUBERGER, 2009; QUADROS et al., 2013), podendo ocorrer não intencionalmente, durante todo o ciclo de vida de produtos de consumo contendo nanomateriais – que inclui a fabricação, uso e descarte destes (BOYES et al., 2017) – e intencionalmente por seu uso na agricultura. Assim, preocupações são crescentes neste contexto, devido aos potenciais efeitos adversos que essas NPs podem conferir aos organismos (LEVARD et al., 2012).

De fato, a toxicidade de AgNPs foi demonstrada em uma variedade de organismos em estudos recentes, como organismos aquáticos invertebrados (*Lemna minor*) (GUBBINS; BATTY; LEAD, 2011) e vertebrados (*Danio rerio*/zebrafish) (ASHARANI et al., 2008), plantas terrestres (*Allium cepa*, *Lolium multiflorum*) (KUMARI; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2009; YIN et al., 2011) algas (*Chlamydomonas reinhardtii*) (NAVARRO et al., 2008a), invertebrados terrestres (*Caenorhabditis elegans*) (MEYER et al., 2010), microrganismos (*Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*) (DROR-EHRE et al., 2009; FABREGA; RENSHAW; LEAD, 2009), e células humanas (ASHARANI et al., 2009; LU et al., 2010). Além disso, evidências crescentes mostram que a exposição às AgNPs pode induzir genotoxicidade (KUMARI; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2009; LI et al., 2014b; TAVARES; BALBINOT; MARTINS, 2012; WANG et al., 2013). Os danos ao DNA relatados a exposição à AgNPs, são muitas vezes relacionados com sua capacidade de induzir a formação

de espécies reativas de oxigênio (ROS) e, conseqüentemente, causar estresse oxidativo (LI et al., 2014b; TAVARES; BALBINOT; MARTINS, 2012). Esses achados sugerem potencial risco a longo prazo e danos aos ecossistemas e aos seres humanos (WANG et al., 2013).

A toxicidade de AgNPs é frequentemente relacionada com seu tamanho, forma e agregação. A maioria das AgNPs industriais constitui um núcleo Ag^0 com tamanho e forma variados e um revestimento orgânico (cápsula) com peso molecular e grupos funcionais variáveis (PILLAI; KAMAT, 2004; WILEY et al., 2005). Tais revestimentos afetam fortemente a carga de superfície, forma e agregação de AgNPs (BADAWY et al., 2011; FOLDBJERG et al., 2009; HOTZE; PHENRAT; LOWRY, 2010), indicando a importância da realização de estudos que comparem a toxicidade de AgNPs não encapsuladas e encapsuladas. A polivinilpirrolidona (PVP), um dos agentes de cobertura de AgNPs mais utilizados atualmente, estabiliza estereoisomericamente as NPs e está fortemente ligado ao núcleo Ag^0 (TEJAMAYA; MERRIFIELD; LEAD, 2012). Segundo Tejamaya et al. (2012), em comparação com outros agentes de cobertura, tais como citrato e polieteno glicol (PEG), AgNPs encapsuladas com PVP (AgNP-PVP) foram verificadas como as mais estáveis, sendo as mais recomendadas para exposição e estudos de efeitos ecotoxicológicos de AgNPs estabilizadas.

Devido à fotossensibilidade das AgNPs, estudos relatam mudanças em sua toxicidade quando expostas a diferentes tipos de luz, em comparação com o escuro. Aumento de citotoxicidade em embriões de zebrafish (*Danio rerio*) e linhagens de células de peixes BF2 quando expostas a um simulador de luz solar (SSL) (GEORGE et al., 2014); diminuição de toxicidade em *T. pyriformis* quando expostas às luzes natural e contínua (SHI et al., 2013; ZOU; SHI; ZHANG, 2014) e aumento de toxicidade em bactérias *E.coli* quando expostas à luz UVA (ZHAO; TOYOOKA; IBUKI, 2013) já foram relatadas nos estudos toxicológicos de AgNPs. No entanto, até o presente, nenhum estudo investigou se estas alterações na toxicidade ocorrem em baixas concentrações de AgNPs, e tampouco comparou se AgNPs, não estabilizadas (AgNP) e estabilizadas (AgNP-PVP), têm a toxicidade, incluindo a genotoxicidade, alterada na presença de luz.

O presente estudo objetivou investigar o efeito da luz visível na toxicidade de AgNP e AgNP-PVP no estabelecido modelo vegetal *Allium cepa* (GRANT, 1994; LEME; MARIN-MORALES, 2009). Sementes de *A. cepa* foram expostas a AgNP e AgNP-PVP nas condições

de ausência (escuro) e presença de luz (claro), sendo avaliados os seguintes parâmetros: toxicidade aguda (inibição da germinação e desenvolvimento da raiz), citotoxicidade [Índice Mitótico (IM)], genotoxicidade [Aberrações Cromossômicas (AC) e Micronúcleo (MN)], estresse oxidativo (quantificação de atividade enzimática) e alterações morfológicas das raízes. A caracterização química das NPs foi realizada para aferir seu estado de agregação nas diferentes condições de exposição para posterior correlação com os efeitos tóxicos observados.

5.2. Material e Métodos

5.2.1. Preparo e caracterização das suspensões de AgNPs

As suspensões de AgNPs não encapsuladas (AgNP, silver nanoparticle, <100 nm particle size, 99,5% trace metals basis, Sigma-Aldrich[®]) e encapsuladas (AgNP-PVP, silver nanospheres, 20 nm particle size, 0.02 mg/mL in water, PVP functionalized, Sigma-Aldrich[®]) foram preparadas em água ultrapura, em concentrações que partem da mais baixa determinada pelo guideline de fitotoxicidade do EPA (1996) (100 ng/mL), e quatro concentrações abaixo desta, sendo assim: 0,5; 1; 5; 10 e 100 ng/mL. As suspensões de AgNP foram desagregadas em banhos ultrassônico (42 Hz) por 30 min, imediatamente a cada exposição do sistema biológico e da caracterização química, para dispersão das partículas. A AgNP-PVP não foi submetida ao processo de desagregação para não interferir na cobertura de PVP.

As suspensões teste de NPs de 5; 10 e 100 ng/mL foram analisadas utilizando o Zetasizer[®] Nano Series ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) para a verificação do tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersão (Pdl) e potencial zeta (ζ). Para o cálculo da porcentagem de polidispersão (%PD), a seguinte equação foi utilizada: $\%PD = \sqrt{Pdl} \times 100$. Além disso, imagens em microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram realizadas para visualização de forma e tamanho das AgNPs.

5.2.2. Caracterização da luz utilizada nos experimentos no claro

Para certificação de que o tipo de lâmpada utilizada compreendia somente ondas eletromagnéticas no espectro visível, a actinometria química (CURCÓ et al., 1996; DEMAS; CROSBY, 1971) foi utilizada para a determinação total de *quantum* absorvido em 1 hora de

radiação da lâmpada utilizada nos testes. Acetato de uranila a 0,02 mol/L e ácido oxálico a 0,1 mol/L foram expostos a 0, 15, 30, 45 e 60 min à luz, e a titulação foi realizada com permanganato de potássio a 0,01706 mol/L para avaliar degradação de oxalato de sódio e assim, a presença de ondas eletromagnéticas na faixa de 208 a 436 nm (comprimentos de onda que compreendem UVA e UVB). A quantificação de ondas eletromagnéticas de 100 a 200 nm (UVC) foi realizada com radiômetro de luz ultravioleta.

5.2.3. Bioensaios com *Allium cepa*

Os experimentos no escuro e na presença de luz foram realizados, respectivamente, em incubadora BOD e incubadora equipada com lâmpada fluorescente FLC[®] eletrônica circular 32w, ambos em temperatura controlada de 25°C. Para os experimentos no claro, as sementes foram expostas à luz durante 8 h por dia.

As suspensões teste de AgNPs foram repostas diariamente para garantir a biodisponibilidade ao sistema-teste.

5.2.3.1. Teste de toxicidade por índice de germinação e desenvolvimento da raiz

Sementes de *A. cepa* (baia periforme) foram dispostas em placas de Petri de plástico (100 sementes/placa) forradas com rede de nylon e submetidas à germinação em 5 concentrações teste de AgNP e AgNP-PVP (0,5; 1; 5; 10 e 100 ng/mL). Após 5 dias de exposição, o índice de germinação (IG) e o comprimento médio (CM) das raízes foram determinados para todos os tratamentos realizados. O experimento foi realizado em triplicata. A EC₅₀ foi calculada pela análise de regressão linear adotando curva dose-reposta inibitória.

Como controles negativo (CN) e positivo (CP), foram utilizados água ultrapura e Sulfato de Zinco heptahidratado (CAS 7446-20-0, Sigma-Aldrich[®]) a 6 mg/mL, respectivamente.

5.2.3.2. Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade

Sementes de *A. cepa* foram expostas às suspensões de AgNP e AgNP-PVP (5, 10 e 100 ng/mL); água ultrapura (CN) e Metil metanossulfonato (MMS, CAS 66-27-3, Sigma-Aldrich) a 10 mg/L (CP), assim como descrito no item 2.2.1, porém, até atingirem 2 cm de comprimento (4 dias). As raízes foram então fixadas em álcool e ácido-acético (3:1-v/v) e submetidas a

coloração em reativo de Schiff (Mello; Vidal, 1978). As lâminas citológicas foram preparadas com os meristemas, segundo o protocolo de Leme; Marin-Morales (2008).

As lâminas foram analisadas por microscopia de luz para IM (citotoxicidade), AC e MN (genotoxicidade), pela contagem de 5000 células por tratamento (500 células/lâmina, 10 lâminas/tratamento, 10 indivíduos/tratamento).

5.2.3.3. Quantificação de enzimas envolvidas no estresse oxidativo

Sementes de *A. cepa* (n=400) foram germinadas para cada tratamento (CN, AgNP e AgNP-PVP a 100 ng/mL), como descrito no item 2.2.1, porém, por 4 dias. Após a exposição, os meristemas foram coletados (400 meristemas/tratamento) e armazenados a -80°C, para posterior quantificação enzimática. As amostras foram homogeneizadas, com auxílio de micro-homogeneizador automático, em tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7 na proporção de 1:10 (w/v). O homogeneizado foi centrifugado por 30 min a 15.000g e 4°C. O sobrenadante foi aliqotado para as análises das atividades enzimáticas e concentração de proteína, como segue.

A concentração de proteínas totais foi quantificada de acordo com o método descrito por Bradford (1976). A leitura foi feita em espectrofotômetro a 595 nm. Como curva padrão foi utilizado albumina do soro bovino (BSA), nas concentrações de 0, 125, 250, 500 e 1000 µg/mL.

Para a análise da atividade da superóxido-dismutase (SOD), foi utilizado o método proposto por Gao et al. (1998), que se baseia na capacidade da SOD em inibir a auto oxidação do pirogalol e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 440 nm.

A cinética da catalase (CAT) foi avaliada pelo método de Aebi (1984), que se baseia no consumo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) exógeno pela CAT, gerando água e oxigênio com decréscimo gradual na absorbância. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 240 nm.

A atividade da Glutathione S-transferase (GST) foi medida segundo o método descrito por Keen, Habig e Jakoby (1976), baseado na catalisação da reação de conjugação do substrato 1- 26 cloro- 2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com a glutathione reduzida (GSH) pela GST, formando um tio éter. A leitura foi realizada a cada 15 segundos durante 3 minutos em espectrofotômetro a 340 nm.

5.2.3.4. Análise morfoanatômica

Sementes de *A. cepa* (n= 3) foram expostas a AgNP e AgNP-PVP a 100 ng/mL e água ultrapura (CN) por 4 dias e fixadas em Karnovsky. Para a análise em microscopia de luz (ML), as amostras foram desidratadas em série crescente de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%) e incluídas em resina acrílica tipo metacrilato. Cortes longitudinais com 5 µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo manual Reichert, corados em azul de toluidina pH 4 (O'BRIEN & MCCULLY, 1981) e montados em lâmina e lamínula.

Para análise em microscopia eletrônica de transmissão (MET) as amostras foram lavadas em tampão cacodilato a 0,05 M e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% por 1 h. Em seguida, contrastadas em acetato de uranila a 0,5% (pernoite), desidratadas em acetona (30, 50, 70, 90 e 100%) e incluídas em resina (SPURR), permanecendo em estufa a 60°C por período de 2 dias. Foram realizados cortes ultrafinos (70 nm de espessura), que foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963).

5.2.4. Análise estatística

Teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov foi realizado e os grupos foram analisados para IM, AC e MN por teste de Mann-Whitney e teste t conforme a distribuição dos grupos. Comparações entre os resultados no escuro e no claro de AgNP e AgNP-PVP, e alterações de enzimas oxidativas foram realizadas pelo método de Fold-change, sendo considerada diferenças significativas $2 < \text{Fold-change} < 0.5$. Os resultados das análises morfoanatômicas foram analisados qualitativamente, conforme as imagens obtidas pelas técnicas de ML e MET, comparando as imagens dos tratamentos de NPs no claro e no escuro com as imagens de seus respectivos CN.

5.3. Resultados

5.3.1. Caracterização da luz utilizada nos experimentos no claro

As concentrações de oxalato de sódio se mantiveram constantes em 1h de exposição à luz, indicando que os íons uranil não estavam sendo eletronicamente excitados por radiação UVA e UVB para que ocorra a degradação do oxalato de sódio, portanto, não houve emissão

de radiação UVA e UVB pela lâmpada utilizada. O radiômetro de luz ultravioleta não detectou qualquer radiação UVC emitida pela lâmpada (fig.1S), comprovando-se que a lâmpada utilizada emite radiação de ondas eletromagnéticas compreendidas apenas no espectro visível.

5.3.2. Caracterização química das nanopartículas de prata (AgNP e AgNP-PVP)

As imagens em MET permitiram a visualização da forma e tamanho das AgNPs (Fig. 1). As imagens comprovaram que as AgNP-PVP são nanoesferas, com tamanhos heterogêneos (Fig. 1B) e presença da cápsula de PVP (Fig. 1D). AgNPs também apresentaram tamanhos variados e forma majoritariamente esférica (Fig. 1A e C), com agregações maiores e mais densas (Fig. 1E) em relação às pequenas agregações de AgNP-PVP observadas (Fig. 1F).

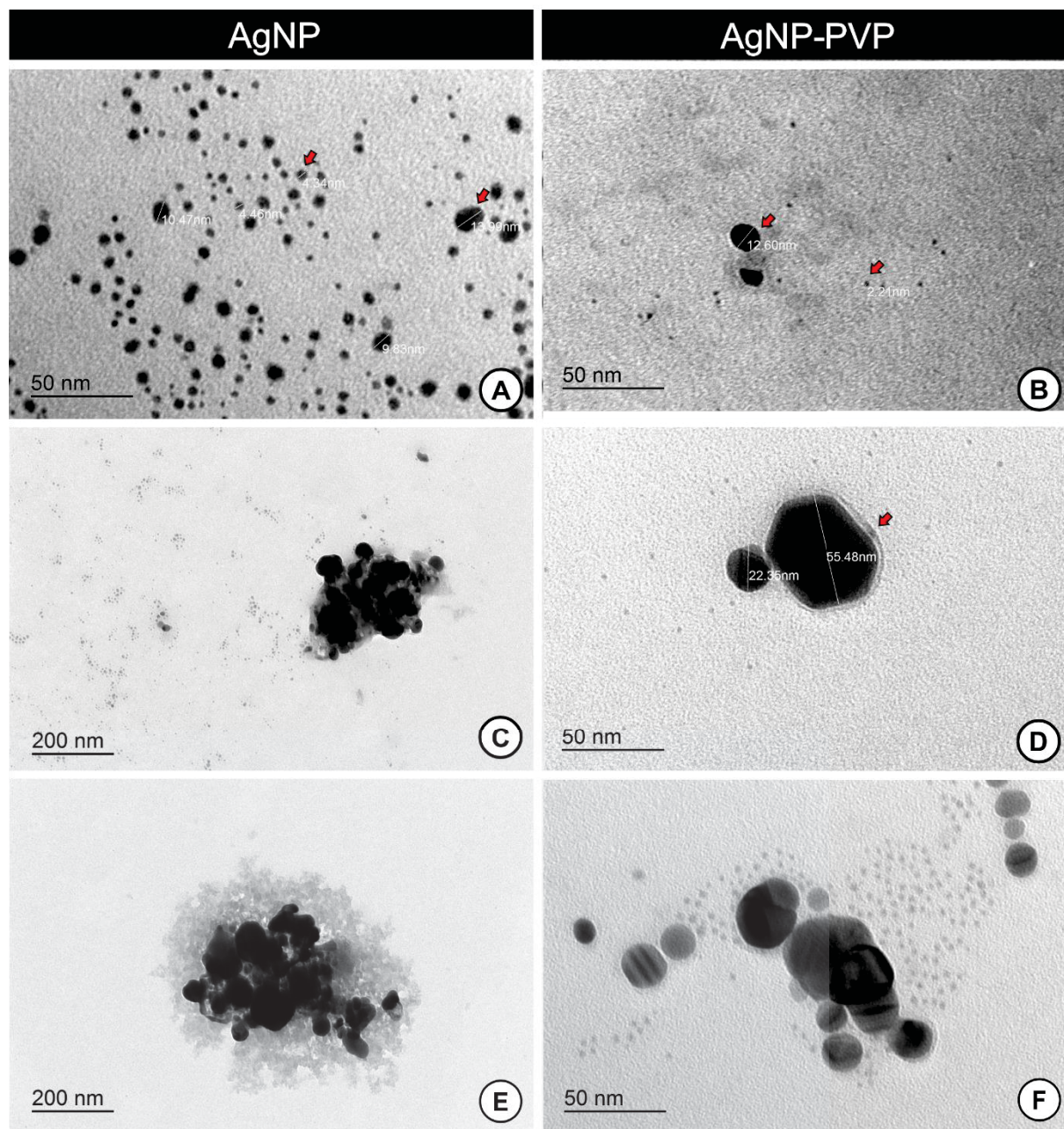


Figura 1. AgNP e AgNP-PVP visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). **A.** AgNPs com tamanhos variados e forma esférica (setas indicam NPs com 4,34 nm e 14 nm); **B.** AgNP-PVP com tamanhos variados e forma esférica (setas indicam NPs com 12,60 nm e 2,21 nm). **C.** Partículas pequenas ao redor de um grande agregado de AgNP; **D.** Cápsula de PVP (seta vermelha) em AgNP-PVP. **E.** Agregação grande e densa de AgNP; **F.** Pequena agregação de AgNP-PVP.

Os picos de % de intensidade de cada concentração obtidos por zetasizer, indicam o tamanho da maior parte das partículas contidas nas suspensões (Fig. 2). O tamanho das

partículas de AgNP e AgNP-PVP variou bastante em ambas as condições de escuro e claro, demonstrando uma instabilidade das suspensões quanto ao tamanho, e tendência a agregação o que faz com que algumas partículas se tornem maiores do que outras. A porcentagem de polidispersão (pd), obtida a partir do índice de polidispersão ($\sqrt{PDI} \times 100$), comprovou que as amostras foram heterogêneas quanto aos diâmetros de partículas encontradas (pd >20%). O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, a qual é influenciada pelas mudanças na interface com o meio dispersante, e também presume se as partículas estão em maior ou menor estado de agregação, já que dependendo de sua carga de superfície as partículas terão maior ou menor repulsão entre si. Todos os resultados de potencial zeta das AgNPs e AgNP-PVP, no escuro e no claro, estiveram dentro da faixa que indica instabilidade das suspensões (entre -30 mV e +30mV), e conseqüentemente, tendência à agregação. No entanto, nota-se que as AgNPs apresentaram tamanhos muito maiores que as AgNP-PVP, o que já era esperado devido à sua falta de agentes estabilizantes, que permitem que estas partículas se agreguem e formem aglomerados maiores que as que são estabilizadas com PVP. Com exceção da concentração de 5ng/mL, as AgNPs no escuro foram um pouco maiores que em condição de exposição na luz, enquanto que todas as concentrações de AgNP-PVP foram muito menores no escuro que quando expostas à luz (tab. 1S).

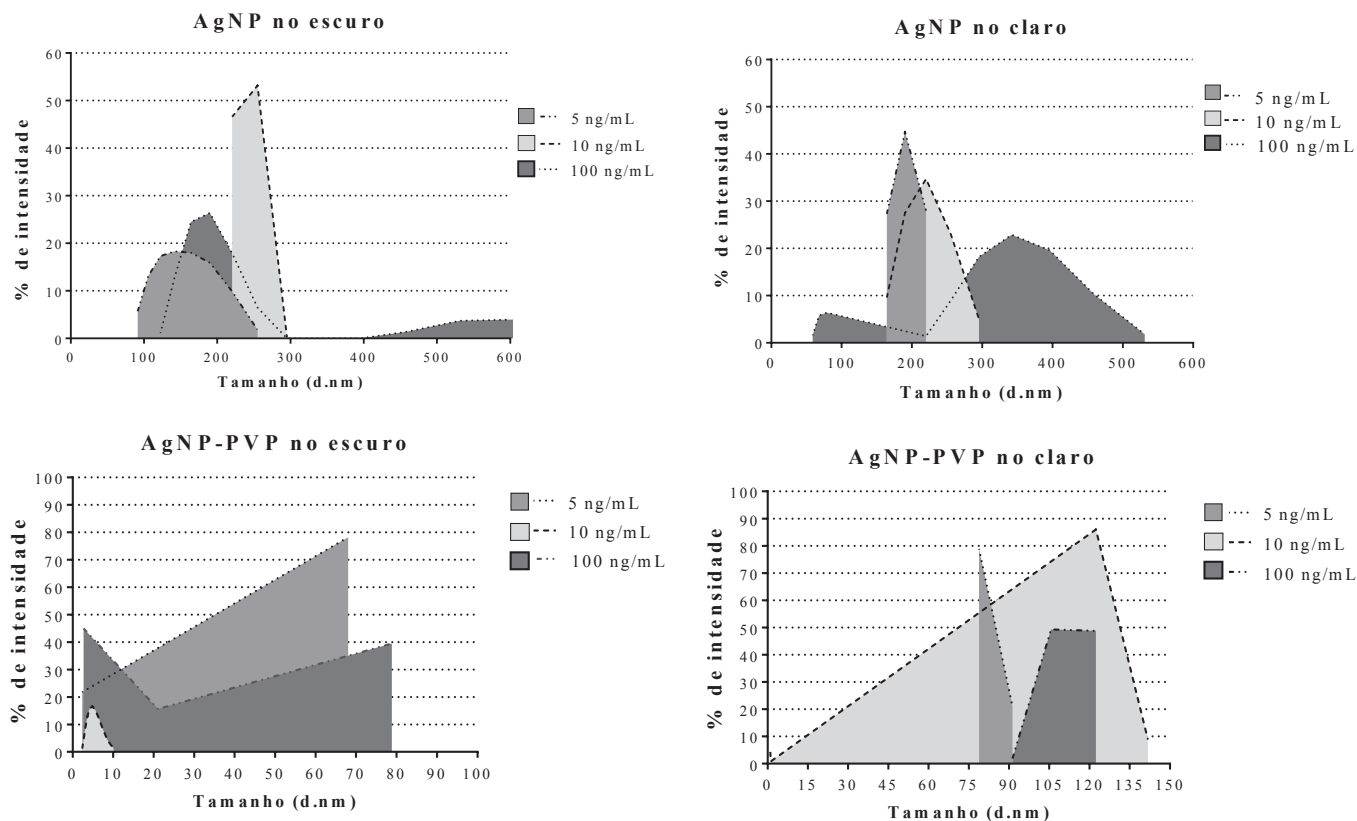


Figura 2. Distribuição de tamanho de AgNP e AgNP-PVP nas condições de claro e escuro. A % de intensidade, no eixo Y dos gráficos, indica a porcentagem de partículas dos tamanhos indicados no eixo X.

5.3.3. Avaliação toxicológica das nanopartículas de prata (AgNP e AgNP-PVP)

5.3.3.1. Teste de toxicidade

Diferenças significativas quanto a redução da taxa de germinação (IG) e inibição do desenvolvimento das raízes (CM) não foram observadas para nenhum dos tratamentos realizados com as suspensões de AgNP (Fig.3) e AgNP-PVP (Fig.4) em relação ao CN.

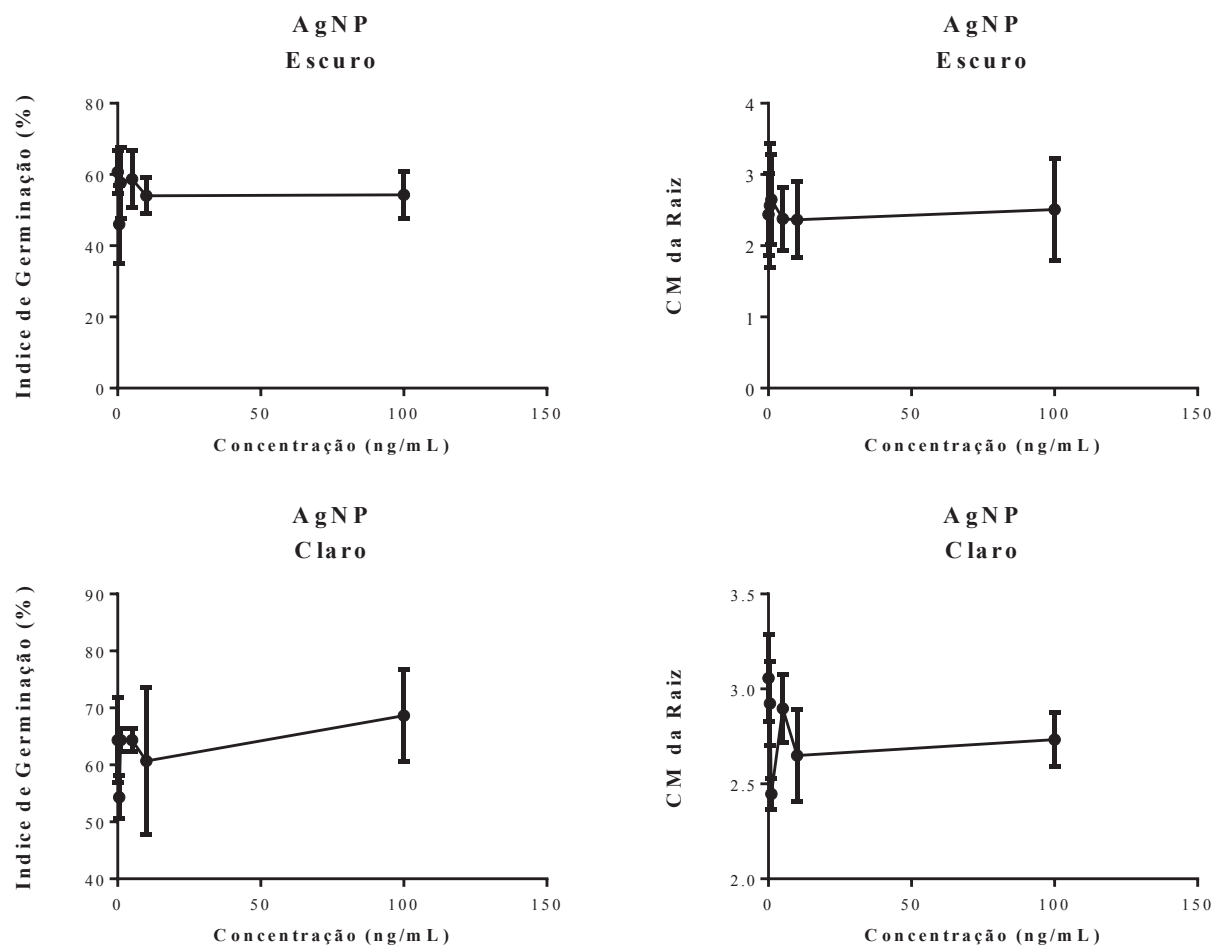


Figura 3. Índice de germinação e desenvolvimento da raiz de sementes de *A. cepa* expostas à AgNP nas condições claro e escuro. Os pontos representam as médias e as barras representam o desvio padrão. CM: comprimento médio da raiz em cm.

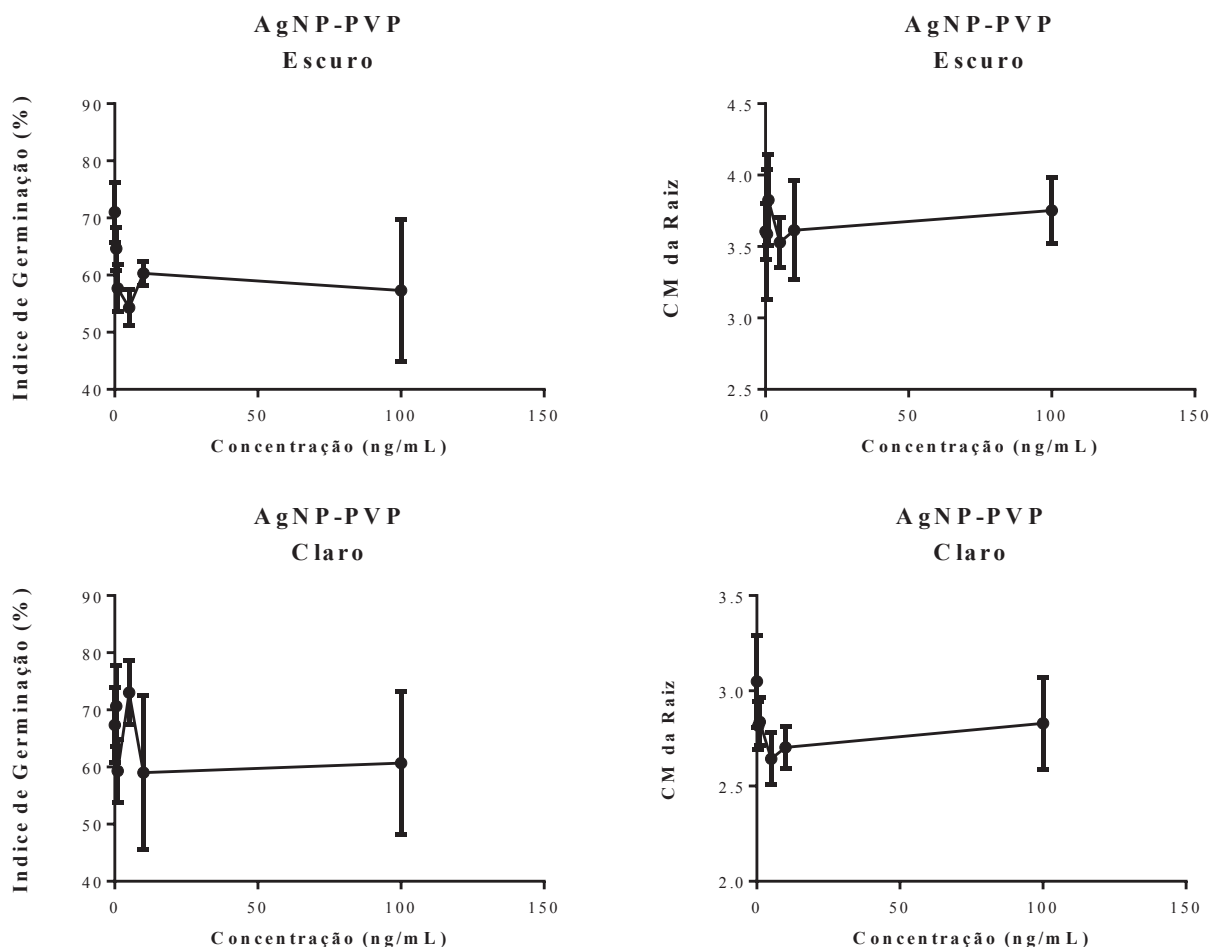


Figura 4. Índice de germinação e desenvolvimento da raiz de sementes de *A. cepa* expostas à AgNP-PVP nas condições claro e escuro. Os pontos representam as médias e as barras representam o desvio padrão. CM: comprimento médio da raiz em cm.

5.3.3.2. Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade

O IM foi maior na concentração de 100 ng/mL de AgNP no escuro e menor nas concentrações de 10 e 100 ng/mL de AgNP-PVP no escuro comparados com o CN (Fig.5 A-B). Quando AgNP e AgNP-PVP foram expostas no claro, o IM não foi significativamente alterado em nenhuma concentração (Fig. 6 A-B).

Quando expostas à AgNP, a frequência de AC e MN nas células meristemáticas de *A. cepa* foi significativamente maior que no CN, em todas as concentrações, no escuro (Fig. 5 C-E) e no claro (Fig. 6 C-E). Quando expostas à AgNP-PVP, a frequência de AC e MN também foi significativamente maior que no CN em todas as concentrações no escuro (Fig. 5 D-F), enquanto que no claro a frequência de AC aumentou para todas as concentrações (Fig. 6 D) e para MN esta foi maior apenas nas concentrações de 5 e 10 ng/mL (Fig.6 F). As ACs encontradas foram tanto clastogênicas (pontes e quebras cromossômicas) quanto aneugênicas (brotos nucleares, anáfases multipolares, atrasos e perdas cromossômicas) (Fig.7). Ao analisar quais os tipos de AC mais frequentes, nota-se que pontes e perdas cromossômicas foram as mais frequentes. A exposição à AgNP no escuro, causou pontes cromossômicas significativamente maiores que o CN em todas as concentrações testadas e, para AgNP-PVP no escuro, as 3 concentrações testadas foram significativamente maiores que o CN para pontes e perdas cromossômicas (tab. 1). Na condição de claro, AgNP causou pontes cromossômicas significativamente maiores quando expostas à 5 ng/mL e perdas cromossômicas maiores nas concentrações de 10 e 100 ng/mL, comparadas com o CN (tab. 2). Enquanto que a exposição à AgNP-PVP no claro causou aumento significativo de pontes cromossômicas nas 3 concentrações testadas e de perdas cromossômicas nas concentrações de 5 e 10 ng/mL (tab.2).

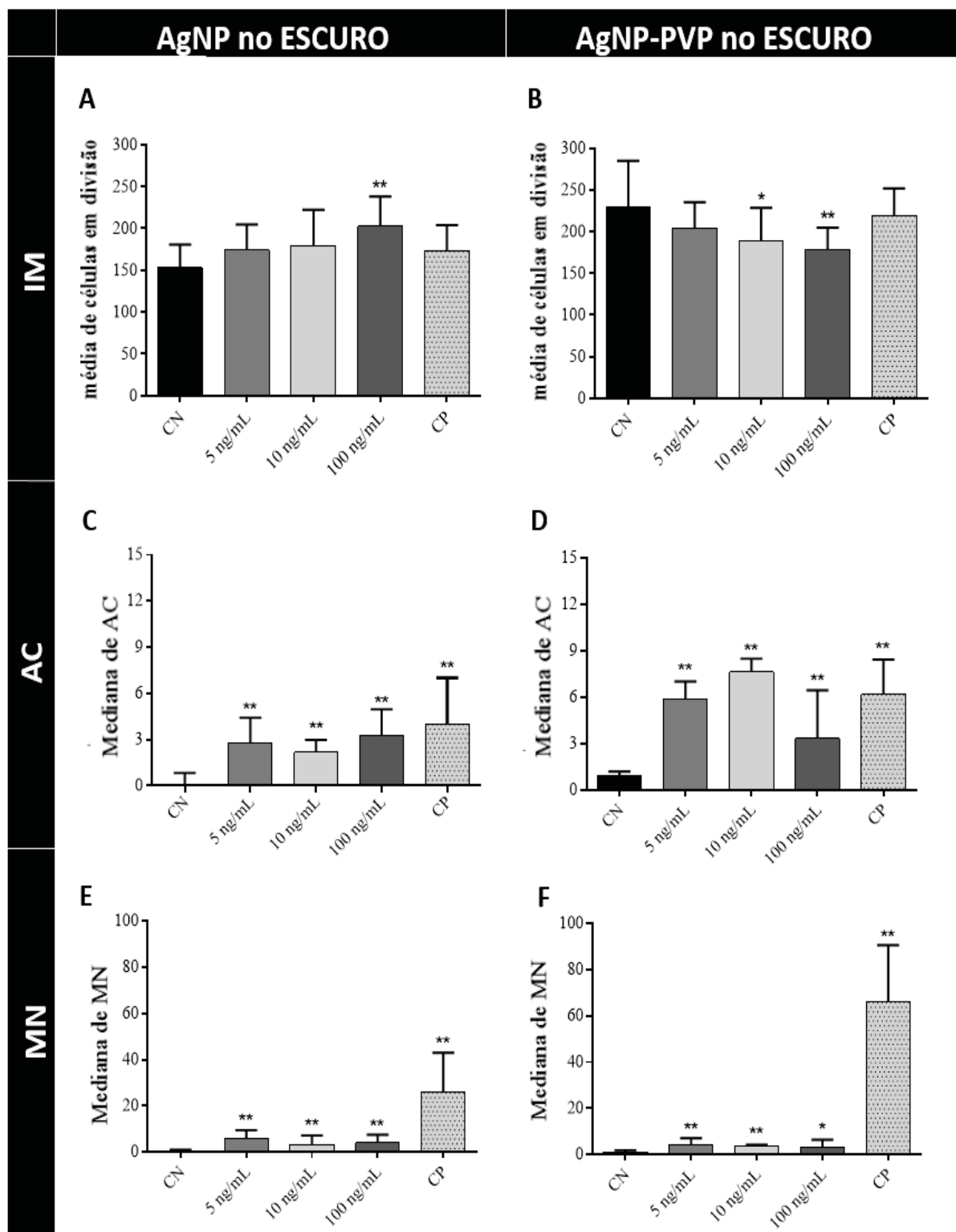


Figura 5. Citotoxicidade e genotoxicidade de AgNP e AgNP-PVP na condição de escuro. IM: índice mitótico; AC: Aberrações cromossômicas; MN: micronúcleo. **A.** IM de AgNP; **B.** IM de AgNP-PVP; **C.** AC de AgNP; **D.** AC de AgNP-PVP; **E.** MN de AgNP; **F.** MN de AgNP-PVP. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ comparado com o CN por Mann Whitney ou teste t. Barras indicam interquartis.

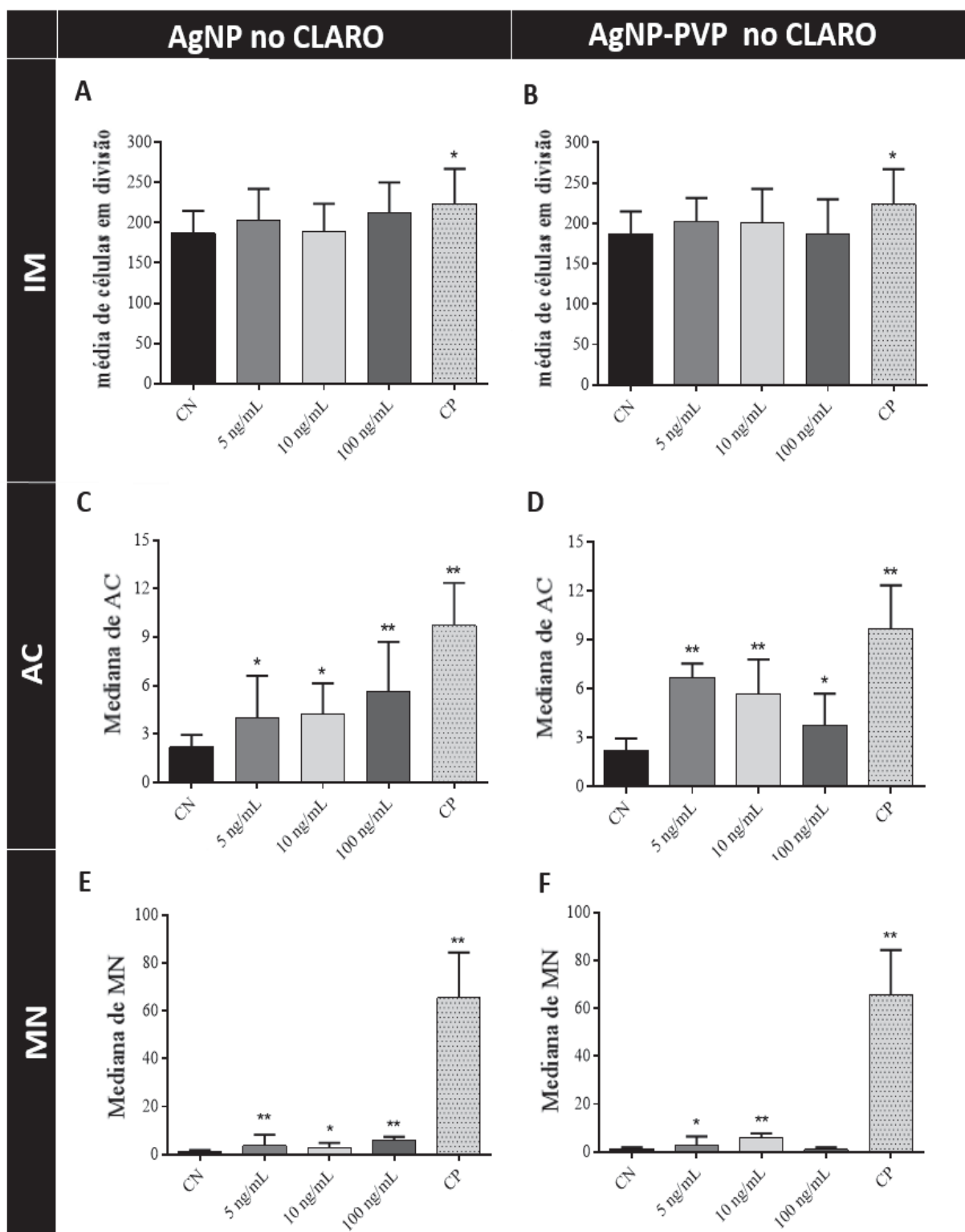


Figura 6. Citotoxicidade e genotoxicidade de AgNP e AgNP-PVP na condição de claro. IM: índice mitótico; AC: Aberrações cromossômicas; MN: micronúcleo. **A.** IM de AgNP; **B.** IM de AgNP-PVP; **C.** AC de AgNP; **D.** AC de AgNP-PVP; **E.** MN de AgNP; **F.** MN de AgNP-PVP. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ comparado com o CN por Mann Whitney ou teste t. Barras indicam interquartis.

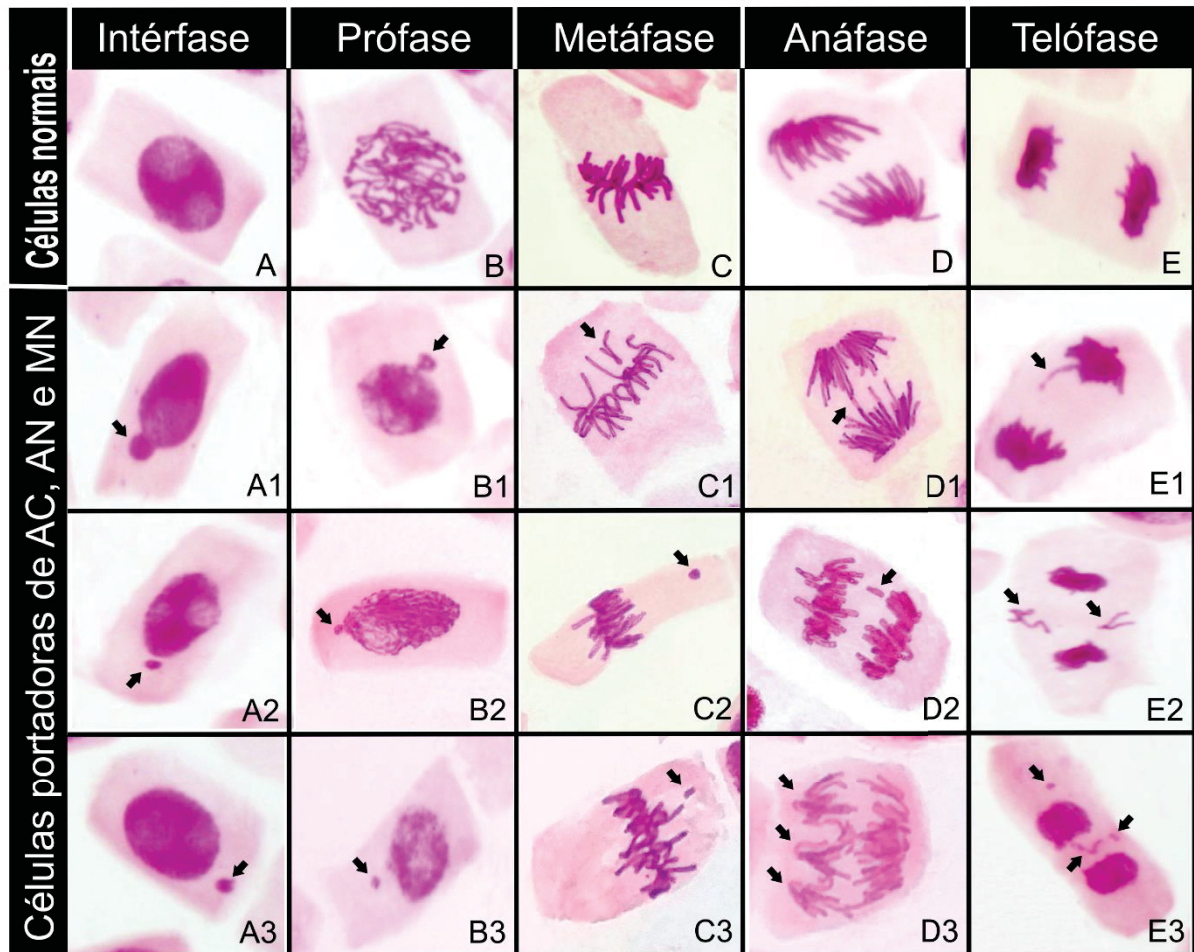


Figura 7. Anormalidades nucleares e cromossômicas encontradas em diferentes fases do ciclo celular de células meristemáticas de *Allium cepa* expostas às AgNP e AgNP-PVP. **A-E.** células normais nas diferentes fases do ciclo celular; **A1.** Broto nuclear em interfase; **A2-3.** MN em interfase; **B1-2.** Broto nuclear em prófase; **B3.** MN em prófase; **C1.** Perda cromossômica; **C2.** MN em metáfase; **C3.** Quebra cromossômica; **D1.** Ponte cromossômica; **D2.** Anáfase com quebra cromossômica; **D3.** Anáfase multipolar; **E1.** Atraso cromossômico; **E2.** Telófases com perdas cromossômicas; **E3.** Perda, quebra cromossômicas e MN em telófase. AC: Aberrações Cromossômicas, AN: Anormalidades Nucleares e MN: Micronúcleos.

Tabela 1. Tipos de aberrações cromossômicas observados em células meristemáticas de *A. cepa* expostas à AgNP e AgNP-PVP na condição de escuro.

AC	Concentrações de AgNP (ng/mL)					Concentrações de AgNP-PVP (ng/mL)				
	CN	5	10	100	CP	CN	5	10	100	CP
Clastogênicas										
Ponte cromossômica	0,02	0,30*	0,20*	0,36*	0,30*	0,05	0,57*	0,52*	0,38*	0,23*
Quebra cromossômica	0,00	0,00	0,06	0,03	0,10	0,06	0,04	0,17	0,02	0,20
Total	0,02	0,30	0,26	0,39	0,40	0,11	0,61	0,69	0,40	0,42
Aneugênicas										
Atraso cromossômico	0,02	0,05	0,04	0,09	0,02	0,08	0,17	0,09	0,15	0,08
Perda cromossômica	0,01	0,11	0,09	0,07	0,14	0,04	0,37*	0,39*	0,32*	0,29*
Anáfase multipolar	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00
Broto nuclear	0,00	0,11	0,05	0,12	0,24	0,07	0,13	0,02	0,00	0,42*
Total	0,03	0,28	0,18	0,28	0,53	0,15	0,67	0,50	0,49	0,79

AgNP e AgNP-PVP: nanopartícula de prata não encapsulada e encapsulada com PVP, respectivamente; AC: aberrações cromossômicas; CN: controle negativo (água ultrapura); CP: controle positivo (Metil metanossulfonato a 10 mg/L). Dados expressos em frequência (%). 5000 células analisadas por tratamento. * diferença significativa em relação ao controle negativo, $p < 0,05$ de acordo com teste de Mann-Whitney.

Tabela 2. Tipos de aberrações cromossômicas observados em células meristemáticas de *A. cepa* expostas à AgNP e AgNP-PVP na condição de claro.

AC	CN	Concentrações de AgNP (ng/mL)			Concentrações de AgNP-PVP (ng/mL)			CP
		5	10	100	5	10	100	
Clastogênicas								
Ponte cromossômica	0,27	0,43*	0,34	0,44	0,59*	0,42*	0,40*	0,46
Quebra cromossômica	0,02	0,00	0,02	0,04	0,00	0,03	0,00	0,51*
Total	0,29	0,43	0,36	0,47	0,59	0,45	0,40	0,97
Aneugênicas								
Atraso cromossômico	0,02	0,09	0,04	0,09	0,10	0,08	0,09	0,11
Perda cromossômica	0,09	0,27	0,46*	0,65*	0,58*	0,41*	0,31	0,40*
Anáfase multipolar	0,00	0,02	0,02	0,04	0,02	0,00	0,00	0,02
Broto nuclear	0,02	0,05	0,02	0,15	0,09	0,17	0,00	0,40*
Total	0,13	0,43	0,54	0,93	0,79	0,65	0,40	0,94

AgNP e AgNP-PVP: nanopartícula de prata não encapsulada e encapsulada com PVP, respectivamente; AC: aberrações cromossômicas; CN: controle negativo (água ultrapura); CP: controle positivo (Metil metanossulfonato a 10 mg/L). Dados expressos em frequência (%). 5000 células analisadas por tratamento. * diferença significativa em relação ao controle negativo, $p < 0,05$ de acordo com teste de Mann-Whitney.

Quando os resultados foram comparados por fold change entre as condições claro e escuro observou-se diminuição da genotoxicidade de AgNP e AgNP-PVP quando expostas à luz. No claro, a AgNP teve as frequências de AC e MN reduzidas em até 5,60 vezes e 2,69 vezes, respectivamente, em relação ao escuro. (Fig. 8). A redução observada para as AgNP-

PVP foi mais sutil, sendo as frequências de AC e MN reduzidas em até 2,01 e 3,70 vezes, respectivamente, em relação ao escuro (Fig. 8). Nota-se que as ACs tiveram diminuições maiores que os MNs em ambos os tipos de NPs. No entanto, com exceção da concentração de 10 ng/mL de AgNP-PVP, em que não houve diminuição de MN no claro, tanto AC quanto MN foram diminuídos no claro em todas as concentrações de AgNP e AgNP-PVP.

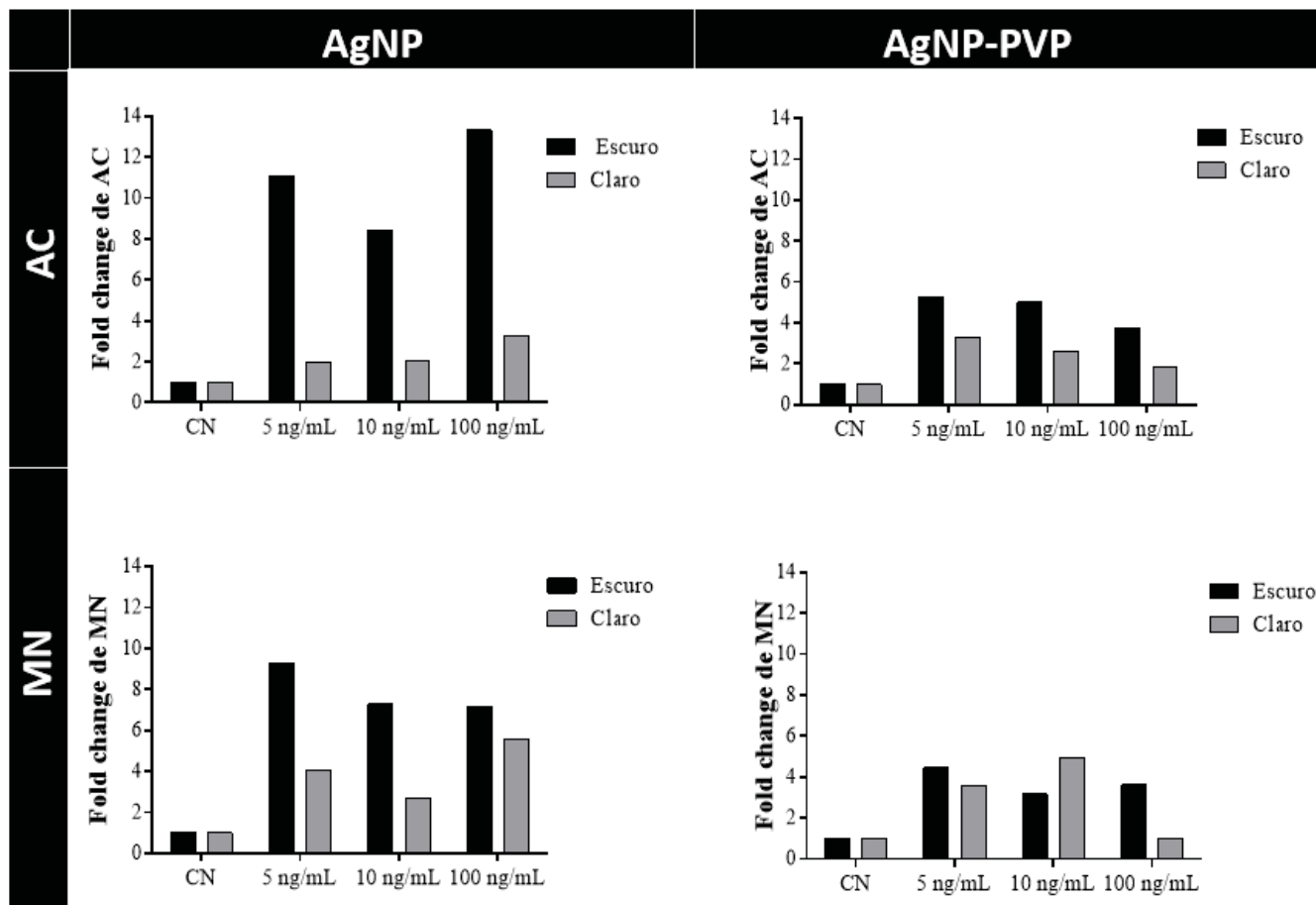


Figura 8. Comparação da genotoxicidade entre as condições claro e escuro de cada NP (AgNP e AgNP-PVP). O Fold change de Micronúcleo (MN) e Aberrações Cromossômicas (AC) indica quantas vezes estes parâmetros foram maiores que o CN no escuro ou no claro.

Quando comparado qual das duas NPs de prata foi mais genotóxica, nota-se que no escuro o aumento de AC e MN em relação ao CN, foi muito maior em AgNP que em AgNP-PVP, com um aumento de até 13,30 vezes de AC em 100 ng/mL de AgNP e apenas 3,74 vezes

em AgNP-PVP na mesma concentração (Fig. 9). No entanto, no claro, a AgNP-PVP obteve fold change de ACs em relação ao CN maior que a AgNP nas concentrações de 5 ng/mL e 10 ng/mL, e maior fold change de MN na de 10 ng/mL, sendo mais genotóxica que a AgNP na luz, nestas concentrações (Fig. 9). Isto se deve à drástica diminuição da genotoxicidade da AgNP na luz, e não a um aumento de genotoxicidade da AgNP-PVP no claro, visto que ambas as NPs diminuíram sua toxicidade quando expostas a luz.

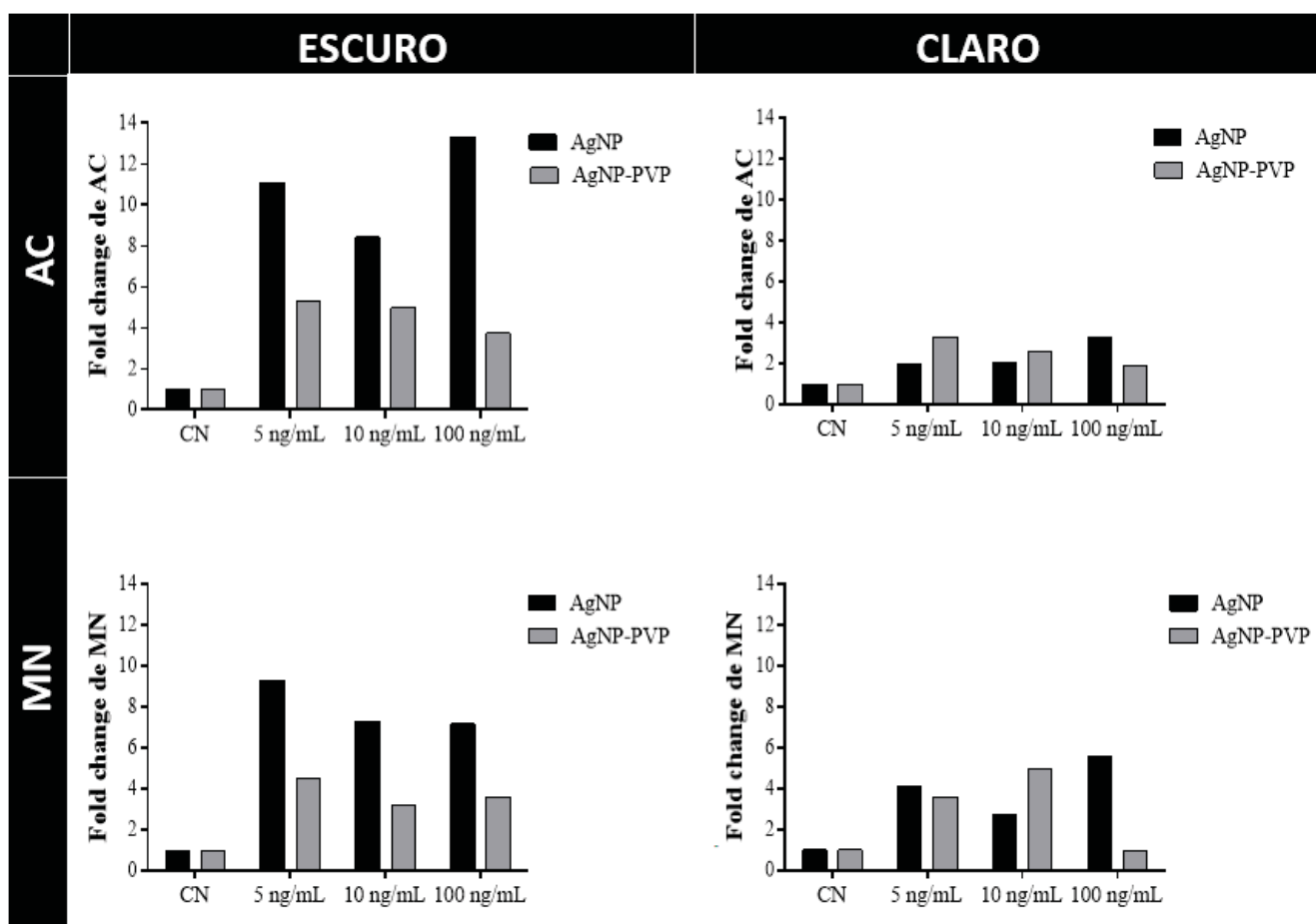


Figura 9. Comparação da genotoxicidade de AgNP e AgNP-PVP em cada condição (claro e escuro). O Fold change de Micronúcleos (MN) e Aberrações Cromossômicas (AC) indica quantas vezes estes parâmetros foram maiores que o CN no escuro ou no claro.

5.3.3.3. Análise morfoanatômica

As imagens de ML mostram um aumento de vacúolos digestivos nas células meristemáticas das raízes de *A. cepa* tratadas com AgNP e, principalmente em AgNP-PVP, em relação ao CN, quando estas foram germinadas no escuro. Enquanto que no claro, esta alteração não foi observada em nenhum tratamento (Fig. 10).

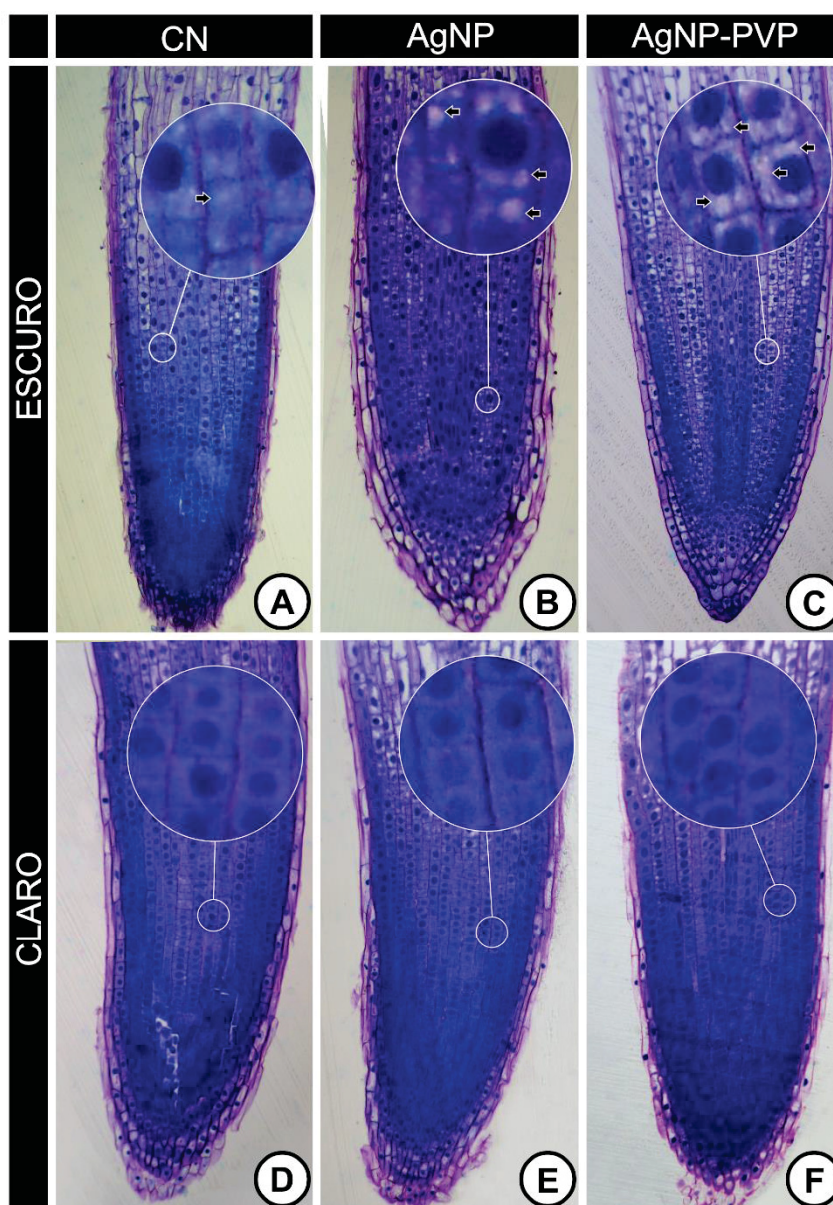


Figura 10. Análise estrutural, em microscopia de luz, das raízes de *A. cepa* expostas à 100 ng/mL de AgNP e AgNP-PVP em condições de claro e escuro. **A.** Controle negativo (CN- água ultrapura) no escuro com pequeno número de vacúolos nas células meristemáticas. **B.** Vacúolos volumosos e em grande quantidade em células de raízes tratadas com AgNP no escuro; **C.** Vacúolos volumosos e em grande quantidade em células de raízes tratadas com AgNP-PVP no

escuro. **D.** CN no claro sem vacúolos aparentes; **E.** Raiz sem vacúolos aparentes tratada com AgNP no claro; **F.** Raiz sem vacúolos aparentes tratada com AgNP-PVP no claro.

As imagens de MET, mostraram uma degradação de membranas de células meristemáticas expostas à AgNP-PVP no escuro, e o aumento de vesículas contendo material mais eletrón-denso desconhecido (Fig. 11 C) e uma provável internalização de AgNP-PVP na célula (fig. 11 D). Além disso, observa-se que no CN (Fig. 11 A-B) há uma grande quantidade de mitocôndrias, diferente das imagens do tratamento com AgNP-PVP (Fig. 11 C-D). Devido aos problemas na realização da técnica, as imagens dos outros tratamentos não foram capturadas.

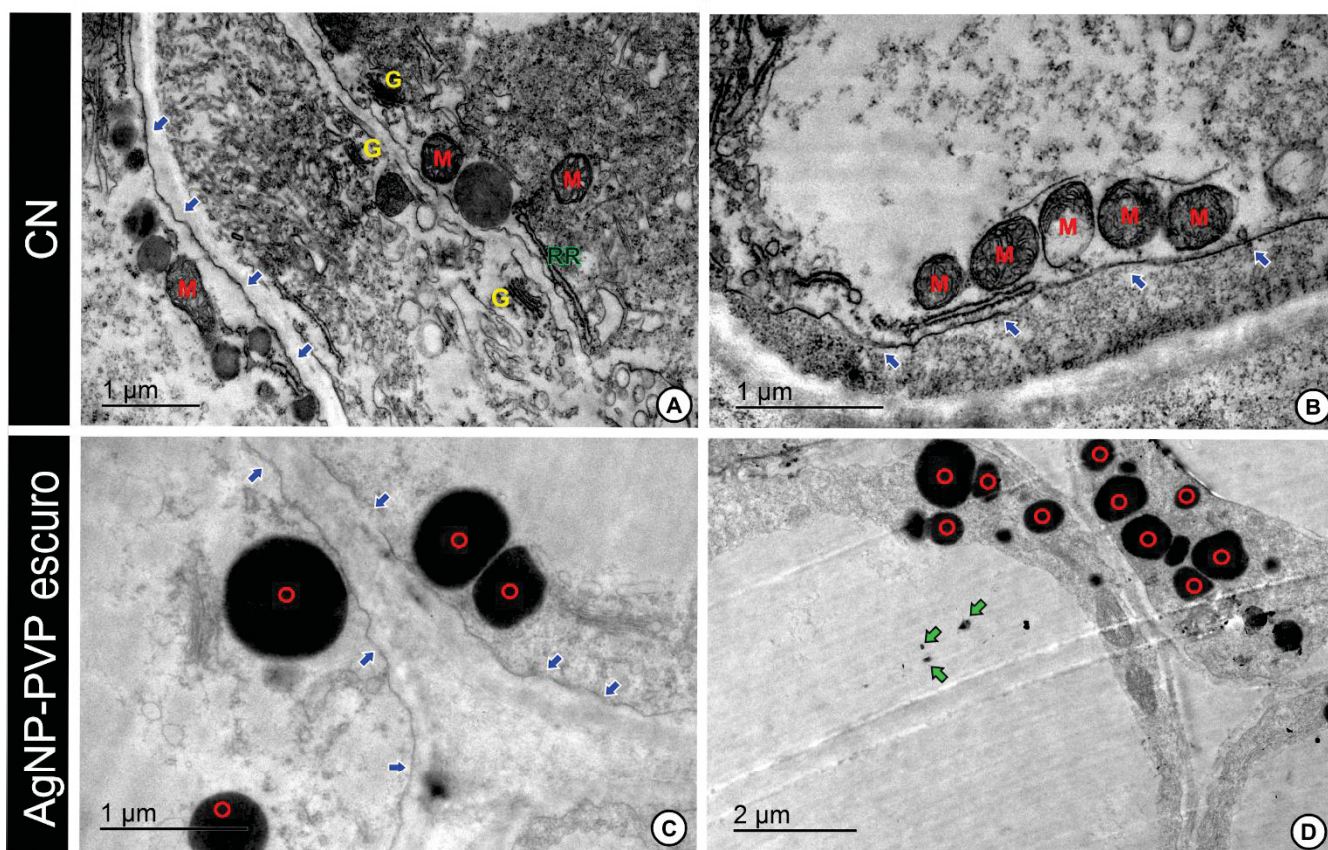


Figura 11. Análise ultraestrutural, em microscopia eletrônica de transmissão, de raízes de *A. cepa* expostas ao CN (água ultrapura) e à 100 ng/ mL de AgNP-PVP no escuro. **A-B.** estruturas celulares normais [mitocôndrias (M) em grande quantidade, Golgi (G), Retículo endoplasmático rugoso (RR) e membrana celular íntegra (setas azuis)]; **C.** Membrana celular (setas azuis) degradadas, diminuição no número de mitocôndrias e grande quantidade de vesículas em disposição parietal contendo material

elétrico-denso (o). **D.** grande quantidade de vesículas contendo material eletrônico-denso (o) e possível internalização de AgNP-PVP (setas verdes).

5.3.3.4. Enzimas envolvidas no estresse oxidativo

A atividade de LPO e das enzimas CAT, SOD, e GST nos meristemas de *A. cepa* expostos às NPs, demonstraram que apenas AgNP-PVP no escuro e AgNP-PVP no claro causaram alterações na atividade de LPO e SOD, respectivamente (Fig.12). A SOD diminuiu 2 vezes em relação ao CN, em meristemas expostos à AgNP-PVP no claro. Quando expostas à AgNP-PVP no escuro, a LPO aumentou 5,5 vezes em relação ao CN.

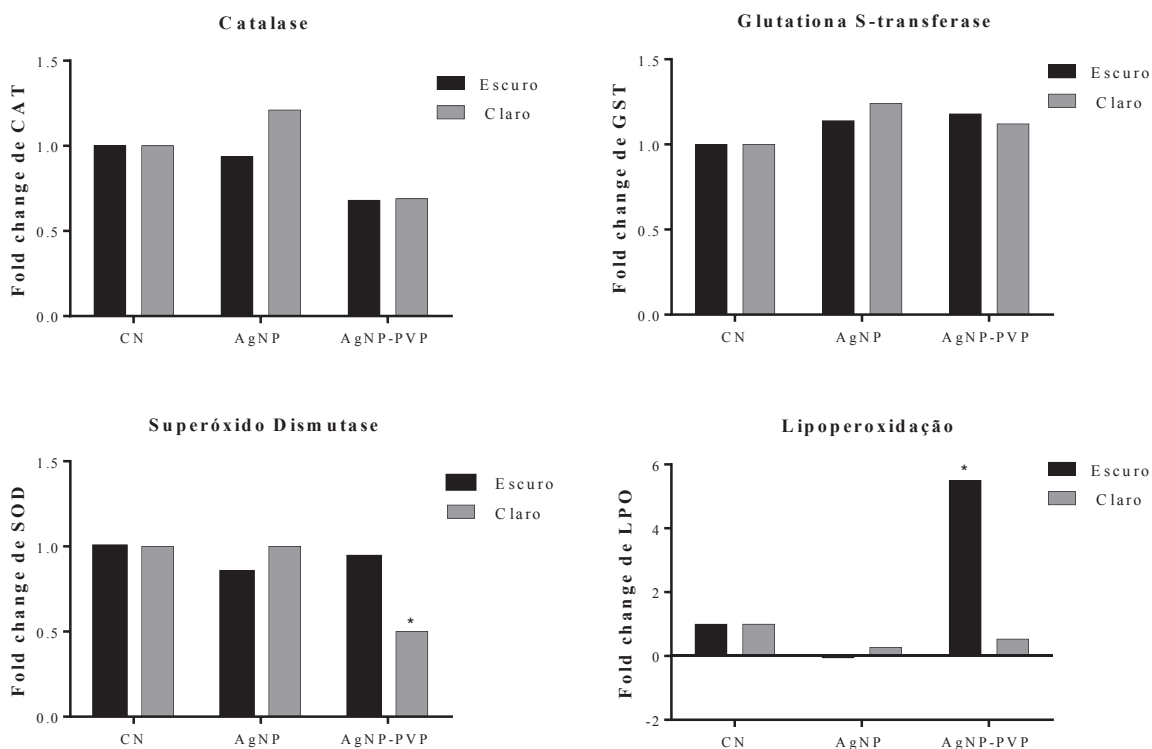


Figura 12. Atividade de enzimas envolvidas com o estresse oxidativo e liperoxidação das regiões meristemáticas de raízes de *A. cepa* expostas ao CN (água ultrapura), e à 100 ng/mL de AgNP e AgNP-PVP no claro e no escuro. * indica diferenças significativas a $\text{Fold change} > 2$ em Liperoxidação (LPO) e a $2 < \text{Fold change} < 0.5$ em Superóxido dismutase (SOD).

5.4. Discussão

5.4.1. AgNPs não foram capazes de induzir efeitos tóxicos no sistema vegetal *Allium cepa*

Os testes realizados demonstraram que as NPs de prata não causaram toxicidade por inibição de germinação e desenvolvimento das raízes de *A. cepa*. No entanto, quando as análises foram feitas para genotoxicidade e citotoxicidade, as duas NPs se mostraram tóxicas mesmo em concentrações muito baixas (100 ng/mL, 10 ng/mL e 5 ng/mL) e ainda não reportadas em testes de toxicidade em plantas. A inibição de crescimento e germinação por AgNPs já foi relatada em estudos de fitotoxicidade (VANNINI et al., 2014; YIN et al., 2011), porém, em concentrações muito mais altas que as utilizadas no presente estudo e se mostrando dependente da espécie de planta (YIN et al., 2012) e do tipo de AgNP utilizada (CVJETKO et al., 2017). No entanto, a ausência de efeito no crescimento da raiz por AgNP-PVP já foi relatada em *A. cepa* (CVJETKO et al., 2017) e em diversas espécies de plantas (*Panicum virgatum*, *Carex lurida*, *C. scoparia*, *C. vulpinoidea*, *C. crinita*, *Eupatorium fistulosum*, *Phytolacca americana*, *Scirpus cyperinus*, *Lobelia cardinalis* e *Juncus effusus*) (YIN et al., 2012). Portanto, os resultados demonstram que a avaliação da fitotoxicidade de NPs por parâmetros macroscópicos, como taxa de germinação e desenvolvimento da raiz, pode não prever corretamente a toxicidade das NPs, pois geralmente ausência ou fraca toxicidade são detectadas por estes parâmetros enquanto que análises celulares podem demonstrar severos comprometimentos em sistemas vegetais. Como exemplo, cita-se a ausência de efeitos na germinação e desenvolvimento das raízes em *A. cepa* exposta às nanopartículas de dióxido de titânio e de sílica biogênica em estudos realizados em nosso grupo de pesquisa (dados submetidos à publicação).

5.4.2. Citotoxicidade e genotoxicidade mediada pelas AgNPs em baixas concentrações

O potencial citotóxico das NPs de prata testadas foi demonstrado com a diminuição de IM em relação ao CN, nas maiores concentrações de AgNP-PVP (10 e 100 ng/mL) expostas no escuro, podendo resultar em danos ao organismo da planta, ao causar comprometimento do desenvolvimento do organismo exposto, por diminuição de células em divisão (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Esta diminuição de divisão celular por AgNP pode ser atribuída à

inibição de síntese de DNA na fase S do ciclo celular (KURIYAMA; SAKAI, 1974). O aumento de IM em AgNP no escuro indica um aumento de células em divisão, que pode ser prejudicial para o organismo ao levar a uma proliferação celular desordenada que pode culminar em um processo tumoral (LEME; MARIN-MORALES, 2009). No entanto, de acordo com os resultados do teste de toxicidade, o aumento e a diminuição do IM da região meristemática, não tiveram impacto no tamanho da raiz, isto ocorre porque a região meristemática é responsável pela proliferação de células que se diferenciarão em demais tecidos, porém, esta divisão celular por si só não caracteriza crescimento do organismo, para isto é necessária a expansão celular, a zona de alongamento da raiz se encontra logo abaixo da região meristemática (TAIZ; ZEIGER, 2006).

A genotoxicidade de AgNP e AgNP-PVP foi demonstrada pela indução de vários tipos de ACs, tais como ponte, quebra, perda, atraso e alterações nucleares como broto nuclear, e de MNs. ACs são caracterizadas por alterações na estrutura e número de cromossomos (RUSSELL, 2002). A geração de ACs estruturais, como pontes cromossômicas, podem ser causadas por quebras e rearranjos cromossômicos, e requerem uma ou várias duplas quebras na fita de DNA (HAGMAR et al., 2004). A clastogenicidade causada por AgNPs, pode ser atribuída à degradação ou despolimerização de DNA cromossômico ou por mistura de fibras de cromatina intercromossômicas, o que leva a sub-conexões de cromátides (pontes) entre os cromossomos (KUMARI; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2009). Perdas cromossômicas, atrasos cromossômicos, núcleo irregular e brotos indicam problemas no fuso mitótico, sugerindo que as NPs causam uma interrupção ou má formação do fuso mitótico, levando a uma segregação inapropriada quando células-filha são formadas (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007), caracterizando o modo de ação aneugênico do toxicante. A interação de AgNP com o grupo SH de tubulinas pode ser responsável pelo fuso mitótico ineficaz (KURIYAMA; SAKAI, 1974). A formação de MNs, pequenos núcleos formados por fragmentos ou unidades inteiras de cromossomos que não foram incorporados no núcleo celular (FENECH; MORLEY, 1985), foi demonstrada frequente em células tratadas com os dois tipos NP de prata. MNs podem ser causados por um modo de ação aneugênico ou clastogênico (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007; LEME; MARIN-MORALES, 2009) e indicam a mutagenicidade das NPs, visto que resultam de danos, não ou

erroneamente reparados pelos sistemas de reparo de DNA (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003), podendo oferecer riscos de alteração do patrimônio genético dos seres vivos.

Os impactos da genotoxicidade em plantas é uma preocupação que engloba desde as consequências que isto oferece ao organismo da planta – como alterações genéticas que podem resultar em alterações na síntese de proteínas e no balanço gênico, alterando o desenvolvimento da planta – às consequências ao meio ambiente, dado a sua importância na cadeia trófica, sendo um indicador de que outros seres podem estar em risco na presença de AgNPs em baixas concentrações.

5.4.3. Alterações de enzimas envolvidas no estresse oxidativo como indicativo de ROS

Metais são conhecidamente genotóxicos pela alta afinidade com a molécula de DNA e proteínas associadas, podendo se ligar a estas, causando danos. Além disso, metais são reconhecidos por causarem danos no DNA indiretamente via geração de ROS, lesionando bases do DNA (oxidação de bases) e induzindo quebras nessa macromolécula (MATEUCA et al., 2006).

Para compreender melhor a causa dos danos no DNA encontrados, a análise bioquímica nos forneceu informações sobre enzimas envolvidas no estresse oxidativo. Os resultados demonstraram que AgNP-PVP reduziu a SOD em células meristemáticas de *A. cepa* quando expostas no claro e aumentou a LPO em células meristemáticas de *A. cepa* expostas no escuro. A diminuição de SOD por nanopartícula já foi relatada em embriões de peixes Medaka (*Oryzias latipes*) (WU; ZHOU, 2013) e em ratos (RANJBAR et al., 2014). Segundo Wu & Zhou (2013), a redução de SOD pode significar um consumo excessivo desta enzima no tecido e/ou uma redução da síntese de SOD – por causas que incluem desde danos à componentes moleculares envolvidos na síntese à danos aos genes envolvidos nesta – significando que a habilidade de defesa antioxidante estava diminuída havendo um potencial aumento de danos causados por ROS na célula (JING et al., 2011).

Uma das vias da lipoperoxidação é conhecidamente causada por íons de metais de transição, que catalisam a formação de radicais lipídicos alcóxila, peróxila e hidroxila, ROS e

outros radicais livres (LIMA; ABDALLA, 2016). Desta forma, nossos dados sugerem que a AgNP-PVP no escuro pode ter liberado íons Ag^+ e induzido a formação de ROS, ativando esta via de deterioração oxidativa de lipídeos, importantes constituintes das membranas celulares. Este fato pode ser comprovado com as membranas celulares deterioradas de células expostas a este tratamento, observadas em MET (fig. 11).

As alterações nas membranas levam a transtornos da permeabilidade, alterando o fluxo iônico e o fluxo de outras substâncias, o que resulta na perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, alterações do DNA, oxidação da LDL e comprometimento dos componentes da matriz extracelular (proteoglicanos, colágeno e elastina) (LIMA; ABDALLA, 2016). A LPO talvez se constitua no evento citotóxico primário que desencadeia uma sequência de lesões na célula (LIMA; ABDALLA, 2016). O aumento de LPO dá suporte à citotoxicidade observada no mesmo tratamento, o qual apresentou diminuição de IM nas maiores concentrações.

5.4.4. Efeitos adversos dependentes do tamanho das partículas em suspensão, composição química das AgNPs e ausência e presença de luz visível

Devido a heterogeneidade dos tamanhos de ambas as NPs na caracterização por zeta sizer e MET, foi detectada a presença de partículas maiores e também muito pequenas de AgNP e AgNP-PVP (com tamanhos de ~ 4,32 nm e 2,21 nm, respectivamente) (fig. 1). O tamanho do poro da parede celular de *A. cepa*, já foi demonstrado em MET, com uma variação entre 10 e 20 nm, dependendo das condições de turgidez da célula. (MCCANN; WELLS; ROBERTS, 1990). Isso sugere que as NPs podem estar sendo internalizadas pelas células vegetais devido ao seu tamanho muito pequeno, como mostrado nas imagens de MET de células de raízes tratadas com AgNP-PVP no escuro (fig. 11 D), podendo causar danos às células.

Outro indicativo desta internalização de AgNPs pode ser demonstrado com os resultados da análise morfológica das raízes em ML e MET, em que houve aumento de vacúolos nas raízes expostas à AgNP e AgNP-PVP no escuro. Os vacúolos são compartimentos importantes para estocagem de vários metabólitos e também retiram produtos tóxicos resultantes do metabolismo secundários dentro do citoplasma (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1996) e exercem função na defesa vegetal. O aumento de vacúolos em células expostas a um toxicante pode indicar uma

ação de defesa da célula frente à internalização do toxicante ou à produtos tóxicos provenientes do toxicante. Isto foi observado, principalmente em raízes expostas a AgNP-PVP no escuro, que conforme a tabela 1S, contém até 45% das NPs com 2, 69 nm na concentração de 100 ng/mL e podem ser facilmente internalizadas pelo poro vegetal de *A. cepa*, enquanto que a AgNP continha partículas pequenas que podem ser internalizadas, mas a maior parte é grande. O mesmo não foi observado em células expostas a AgNP e AgNP-PVP no claro, possivelmente devido aos tamanhos maiores e maior agregação que pode ter impossibilitado ou diminuído a internalização das NPs. Estes resultados estão de acordo com a citotoxicidade presente na AgNP no escuro e ausente no claro e genotoxicidade reduzida para ambas as NPs no claro.

A toxicidade de AgNPs é frequentemente relacionada ao seu tamanho, e as AgNPs menores são frequentemente apontadas como mais tóxicas devido à maior internalização e maior liberação de Ag^+ . No entanto, em nosso estudo, mesmo sendo maior e não contendo agentes estabilizantes, a AgNP foi mais genotóxica que a AgNP-PVP no escuro, indicando que o tamanho e a estabilidade à agregação não foram os determinantes principais da genotoxicidade e que menor tamanho de NP como indicador de maior toxicidade não constitui uma regra. AgNPs com tamanhos diferentes e mesma composição de cápsula, resultando em NPs maiores liberando maior quantidade de íons de Ag^+ e sendo mais tóxicas que as menores (YANG et al., 2012), evidenciam este fato. A liberação de íons Ag^+ tem sido considerada o maior causador de toxicidade de AgNPs (ZHAO; TOYOOKA; IBUKI, 2013). Acreditamos que a AgNP pode estar sendo mais genotóxica no escuro por outro mecanismo, além da internalização da NP, como a maior oxidação destas NPs que resulta em maior liberação de Ag^+ .

A caracterização química das AgNPs, demonstrou um aumento do tamanho da AgNP-PVP, após a exposição à luz visível. Este resultado está de acordo com estudos prévios. Segundo Shi et al. (2013), alterações no potencial de superfície das NPs expostas a luz, faz com que elas se tornem instáveis e agreguem, podendo aumentar seu tamanho. No entanto, o drástico aumento de tamanho na AgNP-PVP na luz, não ocorreu com a AgNP. Já foi relatado que quando expostas à luz, NPs de prata pequenas sofrem agregação mais drástica que NPs maiores, devido à promoção de rápida liberação de Ag^+ e fotorredução destes íons na superfície das NPs que reduz a força elétrica repulsiva, resultando em maior agregação e consequente

aumento de tamanho, enquanto que AgNPs maiores não são ativadas tão facilmente pela luz (SHI et al., 2013; ZOU; SHI; ZHANG, 2014). Portanto, o tamanho inicial menor das AgNP-PVP pode ter causado uma interação diferenciada destas com a luz que acarretou em uma agregação mais drástica que em AgNP. Isto, poderia explicar a diminuição de toxicidade das AgNP-PVP na luz demonstrada em nossos resultados, visto que a agregação pode diminuir a biodisponibilidade de NPs nas células, resultando em redução de toxicidade (SHI et al., 2013). No entanto, o mesmo não se aplica à redução de genotoxicidade da AgNP no claro, esta teve uma redução de toxicidade maior que a AgNP-PVP, mesmo não apresentando grande diferença de agregação no claro e no escuro, sugerindo que a explicação para a diminuição de toxicidade na luz visível, pode ir muito além da agregação das NPs e pode não ser o único fator para diminuição de toxicidade no claro.

A oxidação da prata e liberação de íons Ag^+ constitui outro determinante na toxicidade e já foi demonstrado como sendo menor em condições de exposição à luz (SHI et al., 2013; ZOU; SHI; ZHANG, 2014), podendo ser um dos caminhos para compreender a diminuição de toxicidade na luz. Outros estudos já demonstraram aumento de toxicidade de AgNPs na luz (DEWEZ; OUKARROUM, 2013; GEORGE et al., 2014; ZHAO; TOYOOKA; IBUKI, 2013), porém, Zou, Shi e Zhang (2014) mostraram que diferentes tipos de irradiação de luz causam toxicidade diferenciada de AgNPs e as divergências de resultados podem se dar pelos diferentes tipos de luz usados nos estudos, mostrando a importância da caracterização da luz utilizada em estudos de NPs expostas ao claro. As maiores evidências de aumento de toxicidade de AgNP na luz, ocorrem com exposição à luz UV. Desta forma não poderíamos afirmar que AgNPs diminuiriam sua toxicidade no meio ambiente, devido a presença de luz visível, visto que o espectro solar também inclui luz UV, e já foi demonstrado por George et al. (2014) aumento de toxicidade de AgNPs em células de peixes e embriões de zebrafish em simulador de luz solar. No entanto, a descoberta de tipos de luz que diminuam a toxicidade de AgNPs é um ponto positivo e poderia auxiliar na prevenção de riscos à exposição de AgNPs, podendo ser aplicados por exemplo em processos de tratamento de efluentes, diminuindo os riscos ao meio ambiente.

5.5. Conclusão

O presente estudo demonstra que AgNP e AgNP-PVP são genotóxicas e causam estresse oxidativo em vegetais superiores (monocotiledôneas), mesmo em concentrações muito baixas, evidenciando os riscos que os resíduos de nanomateriais podem trazer ao meio ambiente e a importância de estabelecer o uso responsável destes. AgNPs sem estabilizantes foram mais genotóxicas que as estabilizadas com PVP, indicando que apesar de agregação e estabilidade serem demonstradas por outros estudos como fatores importantes de toxicidade, estes podem não ser os determinantes principais de toxicidade, e outros fatores, como a oxidação da prata, devem ser levados em consideração quando a toxicidade de NPs for investigada.

Poucos estudos trazem possíveis soluções para a redução/eliminação da toxicidade apresentada por NPs, no entanto, nosso estudo foi pioneiro ao mostrar citotoxicidade e genotoxicidade de AgNPs em baixas concentrações, e ao mostrar que quando expostas à luz visível, AgNPs reduzem drasticamente sua ação genotóxica e eliminam a sua ação citotóxica em plantas. Acreditamos que a luz visível poderia ser uma importante ferramenta para tratamento de resíduos de AgNPs, por exemplo, em processos de tratamento de efluentes – importante via de entrada desses contaminantes ao ambiente, podendo diminuir os riscos ao meio ambiente. Para isso mais pesquisas com os diferentes tipos de irradiação por luz, AgNPs e tempo de iluminação, devem ser realizadas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro a essa pesquisa.

5.6. Referências

- AEBI, H. Catalase in Vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. 13, p. 121–126, 1984.
- AGARWAL, A. et al. Biomaterials Surfaces modified with nanometer-thick silver-impregnated polymeric films that kill bacteria but support growth of mammalian cells. **Biomaterials**, v. 31, n. 4, p. 680–690, 2010.
- AHAMED, M.; ALSALHI, M. S.; SIDDIQUI, M. K. J. Silver nanoparticle applications and human health. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, n. 23–24, p. 1841–1848, 2010.

- ANDY, R. I. D. H. et al. Critical Review AND EFFECTS. v. 27, n. 9, p. 1825–1851, 2008.
- ASCHBERGER, K. et al. Analysis of currently available data for characterising the risk of engineered nanomaterials to the environment and human health — Lessons learned from four case studies. **Environment International**, v. 37, n. 6, p. 1143–1156, 2011.
- ASHARANI, P. V et al. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. **Nanotechnology**, v. 19, p. 1–8, 2008.
- ASHARANI, P. V et al. Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver in Human Cells. **AcsNano**, v. 3, n. 2, p. 279–290, 2009.
- ASLANI, F. et al. Effects of Engineered Nanomaterials on Plants Growth : An Overview. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–28, 2014.
- BADAWY, A. M. EL et al. Surface Charge-Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles. **Environmental Science and Technology**, v. 45, p. 283–287, 2011.
- BARCELÓ, L. D.; LÓPEZ, J. **Contaminación y calidad química del agua : el problema de los contaminantes emergentes** Panel Científico- Técnico de seguimiento de la política de aguas. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC Barcelona, 2007.
- BARNES, C. A. et al. Reproducible Comet Assay of Amorphous Silica Nanoparticles Detects No Genotoxicity. **Nano Letters**, v. 8, n. 9, p. 3069–3074, 2008.
- BENN, T. M.; WESTERHOFF, P. Nanoparticle Silver Released into Water from Commercially Available Sock Fabrics. **Environmental Science and Technology**, v. 42, p. 4133–4139, 2008.
- BOYES, W. K. et al. Critical Reviews in Toxicology A comprehensive framework for evaluating the environmental health and safety implications of engineered nanomaterials. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 0, n. 0, p. 1–44, 2017.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberrations in the Allium cepa test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v. 72, p. 722–725, 2008.
- CURCÓ, D. et al. Photocatalysis and radiation absorption in a solar plant. **Solar Energy Materials and Solar Cells**, v. 44, p. 199–217, 1996.
- CVJETKO, P. et al. Toxicity os silver ions and differently coated silver nanoparticles in Allium cepa roots. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 137, n. July 2016, p. 18–28, 2017.
- DAVIES, J. C. **EPA AND NANOTECHNOLOGY : OVERSIGHT for THE 21st CENTURY**. [s.l: s.n.].
- DEMAS, J. N.; CROSBY, G. A. The Measurement of Photoluminescence Quantum Yields. A Review. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 75, n. 8, p. 991–1023, 1971.

- DEWEZ, D.; OUKARROUM, A. Silver nanoparticles toxicity effect on photosystem II photochemistry of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* treated in light and dark conditions. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 94, n. 8, p. 1536–1546, 2013.
- DROR-EHRE, A. et al. Silver nanoparticle – *E. coli* colloidal interaction in water and effect on *E. coli* survival. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 339, n. 2, p. 521–526, 2009.
- EICHERT, T. et al. Size exclusion limits and lateral heterogeneity of the stomatal foliar uptake pathway for aqueous solutes and water- suspended nanoparticles. **Physiologia Plantarum**, v. 134, p. 151–160, 2008.
- FABREGA, J. et al. **Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment** *Environment International*, 2011.
- FABREGA, J.; RENSHAW, J. C.; LEAD, J. R. Interactions of Silver Nanoparticles with *Pseudomonas putida* Biofilms. **Environmental Science and Technology**, v. 43, n. 23, p. 9004–9009, 2009.
- FATIMA, R. A.; AHMAD, M. Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater. **Science of the Total Environment**, v. 346, p. 256–273, 2005.
- FATIMA, R. A.; AHMAD, M. Genotoxicity of industrial wastewaters obtained from two different pollution sources in northern India: A comparison of three bioassays. **Mutation Research**, v. 609, p. 81–91, 2006.
- FENECH, M. et al. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research**, v. 534, p. 65–75, 2003.
- FENECH, M.; MORLEY, A. A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutation Research**, v. 147, p. 29–36, 1985.
- FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, p. 252–259, 2007.
- FERNANDES, T. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Ecotoxicology and Environmental Safety Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent — Trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1680–1686, 2009.
- FISKESJO, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99–112, 1985.
- FOGELBERG, H.; SANDÉN, B. A. Understanding reflexive systems of innovation: An analysis of Swedish nanotechnology discourse and organization. **Technology Analysis and Strategic Management**, v. 20, n. 1, p. 65–81, 2008.
- FOLDBJERG, R. et al. PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. **Toxicology Letters**, v. 190, p. 156–162,

2009.

GADANO, A. et al. In vitro genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 11–16, 2002.

GAO, R. et al. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 45, p. 41–45, 1998.

GEORGE, S. et al. Differential Effect of Solar Light in Increasing the Toxicity of Silver and Titanium Dioxide Nanoparticles to a Fish Cell Line and Zebra fish Embryos. **Environmental Science and Technology**, v. 48, p. 6374–6382, 2014.

GERANIO, L.; HEUBERGER, M. The Behavior of Silver Nanotextiles during Washing. **Environmental Science and Technology**, v. 43, n. 21, p. 8113–8118, 2009.

GORHAM, J. M. et al. UV-induced photochemical transformations of citrate-capped silver nanoparticle suspensions. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, n. 1139, p. 1–16, 2012.

GOTTSCHALK, F.; NOWACK, B. The release of engineered nanomaterials to the environment †. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, p. 1145–1155, 2011.

GOU, N. A.; ONNIS-HAYDEN, A.; GU, A. Z. Mechanistic Toxicity Assessment of Nanomaterials by Whole-Cell-Array Stress Genes Expression Analysis. **Environmental Science and Technology**, v. 44, n. 15, p. 5964–5970, 2010.

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in *Allium*: A report of the U . S . Environmental Protection Agency Gene-Tox Program *. **Mutation Research**, v. 99, n. 80, p. 273–291, 1982.

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, v. 310, n. 2, p. 175–185, 1994.

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

GUZMÁN, KATHERINE A. D.; TAYLOR, M. R.; BANFIELD, J. F. Environmental Risks of Nanotechnology : National Nanotechnology Initiative Funding , 2000 - 2004. **Environmental Science and Technology**, v. 40, n. 5, p. 1401–1407, 2006.

HAGMAR, L. et al. Impact of Types of Lymphocyte Chromosomal Aberrations on Human Cancer Risk : Results from Nordic and Italian Cohorts. n. 11, p. 2258–2263, 2004.

HELLAND, A. et al. Nanoparticulate materials and regulatory policy in Europe : An analysis of stakeholder perspectives. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 8, p. 709–719, 2006.

HENDREN, C. O. et al. Estimating Production Data for Five Engineered Nanomaterials As a Basis for Exposure Assessment. **Environmental Science and Technology**, v. 45, p. 2562–2569, 2011.

HOLT, K. B.; BARD, A. J. Interaction of Silver (I) Ions with the Respiratory Chain of *Escherichia coli* : An Electrochemical and Scanning Electrochemical Microscopy Study of the Antimicrobial Mechanism of Micromolar Ag^+ †. **Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 13214–13223, 2005.

- HOTHORN, L. A. Statistical evaluation of toxicological bioassays – a review. **Toxicology Research**, v. 3, n. 1, p. 418–432, 2014.
- HOTZE, E. M.; PHENRAT, T.; LOWRY, G. V. Nanoparticle Aggregation : Challenges to Understanding Transport and Reactivity in the Environment. **Journal of Environmental Quality**, v. 39, p. 1909–1924, 2010.
- INVERNIZZI, N.; FOLADORI, G. Nanotechnology and the Developing World: Will Nanotechnology Overcome Poverty or Widen Disparities? **Nanotechnology Law and Business Journal**, v. 2, n. 3, p. 1–10, 2005.
- ISHIZU, S. et al. Toward the responsible innovation with nanotechnology in Japan : our scope. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 2008, n. 10, p. 229–254, 2008.
- JIANG, Z.; HUNT, J. V; WOLFF, S. P. Ferrous Ion Oxidation in the Presence of Xylenol Orange for Detection of Lipid Hydroperoxide in Low Density Lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, v. 202, p. 384–389, 1992.
- JING, M. et al. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. **Toxicology Letters**, v. 201, n. 1, p. 92–100, 2011.
- KARNOVSKY, M. J. A Formaldehyde-Glutaraldehyde Fixative of High Osmolality for Use in Electron Microscopy. **The Journal of Cell Biology**, v. 27, n. 2, p. 1–149, 1965.
- KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the Several Activities of the Glutathione S- Transferases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 20, p. 6183–6188, 1976.
- KITTLER, S. et al. Synthesis of PVP-coated silver nanoparticles and their biological activity towards human mesenchymal stem cells. **Materialwissenschaft und Werkstofftechnik**, v. 40, n. 4, p. 258–264, 2009.
- KUMARI, M. et al. Cytogenetic and genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on root cells of *Allium cepa*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 190, n. 1–3, p. 613–621, 2011.
- KUMARI, M.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 19, p. 5243–5246, 2009.
- KURIYAMA, R.; SAKAI, H. Role of Tubulin -SH Groups in Polymerization to Microtubules. **The Journal of Biochemistry**, v. 76, n. 3, p. 651–654, 1974.
- LEME, D. M.; ANGELIS, D. DE F.; MARIN-MORALES, M. A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. **Aquatic Toxicology**, v. 88, p. 214–219, 2008.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water — A case study. **Mutation Research**, v. 650, p. 80–86, 2008.

- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Allium cepa test in environmental monitoring : A review on its application. **Mutation Research**, v. 682, p. 71–81, 2009a.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Allium cepa test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71–81, 2009b.
- LEVARD, C. et al. Sulfidation Processes of PVP-Coated Silver Nanoparticles in Aqueous Solution : Impact on Dissolution Rate Cl. **Environmental Science and Technology**, v. 45, p. 5260–5266, 2011.
- LEVARD, C. et al. Environmental Transformations of Silver Nanoparticles : Impact on Stability and Toxicity. **Environmental Science and Technology**, v. 46, p. 6900–6914, 2012.
- LI, Y. et al. Cytotoxicity and genotoxicity assessment of silver nanoparticles in mouse. **Nanotoxicology**, v. 5390, p. 36–45, 2014a.
- LI, Y. et al. Cytotoxicity and genotoxicity assessment of silver nanoparticles in mouse. v. 5390, p. 36–45, 2014b.
- LIMA, É. S.; ABDALLA, D. S. Peroxidação lipídica : mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 293–303, 2016.
- LIN, D.; XING, B. Root Uptake and Phytotoxicity of ZnO Nanoparticles. **Environmental Science and Technology**, v. 42, n. 15, p. 5580–5585, 2008.
- LIU, J. et al. Controlled Release of Biologically Active Silver from Nanosilver Surfaces. **AcsNano**, v. 4, n. 11, p. 6903–6913, 2010.
- LOK, C. et al. Silver nanoparticles : partial oxidation and antibacterial activities. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 12, n. 4, p. 527–534, 2007.
- LOWRY, G. V. et al. Long-term transformation and fate of manufactured Ag nanoparticles in a simulated large scale freshwater emergent wetland. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 13, p. 7027–7036, 2012.
- LU, W. et al. Effect of surface coating on the toxicity of silver nanomaterials on human skin keratinocytes. **Chemical Physics Letters**, v. 487, n. 1–3, p. 92–96, 2010.
- MA, T. et al. The improved Allium/Vicia root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, v. 334, p. 185–195, 1995.
- MASCIANGIOLI, T.; ALPER, J. **Challenges in Characterizing Small Particles: Exploring Particles from the Nano- to Microscale**. The National Academies Press. **Anais...**2012
- MATEUCA, R. et al. Chromosomal changes : induction , detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v. 88, p. 1515–1531, 2006.
- MCCANN, M. C.; WELLS, B.; ROBERTS, K. Direct visualization of cross-links in the primary plant cell wall. **Journal of Cell Science**, v. 96, p. 323–334, 1990.
- MEYER, J. N. et al. Intracellular uptake and associated toxicity of silver nanoparticles in

- Caenorhabditis elegans. **Aquatic Toxicology**, v. 100, n. 2, p. 140–150, 2010.
- MIRALLES, P.; CHURCH, T. L.; HARRIS, A. T. Toxicity , Uptake , and Translocation of Engineered Nanomaterials in Vascular plants. **Environmental Science and Technology**, v. 46, p. 9224–9239, 2012.
- MISHRA, S.; SINGH, H. B. Biosynthesized silver nanoparticles as a nanoweapon against phytopathogens : exploring their scope and potential in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2014.
- MOCK, J. J. et al. Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles. **The Journal of Chemical Physics**, v. 116, n. 6755, 2002.
- MUDGE, S. M. Is the use of biofuels environmentally sound or ethical? **Journal of Environmental Monitoring**, v. 10, p. 701–702, 2008.
- NAVARRO, E. et al. Toxicity of Silver Nanoparticles to Chlamydomonas reinhardtii. **Environmental Science and Technology**, v. 42, p. 8959–8964, 2008a.
- NAVARRO, E. et al. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. **Ecotoxicology**, v. 17, p. 372–386, 2008b.
- NOWACK, B.; BUCHELI, T. D. Occurrence , behavior and effects of nanoparticles in the environment. **Environmental Pollution**, v. 150, n. 2007, p. 5–22, 2011.
- OBERDÖRSTER, G. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine : concepts of nanotoxicology. **Journal of Internal Medicine**, v. 267, p. 89–105, 2010.
- PAKRASHI, S. et al. In Vivo Genotoxicity Assessment of Titanium Dioxide Nanoparticles by Allium cepa Root Tip Assay at High Exposure Concentrations. v. 9, n. 2, 2014.
- PARK, H. et al. Silver-ion-mediated reactive oxygen species generation affecting bactericidal activity. **Water Research**, v. 43, n. 4, p. 1027–1032, 2009.
- PETROVIC, M.; GONZALEZ, S.; BARCELÓ, D. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 10, p. 685–696, 2003.
- PILLAI, Z. S.; KAMAT, P. V. What Factors Control the Size and Shape of Silver Nanoparticles in the Citrate Ion Reduction Method? **Journal of Physical Chemistry**, v. 108, p. 945–951, 2004.
- PITTOL, M. et al. Macroscopic effects of silver nanoparticles and titanium dioxide on edible plant growth. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, v. 8, n. April, p. 127–133, 2017.
- QUADROS, M. E. et al. Release of silver from nanotechnology-based consumer products for children. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 15, p. 8894–8901, 2013.
- RAJESHWARI, A. et al. Cytotoxicity of aluminum oxide nanoparticles on Allium cepa root tip — effects of oxidative stress generation and biouptake. **Environmental Science and**

Pollution Research, v. 22, n. 14, p. 11057–11066, 2015.

RANJBAR, A. et al. Effects of silver nanoparticle (Ag NP) on oxidative stress biomarkers in rat. **Nanomedicine Journal**, v. 1, n. 3, p. 205–210, 2014.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 5. ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

SANTOS-FILHO, R. **NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO UTILIZANDO O SISTEMA TESTE DE Allium cepa**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2016.

SAUVÉ, S.; DESROSIERS, M. A review of what is an emerging contaminant. **Chemistry Central Journal**, v. 8, n. 15, p. 1–7, 2014.

SCHAUMANN, G. E. et al. Understanding the fate and biological effects of Ag- and TiO₂-nanoparticles in the environment: The quest for advanced analytics and interdisciplinary concepts. **Science of the Total Environment**, v. 535, p. 3–19, 2014.

SHI, J. et al. Light induced toxicity reduction of silver nanoparticles to Tetrahymena Pyriformis: Effect of particle size. **Aquatic Toxicology**, v. 132–133, p. 53–60, 2013.

SILVER, S.; PHUNG, L. T.; SILVER, G. Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 7, p. 627–634, 2006.

SILVESTRY-RODRIGUEZ, N. et al. Silver as a disinfectant. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 191, p. 23–45, 2007.

STAMPOULIS, D.; SINHA, S. K.; WHITE, J. C. Assay-Dependent Phytotoxicity of Nanoparticles to Plants. **Environmental Science and Technology**, v. 43, n. 24, p. 9473–9479, 2009.

STATNANO. **Nanotechnology in Latin America**. [s.l: s.n.].

STATNANO. **StatNano 2016: Status of Nano-Science, Technology and Innovation 2016StatNano**. [s.l: s.n.].

SWEET, M. J.; SINGLETON, I. Silver Nanoparticles: A Microbial Perspective. **Advances in Applied Microbiology**, v. 77, p. 115–133, 2011.

TAVARES, P.; BALBINOT, F.; MARTINS, H. Evaluation of genotoxic effect of silver nanoparticles (Ag-Nps) in vitro and in vivo. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, p. 1–7, 2012.

TEJAMAYA, M.; MERRIFIELD, R. C.; LEAD, J. R. Stability of Citrate, PVP, and PEG Coated Silver Nanoparticles in Ecotoxicology Media. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 13, p. 7011–7017, 2012.

VANCE, M. E. et al. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. **Journal of Nanotechnology**, v. 6, p. 1769–1780, 2015.

VANNINI, C. et al. Phytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles exposure on

- germinating wheat seedlings. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, n. 13, p. 1–25, 2014.
- WANG, H. et al. Engineered Nanoparticles May Induce Genotoxicity. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 23, p. 13212–13214, 2013.
- WARHEIT, D. B. TOXICOLOGICAL HIGHLIGHT How Meaningful are the Results of Nanotoxicity Studies in the Absence of Adequate Material Characterization? **Toxicological Sciences**, v. 101, n. 2, p. 183–185, 2008.
- WIJNHOFEN, S. W. P. et al. Nano-silver – a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. **Nanotoxicology**, v. 3, n. 2, p. 109–138, 2009.
- WILEY, B. et al. Shape-Controlled Synthesis of Metal Nanostructures : The Case of Silver. **Chemistry a European Journal**, v. 11, p. 454–463, 2005.
- WU, Y.; ZHOU, Q. SILVER NANOPARTICLES CAUSE OXIDATIVE DAMAGE AND HISTOLOGICAL CHANGES IN MEDAKA (ORYZIAS LATIPES) AFTER 14 DAYS OF EXPOSURE. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 165–173, 2013.
- YANG, X. et al. Mechanism of Silver Nanoparticle Toxicity Is Dependent on Dissolved Silver and Surface Coating in *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Science and Technology**, v. 46, p. 1119–1127, 2012.
- YIN, L. et al. More than the Ions : The Effects of Silver Nanoparticles on *Lolium multiflorum*. **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 6, p. 2360–2367, 2011.
- YIN, L. et al. Effects of Silver Nanoparticle Exposure on Germination and Early Growth of Eleven Wetland Plants. **Plos One**, v. 7, n. 10, p. 1–8, 2012.
- ZHANG, W.; ELLIOTT, D. W. Applications of Iron Nanoparticles for Groundwater Remediation. **Remediation**, v. 16, n. 2, p. 7–21, 2006.
- ZHAO, X.; TOYOOKA, T.; IBUKI, Y. Synergistic bactericidal effect by combined exposure to Ag nanoparticles and UVA. **Science of the Total Environment**, v. 458–460, p. 54–62, 2013.
- ZOU, X.; SHI, J.; ZHANG, H. Coexistence of silver and titanium dioxide nanoparticles : Enhancing or reducing environmental risks? **Aquatic Toxicology**, v. 154, p. 168–175, 2014a.
- ZOU, X.; SHI, J.; ZHANG, H. Coexistence of silver and titanium dioxide nanoparticles : Enhancing or reducing environmental risks ? **Aquatic Toxicology**, v. 154, p. 168–175, 2014b.

5.6. Material Suplementar



Figura 1S. Radiômetro de luz UVC, com sensor posicionado no interior da incubadora equipada com lâmpada, indicando 0 mW/cm² de radiação UVC.

Tabela 1S. Tamanhos das AgNPs no escuro e no claro.

Concentração de AgNP	Picos de % de intensidade		Concentração AgNP-PVP	Picos de % de intensidade	
	Escuro	Claro		Escuro	Claro
5 ng/mL	152,3 nm	191,5 nm	5 ng/mL	2,32 nm (21,8%) 68,06 nm (78,2%)	81,45 nm
10 ng/mL	238,9 nm	218,4 nm	10 ng/mL	5,05 nm	0,98 nm (5,1%) 124,2 nm (94,9%)
100 ng/mL	186 nm (89,1%), 581,5 nm (10,9%)	75,34 nm (16,8%) 351,7 nm (82,3%)	100 ng/mL	2,69 nm (45%), 21,04 nm (39%) 78,82 nm (39%)	113,6 nm

Picos de tamanhos de AgNP e AgNP-PVP analisadas por zetasizer em condições de escuro e claro (exposição das suspensões por 8 horas em luz visível).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente nanomateriais estão sendo amplamente utilizados na indústria e em produtos de consumo, sem saber ao certo quais são os riscos para a exposição humana e ambiental. Ensaio toxicológicos são de extrema importância para a implantação responsável de materiais nanotecnológicos. AgNPs são uma das mais utilizadas atualmente devido sua ação antibacteriana e podem ser utilizadas sem cápsula ou com cápsula. Com a utilização de um modelo teste vegetal bem estabelecido, *Allium cepa*, foi possível indicar os riscos da liberação de AgNPs no meio ambiente. Concluiu-se que AgNPs sem cápsula e com cápsula de PVP (AgNP-PVP) não causaram efeitos tóxicos agudo (inibição de germinação e desenvolvimento da raiz), porém, causaram citotoxicidade e alterações no índice mitótico (IM) nas maiores concentrações e genotoxicidade em todas as concentrações testadas (5, 10 e 100 ng/mL). Além disso, houve aumento de vacúolos nas células das raízes de *A. cepa*, visualizadas em ML e MET, indicando uma ação de defesa das células ao agente tóxico, e ruptura de membranas celulares, visualizadas por MET, no tratamento com AgNP-PVP. O estresse oxidativo foi comprovado em AgNP-PVP, com a diminuição de SOD e aumento de lipoperoxidação. As concentrações utilizadas foram muito baixas e indicam que AgNPs podem ser prejudiciais ao meio ambiente, afetando vegetais superiores e oferecendo risco a outros seres vivos.

A transformação destas NPs em diferentes condições, tais com claro e escuro, ainda é pouco estudada. Após a realização dos testes no claro e no escuro, concluiu-se que AgNPs diminuíram sua toxicidade após exposição de 8 horas na luz visível, houve ausência de citotoxicidade e de alterações morfológicas nas raízes e diminuição de genotoxicidade. Os efeitos tóxicos de AgNPs já foram reportados em diversos organismos, os resultados deste estudo abrem espaço para futuras pesquisas que busquem desenvolver soluções para minimizar os efeitos de NPs e diminuir os riscos ao seres vivos e meio ambiente como um todo.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in Vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. 13, p. 121–126, 1984.
- AGARWAL, A. et al. Biomaterials Surfaces modified with nanometer-thick silver-impregnated polymeric films that kill bacteria but support growth of mammalian cells. **Biomaterials**, v. 31, n. 4, p. 680–690, 2010.
- AHAMED, M.; ALSALHI, M. S.; SIDDIQUI, M. K. J. Silver nanoparticle applications and human health. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, n. 23–24, p. 1841–1848, 2010.
- ANDY, R. I. D. H. et al. Critical Review AND EFFECTS. v. 27, n. 9, p. 1825–1851, 2008.
- ASCHBERGER, K. et al. Analysis of currently available data for characterising the risk of engineered nanomaterials to the environment and human health — Lessons learned from four case studies. **Environment International**, v. 37, n. 6, p. 1143–1156, 2011.
- ASHARANI, P. V et al. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. **Nanotechnology**, v. 19, p. 1–8, 2008.
- ASHARANI, P. V et al. Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver in Human Cells. **AcsNano**, v. 3, n. 2, p. 279–290, 2009.
- ASLANI, F. et al. Effects of Engineered Nanomaterials on Plants Growth : An Overview. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–28, 2014.
- BADAWY, A. M. EL et al. Surface Charge-Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles. **Environmental Science and Technology**, v. 45, p. 283–287, 2011.
- BARCELÓ, L. D.; LÓPEZ, J. **Contaminación y calidad química del agua : el problema de los contaminantes emergentes** Panel Científico- Técnico de seguimiento de la política de aguas. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC Barcelona, 2007.
- BARNES, C. A. et al. Reproducible Comet Assay of Amorphous Silica Nanoparticles Detects No Genotoxicity. **Nano Letters**, v. 8, n. 9, p. 3069–3074, 2008.
- BENN, T. M.; WESTERHOFF, P. Nanoparticle Silver Released into Water from Commercially Available Sock Fabrics. **Environmental Science and Technology**, v. 42, p. 4133–4139, 2008.
- BOYES, W. K. et al. Critical Reviews in Toxicology A comprehensive framework for evaluating the environmental health and safety implications of engineered nanomaterials. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 0, n. 0, p. 1–44, 2017.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberrations in the Allium cepa test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v. 72, p. 722–725, 2008.
- CURCÓ, D. et al. Photocatalysis and radiation absorption in a solar plant. **Solar Energy**

Materials and Solar Cells, v. 44, p. 199–217, 1996.

CVJETKO, P. et al. Toxicity of silver ions and differently coated silver nanoparticles in *Allium cepa* roots. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 137, n. July 2016, p. 18–28, 2017.

DAVIES, J. C. **EPA AND NANOTECHNOLOGY: OVERSIGHT for THE 21st CENTURY**. [s.l: s.n.].

DEMAS, J. N.; CROSBY, G. A. The Measurement of Photoluminescence Quantum Yields. A Review. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 75, n. 8, p. 991–1023, 1971.

DEWEZ, D.; OUKARROUM, A. Silver nanoparticles toxicity effect on photosystem II photochemistry of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* treated in light and dark conditions. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 94, n. 8, p. 1536–1546, 2013.

DROR-EHRE, A. et al. Silver nanoparticle – *E. coli* colloidal interaction in water and effect on *E. coli* survival. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 339, n. 2, p. 521–526, 2009.

EICHERT, T. et al. Size exclusion limits and lateral heterogeneity of the stomatal foliar uptake pathway for aqueous solutes and water- suspended nanoparticles. **Physiologia Plantarum**, v. 134, p. 151–160, 2008.

FABREGA, J. et al. **Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment** *Environment International*, 2011.

FABREGA, J.; RENSHAW, J. C.; LEAD, J. R. Interactions of Silver Nanoparticles with *Pseudomonas putida* Biofilms. **Environmental Science and Technology**, v. 43, n. 23, p. 9004–9009, 2009.

FATIMA, R. A.; AHMAD, M. Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater. **Science of the Total Environment**, v. 346, p. 256–273, 2005.

FATIMA, R. A.; AHMAD, M. Genotoxicity of industrial wastewaters obtained from two different pollution sources in northern India: A comparison of three bioassays. **Mutation Research**, v. 609, p. 81–91, 2006.

FENECH, M. et al. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research**, v. 534, p. 65–75, 2003.

FENECH, M.; MORLEY, A. A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutation Research**, v. 147, p. 29–36, 1985.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, p. 252–259, 2007.

FERNANDES, T. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Ecotoxicology and Environmental Safety Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent — Trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.

72, p. 1680–1686, 2009.

FISKESJO, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99–112, 1985.

FOGELBERG, H.; SANDÉN, B. A. Understanding reflexive systems of innovation: An analysis of Swedish nanotechnology discourse and organization. **Technology Analysis and Strategic Management**, v. 20, n. 1, p. 65–81, 2008.

FOLDBJERG, R. et al. PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. **Toxicology Letters**, v. 190, p. 156–162, 2009.

GADANO, A. et al. In vitro genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 11–16, 2002.

GAO, R. et al. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 45, p. 41–45, 1998.

GEORGE, S. et al. Differential Effect of Solar Light in Increasing the Toxicity of Silver and Titanium Dioxide Nanoparticles to a Fish Cell Line and Zebra fish Embryos. **Environmental Science and Technology**, v. 48, p. 6374–6382, 2014.

GERANIO, L.; HEUBERGER, M. The Behavior of Silver Nanotextiles during Washing. **Environmental Science and Technology**, v. 43, n. 21, p. 8113–8118, 2009.

GORHAM, J. M. et al. UV-induced photochemical transformations of citrate-capped silver nanoparticle suspensions. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, n. 1139, p. 1–16, 2012.

GOTTSCHALK, F.; NOWACK, B. The release of engineered nanomaterials to the environment †. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, p. 1145–1155, 2011.

GOU, N. A.; ONNIS-HAYDEN, A.; GU, A. Z. Mechanistic Toxicity Assessment of Nanomaterials by Whole-Cell-Array Stress Genes Expression Analysis. **Environmental Science and Technology**, v. 44, n. 15, p. 5964–5970, 2010.

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in Allium: A report of the U . S . Environmental Protection Agency Gene-Tox Program *. **Mutation Research**, v. 99, n. 80, p. 273–291, 1982.

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, v. 310, n. 2, p. 175–185, 1994.

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

GUZMÁN, KATHERINE A. D.; TAYLOR, M. R.; BANFIELD, J. F. Environmental Risks of Nanotechnology : National Nanotechnology Initiative Funding , 2000 - 2004. **Environmental Science and Technology**, v. 40, n. 5, p. 1401–1407, 2006.

HAGMAR, L. et al. Impact of Types of Lymphocyte Chromosomal Aberrations on Human Cancer Risk : Results from Nordic and Italian Cohorts. n. 11, p. 2258–2263, 2004.

- HELLAND, A. et al. Nanoparticulate materials and regulatory policy in Europe : An analysis of stakeholder perspectives. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 8, p. 709–719, 2006.
- HENDREN, C. O. et al. Estimating Production Data for Five Engineered Nanomaterials As a Basis for Exposure Assessment. **Environmental Science and Technology**, v. 45, p. 2562–2569, 2011.
- HOLT, K. B.; BARD, A. J. Interaction of Silver (I) Ions with the Respiratory Chain of Escherichia coli : An Electrochemical and Scanning Electrochemical Microscopy Study of the Antimicrobial Mechanism of Micromolar Ag + †. **Biochemistry**, v. 44, n. I, p. 13214–13223, 2005.
- HOTHORN, L. A. Statistical evaluation of toxicological bioassays – a review. **Toxicology Research**, v. 3, n. 1, p. 418–432, 2014.
- HOTZE, E. M.; PHENRAT, T.; LOWRY, G. V. Nanoparticle Aggregation : Challenges to Understanding Transport and Reactivity in the Environment. **Journal of Environmental Quality**, v. 39, p. 1909–1924, 2010.
- INVERNIZZI, N.; FOLADORI, G. Nanotechnology and the Developing World: Will Nanotechnology Overcome Poverty or Widen Disparities? **Nanotechnology Law and Business Journal**, v. 2, n. 3, p. 1–10, 2005.
- ISHIZU, S. et al. Toward the responsible innovation with nanotechnology in Japan : our scope. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 2008, n. 10, p. 229–254, 2008.
- JIANG, Z.; HUNT, J. V; WOLFF, S. P. Ferrous Ion Oxidation in the Presence of Xylenol Orange for Detection of Lipid Hydroperoxide in Low Density Lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, v. 202, p. 384–389, 1992.
- JING, M. et al. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. **Toxicology Letters**, v. 201, n. 1, p. 92–100, 2011.
- KARNOVSKY, M. J. A Formaldehyde-Glutaraldehyde Fixative of High Osmolality for Use in Electron Microscopy. **The Journal of Cell Biology**, v. 27, n. 2, p. 1–149, 1965.
- KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the Several Activities of the Glutathione S- Transferases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 20, p. 6183–6188, 1976.
- KITTLER, S. et al. Synthesis of PVP-coated silver nanoparticles and their biological activity towards human mesenchymal stem cells. **Materialwissenschaft und Werkstofftechnik**, v. 40, n. 4, p. 258–264, 2009.
- KUMARI, M. et al. Cytogenetic and genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on root cells of Allium cepa. **Journal of Hazardous Materials**, v. 190, n. 1–3, p. 613–621, 2011.
- KUMARI, M.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Genotoxicity of silver nanoparticles in Allium cepa. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 19, p. 5243–5246, 2009.

- KURIYAMA, R.; SAKAI, H. Role of Tubulin -SH Groups in Polymerization to Microtubules. **The Journal of Biochemistry**, v. 76, n. 3, p. 651–654, 1974.
- LEME, D. M.; ANGELIS, D. DE F.; MARIN-MORALES, M. A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. **Aquatic Toxicology**, v. 88, p. 214–219, 2008.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water — A case study. **Mutation Research**, v. 650, p. 80–86, 2008.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring : A review on its application. **Mutation Research**, v. 682, p. 71–81, 2009a.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71–81, 2009b.
- LEVARD, C. et al. Sulfidation Processes of PVP-Coated Silver Nanoparticles in Aqueous Solution : Impact on Dissolution Rate Cl. **Environmental Science and Technology**, v. 45, p. 5260–5266, 2011.
- LEVARD, C. et al. Environmental Transformations of Silver Nanoparticles : Impact on Stability and Toxicity. **Environmental Science and Technology**, v. 46, p. 6900–6914, 2012.
- LI, Y. et al. Cytotoxicity and genotoxicity assessment of silver nanoparticles in mouse. **Nanotoxicology**, v. 5390, p. 36–45, 2014a.
- LI, Y. et al. Cytotoxicity and genotoxicity assessment of silver nanoparticles in mouse. v. 5390, p. 36–45, 2014b.
- LIMA, É. S.; ABDALLA, D. S. Peroxidação lipídica : mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 293–303, 2016.
- LIN, D.; XING, B. Root Uptake and Phytotoxicity of ZnO Nanoparticles. **Environmental Science and Technology**, v. 42, n. 15, p. 5580–5585, 2008.
- LIU, J. et al. Controlled Release of Biologically Active Silver from Nanosilver Surfaces. **AcsNano**, v. 4, n. 11, p. 6903–6913, 2010.
- LOK, C. et al. Silver nanoparticles : partial oxidation and antibacterial activities. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 12, n. 4, p. 527–534, 2007.
- LOWRY, G. V. et al. Long-term transformation and fate of manufactured Ag nanoparticles in a simulated large scale freshwater emergent wetland. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 13, p. 7027–7036, 2012.
- LU, W. et al. Effect of surface coating on the toxicity of silver nanomaterials on human skin keratinocytes. **Chemical Physics Letters**, v. 487, n. 1–3, p. 92–96, 2010.
- MA, T. et al. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, v. 334, p. 185–195, 1995.

- MASCIANGIOLI, T.; ALPER, J. **Challenges in Characterizing Small Particles: Exploring Particles from the Nano- to Microscale**. The National Academies Press. **Anais...**2012
- MATEUCA, R. et al. Chromosomal changes : induction , detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v. 88, p. 1515–1531, 2006.
- MCCANN, M. C.; WELLS, B.; ROBERTS, K. Direct visualization of cross-links in the primary plant cell wall. **Journal of Cell Science**, v. 96, p. 323–334, 1990.
- MEYER, J. N. et al. Intracellular uptake and associated toxicity of silver nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*. **Aquatic Toxicology**, v. 100, n. 2, p. 140–150, 2010.
- MIRALLES, P.; CHURCH, T. L.; HARRIS, A. T. Toxicity , Uptake , and Translocation of Engineered Nanomaterials in Vascular plants. **Environmental Science and Technology**, v. 46, p. 9224–9239, 2012.
- MISHRA, S.; SINGH, H. B. Biosynthesized silver nanoparticles as a nanoweapon against phytopathogens : exploring their scope and potential in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2014.
- MOCK, J. J. et al. Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles. **The Journal of Chemical Physics**, v. 116, n. 6755, 2002.
- MUDGE, S. M. Is the use of biofuels environmentally sound or ethical? **Journal of Environmental Monitoring**, v. 10, p. 701–702, 2008.
- NAVARRO, E. et al. Toxicity of Silver Nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. **Environmental Science and Technology**, v. 42, p. 8959–8964, 2008a.
- NAVARRO, E. et al. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. **Ecotoxicology**, v. 17, p. 372–386, 2008b.
- NOWACK, B.; BUCHELI, T. D. Occurrence , behavior and effects of nanoparticles in the environment. **Environmental Pollution**, v. 150, n. 2007, p. 5–22, 2011.
- OBERDÖRSTER, G. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine : concepts of nanotoxicology. **Journal of Internal Medicine**, v. 267, p. 89–105, 2010.
- PAKRASHI, S. et al. In Vivo Genotoxicity Assessment of Titanium Dioxide Nanoparticles by *Allium cepa* Root Tip Assay at High Exposure Concentrations. v. 9, n. 2, 2014.
- PARK, H. et al. Silver-ion-mediated reactive oxygen species generation affecting bactericidal activity. **Water Research**, v. 43, n. 4, p. 1027–1032, 2009.
- PETROVIC, M.; GONZALEZ, S.; BARCELÓ, D. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 10, p. 685–696, 2003.
- PILLAI, Z. S.; KAMAT, P. V. What Factors Control the Size and Shape of Silver Nanoparticles in the Citrate Ion Reduction Method ? **Journal of Physical Chemistry**, v. 108, p. 945–951, 2004.

- PITTOL, M. et al. Macroscopic effects of silver nanoparticles and titanium dioxide on edible plant growth. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, v. 8, n. April, p. 127–133, 2017.
- QUADROS, M. E. et al. Release of silver from nanotechnology-based consumer products for children. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 15, p. 8894–8901, 2013.
- RAJESHWARI, A. et al. Cytotoxicity of aluminum oxide nanoparticles on *Allium cepa* root tip — effects of oxidative stress generation and biouptake. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 14, p. 11057–11066, 2015.
- RANJBAR, A. et al. Effects of silver nanoparticle (Ag NP) on oxidative stress biomarkers in rat. **Nanomedicine Journal**, v. 1, n. 3, p. 205–210, 2014.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 5. ed. Rio de Janeiro: [s.n.].
- SANTOS-FILHO, R. **NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO UTILIZANDO O SISTEMA TESTE DE *Allium cepa***. Universidade Federal do Paraná, 2016.
- SAUVÉ, S.; DESROSIERS, M. A review of what is an emerging contaminant. **Chemistry Central Journal**, v. 8, n. 15, p. 1–7, 2014.
- SCHAUMANN, G. E. et al. Understanding the fate and biological effects of Ag- and TiO₂-nanoparticles in the environment: The quest for advanced analytics and interdisciplinary concepts. **Science of the Total Environment**, v. 535, p. 3–19, 2014.
- SHI, J. et al. Light induced toxicity reduction of silver nanoparticles to *Tetrahymena Pyriformis*: Effect of particle size. **Aquatic Toxicology**, v. 132–133, p. 53–60, 2013.
- SILVER, S.; PHUNG, L. T.; SILVER, G. Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 7, p. 627–634, 2006.
- SILVESTRY-RODRIGUEZ, N. et al. Silver as a disinfectant. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 191, p. 23–45, 2007.
- STAMPOULIS, D.; SINHA, S. K.; WHITE, J. C. Assay-Dependent Phytotoxicity of Nanoparticles to Plants. **Environmental Science and Technology**, v. 43, n. 24, p. 9473–9479, 2009.
- STATNANO. **Nanotechnology in Latin America**. [s.l: s.n.].
- STATNANO. **StatNano 2016: Status of Nano-Science, Technology and Innovation 2016**StatNano. [s.l: s.n.].
- SWEET, M. J.; SINGLETON, I. Silver Nanoparticles: A Microbial Perspective. **Advances in Applied Microbiology**, v. 77, p. 115–133, 2011.
- TAVARES, P.; BALBINOT, F.; MARTINS, H. Evaluation of genotoxic effect of silver nanoparticles (Ag-Nps) in vitro and in vivo. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, p. 1–7, 2012.

- TEJAMAYA, M.; MERRIFIELD, R. C.; LEAD, J. R. Stability of Citrate, PVP, and PEG Coated Silver Nanoparticles in Ecotoxicology Media. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 13, p. 7011–7017, 2012.
- VANCE, M. E. et al. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. **Journal of Nanotechnology**, v. 6, p. 1769–1780, 2015.
- VANNINI, C. et al. Phytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles exposure on germinating wheat seedlings. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, n. 13, p. 1–25, 2014.
- WANG, H. et al. Engineered Nanoparticles May Induce Genotoxicity. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 23, p. 13212–13214, 2013.
- WARHEIT, D. B. TOXICOLOGICAL HIGHLIGHT How Meaningful are the Results of Nanotoxicity Studies in the Absence of Adequate Material Characterization? **Toxicological Sciences**, v. 101, n. 2, p. 183–185, 2008.
- WIJNHOFEN, S. W. P. et al. Nano-silver – a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. **Nanotoxicology**, v. 3, n. 2, p. 109–138, 2009.
- WILEY, B. et al. Shape-Controlled Synthesis of Metal Nanostructures: The Case of Silver. **Chemistry a European Journal**, v. 11, p. 454–463, 2005.
- WU, Y.; ZHOU, Q. SILVER NANOPARTICLES CAUSE OXIDATIVE DAMAGE AND HISTOLOGICAL CHANGES IN MEDAKA (ORYZIAS LATIPES) AFTER 14 DAYS OF EXPOSURE. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 165–173, 2013.
- YANG, X. et al. Mechanism of Silver Nanoparticle Toxicity Is Dependent on Dissolved Silver and Surface Coating in *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Science and Technology**, v. 46, p. 1119–1127, 2012.
- YIN, L. et al. More than the Ions: The Effects of Silver Nanoparticles on *Lolium multiflorum*. **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 6, p. 2360–2367, 2011.
- YIN, L. et al. Effects of Silver Nanoparticle Exposure on Germination and Early Growth of Eleven Wetland Plants. **Plos One**, v. 7, n. 10, p. 1–8, 2012.
- ZHANG, W.; ELLIOTT, D. W. Applications of Iron Nanoparticles for Groundwater Remediation. **Remediation**, v. 16, n. 2, p. 7–21, 2006.
- ZHAO, X.; TOYOOKA, T.; IBUKI, Y. Synergistic bactericidal effect by combined exposure to Ag nanoparticles and UVA. **Science of the Total Environment**, v. 458–460, p. 54–62, 2013.
- ZOU, X.; SHI, J.; ZHANG, H. Coexistence of silver and titanium dioxide nanoparticles: Enhancing or reducing environmental risks? **Aquatic Toxicology**, v. 154, p. 168–175, 2014a.
- ZOU, X.; SHI, J.; ZHANG, H. Coexistence of silver and titanium dioxide nanoparticles: Enhancing or reducing environmental risks? **Aquatic Toxicology**, v. 154, p. 168–175, 2014b.

