

---

# Estudo ecotoxicológico da nanopartícula de prata em *Daphnia similis*

*Ecotoxicological study of silver nanoparticle on Daphnia similis*

Joana da Silva Maziero<sup>1,2</sup>, Sizue Ota Rogero<sup>2</sup>, Adair Alemany<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Curso de Ciências Biológicas da Universidade Paulista, São Paulo-SP, Brasil; <sup>2</sup>Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo-SP, Brasil.

---

## Resumo

**Objetivo** – Verificar a toxicidade da NPAg em organismos aquáticos por meio do ensaio de ecotoxicidade aguda. O aumento na produção e utilização das nanopartículas de prata (NPAg) em diversas áreas, tem provocado preocupação quanto aos impactos e riscos potenciais que estas podem causar ao meio ambiente. **Métodos** – O teste de ecotoxicidade aguda foi realizado seguindo a Norma Brasileira ABNT NBR 12713, utilizando como organismo-teste a *Daphnia similis*. A exposição dos organismos ocorreu em cinco concentrações de NPAg, durante 48 horas. O resultado de CE50, concentração do agente tóxico que causa imobilidade a 50% dos organismos expostos, da NPAg foi obtida pelo método estatístico de Trimmed Spearman-Kärber. **Resultados** – A média da CE50 da NPAg obtidas nos três ensaios realizados foi de 4,70 µg L<sup>-1</sup>. **Conclusão** – De acordo com os resultados obtidos, a NPAg causou imobilidade a 50% dos organismos expostos na concentração de 4,70 µg L<sup>-1</sup>. Estudos devem ser continuados para melhor esclarecimento dos impactos no meio ambiente aquático.

**Descritores:** Ambiente aquático; Ecotoxicologia; Nanopartículas metálicas; Prata

## Abstract

**Objective** – To assess the toxicity of AgNP in aquatic organisms through acute ecotoxicity test. The increasing of silver nanoparticle (AgNP) production and use in several areas, has caused great concern about the potential impacts and risks that they can cause to the environment. **Methods** – The ecotoxicity tests were carried out according to the Brazilian Standard ABNT NBR 12713, using *Daphnia similis* as test-organisms. The organisms were exposed to five AgNP concentrations for a period of 48 hours. The AgNP EC50 result, concentration of the toxic agent which causes immobility to 50% of exposed organisms, was obtained by the statistical method of Spearman-Kärber Trimmed. **Results** – The average of AgNP EC50 result from three performed tests was 4.70 µg L<sup>-1</sup>. **Conclusion** – According to the results, AgNP showed immobility to 50% of exposed organisms in the concentration of 4.70 µg L<sup>-1</sup>. Studies must be continued to better understand the impacts on the aquatic environment.

**Descriptors:** Aquatic environment; Ecotoxicology; Metallic nanoparticles; Silver

---

## Introdução

A toxicologia é o estudo dos efeitos adversos de agentes químicos ou físicos em organismos vivos, e é capaz de examinar e comunicar a natureza desses efeitos na saúde humana, animal e ambiental<sup>1</sup>.

O termo ecotoxicologia foi sugerido pela primeira vez por René Truhaut, em 1969, durante uma reunião do *Committee of the International Council of Scientific Unions (ICSU)*, em Estocolmo<sup>2</sup>.

A ecotoxicologia é o ramo da toxicologia que estuda os efeitos ocasionados por agentes químicos e físicos, sobre a dinâmica de populações e comunidades, integrantes de ecossistemas definidos. É considerada multidisciplinar, envolvendo as áreas da física, química e biologia. Ao se realizar testes de ecotoxicidade as análises físicas e químicas são importantes para avaliação dos resultados, pois com base nessas informações, pode-se identificar e quantificar as concentrações das substâncias tóxicas, já as análises biológicas avaliam os efeitos dessas substâncias nas biotas<sup>3</sup>.

O ambiente aquático compreende vários tipos de ecossistemas: rios, lagos, estuários, mares e oceanos; tais ecossistemas são altamente complexos, abertos e dinâmicos, portanto sofrem modificações contínuas na sua composição química. Esses ambientes são produtos di-

nâmicos de interações complexas entre os componentes bióticos e abióticos característicos de cada um deles<sup>3</sup>.

Os organismos aquáticos podem ser expostos aos agentes químicos presentes na água e nos sedimentos. A bioacumulação, resultante do acúmulo dos poluentes nos tecidos dos organismos vivos, quando não metabolizados ou excretados, pode contribuir para o processo de biomagnificação, onde este acúmulo é transmitido para o nível superior da cadeia trófica<sup>4</sup>.

A ecotoxicologia aquática avalia os efeitos de substâncias químicas sobre os organismos representativos do ecossistema aquático. Engloba o transporte, a distribuição, a transformação e o destino final dos contaminantes no ambiente aquático<sup>3</sup>. O desenvolvimento acelerado da ecotoxicologia aquática deveu-se ao conhecimento da toxicidade de efluentes líquidos complexos e das interações entre os agentes tóxicos presentes em efluentes e seus efeitos à biota aquática<sup>5</sup>.

No meio aquático a toxicidade de agentes químicos é avaliada por meio de ensaios ecotoxicológicos com organismos representativos da coluna d'água ou dos sedimentos de ambientes de água doce, estuarina ou marinha<sup>5</sup>.

O conhecimento da toxicidade desses agentes a diferentes organismos aquáticos permite, averiguar o impacto temporário que esses poluentes causam a biota dos corpos hídricos, além da determinação dos limites

permissíveis de várias substâncias químicas para proteção da vida aquática<sup>5</sup>.

Os ensaios ecotoxicológicos podem ser classificados de acordo com o método de adicionar a solução-teste (sistema estático, semi-estático e de fluxo contínuo), propósito (teste de composto isolado; monitoramento da qualidade de efluente; toxicidade relativa; sabor ou odor; taxa de crescimento; entre outros) e duração (agudo, sub-crônico ou crônico)<sup>6</sup>.

O ensaio de toxicidade aguda pode ser esclarecido como aquele que avalia as respostas rápidas e severas dos organismos aquáticos a um estímulo que se manifesta geralmente por agentes químicos ou amostras ambientais num intervalo de 0 a 96 horas, o efeito observado na maioria dos casos, para peixes é a letalidade e para invertebrados a imobilidade, ou outras manifestações do organismo que as antecede<sup>5</sup>.

O ensaio de toxicidade crônica consiste em uma exposição mais prolongada. Avalia a ação dos poluentes cujo efeito traduz-se pela resposta a um estímulo que continua por longo tempo, geralmente por um período que vai de 10% do ciclo vital até a totalidade da vida do organismo<sup>7</sup>. No ambiente aquático, devido a fatores de diluição, os organismos estão expostos a níveis subletais dos poluentes. Esta exposição pode não levar a morte do organismo, mas causar distúrbios fisiológicos e/ou comportamentais após um longo período de tempo, efeitos que muitas vezes só são observados no ensaio crônico<sup>8</sup>.

A *Daphnia similis* (Crustacea, Cladocera), é um microcrustáceo planctônico de água doce, com comprimento médio de 4 mm. São vulgarmente conhecidos como pulga d'água e tem larga distribuição no hemisfério norte. Atua como consumidor primário na cadeia alimentar aquática entre os metazoários e se alimentam por filtração de material orgânico particulado em suspensão, especialmente algas unicelulares<sup>9</sup>.

Em condições favoráveis, a reprodução da *Daphnia similis* é assexuada por paternogênese, originando apenas fêmeas, isso garante a produção de indivíduos isogênicos, permitindo assim, organismos com sensibilidade constante. Caso contrário, em condições estressantes, como superpopulação ou falta de alimento, surgem machos na cultura, que após fecundar os ovos, originam os efépios (ovos envoltos por uma casca única de cor escura, altamente resistente às condições desfavoráveis)<sup>10</sup>.

As *Daphnia similis* são amplamente distribuídos nos corpos d'água doce, são fonte significativa de alimento para peixes e são importantes em muitas cadeias alimentares. São organismos facilmente cultivados em laboratório, sensíveis a vários contaminantes do ambiente aquático e devido ao seu tamanho reduzido, necessitam de menores volumes de amostras-teste e água de diluição<sup>3</sup>. Portanto, são amplamente utilizadas como organismo-teste (organismo utilizado na realização do ensaio de ecotoxicidade)<sup>9</sup>.

A nanotecnologia compreende a investigação e desenvolvimento de materiais em nível molecular e atômico, dentro da escala nanométrica, de um a cem nanômetros. Um nanômetro equivale a um milionésimo de um milímetro ou a um bilionésimo de um metro, que corresponde a aproximadamente dez átomos<sup>11</sup>.

As nanopartículas são diferentes de substâncias químicas

tradicionais, pois não possuem comportamento padrão para o mesmo produto, ainda que apresentem a mesma composição, são diferentes devido ao tamanho da partícula, seu metabolismo e interação com o sítio de ação<sup>11</sup>. Foi verificado que em cada tamanho, um mesmo material pode apresentar características muito diferentes<sup>12</sup>. Segundo Asharani *et al.* (2008), estudos demonstraram que as partículas ultrafinas podem causar mais danos que as partículas maiores, na mesma concentração<sup>13</sup>.

A nanotecnologia engloba um conjunto de técnicas com aplicações potenciais na maioria dos setores industriais existentes na atualidade<sup>14</sup>. É muito utilizada por inúmeras áreas, está presente na biotecnologia, biologia molecular, medicina, eletrônica, indústria química, farmacêutica, entre outras. Acredita-se que a nanotecnologia tenha um profundo impacto na economia e na sociedade durante o século 21, talvez comparável à tecnologia da informação ou aos avanços na biologia celular e molecular<sup>14</sup>.

Dentre os nanomateriais, existem as nanopartículas de prata (NPAg), que tem sido incorporadas ao cotidiano sob diversas formas, tais como: cosméticos, drogas farmacêuticas, terapêuticas e biosensores, porém ainda pouco se sabe sobre sua bioatividade e biodistribuição<sup>13</sup>. Entretanto as propriedades que fazem os nanomateriais serem tão atrativos, devido ao tamanho pequeno, formato variado e elevada área superficial, também pode ser responsável pela contaminação do meio ambiente e efeitos nocivos para seres humanos e outros organismos vivos<sup>15</sup>.

As NPAg por serem facilmente incorporadas a diversos materiais e devido a sua propriedade bactericida, tem sido amplamente utilizadas: em curativos; no interior de refrigeradores, para retardar a deterioração de alimentos; em palmilhas antimicrobianas, para evitar odores; em purificadores de ar e em instrumentos cirúrgicos<sup>16</sup>.

O aumento na produção e utilização das NPAg em diversas áreas tem provocado grande preocupação quanto aos impactos e riscos potenciais que estas podem causar ao meio ambiente e à saúde humana, o que eleva a importância da determinação da toxicidade em várias espécies de interesse biológico, como por exemplo: algas, bactérias, microcrustáceos, peixes, entre outros<sup>13,15</sup>.

Após a descoberta da penicilina, por Alexander Fleming em 1928, o uso da prata como agente bactericida diminuiu consideravelmente, porém, devido a grande resistência de cepas aos antibióticos, a comunidade científica despertou novamente o interesse pela prata<sup>12,17</sup>.

De acordo com as demonstrações realizadas pela área da medicina, a prata aniquila mais de 650 agentes patogênicos, sem criar resistência. As NPAg agem no processo de permeabilidade e respiração celular na membrana das bactérias, assim como podem conectar-se ao fósforo e ao enxofre presentes na estrutura do DNA, impedindo a divisão celular<sup>12</sup>.

As NPAg podem ser liberadas ao meio ambiente de diversas formas, durante sua síntese, fabricação, utilização e processo de reciclagem de materiais que contenham a mesma em sua composição<sup>18</sup>. Desta forma, podem atingir o ecossistema aquático e apresentar riscos a biota.

No estudo realizado por Rosana Wal (2010), estima-se que as NPAG estejam presentes entre 0,03 a 500ng L<sup>-1</sup> em águas não tratadas, e seus efeitos nos organismos aquáticos são pouco elucidados<sup>19</sup>. Além disso, há poucos trabalhos na literatura referindo-se a sua toxicidade em *Daphnia similis*. O objetivo deste estudo foi verificar a toxicidade da NPAG em organismos aquáticos frente à *Daphnia similis* por meio do ensaio de ecotoxicidade aguda.

## Métodos

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Ecotoxicologia e Citotoxicidade do Centro de Química e Meio Ambiente (CQMA), do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), da Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN).

A substância teste utilizada foi a NPAG de 22ppm, de 80nm, gentilmente cedidas pela empresa Khemia.

Os ensaios de ecotoxicidade aguda foram realizados de acordo com a norma ABNT NBR 12713<sup>9</sup>, para determinação da CE50, concentração efetiva que causa imobilidade a 50% dos organismos expostos, da NPAG.

As *Daphnia similis*, apresentada na Figura 1, foram cultivadas no laboratório de Ecotoxicologia do CQMA seguindo a norma ABNT NBR 12713<sup>9</sup>. Foram mantidos em béqueres de 500mL, em incubadoras com temperatura controlada de 20 ± 2°C, com fotoperíodo de 16 horas-luz e luminosidade difusa. A água utilizada tanto para os cultivos quanto para diluição nos testes, foi o Meio MS<sup>9</sup>, cujo preparo consta nas Tabelas 1 e 2, com dureza ajustada entre 40 e 48 mg L de CaCO<sub>3</sub> e pH na faixa de 7,0 – 7,6. Os reagentes utilizados para o pre-

paro das soluções são de grau PA e de fornecedores como Merck e Sigma-Aldrich. A alga utilizada como alimento foi a *Pseudokirchneriella subcapitata*, uma alga clorofícea, unicelular, administrada diariamente na concentração de 1 a 5 x 10<sup>6</sup> células por organismo. Para a alimentação complementar foi utilizado a ração para peixe da marca Tetramin, fornecida 3 vezes por semana na concentração de 0,02 mL de alimento por organismo.

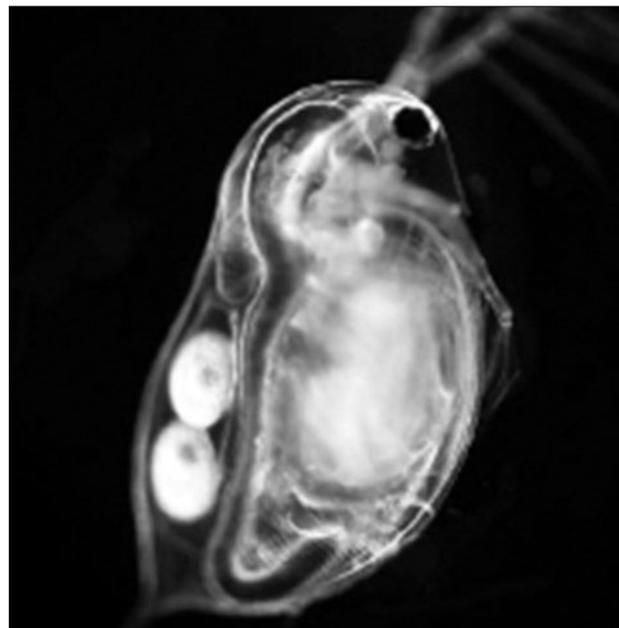


Figura 1. *Daphnia similis*. Fonte: <http://petecologiaufrpe.blogspot.com.br/2013/02/artigo-o-uso-do-bioindicador-daphnia.html>

Tabela 1. Preparo das soluções para o Meio MS

Solução	Reagente	Quantidade (g)	Preparo
1	Nitrato de Sódio	10	Dissolver e diluir a 1000mL com água processada
	Metassilicato de Sódio	1,7183	
	Fosfato de Potássio Monobásico	1,8125	
	Fosfato de Potássio Dibásico	2,0	
2	Cloreto de Potássio	2,0	Dissolver e diluir a 1000mL com água processada
	Sulfato de Magnésio Heptahidratado	5,1455	
3	Cloreto de Cálcio Dihidratado	24,4769	Dissolver e diluir a 500mL com água processada
4	Ácido Bórico	2,8	Dissolver e diluir a 2000 mL com água processada
	Cloreto de Zinco	0,026	
	Cloreto de Cobalto Hexahidratado	0,0101	
	Cloreto de Ferro III Hexahidratado	0,966	
	Cloreto de Manganês II Tetrahidratado	0,36	
	Cloreto de Lítio	0,3035	
	Cloreto de Rubídio	0,071	
	Cloreto de Estrôncio Hexahidratado	0,1517	
	Brometo de Sódio	0,0321	
	Molibdato de Sódio Dihidratado	0,063	
Cloreto de Cobre II Dihidratado	0,0101		
	Iodeto de Potássio	0,0033	
5	Dióxido de Selênio	0,0014	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada
6	Metavanadato de Amônio	0,0011	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada
7	Vitamina B12	0,0010	Dissolver e diluir a 100 mL com água processada

Fonte: Adaptado de NBR ABNT 12713: 2009

**Tabela 2. Volumes utilizados para o preparo de 20 L de Meio MS**

Solução	Volume (mL)
1	100
2	100
3	20
4	80
5	20
6	20
7	2

Fonte: Adaptado de NBR ABNT 12713: 2009

**Tabela 3. Resumo dos requisitos para o ensaio de ecotoxicidade aguda**

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

Fonte: Adaptado de NBR ABNT 12713: 2009

Testes de sensibilidade das *Daphnia similis* foram realizados mensalmente, nas mesmas condições do ensaio de ecotoxicidade aguda, utilizando como substância de referência o cloreto de sódio (NaCl), para garantir a adequada sensibilidade das mesmas. Os resultados da CE50, calculada no programa Trimmed Spearman-Kärber, são inseridos na carta-control, que consiste em um gráfico contendo a média da CE  $\pm$  2 DP. Se dois resultados seguidos estiverem fora dos limites, ou se sete consecutivos estiverem do mesmo lado da linha de tendência central, os procedimentos do ensaio devem ser reavaliados<sup>9</sup>.

A solução estoque de NPAG utilizada nos ensaios foi de 160  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Foram realizados 2 ensaios preliminares, onde foi constatado que a concentração que causou imobilidade a 100% dos organismos foi 16  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Estes ensaios possibilitaram um conhecimento prévio da faixa de concentrações a serem empregadas nos ensaios definitivos.

Para os ensaios definitivos, conforme sugerido pela ABNT NBR 12713, optou-se pelo fator de diluição de 1,5, a partir da concentração de 16  $\mu\text{g L}^{-1}$ , tendo as seguintes concentrações: 0; 3,1; 4,7; 7,1; 10,5 e 16  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Os ensaios foram realizados em triplicata, e os organismos na fase neonatal (de 6 a 24 horas), foram expostos as concentrações de NPAG, por um período de 48 horas. A exposição ocorreu em 4 réplicas para cada concentração, contendo 10 mL de solução, com 5 organismos por réplica, totalizando 20 organismos por concentração.

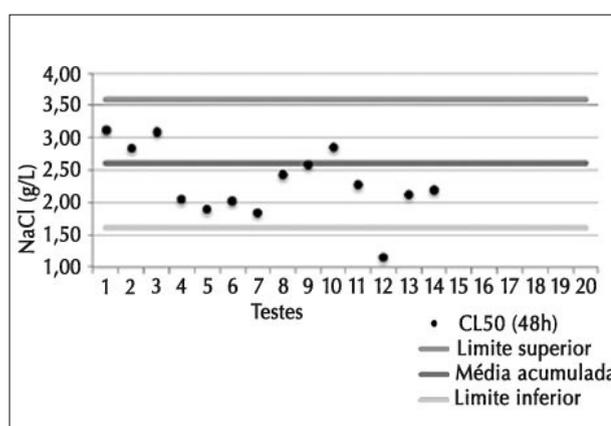
Os organismos foram mantidos a temperatura de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , com luminosidade difusa e fotoperíodo de 16 horas de luz. Os parâmetros como condutividade (Condu.), concentração de oxigênio dissolvido (OD), pH, dureza e temperatura, foram verificados previamente e ao término dos ensaios. No final do período de exposição, foi verificada a quantidade de indivíduos imóveis.

Na Tabela 3 está representado o resumo dos requisitos para o ensaio de ecotoxicidade aguda.

Para análise estatística os resultados de imobilidade dos organismos, em relação as concentrações da NPAG, foram inseridos no programa Trimmed Spearman-Kärber para obtenção da CE50.

## Resultados

Os resultados da CE50 dos ensaios de sensibilidade, estavam dentro da faixa de sensibilidade estabelecida para os mesmos, de acordo com a carta controle obtida no laboratório de Ecotoxicologia do CQMA (IPEN), apresentada no Gráfico 1.



**Gráfico 1. Carta controle de sensibilidade da *Daphnia similis* ao NaCl**

A leitura dos parâmetros iniciais e finais das soluções de NPAG dos 3 ensaios realizados podem ser observados nas Tabelas 4, 5 e 6.

Nas Tabelas 7, 8 e 9 estão apresentados os resultados referente aos três ensaios realizados de ecotoxicidade aguda da NPAG em *Daphnia similis*, mostrando o número de organismos imóveis em cada replicata.

Os resultados consolidados de indivíduos imóveis e as respectivas porcentagens dos 3 ensaios realizados, constam na Tabela 10 e no Gráfico 2.

Na Tabela 11 constam os valores das CE50 e do limite de confiabilidade dos 3 ensaios realizados no programa de Trimmed Spearman-Kärber.

**Tabela 4. Leituras dos parâmetros do ensaio 1**

Concentração NPAg ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	pH		OD (mg L)		Conduct. ( $\mu\text{S}_{25}\text{cm}$ )	
	Inicial	Final	Inicial*	Final	Inicial	Final
0	7,12	7,72	3,45	6,97	187,2	203,0
3,1	7,00	7,39	3,80	6,22	384,0	199,0
4,7	7,07	7,31	3,84	5,24	212,0	195,0
7,1	7,11	7,23	1,40	5,05	188,0	193,0
10,5	7,11	7,03	2,75	4,52	183,0	189,7
16	7,09	7,11	3,52	4,24	175,0	183,5

\* Medição realizada no dia seguinte, devido a problemas na membrana do eletrodo

**Tabela 5. Leituras dos parâmetros do ensaio 2**

Concentração NPAg ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	pH		OD (mg L)		Conduct. ( $\mu\text{S}_{25}\text{cm}$ )	
	Inicial	Final	Inicial*	Final	Inicial	Final
0	7,10	7,20	7,67	7,81	202,0	202,0
3,1	6,98	7,02	7,48	7,80	197,0	198,6
4,7	7,01	7,06	7,73	7,82	199,0	199,0
7,1	6,93	7,03	7,63	8,02	197,0	199,0
10,5	6,93	6,98	7,61	7,63	196,9	199,0
16	6,92	6,88	8,03	5,83	196,5	199,0

**Tabela 6. Leituras dos parâmetros do ensaio 3**

Concentração NPAg ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	pH		OD (mg L)		Conduct. ( $\mu\text{S}_{25}\text{cm}$ )	
	Inicial	Final	Inicial*	Final	Inicial	Final
0	6,04	7,44	6,97	8,59	197,1	201,0
3,1	6,71	7,54	6,98	8,56	194,1	191,9
4,7	6,76	7,52	7,01	8,50	191,7	188,6
7,1	6,79	7,50	7,15	8,54	188,1	186,1
10,5	6,81	7,48	7,42	8,43	186,0	183,6
16	6,83	7,35	7,53	7,59	180,4	178,0

**Tabela 7. Resultado de organismos imóveis no ensaio 1**

Replicatas	Concentração NPAg ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )					
	0	3,1	4,7	7,1	10,5	16
1	0	0	5	5	5	5
2	0	0	1	5	5	5
3	0	0	5	2	5	5
4	0	0	0	5	5	5

**Tabela 8. Resultado de organismos imóveis no ensaio 2**

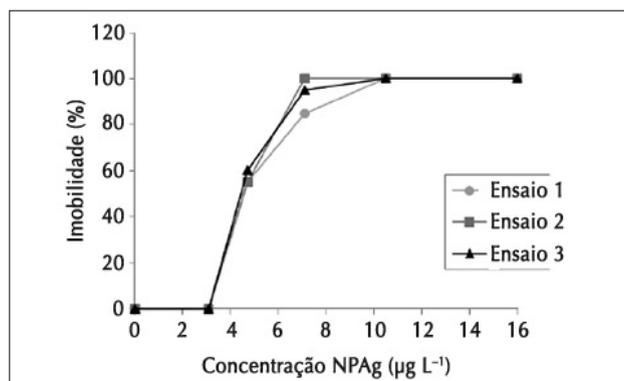
Replicatas	Concentração NPAg ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )					
	0	3,1	4,7	7,1	10,5	16
1	0	0	3	5	5	5
2	0	0	3	5	5	5
3	0	0	4	5	5	5
4	0	0	1	5	5	5

**Tabela 9. Resultado de organismos imóveis no ensaio 3**

Replicatas	Concentração NPAg ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )					
	0	3,1	4,7	7,1	10,5	16
1	0	0	3	5	5	5
2	0	0	4	5	5	5
3	0	0	3	4	5	5
4	0	0	2	5	5	5

**Tabela 10. Porcentagem de organismos imóveis nos ensaios realizados**

Concentração NPAg ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Organismos móveis					
	Ensaio 1		Ensaio 2		Ensaio 3	
	Total	%	Total	%	Total	%
0	0	0	0	0	0	0
3,1	0	0	0	0	0	0
4,7	11	55	11	55	12	60
7,1	17	85	20	100	19	95
10,5	20	100	20	100	20	100
16	20	100	20	100	20	100



**Gráfico 2. Curvas de imobilidade da *Daphnia similis* no ensaio de ecotoxicidade aguda de NPAg**

**Tabela 11. Valores das CE50 nos ensaios de ecotoxicidade de NPAg em *Daphnia similis***

Ensaio	CE50 ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Limites de confiança	
		Inferior	Superior
1	4,89	4,37	5,47
2	4,60	4,19	5,04
3	4,60	4,16	5,07
Média	4,70	4,24	5,19

## Discussão

Os valores da CE50 obtidos nos ensaios de sensibilidade, mostraram que os organismos-teste estavam apropriados para utilização nos testes de ecotoxicidade aguda realizados neste trabalho, conforme mostrado na Figura 2.

Referindo-se a leitura dos parâmetros das soluções teste, conforme Tabelas 4, 5 e 6, os resultados de pH apresentaram pequena variação entre os 3 ensaios, sendo os valores da leitura final maiores que a inicial. Observando os valores de OD obtidos, a leitura final foi maior que a inicial, exceto no ensaio 1 (Tabela 4). Nota-se que os valores estão abaixo dos demais, devido a medição ter sido feita no dia seguinte, por problemas na membrana do eletrodo. Quanto aos resultados do parâmetro de condutividade, houve pouca variação.

A média dos resultados de CE50 da NPAg obtida pelo método de Trimmed Spearman-Kärber, foi de  $4,70 \mu\text{g L}^{-1}$  (Tabela 11). Resultado semelhante ao encontrado por Rogero *et al.* (2015), cuja CE50 foi de  $6,90 \mu\text{g L}^{-1}$ , ambos os trabalhos com NPAg de cerca de  $80 \text{ nm}^{20}$ .

A toxicidade das NPAg também tem sido estudada utilizando embriões do peixe *Danio rerio* (Zebrafish), por meio do ensaio de embriotoxicidade aguda. Asharani *et al.* (2008), testou NPAg de 5 a 20 nm e obteve valor de CL50, concentração do agente tóxico que causa mortalidade a 50% dos organismos expostos, entre 25 e  $50 \text{ mg L}^{-1}$ <sup>13</sup>. O trabalho de Xin *et al.* (2015), realizado também com embriões, mostrou o valor de CL50 de  $4,120 \text{ mg L}^{-1}$  com NPAg de 3 a 6 nm e  $5,909 \text{ mg L}^{-1}$  com nanopartículas de 8 a 10 nm<sup>21</sup>. Nesses trabalhos foi possível observar que quanto menor o tamanho da nanopartícula, maior é seu efeito tóxico.

## Conclusão

O objetivo deste estudo foi alcançado, tendo sido verificado a concentração efetiva que causou 50% de imobilidade em *Daphnia similis* no teste de ecotoxicidade aguda.

A CE50 revelou a importância de se realizar mais estudos relacionados as adversidades que as NPAg podem causar ao meio ambiente. Assim como a importância da determinação da toxicidade em várias espécies de interesse biológico, como por exemplo: algas, bactérias, microcrustáceos, peixes, entre outros.

Além disso, mostra-se necessário verificar o descarte das NPAg no meio ambiente, visto que no Brasil ainda não há legislações que quantifiquem os limites permisíveis para esse descarte. Este trabalho poderá contribuir para as informações sobre a ecotoxicidade aguda das NPAg, amplamente utilizadas atualmente.

## Agradecimentos

Agradeço ao Laboratório de Ecotoxicologia e Citotoxicidade do Centro de Química e Meio Ambiente (CQMA) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) da Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), pela infraestrutura disponibilizada para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Ademar B. Lugão, Dr. José Roberto Rogero e minha orientadora Msc. Sizue Ota Rogero do IPEN, pela oportunidade, apoio e suporte.

A minha co-orientadora Msc. Adair Alemany e a Dra. Paula Juliana da Universidade Paulista (UNIP), pela paciência e suporte.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A empresa Khemia, por fornecer gentilmente a solução de NPAg.

## Referências

1. Curtis DK, Casaret & Doull's. Toxicology: the basic science of poisons. London: McGraw Hill; 2005.
2. Magalhães DP, Ferrão Filho AS. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecologia Brasiliensis*, 2008;12(3):355-81.
3. Costa CR. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*, 2008;31(7):1820-30.
4. Baptista DF. Spatial and temporal organization of aquatic insects assemblages in the longitudinal gradient of a tropical river. *Rev Bras Biol*. 2001;61(2).
5. Zagatto PA, Bertoletti E. Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações. São Carlos: Rima; 2006.
6. Rubinger CF. Seleção de métodos biológicos para a avaliação toxicológica de efluentes industriais (dissertação de mestrado). Minas Gerais: Universidade Federal de Minas Gerais; 2009.
7. Laboratório de Ecotoxicologia. Testes de toxicidade aquática no controle da poluição. Santos (SP): Universidade Santa Cecília; 1997.
8. Gimiliani TG. Comparação ecotoxicológica de princípios ativos de repelentes para invertebrados aquáticos irradiados e não irradiados com radiação gama (dissertação de mestrado). São Paulo: Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares; 2013.
9. Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Ecotoxicidade aquática – toxicidade aguda – método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera). Norma; ABNT-NBR Brasília-DF 12713. 2009.
10. Georgetti M. Avaliação química e ecotoxicológica de efluentes químicos, visando seu reuso (tese de mestrado). São Carlos; Universidade Federal; 2010.
11. Miller JC, Serrato R, Kundahl G. The handbook of nanotechnology: business, policy and intellectual property law. New Jersey: John Wiley & Sons; 2005.
12. Antunes FS. Síntese, caracterização e aplicação de nanopartículas de prata como agentes antimicrobianos. *Estudos Tecnológicos em Engenharia*. 2013;9(1):20-60.
13. Asharani PV. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *IOP Science Nanotechnol*. 2008;19(25).
14. Bastos RMP. Nanotecnologia: Uma revolução no desenvolvimento de novos produtos. (Monografia). Juiz de Fora, MG: Universidade Federal de Juiz de Fora; 2005.
15. Nogueira PFM, Paino IMM, Zucolotto V. Nanosilver: properties, applications and impacts on health and environment. *Revista Vigilância Sanitária em Debate*. 2013;1(4):57-68.
16. Souza GD. Prata: breve histórico, propriedades e aplicações. *Educação Química*. 2013;24(1):14-6.
17. Guimarães DO. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, 2010;33(3):667-79.
18. Mathias FT. Avaliação dos efeitos toxicológicos e ambientais de nanopartículas de sais de prata. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. 2014;35(2):187-93.
19. Wal R. Prata nanoparticulada: avaliação das potencialidades de aplicação e dos riscos associados na desinfecção de água em comparação com sistemas convencionais de cloração (dissertação de mestrado). São Paulo. IPT: 2010.
20. Rogero SO, *et al*. Toxicidade da nanopartícula de prata (NPAg): estudo comparativo entre suspensões de NPAg obtidas por diferentes métodos. *In: Anais da 4.ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais: 2015; Campina Grande, PB: Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais; 2015.*
21. Xin Q. Silver nanoparticles affect the neural development of zebrafish embryos. *J Appl Toxicol*, 2015;35(12):1481-92.

### Endereço de correspondência:

Joana da Silva Maziero  
Rua Itaguaí, 178 – Jd. Nossa Senhora de Fátima  
Jandira-SP, CEP 06624-130  
Brasil

E-mail: joana.maziero@gmail.com

Recebido em 13 de julho de 2016  
Aceito em 31 de agosto de 2016