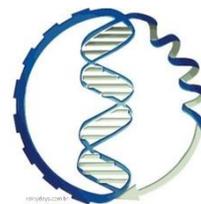




UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais - FCBA
Curso de Biotecnologia



Reiane Moellmann Souza

**Avaliação dos efeitos das nanopartículas de prata de diferentes dimensões
em células meristemáticas de *Allium cepa* e *Vicia faba*.**

Dourados - MS
2018

Reiane Moellmann Souza

**Avaliação dos efeitos das nanopartículas de prata de diferentes dimensões
em células meristemáticas de *Allium cepa* e *Vicia faba*.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Banca Examinadora da Universidade Federal da Grande Dourados, como pré-requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia, sob a orientação da Profa. Dra. Alexeia Baruffatti Grisolia e coorientação da Dra. Marisa Scherer.

**Dourados - MS
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S729a Souza, Reiane Moellmann
Avaliação dos efeitos das nanopartículas de prata de diferentes dimensões em células meristemáticas de *Allium cepa* e *Vicia faba*. / Reiane Moellmann Souza. –2018.
34f.

Orientadora: Profa. Dr^a Alexeia Barufatti Grisolia .
Coorientadora: Profa. Dr^a Marisa Scherer.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia)–
Universidade Federal da Grande Dourados, 2018.

1. Nanotecnologia. 2. Cebola – Biotecnologia. 3. Feijão-fava (leguminosa) – Biotecnologia. - I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.

REIANE MOELLMANN SOUZA

**Avaliação dos efeitos das nanopartículas de prata de diferentes dimensões
em células meristemáticas de *Allium cepa* e *Vicia faba*.**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito necessário para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, da Universidade Federal da Grande Dourados, pela banca examinadora formada por:

Prof. Dra Alexéia Barufatti Grisolia
Universidade Federal da Grande Dourados

Me. Juliana Caroline Vivian Sposito
Universidade Federal da Grande Dourados

Me. William Ferreira Falco
Universidade Federal da Grande Dourados

**Dourados - MS
2018**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e ao Santo Expedito, nas horas de aflição foram meu refúgio.

Agradeço aos meus pais por me darem a vida e irmã por todo o apoio que me deram e ainda me dão.

Ao meu namorado João Pedro, por sempre me apoiar e me incentivar nas horas difíceis e não deixar desistir.

À Professora Dra. Alexeia Barufatti Grisolia pela orientação e a Marisa Scherer pela coorientação, ensinamentos e paciência.

Agradeço a minhas amigas que me ajudaram a passar essa fase da graduação, principalmente às meninas Caroline Castilha, Aline Karpinski, Silvia Sayuri, Jaqueline Marques, Stéfany Brandão e Pâmela Prates, que conviveram comigo todos os dias.

Aos amigos dos Laboratórios de Biotecnologia Aplicada à Produção Animal e Mutagênese Ambiental (Bruno, André, Alexandre, Ândrea, Rafaela, Héliana, Rafael, Juliana Fernandes, Juliana S., Luiza, e demais), por todo o conhecimento compartilhado, amizade, companheirismo e momentos de descontração.

À todos os professores que me deram aula e passaram seus conhecimentos.

À Universidade Federal da Grande Dourados por proporcionar a graduação em Biotecnologia.

À FUNDECT pelo suporte financeiro à pesquisa.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e meu desenvolvimento acadêmico.

RESUMO

Embora os efeitos das nanopartículas de prata já tenham sido avaliados em alguns estudos, mais dados são necessários sobre os efeitos adversos em modelos biológicos, considerando o uso crescente dessas substâncias e consequente liberação no meio ambiente. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito citotóxico e genotóxico das nanopartículas de prata em diferentes dimensões em células meristemáticas de *Allium cepa* e *Vicia faba*. As sementes *Allium cepa* e *Vicia faba* foram expostas a diferentes dimensões das NPs de prata 5, 25, 50 e 75 nm em concentrações pré-determinadas de 100 mg/L e germinadas a 24 °C por 24h. Controle negativo (água destilada) foram submetidas as mesmas condições. Os seguintes parâmetros foram avaliados: índice mitótico (IM), índice de anormalidades nucleares (IAN) e índice de micronúcleos (IMC). As análises estatísticas foram realizadas no software Origin 8.5 utilizando teste de E. student (nível de significância de 5%). Os resultados evidenciaram que quanto menor a dimensão das NPs de prata maior foi a redução do índice mitótico (IM) nas células meristemáticas de *A. cepa* e *V. faba*. Também foram observados efeitos genotóxicos e mutagênicos das NPs de prata, onde notou-se diferença significativa de IMC e IAN em todas as dimensões. Dessa forma essas nanopartículas de menores dimensões causam maiores danos nas células vegetais promovendo alterações no DNA.

Palavras-chave: Efeitos citogenéticos, Nanopartículas de Prata, *Allium cepa*, *Vicia faba*.

ABSTRACT

Although the effects of silver nanoparticles have already been evaluated in some studies, more data are needed on the adverse effects in biological models, considering the increasing use of these substances and consequent release into the environment. In this context, the objective of this work was to evaluate the cytotoxic and genotoxic effect of silver nanoparticles in different dimensions on meristematic cells of *Allium cepa* and *Vicia faba*. *Allium cepa* and *Vicia faba* seeds were exposed to different sizes of silver NPs 5, 25, 50 and 75 nm at predetermined concentrations of 100 mg / L and germinated at 24 ° C for 24 h. Negative control (distilled water) were subjected to the same conditions. The following parameters were evaluated: mitotic index (MI), nuclear abnormality index (NAI) and micronucleus index (MNI). Statistical analyzes were carried out in the software Origin 8.5 using E. student test (significance level 5%). The results showed that the smaller the size of the silver NPs, the greater the reduction of the mitotic index (MI) in the meristematic cells of *A. cepa* and *V. faba*. We also observed genotoxic and mutagenic effects of silver NPs, where a significant difference of BMI and NAI was observed in all dimensions. In this way, these smaller nanoparticles cause greater damages in the plant cells, promoting changes in the ADN.

Key words: Cytogenetic effects, Silver nanoparticles, *Allium cepa*, *Vicia faba*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama da formação de micronúcleo em células adaptado de (SILVA, 2011).

Figura 2: Coluna A: Imagem Microscopia Eletrônica de Transmissão das NPs de prata: 5, 25, 50 e 75 nm; Coluna B: Cálculo da distribuição das dimensões em diâmetros das partículas; Coluna C: Espectroscopia de Energia Dispersiva para as NPs de prata (FALCO, 2018).

Figura 3: Extrapolação do cálculo da área superficial total das NPs de prata em função do diâmetro (FALCO, 2018).

Figura 4: Demonstração da área superficial total das NPs de prata em função do diâmetro (FALCO, 2018).

Figura 5: Resultado de índice mitótico (%) em células meristemáticas de *Allium cepa* (a) e *Vicia faba* (b) em relação ao diâmetro (nm) das NPs de prata. A diferença estatística significativa ($p < 0,05$) foi representada por (*).

Figura 6: Células meristemáticas de *A. cepa* expostas ao tratamento com NPs de Prata com anormalidades nucleares: A: brotamento, B: ponte cromossômica. Células coradas com Schiff e aumento de 400x (MOELLMANN, 2017).

Figura 7: Resultado de índice de anormalidades nucleares (%) em células meristemáticas de *Allium cepa* (a) e *Vicia faba* (b) em relação ao diâmetro (nm) das NPs de prata. A diferença estatística significativa ($p < 0,05$) foi representada por (*).

Figura 8: Células meristemáticas de *A. cepa* expostas ao tratamento com NPs de Prata com micronúcleo em aumento de 400x (MOELLMANN, 2017).

Figura 9: Resultado de índice de micronúcleo (%) em células meristemáticas de *Allium cepa* (a) e *Vicia faba* (b) em relação ao diâmetro (nm) das NPs de prata. A diferença estatística significativa ($p < 0,05$) foi representada por (*).

LISTA DE SIGLAS

AgNPs- Nanopartículas de Prata

ANOVA- Análise de Variância

CETENE- Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste

CN- Controle Negativo

CONAMA- Conselho Nacional do Meio Ambiente

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

EDS- Electronic Data Systems

EED- Espectroscopia de Energia Dispersiva

HCl- Ácido Clorídrico

IAN- Índice de Anormalidades Nucleares

IM- Índice Mitótico

IMC- Índice de Micronúcleo

ISO- International Standardization Organization/ Organização Internacional para Padronização

LAMM- Laboratório de Microscopia e Microanálise

MET- Microscopia Eletrônica de Transmissão

ng- Nanograma

nm- Nanômetro

NPs- Nanopartículas

TEM- Transmission Electron Microscopy

Sumário

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 NANOTECNOLOGIA	13
2.2.2 NANOPARTÍCULA DE PRATA	14
2.3 TOXICOLOGIA E ECOTOXICOLOGIA	15
2.4 TESTES DE CITOXICIDADE, MUTAGENICIDADE E GENOTOXICIDADE	16
2.5 BIOINDICADORES	17
2.5.1 <i>Allium cepa</i>	18
2.5.2 <i>Vicia faba</i>	18
3. OBJETIVOS	19
3.1 OBJETIVO GERAL	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4. HIPÓTESES	20
5. MATERIAIS E MÉTODOS	21
5.1 Preparação das nanopartículas	21
5.2. Caracterização das Nanopartículas	21
5.3 Modelo vegetal para bioensaios	21
5.4 Bioensaio <i>Allium cepa</i> e <i>Vicia faba</i>	22
6. RESULTADOS	23
6.1 Caracterização da NP de Prata	23
6.2 Efeito das NPs de prata sobre o Índice Mitótico	26
6.3 Efeito das NPs de prata sobre o Índice de Anormalidades Nucleares	26
6.4 Efeito das NPs de prata sobre o Índice de Micronúcleo	27
7. DISCUSSÃO	28
8. CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS	31

1. INTRODUÇÃO

Na última década intensificou-se a utilização das nanopartículas em produtos comercializados.

Os nanoproductos são inúmeros e estão presentes em todas as áreas das grandes indústrias, como a alimentícia, eletrônica, biotecnológica, farmacêutica, têxtil, cosmética, agrícola, médica, entre muitas outras.

Considerando as suas características nanométricas em relação ao tamanho, possibilita a sua entrada em células ou em materiais abióticos facilmente (SIMONET et al., 2009).

Dentre as várias nanopartículas metálicas, pode-se destacar a nanopartícula de prata que possui maior relevância na área da saúde, pelas suas propriedades antimicrobianas. Estas são de vasta comercialização no mercado (LU et al., 2010), por serem de fácil incorporação em diferentes materiais (SOUZA et al., 2013).

Porém, o que torna as nanopartículas tão atrativas no mercado, suas características nanométricas, pode acabar constituindo um problema para os organismos vivos, principalmente para o homem, uma vez que não se conhecem as implicações do seu acúmulo nos mesmos (WEI et al., 2010).

A crescente produção e disponibilização destes produtos traz consigo um grande problema ambiental a ser enfrentado. Uma vez que esses nanomateriais são processados, produzidos e sintetizados em escalas cada vez maiores, e estão sendo descartados em efluentes sem um aviso prévio de sua toxicidade (LOVERN et al., 2007).

Os parâmetros exigidos pelo CONAMA Res. Nº 20 de 1986, Portaria 36 do Ministério da Saúde (1990), defere que efluente só podem ser lançado se tiver com valores abaixo de 0,1 mg/L de prata. Resultados obtidos nos ensaios ecotoxicológicos com *Ceriodaphnia dubia* demonstraram a toxicidade destes efluentes relacionada com a presença de prata (HOCEVAR et al., 2002).

Esses produtos contendo NPs são bioacumulados pelos organismos, uma vez que as nanopartículas e os íons de prata são liberados e não são biodegradáveis (GOTTSCHALK et al., 2009). A bioacumulação é o processo em que um determinado ser vivo absorve e retém substâncias químicas do meio. Pode ocorrer de forma direta, pela exposição do meio, ou indiretamente pela ingestão de alimentos contendo a substância (GOMES et al., 2011).

Estudos têm indicado efeitos adversos das nanopartículas na saúde humana como: inflamação, eliminação de células cerebrais e lesões pré-cancerígenas, ainda que pesquisas com seres humanos sejam desaprovados, no final da Segunda Guerra Mundial houve evidências de experiências comandadas por cientistas nazistas (NOLASCO, 2017).

Para avaliação da toxicidade das nanopartículas de prata foram realizados ensaios ecotoxicológicos em várias espécies bioindicadoras, particularmente plantas (KANAYA et al., 1994). *Allium cepa* e *Vicia faba* são exemplos de vegetais que são comumente utilizados para estudos de genotoxicidade e mutagenicidade. Esses bioindicadores também têm grande importância no monitoramento ambiental, permitindo avaliar a toxicidade de muitos outros compostos químicos (BAGATINI et al., 2007).

Considerando a carência de estudos sobre os efeitos adversos das nanopartículas países em desenvolvimento como o Brasil, em constantes avanços tecnológicos (FUNARI et al., 2005), devem buscar monitoramento dos consumos de materiais contendo nanopartículas. Sendo assim de suma importância a avaliação dos efeitos negativos que alteram o material genético dos seres vivos e permanecem nos ecossistemas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 NANOTECNOLOGIA

No século IV d.C. partículas metálicas nanométricas eram usadas pelos romanos na decoração de vidrarias e copos. Um exemplo desta aplicação é o Copo de Lycurgus, feito de NPs de ouro e prata, misturadas com vidro. Devido à presença de nanopartículas a coloração do copo mudava de acordo com a incidência da luz, iluminação normal e iluminação a partir do interior do copo. Outro exemplo desta aplicação, são os famosos vitrais dos séculos X, XI e XII (LOGOTHETIDIS, 2012).

As nanopartículas estão presentes naturalmente no meio ambiente, podendo ser apresentadas em minérios ou provocadas a partir de combustão incompleta de combustíveis fósseis e erupções vulcânicas (NOWACK et al., 2007). Porém, as nanopartículas ou nanomaterial, são termos utilizados apenas para determinar partículas em escalas nanométricas sintetizadas industrialmente, como por exemplo, os óxidos metálicos, fulerenos, nanotubos de carbono, nanopartículas metálicas, entre outros (HOYT et al., 2008; FELIU et al., 2010).

A Organização Internacional de Padronização (International Standardization Organization – ISO), estabelece que a NP é um material que expõe pelo menos uma de suas dimensões em escala nanométrica (MIRANDA, 2017). Porém, na literatura são encontradas e aceitas classificações levando em consideração outras propriedades, como morfologia, composição, dimensão e uniformidade (BYSTRZEJEWSKA-PIOTROWSKA et al., 2009).

As propriedades das nanopartículas têm por base o aumento das superfícies envolvidas, quando comparadas a partículas de maiores dimensões, aumentando assim as áreas de contato. Quando uma partícula apresenta um tamanho inferior, no caso a nanopartícula, grande parte dos seus átomos concentram-se na superfície, quando comparado com as camadas mais internas. Uma vez que reações químicas ocorrem na superfície, isso significa que as nanopartículas, são mais reativas que um material feito de partículas maiores (GARCIA et al., 2011).

Assim, a correlação entre a porcentagem de átomo na superfície e o volume da partícula, abrange maior reatividade atômica na superfície, dando assim às NPs, características magnéticas, físicas, químicas, catalíticas e elétricas, o que não ocorre em materiais de escala não-nanométrica (NEL et al., 2006; SIERRA et al., 2016).

As inovadoras propriedades encontradas nas NPs, vêm conferindo o avanço tecnológico e científico em diversas áreas, como biomédica, farmacêutica, eletrônica, biorremediação ambiental e agrícola (KUMARI et al., 2016; PETERS et al., 2016).

Atualmente, há 1827 produtos cadastrados que contém algum tipo de NP incorporada, de acordo com o Nanotech Project (VANCE et al., 2015). Esse uso crescente dos nanomateriais vem se tornando preocupação, pelos efeitos adversos que pode causar em humanos e meio ambiente (FELIU et al., 2010).

Com o uso desenfreado e o avanço da nanotecnologia, surgiu a necessidade de abordar os efeitos nocivos da produção em larga escala desses nanomateriais. Dessa forma, a nanotoxicologia surgiu com o intuito de contribuir para a sustentabilidade e o desenvolvimento seguro da nanotecnologia (DONALDSON, 2004).

Existem vários tipos de nanopartículas com diferentes dimensões e utilidades. Como nanopartículas metálicas comuns como ouro, ferro, prata, e outras menos comuns como as nanopartículas de dióxido de ferro, fulerenos. Podemos destacar a nanopartícula de prata como uma das principais por ser especialmente utilizada na área medicinal (MARTINS et al., 2012).

2.2.2 NANOPARTÍCULA DE PRATA

A prata possui propriedades antimicrobianas amplamente conhecidas. No entanto, vem sendo utilizada de forma crescente, na sua forma de tamanho mais reduzido, como nanopartículas. Nessa forma, sua superfície de contato é extremamente maior, sendo os seus efeitos e propriedades potencializados. A medicina comprovou que a prata destrói mais de 650 organismos patogênicos (GARCIA et al., 2011). Aproximadamente 25% dos produtos cadastrados no banco de dados Nanotech Project são incorporados nanopartículas de prata (AgNPs) para sua confecção (VANCE et al., 2015).

Porém, as NPs de prata têm mostrado efeitos adversos e estão sendo reportados em diferentes organizações biológicas (GLIGA et al., 2014; MONFARED et al., 2015; WU et al., 2010), despertando assim preocupação para o meio científico. É possível ver em outras publicações com modelos *in vivo* e *in vitro* que demonstraram a toxicidade das NPs de prata não apenas com a concentração (CARLSON et al., 2008; WU et al., 2010), mas também com a dimensão da nanopartícula (MIETHLING-GRAFF et al., 2014; KUMAR et al., 2015).

Modelos propostos (CLEVELAND et al., 2012) indicam que os nanomateriais são capazes de penetrar em águas superficiais, podendo interagir com os organismos e levar à exposição humana, pelo contato direto ou pelo consumo da água (CHRISTENSEN et al., 2010; WEIR et al., 2012; MARKUS et al., 2013). Assim, as NP de prata, sendo as mais comercializadas em produtos, seu aparecimento no ambiente pode se tornar uma via para a contaminação humana (MIRANDA, 2017).

A regulamentação existente serve apenas para a quantidade de prata total presente em águas para diversos fins, como por exemplo, consumo humano, práticas de lazer, consumo animal e efluentes (NASCIMENTO et al., 2016). A concentração de NPs de prata prevista para ambientes naturais, seja entre 0.088-10.000 ng/L (KIM et al., 2016). Segundo o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), nas águas destinadas ao consumo humano, a quantidade total de prata permitida é de 0,01 mg/L (CONAMA, 2011). Pela Portaria 36 do Ministério da Saúde (1990), o teor máximo de prata aceitável em águas destinadas ao consumo humano é de 0,05 mg/L, diferentemente do CONAMA como pode ser visto anteriormente, não tendo um senso comum. A preocupação para com a prata é justificável, uma vez que as indústrias despejam no ambiente lixos tóxicos contendo diversos poluentes, incluindo a prata e outros metais pesados (MENDES, 2007).

Atualmente, não existe regulamentação específica para nanopartículas de prata, ainda que os efeitos da prata na saúde humana e outros seres vivos sejam já bem conhecidos e considerando o aumento desses efeitos com a diminuição do tamanho das partículas (MENDES, 2007).

2.3 TOXICOLOGIA E ECOTOXICOLOGIA

A toxicologia é a ciência que estuda os efeitos adversos que resultam das interações de substâncias químicas com o organismo, tendo como objetivo prevenir, avaliar e reverter a intoxicação (RUPPENTHAL, 2013).

A avaliação da toxicidade de um composto realiza-se em duas fases. Primeiro é feita a identificação da periculosidade de forma a determinar se a exposição a determinado composto pode aumentar a ocorrência de efeitos adversos nos organismos, e se estes podem ocorrer em seres humanos. Em seguida é realizada a avaliação de dose-resposta, na qual se quantifica a toxicidade do composto e caracteriza a relação entre a dose do contaminante e a ocorrência de efeitos adversos na população exposta (ALMEIDA, 2014; VARGAS, 2017).

Porém, diferentemente do que acontece com outros contaminantes, a toxicidade das NPs depende de suas características físico-químicas e não somente da sua dose ou concentração. Apesar de materiais em escala convencionais a nível molecular, ser de potencial tóxico amplamente conhecidos, os nanomateriais ainda estão sendo estudados e descobertos (ELSAESSER et al., 2012).

Truhaut (1977), foi o primeiro a utilizar o termo ecotoxicologia, derivado das palavras ecologia e toxicologia. Este termo foi introduzido de modo a refletir o receio decorrente da crescente introdução de compostos químicos no ambiente (ALMEIDA, 2014).

Assim, a ecotoxicologia tem como objetivo o monitoramento do ambiente, avaliando a resposta dos organismos quanto à interação com determinadas substâncias externas ao meio, analisando os efeitos prejudiciais dessas substâncias nos organismos vivos, monitorando a sua ação e entendendo como agem, afim de formular estratégias para a reversão desses efeitos do processo (AZEVEDO et al., 2003; ALMEIDA, 2014).

2.4 TESTES DE CITOXICIDADE, MUTAGENICIDADE E GENOTOXICIDADE

Para testar a toxicidade de substâncias, são realizados ensaios laboratoriais, sob condições experimentais controladas e específicas. Esses testes servem para avaliar efluentes industriais e amostras ambientais, ou substâncias isoladas. São usados organismos-testes nesses ensaios, sendo esses expostos a diferentes concentrações da amostra estudada e os efeitos causados pela amostra são observados e quantificados (RIBO, 1997; DORNFELD, 2002). Apesar dos testes mostrarem a toxicidade de uma determinada substância, não é possível relacionar os resultados de toxicidade entre espécies diferentes, assim, os organismos-teste não obtêm uma resposta de risco absoluta para a humanidade (RIBO, 1997).

De forma a determinar a toxicidade a nível celular, são realizados testes de mutagenicidade, genotoxicidade e citotoxicidade, por meio da análise de micronúcleos, alterações cromossômicas e índice mitótico (IM). Esse índices possibilitam observar os efeitos dos compostos químicos sobre um determinado bioindicador por meio de sua resposta à exposição desse agente (PEDREIRO, 2016).

O teste de micronúcleo (MCN) é um dos mais utilizados para avaliações do potencial mutagênico de poluentes e tem como vantagem uma alta sensibilidade e eficácia, além de oferecer vantagens como baixo custo financeiro, preparações citológicas simples e de rápida execução (FLORES et al., 2008; BALLESTRERI, 2017).

Os micronúcleos correspondem a pequenas massas de cromatina, derivadas de eventos clastogênicos, ou aneugênicos que são inclusos ao núcleo principal da célula filha, durante a divisão celular. Esses fragmentos acêntricos permanecem atrasados na anáfase, enquanto os cromossômicos com centrômero são migrados em direção aos pólos do fuso. Assim, esses fragmentos de DNA são deixados para trás, incorporando dentro de núcleos secundários, chamados assim de micronúcleo (CORRÊA et al., 2009). Essas estruturas continuam no citoplasma das células da interfase, formando a própria membrana nuclear e por isso são parecidos com seus núcleos normais, porém bem menores (FERRAZ et al., 2016).

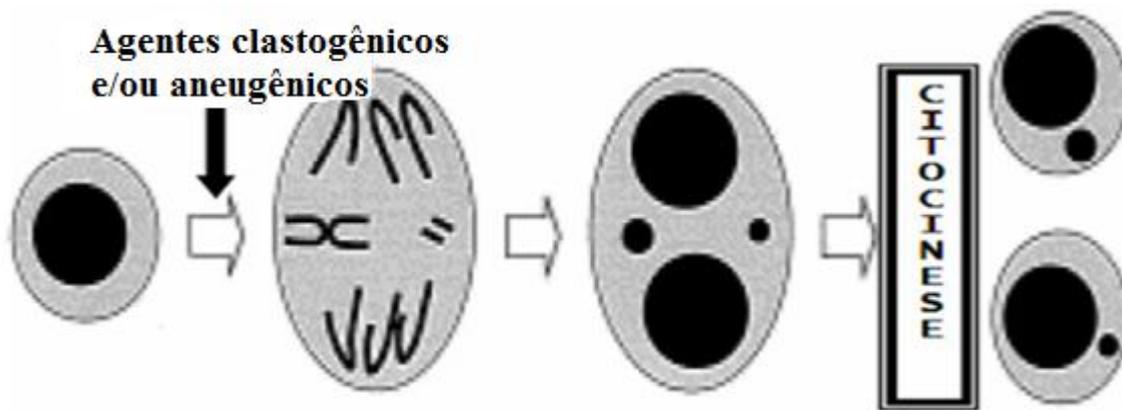


Figura 1: Diagrama da formação de micronúcleo em células adaptado de (SILVA, 2011).

Além dos MCNs outras alterações genéticas podem ser observadas em células expostas a substâncias mutagênicas e/ou genotóxicas. As alterações mais comuns em células meristemáticas, são células com brotamento nuclear, perda cromossômica e menos comum, as pontes cromossômicas (ESTÉCIO et al., 2002).

O índice mitótico (IM) é determinado a partir do número de células em divisão celular, nas fases prófase, metáfase, anáfase e telófase em relação ao número total de células. Quando ocorre uma baixa taxa de índice mitótico, quer dizer que o agente em que as células foram expostas é citotóxico, inibindo sua divisão celular (IGANCI et al., 2006).

2.5 BIOINDICADORES

Os bioindicadores são um meio de monitoramento ambiental, onde estabelece informações sobre a resposta biológica de um organismo, podendo ser animal ou vegetal, que na presença de agentes químicos e outros poluentes reagem naquele determinado ambiente (LINS, 2017). As espécies de determinado habitat podem ser usadas como indicadores pioneiros quando ocorre a contaminação desse ambiente em que vivem (ADAMS, 2002).

Quando se faz a escolha de um bioindicador, devem-se relacionar as características do mesmo de acordo com o estudo e seus objetivos. O bioindicador para ser ideal deve apresentar algumas características, como por exemplo, resistência ao contaminante em que será submetido a exposição. Outra característica importante que pode facilitar o processo do estudo em questão, é a grande quantidade da espécie escolhida no ambiente e a adaptabilidade aos ensaios submetidos no laboratório (AKAISHI, 2004).

Tem aumentado o interesse de empregar plantas superiores, por sua sensibilidade ser maior para encontrar agentes ambientais mutagênicos. São descritos diferentes vegetais desde 1913,

quando foi aplicado *Vicia faba* e *Allium cepa* em experimentos com radiação (CARVALHO, 2005).

2.5.1 *Allium cepa*

A *Allium cepa* pertence à família Alliaceae, divisão Magnoliophyta e classe Liliopsida. A *Allium cepa* é popularmente conhecida como cebola (WITTER et al., 2003).

O gênero *Allium*, possui oito pares de cromossomos. Todas as espécies conhecidas de cebola são alógamas, ou seja, de reprodução cruzada entre as plantas. *Allium cepa* não é encontrada de forma silvestre, sendo somente de cultivo domesticado (OLIVEIRA et al., 2003).

O teste de toxicidade utilizando a *Allium cepa* como bioindicador é muito sensível para produtos químicos, substâncias sintéticas ou naturais, e o tempo de dose-resposta é curto, sendo assim um ótimo método para avaliação de toxicidade de compostos (HISTER, 2017).

2.5.2 *Vicia faba*

Assim como a *Allium cepa*, o teste de toxicidade utilizando a *Vicia faba* como bioindicador também é muito sensível, sendo cada vez mais utilizada para estudos com testes de anormalidades cromossômicas (MALALLAH et al., 1996).

A *Vicia faba* é pertencente à família Fabaceae, também da divisão Magnoliophyta, e da classe Magnoliopsida. Possui seis pares de cromossomos e é popularmente conhecida como feijão-fava. Não é muito conhecida entre os brasileiros, porém consumida no nordeste, sendo nativa do Norte da África e Sudoeste da Ásia. É uma planta cultivada há mais de seis mil anos no oriente médio (CAMARGO, 2013).

O feijão-fava é predominantemente autógama, porém apresenta auto incompatibilidade com seu sistema reprodutivo misto, tendo um nível de cruzamento de até 48%, podendo realizar reprodução cruzada (PENHA, 2014).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos citogenéticos das nanopartículas de prata em *Allium cepa* e *Vicia faba*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade causadas pelas diferentes dimensões de NPs de prata em células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* e *Vicia faba*
- Comparar as respostas aos tratamentos de nanopartículas de prata nas espécies: *Allium cepa* e *Vicia faba*

4. HIPÓTESES

H0: Não existe associação significativa ($p < 0,05$) entre as diferentes dimensões de nanopartículas de prata quanto aos aspectos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos em *Allium cepa* e *Vicia faba*.

H1: Existe associação significativa ($p < 0,05$) entre pelo menos uma das dimensões de nanopartícula de prata na avaliação de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Preparação das nanopartículas

Para os testes, foram utilizadas soluções de nanopartículas de prata da marca NanoComposix® adquiridas comercialmente, com as seguintes dimensões: 5, 25, 50 e 75 nm segundo informações do fabricante.

Nas soluções de nanopartículas (NPs) de prata, foram acrescentadas 50 mL de água destilada e dispersadas por vibração ultrassônica por 30 min, para garantir a homogeneização das amostras. A concentração preparada para este teste foi de 100 mg/L.

5.2. Caracterização das Nanopartículas

A caracterização das NPs de prata foi feita por meio de microscopia eletrônica de transmissão (TEM, do inglês: *Transmission Electron Microscopy*), nos diâmetros, 5, 25, 50 e 75 nm, para posterior análises de Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS, do inglês: *Electronic Data Systems*). O microscópio utilizado é da marca FEI, modelo Tecnai G2, de 200 kV. As soluções de NPs foram agitadas em ultrassom por um tempo de 10 min. Posteriormente, uma camada fina dessa solução foi colocada em um filme do tipo de microscopia *Holey Carbon*. Sobre uma grade de cobre para microscopia, o filme foi preparado. Essa fina camada da solução, com auxílio de uma argola de 3 mm de diâmetro foi mergulhada na solução e colocada na superfície do filme. Esperou-se pela secagem por 24 h, para que as grades fossem analisadas no microscópio. A caracterização das NPs por MET, foi realizada no Laboratório de Microscopia e Microanálise (LAMM), no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), na cidade de Recife, Pernambuco.

5.3 Modelo vegetal para bioensaios

As sementes utilizadas para os experimentos, tanto de *Allium cepa* (variedade Baía Periforme), quanto a de *Vicia faba*, foram adquiridas comercialmente da Marca Isla® (Isla Sementes Ltda., Brasil). São sementes livres de fungicidas e outros agroquímicos de acordo com informações do fabricante.

5.4 Bioensaio *Allium cepa* e *Vicia faba*

Para os testes com *Allium cepa* e *Vicia faba* utilizou-se 50 sementes de cada espécie para cada dimensão. Para *A. cepa* as sementes foram dispersas em placas de petri contendo papel filtro, e para *V. faba* foram colocadas em bandejas entre duas camadas de algodão. Ambas foram regadas com água destilada em ambiente controlado a 24 °C até as raízes atingirem aproximadamente 1 a 2 cm de comprimento. Após o período de germinação, foram selecionadas 10 raízes e transferidas por 24 h para Beckers contendo as NPs para cada tratamento (5, 25, 50 e 75 nm) e também para o controle negativo (CN) com água destilada. Após 24 h de tratamento, as sementes expostas as NPs e CN foram transferidas para placas de petri contendo água destilada por um período de 24 h para recuperação.

Posteriormente a esse tempo de recuperação, as sementes foram coletadas e fixadas em solução de Carnoy, sendo imersas numa solução contendo álcool e ácido acético na proporção de 3:1 v/v, durante 24 h. Posteriormente foram lavadas com água destilada.

As raízes foram hidrolisadas com HCL 1N a 60°C durante 10 min para a preparação das lâminas, e posteriormente lavadas com água destilada e coradas com reagente de Schiff por 2 h. Posterior a esses procedimentos, as regiões meristemáticas de *A. cepa* e *V. faba* foram coradas com 0,5 mL de Carmim acético 45% e cobertas com lamínula. Para cada bioensaio e tratamento foram preparadas cinco lâminas. Posteriormente, as lâminas foram observadas em microscópio óptico Nikon, em um aumento de 400x. Um total de 1000 células por lâminas foram observadas e contadas no programa de contagem ImageJ (SCHINDELIN et al., 2012).

Para o cálculo dos índices mitótico (IM), de anormalidades nucleares (IAN) e de micronúcleo (IMC) e conseqüentemente avaliação de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$IM = \frac{\text{Total de células em divisão}}{\text{Total de células observadas}} \times 100$$
$$IMC = \frac{\text{Total de células com micronúcleo}}{\text{Total de células observadas}} \times 100 \quad IAN = \frac{\text{Total de células alteradas}}{\text{Total de células observadas}} \times 100$$

5.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), utilizando o software Origin 8.5. Para tais análises foi realizado o teste de E. student ($p \leq 0,05$) para comparação das médias.

6. RESULTADOS

6.1 Caracterização da NP de Prata

As análises microscópicas do diâmetro das NPs de prata utilizadas nos experimentos, foram feitas por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET), que forneceu imagens de alta resolução, possibilitando o cálculo da distribuição das dimensões das partículas (Figura 2).

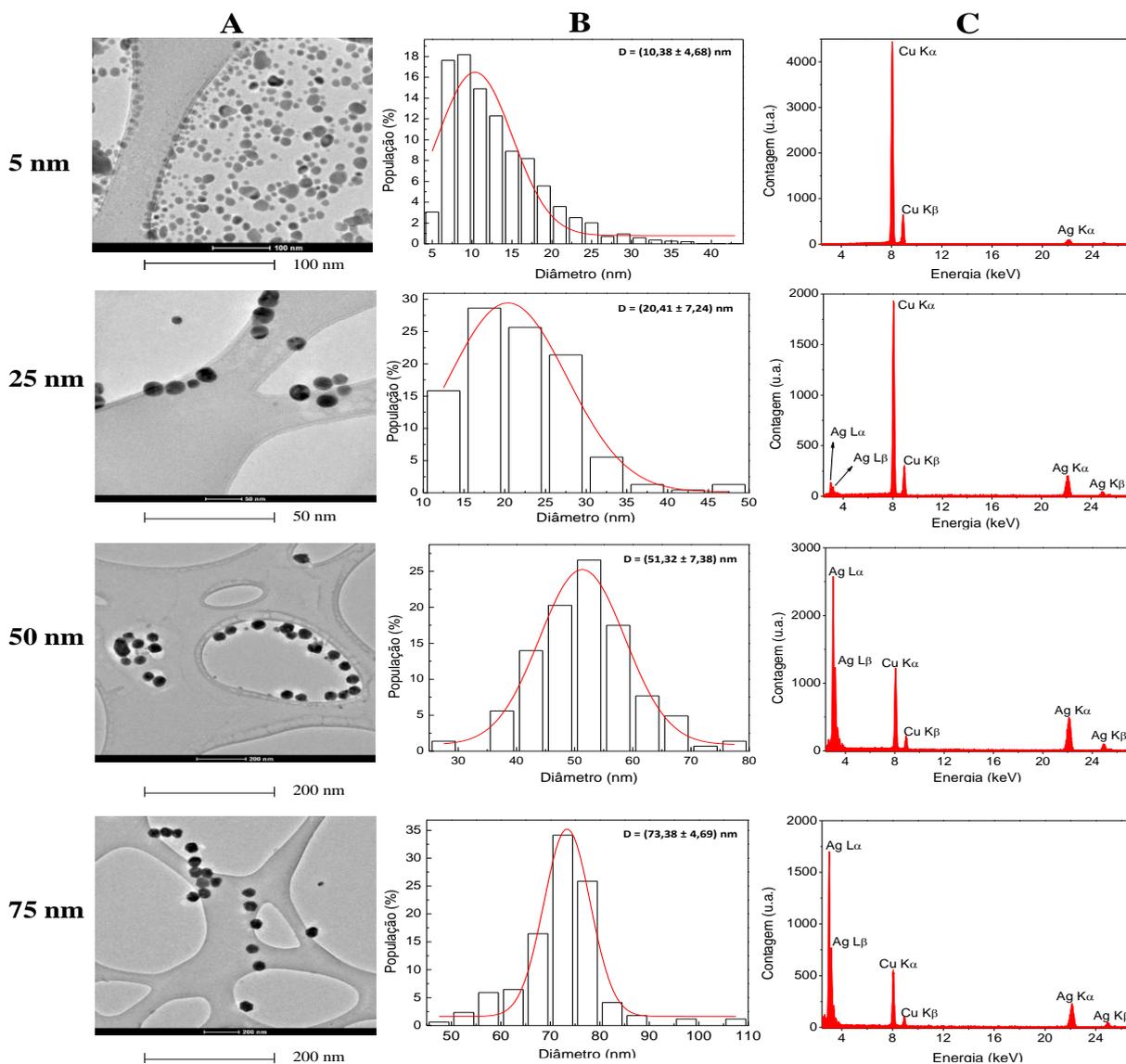


Figura 2: Coluna A: Imagem Microscopia Elettronica de Transmissão das NPs de prata: 5, 25, 50 e 75 nm; Coluna B: Cálculo da distribuição das dimensões em diâmetros das partículas; Coluna C: Espectroscopia de Energia Dispersiva para as NPs de prata (FALCO, 2018).

A Figura 2 (coluna A) apresenta imagens obtidas por MET das NPs de prata de 5, 25, 50 e 75 nm. Na Figura 2 (coluna B) foi apresentado o cálculo da distribuição das

dimensões das partículas. Para as nanopartículas de 5 nm, apesar do fabricante informar que estas eram esféricas e que seu diâmetro médio era de 5 nm, as imagens sugeriram que a forma dessas partículas são assimétricas. Outro aspecto relevante observado foi que apenas 3% das nanopartículas possuíam o diâmetro em torno dos 5 nm, enquanto a maioria apresentava diâmetro superior a 10 nm. A análise de imagem para as NPs de prata de 25 nm revelou que estas possuíam uma forma denominada octaédrica truncada, diferenciando também do formato descrito pelo fabricante, ou seja simétrica.

No histograma da Figura 2 (coluna B) foi possível verificar que as nanopartículas de 25 nm apresentaram porcentagem maior de partículas com diâmetros variáveis entre 10 e 25 nm, apesar da existência de partículas de até 50 nm. Em relação às NPs de prata de 50 nm foi possível averiguar que as mesmas apresentavam distribuição de diâmetro mais homogêneo, quando comparada às NPs de prata de 5 nm, contendo partículas com diâmetros desde 25 até 80 nm, com porcentagens populacionais maiores em torno de 50 nm. Nas NPs de 75 nm também se verificou a forma octaédrica truncada, e a distribuição do diâmetro mostrou-se mais uniforme, contendo partículas com diâmetros desde 45 até 110 nm, tendo sua maior porcentagem concentrada entre 65 e 80 nm.

A Figura 2 (coluna C) apresentou o espectro do tipo EED para as NPs de prata de 5, 25, 50 e 75 nm obtidos por meio das análises de MET. Foi possível observar a presença de picos característicos da prata como em 2,984 keV referente à transição La1, em 3,150 keV referente à transição Lb1, em 22,162 keV referente à transição Ka1 e em 24,942 keV referente à transição Kb1. As linhas de cobre presentes no espectro são referentes à grade de cobre utilizada para a deposição do filme contendo as amostras durante as medidas de MET.

A Figura 3 estabeleceu a área superficial das nanopartículas em função do diâmetro. Sendo as partículas esféricas, a área superficial foi calculada pelo total nas alíquotas em 1 litro de solução, com as NPs em concentração de 100 mg/L. Os quatro primeiros pontos na cor preta, correspondem aos valores nominais de diâmetro estabelecidos pelo fabricante das NPs de prata, já os pontos restantes em vermelho, são a extrapolação usada para visualizar amplamente a estimativa. É visível, que quanto menor o diâmetro das partículas, maior são os valores da área superficial total. Por essa justificativa, que as partículas em nanômetros se comportam distintamente quando comparadas com as partículas em micrômetros. As nanopartículas apresentam maior mudança, física, química e biológica, por ter sua grande área superficial em disposição para contato.

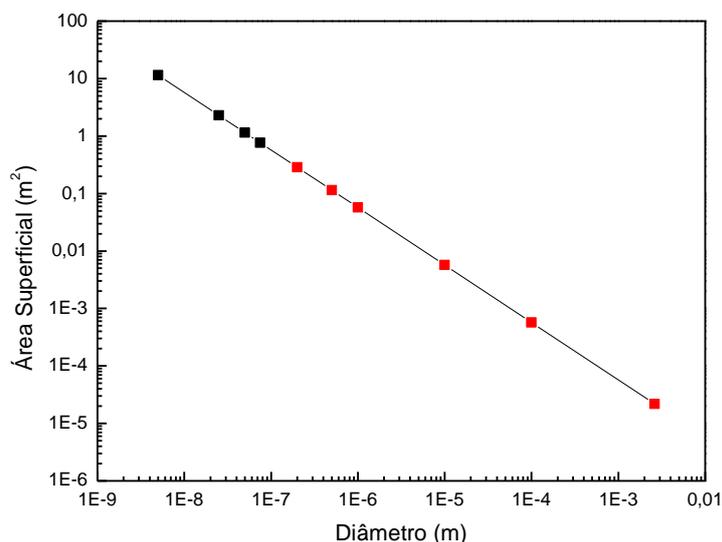


Figura 3: Extrapolação do cálculo da área superficial total das NPs de prata em função do diâmetro (FALCO, 2018).

Na Figura 4 foi apresentado o gráfico que indica o cálculo da área superficial total, o mesmo realizado anteriormente, porém, desta vez, comparando valores nominais do diâmetro de 5, 25, 50 e 75 nm das NPs de prata, que são informados pelo fabricante com os reais valores dos diâmetros das NPs, que foram calculados das imagens de MET. Os valores reais do diâmetro da área superficial total aumenta em um valor de 615% quando diminuído o diâmetro de 73,38 para 10,38 nm. Para as partículas de 20,41 nm quando comparada com as partículas de 73,38 nm a área superficial total é cerca de 260% maior. Já para as NPs de prata de 51,32 nm, existe um aumento de 44% quando comparado com as NPs de prata de 73,38 nm. Nesse gráfico o erro expresso, é o máximo aproximado para a forma esférica, estimando-se em 16%.

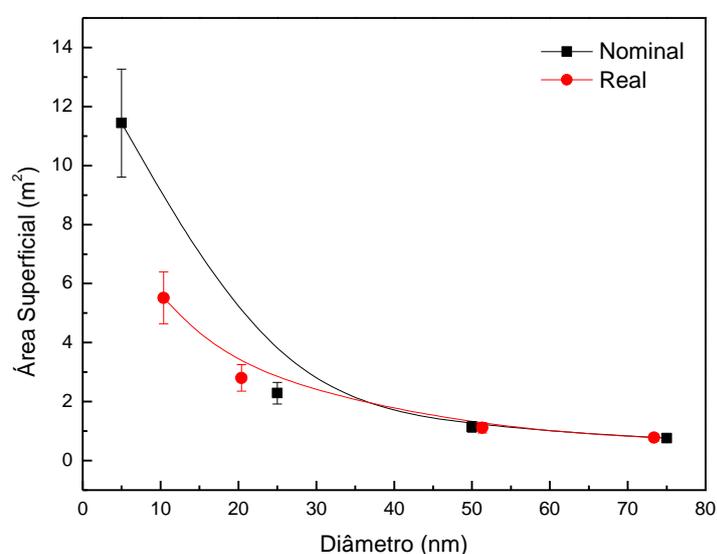


Figura 4: Demonstração da área superficial total das NPs de prata em função do diâmetro (FALCO, 2018).

6.2 Efeito das NPs de prata sobre o Índice Mitótico

Os bioensaios com *Allium cepa* e *Vicia faba* avaliaram os efeitos citotóxicos das NPs de prata em relação ao índice mitótico. Os testes realizados pela exposição de NPs de prata, revelaram uma resposta tóxica quanto a sua menor dimensão em relação as espécies estudadas

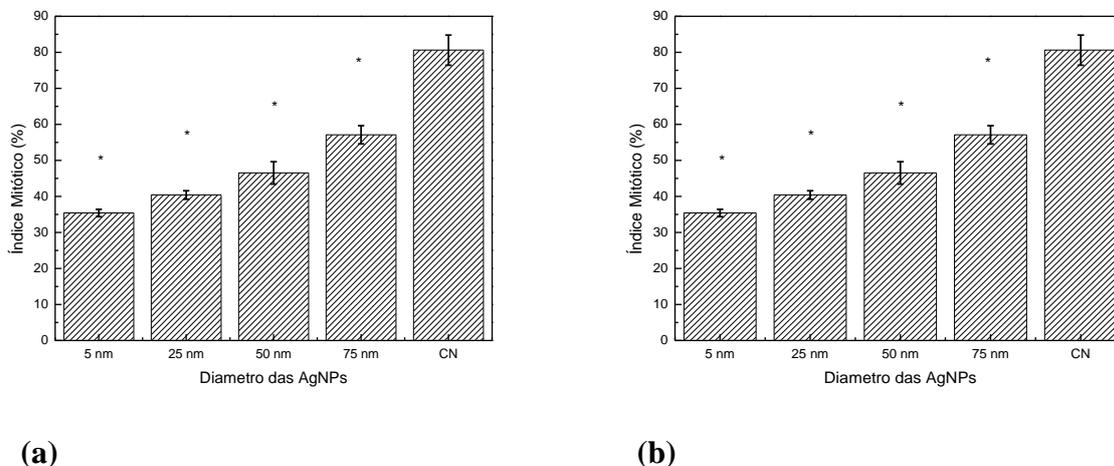


Figura 5: Resultado de índice mitótico (%) em células meristemáticas de *Allium cepa* (a) e *Vicia faba* (b) em relação ao diâmetro (nm) das NPs de prata. A diferença estatística significativa ($p < 0,05$) foi representada por (*).

Os dados para índice mitótico presentes nas Figura 5, mostraram que quanto menor a dimensão da nanopartícula de prata, menor foi o índice mitótico apresentado para ambos os bioensaios, quando comparado com o CN, apresentando assim, citotoxicidade para as células meristemáticas de *Allium cepa* e *Vicia faba*.

6.3 Efeito das NPs de prata sobre o Índice de Anormalidades Nucleares

Os efeitos genotóxicos dos tratamentos foram observados por meio da avaliação do índice de anormalidades nucleares encontradas nas células meristemáticas das raízes de *Allium cepa* e *Vicia faba*, sendo o brotamento mais comum e as pontes cromossômicas menos comuns (Figura 6).

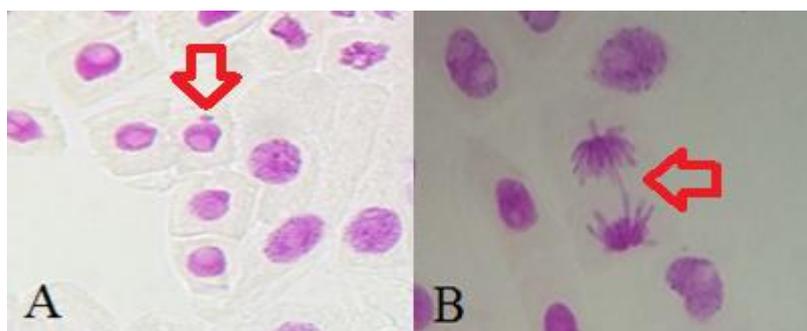


Figura 6: Células meristemáticas de *A. cepa* expostas ao tratamento com NPs de Prata com manifestações de anormalidades nucleares: A: brotamento, B: ponte cromossômica. Células coradas com Schiff e aumento de 400x (MOELLMANN, 2017).

A Figura 7 mostrou a avaliação do índice de anormalidades nucleares, decorrente dos tratamentos com as NPs de prata, encontradas nas células meristemáticas de *Allium cepa* e *Vicia faba*. Quanto menor a dimensão da NP de prata maior é o IAN apresentado, quando comparado com o CN, mostrando ter efeito genotóxico nas células meristemáticas dos bioensaios.

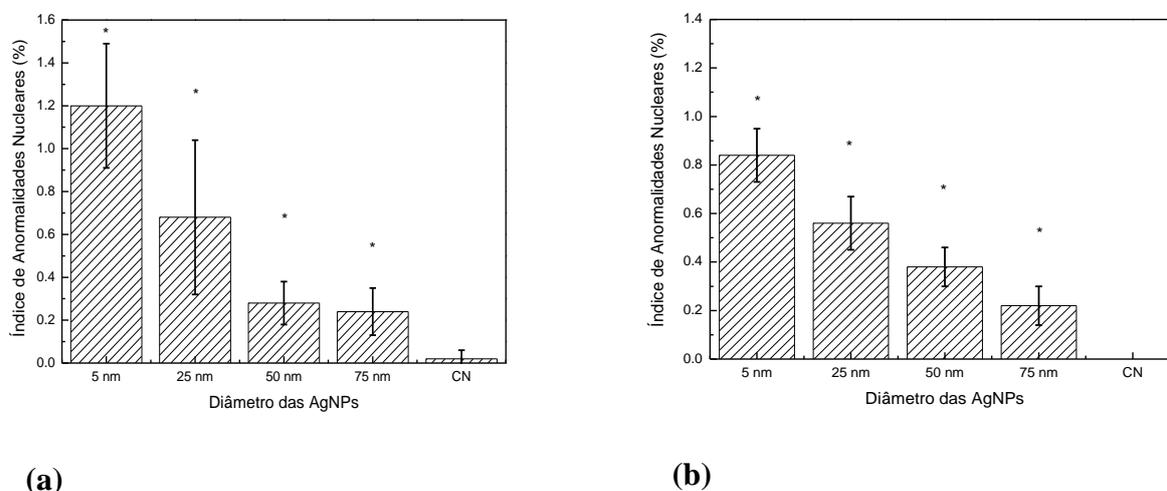


Figura 7: Resultado de índice de anormalidades nucleares (%) em células meristemáticas de *Allium cepa* (a) e *Vicia faba* (b) em relação ao diâmetro (nm) das NPs de prata. A diferença estatística significativa ($p < 0,05$) foi representada por (*).

6.4 Efeito das NPs de prata sobre o Índice de Micronúcleo

Os efeitos mutagênicos dos tratamentos foram observados através da avaliação do índice de micronúcleo, encontradas nas células meristemáticas das raízes de *Allium cepa* e *Vicia faba* (Figura 8).

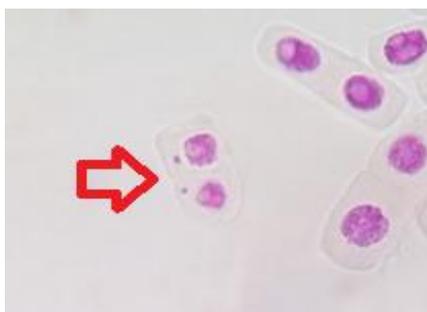


Figura 8: Células meristemáticas de *A. cepa* expostas ao tratamento com NPs de Prata com manifestações de micronúcleo. Células coradas com Schiff e aumento de 400x (MOELLMANN, 2017).

Os dados da Figura 9, mostram que o índice de micronúcleo (IMC) aumenta à medida que diminui o tamanho das NPs de prata. Todas as dimensões de NPs de prata apresentaram, mesmo que minimamente, mutagenicidade para as sementes de *Allium cepa*.

O mesmo acontece com o IMC nas sementes de *Vicia faba*, quando diminui a dimensão da NP de prata maior é o IMC, quando comparado ao CN, apresentando assim, mutagenicidade para as células meristemáticas de *Vicia faba*.

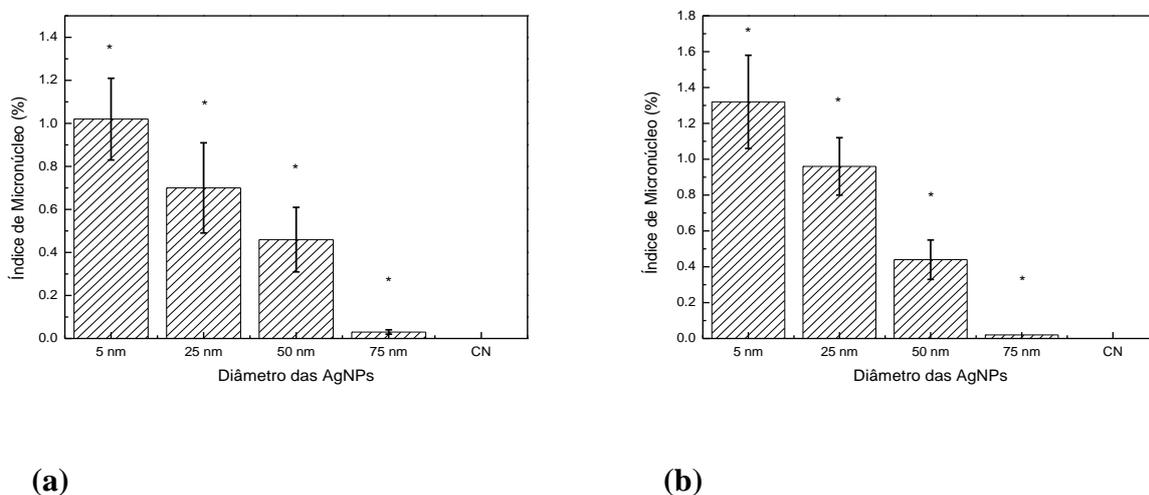


Figura 9: Resultado de índice de micronúcleo (%) em células meristemáticas de *Allium cepa* (a) e *Vicia faba* (b) em relação ao diâmetro (nm) das NPs de prata. A diferença estatística significativa ($p < 0,05$) foi representada por (*).

7. DISCUSSÃO

A dimensão é um fator importante que pode determinar a citotoxicidade das NPs de prata (NAIR et al., 2014).

Os resultados mostram que quanto menor a nanopartícula de prata, maior é a redução do índice mitótico das células meristemáticas, tanto para *Allium cepa* quanto para *Vicia faba*. Essa redução do índice mitótico nos tratamentos indica que as NPs de prata foram citotóxicas, podendo ter ocorrido devido a uma inibição na síntese de DNA na fase S das células dos bioensaios (MOHAMMED et al., 2015).

Os resultados de índice de anormalidades nucleares indicam que quanto menor a nanopartícula de prata, mais anormalidades as mesmas causaram para as células, tanto de *Allium cepa* quanto de *Vicia faba*. As anormalidades nucleares dos cromossomos são causadas pelas alterações de sua estrutura, que pode ser resultado de rupturas ou troca de material genético. A aderência dos cromossomos pode ser atribuída ao emaranhamento das fibras de cromatina, sendo comum quando os cromossomos são expostos em agentes genotóxicos sendo provavelmente irreversível (DARLINGTON et al., 1951).

Anormalidades nucleares também foram visualizadas em células meristemáticas de plantas agrícolas como na *Zea mays* quando expostas a NPs metálicas (RACUCIU et al., 2007).

Os mesmos resultados foram observados para o índice de micronúcleo, onde quanto menor as nanopartículas mais micronúcleos apareceram nas células. A formação de micronúcleo mostra que as NPs de prata são mutagênicas. Foram observados resultados semelhantes em outras pesquisas (XU et al., 2012), onde as nanopartículas possuem potencial mutagênico.

As nanopartículas de menores dimensões causaram maiores danos nas células dos dois bioindicadores, provavelmente as partículas maiores seriam muito grandes para penetrar nas paredes celulares das raízes, assim a acumulação das partículas na parede pode conduzir a uma diminuição na condutividade dessas paredes, pela acumulação das mesmas na camada limite da célula. O que pode explicar os maiores danos causados pelas menores dimensões (menores que 25 nm) das nanopartículas (ASLI et al., 2009).

A composição química, estrutura química, tamanho da partícula e área superficial das nanopartículas estão altamente relacionadas com a sua citotoxicidade, ainda tendo partes inexploradas pelo homem. A citotoxicidade das NPs podem ser devido a duas ações diferentes, sendo a primeira vindo do produto químico da composição da mesma, como por exemplo, a liberação de íons e a segunda, vindo do estresse ou estímulo causado pela sua superfície, tamanho e forma das partículas (BRUNNER et al., 2006).

Os resultados indicam que as nanopartículas de prata são capazes de atravessar a parede celular das células vegetais e causarem danos no material genético. E ainda que, as plantas apresentam classes e famílias distintas, os resultados foram parecidos, sendo os efeitos dependentes do tamanho das nanopartículas.

8. CONCLUSÃO

As NPs de prata nas células através da parede celular, em contato direto com a planta alteram a divisão celular e provocar alterações nucleares tanto em *A. cepa* quanto na *V. fava*. Notou-se que a medida que o tamanho das NPs de prata diminuiu houve aumento dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos nas células. Assim, essas constatações apresentam que esses resultados estão relacionados ao tamanho das NPs, pois a medida que diminui seu tamanho, aumenta a sua área superficial total que interage com a planta para uma dada concentração de NPs.

Portanto, estes resultados contribuem com informações complementares sobre a toxicidade das NPs de prata em sistemas de plantas superiores e bases para o entendimento da importância das propriedades das diversas NPs e seus riscos para o meio ambiente.

Além disso, podemos concluir que os dois sistemas usados para os testes (*A. cepa* e *V. faba*) mesmo apresentando classes e famílias distintas, obtiveram resultados parecidos e complementares, nos mostrando que ambos os testes são eficientes para avaliação do potencial das nanopartículas em promover danos genéticos.

REFERÊNCIAS

ADAMS, S. M. Biological indicators of aquatic ecosystem stress. **Americas Fishers Society**, v. 3, p. 104-112, 2002.

AKAISHI, F. M. et al. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Atyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 244-253, 2004.

ALMEIDA, P.R. **Toxicidade aguda (LC50) e efeitos comportamentais e morfológicos do formulado comercial Roundup Original R em girinos de *Physalaemus cuvieri*(Anura, Leptodactylidae) e *Rhinella icterica*(Anura, Bufonidae).**2014.96f. Dissertação(Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental)- Universidade Federal de Alfenas.Poços de Caldas, Minas Gerais, 2014.

ASLI, S.; NEUMANN, P. M. Colloidal suspensions of clay or titanium dioxide nanoparticles can inhibit leaf growth and transpiration via physical effects on root water transport. **Plant, cell & environment**, v. 32, n. 5, p. 577-584, 2009.

AZEVEDO, F.A. de; CHASIN, A.A. da M. As bases toxicológicas da ecotoxicologia. **São Carlos, SP: RiMa**, v. 2004, 2003.

BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F. da; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Rev Bras Farmacogn**, v. 17, n. 3, p. 444-7, 2007.

BALLESTRERI, E. Teste de micronúcleos como ferramenta para avaliação da exposição ocupacional a pesticidas: revisão. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 10, n. 1, 2017.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional de Meio Ambiente, CONAMA. **Resolução CONAMA nº 20**, de 18 de junho de 1986. –In: Resoluções, 1986. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br>> Acesso em: 12.set.2017.

BRUNNER, T. J. et al. In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. **Environmental science & technology**, v. 40, n. 14, p. 4374-4381, 2006.

BYSTRZEJEWSKA-PIOTROWSKA, G.; GOLIMOWSKI, J.; URBAN, P. L. Nanoparticles: their potential toxicity, waste and environmental management. **Waste Management**, v. 29, n. 9, p. 2587-2595, 2009.

CAMARGO, D. M. De O. Impacto do óleo mineral isolante usado sobre o crescimento de *Vicia faba* L. 2013.

CARLSON, C. et al. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. **J. Phys. Chem. B**, v. 112, n. 43, p. 13608-13619, 2008.

CARVALHO, H. de A. A Tradescantia como bioindicador vegetal na monitoração dos efeitos clastogênicos das radiações ionizantes. **Radiologia Brasileira**, v. 38, n. 6, p. 459-462, 2005.

CHRISTENSEN, F. M. et al. Nano-silver–feasibility and challenges for human health risk assessment based on open literature. **Nanotoxicology**, v. 4, n. 3, p. 284-295, 2010.

CLEVELAND, D. et al. Pilot estuarine mesocosm study on the environmental fate of silver nanomaterials leached from consumer products. **Science of the Total Environment**, v. 421, p. 267-272, 2012.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente (2005). **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005**. Ministério do Meio Ambiente, 58-63p. 2011.

CORRÊA, N. S. et al. Monitoramento da ação genotóxica em trabalhadores de sapatarias através do teste de micronúcleos, Pelotas, Rio Grande do Sul. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 14, n. 6, 2009.

DARLINGTON, C. D.; MCLEISH, J. Action of maleic hydrazide on the cell. **Nature**, v. 167, n. 4245, p. 407, 1951.

DONALDSON, K. et al. **Nanotoxicology**. 2004.

DORNFELD, C. B. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Brasil, 2002.

ELSAESSER, A.; HOWARD, C. V. Toxicology of nanoparticles. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, n. 2, p. 129-137, 2012.

ESTÉCIO, M. R. H.; SILVA, A. E. Alterações cromossômicas causadas pela radiação dos monitores de vídeo de computadores. **Revista de Saúde Pública**, p. 330-336, 2002.

FELIU, N.; FADEEL, B. Nanotoxicology: no small matter. **Nanoscale**, v. 2, n. 12, p. 2514-2520, 2010.

FERRAZ, G. A. et al. Efeitos da idade sobre as frequências de micronúcleos e alterações nucleares degenerativas. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 19, n. 4, 2016.

FALCO, W. F. **AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS EM PLANTAS DE *Vicia faba* INDUZIDAS POR NANOPARTÍCULAS DE PRATA**. Tese de Doutorado. 2018.

FLORES, M.; YAMAGUCHI, M.U. Teste do Micronúcleo: Uma Triagem para Avaliação Genotóxica. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 1, n. 3, p. 337-340, 2008.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Rev Bras Farmacogn**, v. 15, n. 2, p. 178-82, 2005.

GARCIA, M. V. D. et al. Síntese, caracterização e estabilização de nanopartículas de prata para aplicações bactericidas em têxteis. 2011.

GLIGA, A. R. et al. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. **Particle and fibre toxicology**, v. 11, n. 1, p. 11, 2014.

GOMES, M. V. T.; SATO, Y. Avaliação da contaminação por metais pesados em peixes do Rio São Francisco à jusante da represa de Três Marias, Minas Gerais, Brasil. **Saúde & Ambiente em Revista**, v. 6, n. 1, p. 24-30, 2011.

GOTTSCHALK, F. et al. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. **Environmental science & technology**, v. 43, n. 24, p. 9216-9222, 2009.

HISTER, C. A. L. et al. Atividade antiproliferativa e determinação dos compostos fenólicos de extratos aquosos de amoreira-preta (*Rubus* sp.) pelo sistema teste in vivo de *Allium cepa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 15, n. 1, 2017.

HOCEVAR, C. M.; RAYA-RODRIGUEZ, M. T. M. Avaliação do impacto ambiental gerado por efluentes fotográficos, gráficos e eadiológicos em Porto Alegre, RS, Brasil. **Engenharia sanitária e ambiental: órgão oficial de informação técnica da ABES. Rio de Janeiro. Vol. 7, n. 3/4 (jun./dez. 2003), p. 139-143, 2002.**

HOYT, V. W.; MASON, E. Nanotechnology: emerging health issues. **Journal of Chemical Health and Safety**, v. 15, n. 2, p. 10-15, 2008.

IGANCI, J. R. V. et al. Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies de boldo sobre a germinação e índice mitótico de *Allium cepa* L. **Arq Inst Biol**, v. 73, n. 1, p. 79-82, 2006.

KANAYA, N.; GILL, B. S.; GROVER, I.S.; MURIN, A.; OSIECKA, R.; SANDHU, S.S.; ANDERSON, H. C. Vicia faba chromosomal aberration assay. **Mutat. Res.**, 310:231-247, 1994.

KIM, I. et al. Citrate coated silver nanoparticles change heavy metal toxicities and bioaccumulation of *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 143, p. 99-105, 2016.

KUMAR, G. et al. Flow cytometry evaluation of in vitro cellular necrosis and apoptosis induced by silver nanoparticles. **Food and Chemical Toxicology**, v. 85, p. 45-51, 2015.

KUMARI, B.; SINGH, D. P. A review on multifaceted application of nanoparticles in the field of bioremediation of petroleum hydrocarbons. **Ecological Engineering**, v. 97, p. 98-105, 2016.

LINS, J. A. P. N. et al. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 8, n. 4, 2017.

LOGOTHETIDIS, S. Nanotechnology: Principles and applications. In: **Nanostructured Materials and Their Applications**. Springer Berlin Heidelberg, 2012. p. 1-22.

LOVERN, S. B.; STRICKLER, J. R.; KLAPER, R. Behavioral and physiological changes in *Daphnia magna* when exposed to nanoparticle suspensions (titanium dioxide, nano-C60, and C60HxC70Hx). **Environmental science & technology**, v. 41, n. 12, p. 4465-4470, 2007.

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, p. 92-96, 2010.

MALALLAH, G.; AFZAL, M.; GULSHAN, S.; ABRAHAM, D; KURIAN, M. AND DHAMI, M.S.I. Vicia faba as a bioindicator of oil pollution. **Environmental Pollution**, London, v.92, n.2, p.213-217, 1996.

MARKUS, A. A. et al. Predicting the contribution of nanoparticles (Zn, Ti, Ag) to the annual metal load in the Dutch reaches of the Rhine and Meuse. **Science of the total environment**, v. 456, p. 154-160, 2013.

MARTINS, Manuel A.; TRINDADE, Tito. Os nanomateriais e a descoberta de novos mundos na bancada do químico. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1434-1446, 2012.

MENDES, F. M. Estudo do uso da Moringa oleifera para remoção de prata e manganês em águas. **Horizonte Científico**, v. 1, n. 1, 2007.

MIETHLING-GRAFF, R. et al. Exposure to silver nanoparticles induces size- and dose-dependent oxidative stress and cytotoxicity in human colon carcinoma cells. **Toxicology in Vitro**, v. 28, n. 7, p. 1280-1289, 2014.

MIRANDA, R. R. Efeitos citotóxicos da interação entre nanopartículas de prata e metais não essenciais em células de hepatocarcinoma humano (HEPG2). 2017.

MOHAMMED, K. P. et al. Forskolin: genotoxicity assessment in *Allium cepa*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 777, p. 29-32, 2015.

MONFARED, A. L. et al. Effects of Nano-particles on Histo-pathological changes of the fish. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 13, n. 1, p. 62, 2015.

NAIR, Prakash M. Gopalakrishnan; CHUNG, Ill Min. Physiological and molecular level effects of silver nanoparticles exposure in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. **Chemosphere**, v. 112, p. 105-113, 2014.

NASCIMENTO, I. A. et al. Avaliação da toxicidade da nanopartícula de óxido de zinco em microcrustáceo *Daphnia magna*, bactéria bioluminescente *Aliivibrio fischeri*, células de neuroblastoma murino e sementes de alface *Lactuca sativa*. 2016.

NEL, A. et al. Toxic potential of materials at the nanolevel. **science**, v. 311, n. 5761, p. 622-627, 2006.

NOLASCO, L. G. Impactos da nanotecnologia na saúde humana e no meio ambiente. **REVISTA JURÍDICA DIREITO, SOCIEDADE E JUSTIÇA**, v. 4, n. 1, 2017.

NOWACK, B.; BUCHELI, T. D. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. **Environmental pollution**, v. 150, n. 1, p. 5-22, 2007.

OLIVEIRA, V. R.; BOITEUX, L. S. Cultivo da cebola (*Allium cepa* L.). **Série sistemas de cultivo, Embrapa Hortaliças, Brasília-DF. Versão eletrônica (www.cnph.embrapa.br)**, 2003.

PEDREIRO, E. S. D. Análise In Silico de Impurezas Provenientes da Síntese de Fármacos. Pesquisa de Estruturas de Alerta de Genotoxicidade, Mutagenicidade e Carcinogenicidade. 2016.

PENHA, J. S. da. **Determinação da taxa de fecundação cruzada natural e diversidade genética em feijão-fava por marcadores microssatélites**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Piauí. 2014.

PETERS, R. J. B. et al. Nanomaterials for products and application in agriculture, feed and food. **Trends in Food Science & Technology**, v. 54, p. 155-164, 2016.

RACUCIU, M. et al. TMA-OH coated magnetic nanoparticles internalized in vegetal tissue. **Romanian Journal of Physics**, v. 52, n. 3/4, p. 395, 2007.

RIBO, J. M. Interlaboratory comparison studies of the luminescent bacteria toxicity bioassay. **Environmental Toxicology**, v. 12, n. 4, p. 283-294, 1997.

RUPPENTHAL, J. E. Toxicologia. **Colégio Técnico Industrial de Santa Maria. UFSM. Rede e-Tec Brasil**, 2013.

SCHINDELIN, Johannes et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature methods**, v. 9, n. 7, p. 676, 2012.

SIERRA, M. I. et al. The effect of exposure to nanoparticles and nanomaterials on the mammalian epigenome. **International journal of nanomedicine**, v. 11, p. 6297, 2016.

SILVA, F. C. da. et al. Avaliação de mutagênese provocada por sulfato de ferro através do teste micronúcleo em células da medula óssea de camundongos. **Revista Científica FAEMA**, v. 2, n. 1, p. 13-21, 2011.

SIMONET, B. M.; VALCÁRCEL, Miguel. Monitoring nanoparticles in the environment. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 393, n. 1, p. 17, 2009.

SOUZA, Gustavo Duarte de et al. Prata: Breve histórico, propriedades e aplicações. **Educación química**, v. 24, n. 1, p. 14-16, 2013.

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

VARGAS, L. Avaliação da toxicidade de glifosato para duas espécies de Anfíbios Anuros Brasileira: *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus gracilis*. 2017.

XU, Liming et al. Genotoxicity and molecular response of silver nanoparticle (NP)-based hydrogel. **Journal of nanobiotechnology**, v. 10, n. 1, p. 16, 2012.

WEI, L. et al. Cytotoxicity effects of water dispersible oxidized multiwalled carbon nanotubes on marine alga, *Dunaliella tertiolecta*. **Aquatic Toxicology**, v. 100, n. 2, p. 194-201, 2010.

WEIR, A. et al. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. **Environmental science & technology**, v. 46, n. 4, p. 2242-2250, 2012.

WITTER, S.; BLOCHTEIN, B. Efeito da polinização por abelhas e outros insetos na produção de sementes de cebola. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 12, p. 1399-1407, 2003.

WU, Y. et al. Effects of silver nanoparticles on the development and histopathology biomarkers of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using the partial-life test. **Aquatic Toxicology**, v. 100, n. 2, p. 160-167, 2010.