

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**BIOTECNOLOGIA**

**Aline Aparecida Becaro**

**Estudos de atividade antimicrobiana, de migração e de toxicidade de nanopartículas de prata aplicada em filmes poliméricos.**

**2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**BIOTECNOLOGIA**

**ALINE APARECIDA BECARO**

**ESTUDOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, DE MIGRAÇÃO**  
**E DE TOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA**  
**APLICADAS EM FILMES POLIMÉRICOS.**

*Orientadores:*

Dr. Marcos David Ferreira

Dr. Daniel Souza Correa

Tese submetida como requisito para  
obtenção do título de Doutor em  
Biotecnologia, no curso de Pós-Graduação  
em Biotecnologia.

São Carlos, SP

Julho de 2014

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

B388ea      Becaro, Aline Aparecida.  
              Estudos de atividade antimicrobiana, de migração e de  
toxicidade de nanopartículas de prata aplicadas em filmes  
poliméricos / Aline Aparecida Becaro. -- São Carlos :  
UFSCar, 2014.  
              148 f.

              Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,  
2014.

              1. Polímeros. 2. Migração. 3. Toxicidade. 4. Agentes  
antimicrobianos. 5. Nanopartículas de prata. I. Título.

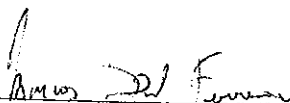
CDD: 668.9 (20<sup>a</sup>)

**Aline Aparecida Becaro**

Tese de Doutorado submetida à  
Coordenação do Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia, da  
Universidade Federal de São  
Carlos, como requisito parcial para  
a obtenção do título de Doutora em  
Biotecnologia

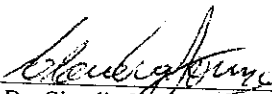
**Aprovado em: 29/07/2014**

**BANCA EXAMINADORA**



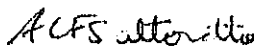
Prof. Dr. Marcos David Ferreira

(EMBRAPA Instrumentação/orientador)



Dr. Claudio Martin Jonsson

(EMBRAPA)



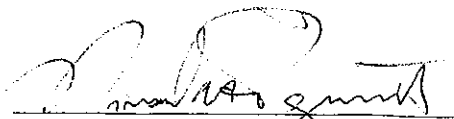
Prof.ª Dr.ª Ana Lucia Fachin Saltoratto

(UNAERP)



Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza

(UFSCar)



Prof. Dr. Nivaldo Antônio Parizotto

(UFSCar)

## **DEDICATÓRIA**

A Deus,

Aos meus pais Paulo Florentino Becaro e Zildinha Donizete Maciel Becaro,

A meu irmão Gustavo Henrique Becaro e

Ao meu noivo Dirceu Ferreira Penteado Neto.

*"Impossível é apenas uma grande palavra usada por gente fraca que prefere viver no mundo como está em vez de usar o poder que tem para mudá-lo. Impossível não é um fato, é uma opinião. Impossível não é uma declaração, é um desafio. Impossível é hipotético. Impossível é temporário. Impossível é nada."*

**(Muhammad Ali)**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me guiou em todos os momentos de escolhas e escutou as minhas preces.

Dedico um agradecimento especial às pessoas que tornaram possível esse projeto de vida, aos meus orientadores Marcos David Ferreira e Daniel Souza Correa. Muito obrigada pela confiança, atenção, paciência, dedicação e carinho durante esses longos quatro anos, especialmente nos momentos mais difíceis em que os seus conhecimentos foram essenciais para concretização e desenvolvimento deste trabalho. Foi uma honra ter sido orientada cientificamente por vocês.

Por ser um trabalho interdisciplinar foi necessário a ajuda de pessoas que apoiassem na realização e desenvolvimento do mesmo. Agradeço, portanto os colaboradores deste projeto e também excelentes profissionais que encontraram tempo diante de suas ocupações e colaboraram com conhecimento e dedicação para a conclusão deste trabalho. O apreço que tenho por vocês não se encerra nestas palavras de agradecimento. Obrigada Dra. Elaine Cristina Paris, Dr. José Manoel Marconcini, Dr. Cláudio M. Jonhsson, Dra. Vera Lucia Scherholz de Castro, Dr. Humberto de Mello Brandão, Dra. Raquel Rech e Dra. Renata Lima.

Agradeço também a duas pessoas que foram de fundamental importância para a realização de partes muito importantes neste trabalho. Aos profissionais e amigos Alan Rodrigo Panosso e Jaqueline Bianchi pelo apoio e suporte nas técnicas empregadas.

A Luzia Pedroso de Oliveira e seu orientador Cesar Gonçalves de Lima da Universidade de São Paulo (USP Piracicaba) meu muito obrigado pela grande colaboração no desenvolvimento das análises estatísticas empregadas no estudo de toxicologia.

À amiga Fernanda da Cunha Puti, pela convivência agradável, todo o seu companheirismo, momentos de descontração, alegria e dedicação. Obrigada por se dispor a me ajudar quase que integralmente para conclusão deste trabalho, tendo muitas vezes deixado de lado as suas necessidades e afazeres. A sua amizade é muito importante para mim espero ter a sua companhia por muitos anos ainda.

À amiga Maria Célia Siqueira que além da amizade, foi companheira, justa e paciente. Teve a “coragem” de dividir um pouquinho do seu tempo quando decidi

morar comigo. Apreendi muito com você. Você é muito especial para mim e espero realmente que essa amizade seja longa.

A todos os funcionários da Embrapa Instrumentação. Em especial aos funcionários: Adriana Thomazi, Silviane, Viviane, Joana, Alice e Matteo. Vocês em muitos momentos foram mais que analistas técnicos, foram confidentes, amigos e companheiros.

Aos amigos e colegas de laboratório: Marcos Lorevice, Alexandra, Luiza, Vanessa, Fábio, Fernanda Koshima, Poliana, Karla, Luis Gustavo, Marcela, Thaís e Carolina.

A Universidade Federal de São Carlos, seus pesquisadores e funcionários.

E por fim dedico algumas palavras á aqueles em que possuo inimaginável estima:

Aos meus pais e meu irmão que souberam compreender minha ausência, distância e escolhas. Meus pais, vocês são meu exemplo de conduta, honestidade e humildade. Espero que ainda tenham muito orgulho da pessoa que sou e que irei me tornar.

Ao meu noivo, Dirceu, que me ajudou nos momentos de dúvida, agonia e aflição. Obrigada por me ajudar nessa conquista, por incentivar a superar os meus limites, a me acolher quando mais precisava. Você é mais que meu amor, é meu amigo e companheiro.

As minhas avós, Eliete e Ana que sempre me ajudavam a matar um pouquinho da saudade de casa quando faziam aquela comidinha especial.

A todos os meus familiares que de alguma forma contribuíram para essa jornada.

*“E assim, depois de muito esperar, em um dia como outro qualquer, decidi triunfar...Decidi não esperar as oportunidades e sim, eu mesma buscá-las. Decidi ver cada problema como uma oportunidade de encontrar uma solução.” (Walt Disney)*

## Sumário

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO GERAL.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	13
1. 1 Nanotecnologia.....	13
1. 2. Polímeros e Nanopartículas de prata na área de embalagens .....	14
1. 3. Embalagens aplicadas a produtos minimamente processados.....	16
1. 4. Ecotoxicidade.....	18
1. 5. Toxicidade em mamíferos.....	20
1. 6. Citotoxicidade e Genotoxicidade em plantas.....	22
REFERÊNCIAS .....	24
CAPÍTULO 2. OBJETIVOS .....	33
1. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO .....	34
2. 1. Objetivos Específicos .....	34
CAPÍTULO 3. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES .....	36
3. 1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3. 1.1 Materiais .....	37
3.1. 2 Preparação dos Filmes .....	38
3. 1. 3. Caracterização dos filmes .....	38
3.1.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	38
3.1.3.2 Difração de raios X (DRX) .....	38
3.1.3.3 Espectroscopia no Infravermelho (FTIR) .....	38
3.1.3.4 Análise térmica: Termogravimetria (TG) e Calorimetria diferencial de Varredura (DSC) .....	39
3.1.3.5 Análise microbiológica .....	39
3. 2. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	40
3.2.1 MEV.....	40
3.2.2 DRX.....	41
3.2.3 FTIR.....	43
3.2.4 Análises térmicas: TGA e DSC .....	44
3.2.5 Atividade antimicrobiana de filmes contendo AgNPs.....	50
3. 3. CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS .....	53
CAPÍTULO 4. QUALIDADE PÓS-COLHEITA DE CENOURAS .....	57
4. 1. MATERIAS E MÉTODOS .....	59
4. 1.1 Processamento dos filmes.....	59



4.1.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	59
4.1.3. Análise de permeabilidade de O <sub>2</sub> .....	59
4.1.4. Processamento mínimo de cenoura.....	60
4. 1.5. Análises físico-químicas .....	61
4.1.5.1 Perda de massa fresca.....	61
4.1.5.2. Firmeza.....	62
4.1.5.3. pH.....	62
4.1.5.4. Acidez titulável (AT) .....	62
4.1.5.5. Ácido ascórbico.....	62
4.1.5.6. Teor de sólidos solúveis (SST) .....	63
4.1.5.7. Ratio (SST/AT).....	63
4.1.6. Análises microbiológicas .....	63
4.1.7. Análises estatísticas .....	63
4. 2. RESULTADOS .....	64
4.2.1. MEV.....	64
4.2. 2 Ensaio de Permeabilidade .....	65
4.2.3. Análises físico-químicas .....	68
4.2.4 Análises microbiológicas .....	76
4. 3. CONCLUSÃO.....	79
REFERÊNCIAS .....	80
ANEXO1 .....	85
CAPÍTULO 5. TESTES DE MIGRAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS .....	86
5. 1. MATERIAIS E MÉTODOS.....	87
5.1.1 Teste de migração de metais pesados nos filmes poliméricos sem contato com alimento .....	87
5.1.2 Teste de migração de metais pesados nos filmes poliméricos em contato com alimento (cenoura) .....	87
5.2. RESULTADOS .....	88
5.2.1. Teste de migração de metais pesados nos filmes poliméricos sem contato com alimento .....	88
5.2.2. Teste de migração de metais pesados nos filmes poliméricos em contato com alimento (cenoura) .....	89
5. 3. CONCLUSÃO.....	90
REFERÊNCIAS .....	91
CAPÍTULO 6. ECOTOXICIDADE.....	93
6. MATERIAIS E MÉTODOS.....	94

6.1	Preparação das AgNPs.....	94
6.2.	Caracterização das nanopartículas obtidas na síntese.....	95
6.2.1	Espectroscopia UV-vis.....	95
6.2.2	Análise de distribuição do tamanho da partícula e potencial zeta.....	95
6.2.3	Medição do tamanho das partículas .....	95
6.3.2.	<i>Artemia salina</i> .....	97
6.3.3.	<i>Daphnia similis</i> .....	97
6. 2.	RESULTADOS .....	98
6.2.1.	UV-vis.....	98
6.2.2	Análise do tamanho das partículas e potencial zeta.....	99
6.2.3	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	100
6.2.4	Ensaio de Toxicidade .....	101
6.2.4.1	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> .....	101
6.2.4.2	<i>Artemia Salina</i> .....	103
6.2.4.3.	<i>Daphnia similis</i> .....	105
6. 3.	CONCLUSÃO.....	108
	REFERÊNCIAS .....	110
	CAPÍTULO 7.AVALIAÇÃO DA REPRODUÇÃO E DESENVOLVIMENTO ANIMAL .....	115
7. 1.	MATERIAL E MÉTODOS.....	116
7.1.1	Animais.....	116
7.1.2.	Delineamento experimental .....	116
7.1.2.1	Características observadas nas ratas .....	117
7.1.2.1.1	Influência da dose no peso das ratas .....	117
7.1.2.1.2	Avaliação da influência das concentrações de AgNP durante o número de dias de gestação.....	117
7.1.2.1.3	Histopatologia e determinação da concentração de Ag tecidos das fêmeas adultas .....	118
7.1.3	Características observadas nas ninhadas.....	118
7.1.3.1	Características físicas dos filhotes .....	119
7.1.4.	Análises Estatísticas.....	119
7. 2.	RESULTADOS .....	120
7.2.1	Influência da dose no número de dias de gestação e no peso corporal das ratas .....	121
7.2.2	Necrópsia .....	122
7.2.3.	Peso dos órgãos.....	122

7.2.4. Análises histopatológicas e de determinação de prata por ICP-OES .....	124
7.2.5 Influência das doses no peso médio dos filhotes .....	126
7.2.6 Número de filhotes nascidos, natimortos e mortos durante a lactação .....	126
7. 3. CONCLUSÃO.....	130
REFERÊNCIAS .....	131
CAPÍTULO 8.CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE EM CÉLULAS DE CEBOLA .....	135
8. 1. METODOLOGIA.....	136
8.1.2. Análise Estatística dos dados.....	137
8. 2. RESULTADOS .....	138
8. 3. CONCLUSÃO.....	144
REFERÊNCIAS .....	145
CONCLUSÃO GERAL .....	147

## Lista De Figuras

FIGURA 1 POSSÍVEIS ROTAS DA EXPOSIÇÃO DE ORGANISMOS AQUÁTICOS A NANOPARTÍCULAS (FIGURA ADAPTADA DE (BAUN <i>ET AL</i> , 2008). .....	20
FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA NORMA JIS Z (2801:2000). .....	40
FIGURA 3 IMAGENS DE MEV (ESQUERDA) E ESPECTRO EDS (DIREITA) DOS FILMES CONTENDO AGNPs: A CONTENDO SiO <sub>2</sub> (A) E B CONTENDO TiO <sub>2</sub> (B) EM SUAS COMPOSIÇÃO. ....	41
FIGURA 4. DIFRATOGRAMAS DE RAIOS-X DOS COMPOSTOS CONTENDO: AG/SiO <sub>2</sub> (A); AG/TiO <sub>2</sub> (B). ....	42
FIGURA 5 OS ESPECTROS DE FTIR DAS AMOSTRAS DE PEBD CONTENDO: AG/SiO <sub>2</sub> (A) E AG/TiO <sub>2</sub> (B). ....	44
FIGURA 6 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICAS (TGA) E CURVAS DTG PARA A E ATMOSFERA DE AR SINTÉTICO 10 A 800°C. ....	45
FIGURA 7 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA) E CURVAS DE DTG PARA B EM ATMOSFERA DE AR SINTÉTICO DE 10 °C TO 800 °C. ....	46
FIGURA 8 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC) PARA OS FILMES: (A) A E (B) DO B. ....	48
FIGURA 9 ESQUEMA REPRESENTATIVO DO PROCESSAMENTO MÍNIMO DE CENOURAS. A) ETAPA DE SELEÇÃO, SANITIZAÇÃO, PROCESSAMENTO E SECAGEM; B) ETAPA DE EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO. ....	61
FIGURA 10 IMAGEM REPRESENTATIVA DAS RODELAS DE CENOURA E IDENTIFICAÇÃO DE SUAS PARTES. ....	62
FIGURA 11. IMAGENS DE MEV OBTIDAS DO MASTERBATCH A E B EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES. OS CÍRCULOS VERMELHOS INDICAM DEPRESSÕES NA SUPERFÍCIE DOS FILMES E OS RETÂNGULOS AZUIS REPRESENTAM O AUMENTO DA PRESENÇA DE SÍLICA NAS AMOSTRAS A. ....	65
FIGURA 12. MODELO REPRESENTATIVO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE PERMEABILIDADE GASOSA. ....	66
FIGURA 13. VALORES DO COEFICIENTE DE PERMEABILIDADE AO O <sub>2</sub> E COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (EM BARRA) DOS FILMES ESTUDADOS. ....	68

FIGURA 14. PERFIL DOS VALORES MÉDIOS E DESVIO PADRÃO PARA A PERDA DE MASSA NAS CENOURAS EMBALADAS NOS FILMES A E B NAS CONCENTRAÇÕES 2,5, 50 E 100 DURANTE 10 DIAS DE ARMAZENAMENTO.....	69
FIGURA 15. PERFIL DOS VALORES MÉDIO PARA TEXTURA DAS CENOURAS EMBALADAS NOS FILMES A E B NAS CONCENTRAÇÕES 2,5, 50 E 100 DURANTE 10 DIAS DE ARMAZENAMENTO.....	70
FIGURA 16 PERFIL DOS VALORES MÉDIOS OBTIDOS PARA ANÁLISE DE pH NAS CENOURAS EMBALADAS NOS FILMES A E B NAS CONCENTRAÇÕES 2,5, 50 E 100 DURANTE 10 DIAS DE ARMAZENAMENTO.....	71
FIGURA 17. PERFIL DOS VALORES MÉDIOS ENCONTRADOS PARA A ANÁLISE AT NAS CENOURAS EMBALADAS NOSS FILMES A E B NAS CONCENTRAÇÕES 2,5, 50, 100 DURANTE 10 DIAS DE ARMAZENAMENTO.....	73
FIGURA 18 PERFIL DOS VALORES MÉDIOS ENCONTRADOS PARA A ANÁLISE AA NAS CENOURAS EMBALADAS NOSS FILMES A E B NAS CONCENTRAÇÕES 2,5, 50, 100 DURANTE 10 DIAS DE ARMAZENAMENTO.....	74
FIGURA 19 PERFIL DOS VALORES MÉDIOS OBTIDOS PARA ANÁLISE DE SÓLIDO SOLÚVEL NAS CENOURAS EMBALADAS NOS FILMES A E B NAS CONCENTRAÇÕES 2,5, 50 E 100 DURANTE 10 DIAS DE ARMAZENAMENTO.....	75
FIGURA 20. PERFIL DOS VALORES MÉDIOS OBTIDOS PARA A ANÁLISE RATIO DAS CENOURAS EMBALADAS NOS FILMES A E B NAS CONCENTRAÇÕES 2,5, 50 E 100 DURANTE 10 DIAS DE ARMAZENAMENTO.....	76
FIGURA 21 EFEITOS DOS FILMES EMPREGADOS NO CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS MESÓFILOS AERÓBIOS.....	77
FIGURA 22 EFEITO DOS FILMES EMPREGADOS NO CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS <i>E. COLI</i> E COLIFORMES TOTAIS. ....	78
FIGURA 23 ESPECTRO DE ABSORÇÃO DAS AGNPs OBTIDAS PELA SÍNTESE DETALHADA NA SEÇÃO EXPERIMENTAL. ....	99
FIGURA 24 DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA OBTIDAS PELA SÍNTESE DETALHADA NA SEÇÃO EXPERIMENTAL. ....	99

FIGURA 25 A) IMAGEM DE MET DAS NANOPARTICULAS DE AG E (B) HISTOGRAMA DE TAMANHO DAS AGNP. ....	100
FIGURA 26 CURVAS DE CRESCIMENTO DE <i>P. SUBCAPITATA</i> EXPOSTA A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (MG L <sup>-1</sup> ) DE AGNPs. OS VALORES FORAM REALIZADOS EM TRIPLICATA. ....	102
FIGURA 27 DOSE-RESPOSTA (AZUL) E INTERVALO DE CONFIANÇA 95% (VERMELHO) PARA <i>A. SALINA</i> PARA DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AGNP. ....	104
FIGURA 28 ALTERAÇÕES OBSERVADAS EM <i>DAPHNIA</i> ADULTOS E NEONATOS DEPOIS DE 24 H DE EXPOSIÇÃO A AGNPs. ....	107
FIGURA 29 INFLUÊNCIA DAS DOSES NO GANHO DE PESO DAS RATAS DURANTE A GESTAÇÃO. ....	121
FIGURA 30. FOTOMICROGRAFIAS DA ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DAS CÉLULAS NORMAIS DO A) FÍGADO E B) DUODENO. ....	125
FIGURA 31 INFLUÊNCIA DA DOSE NO GANHO DE PESO MÉDIO (G) DOS FILHOTES. ....	126
FIGURA 32 FREQUÊNCIAS OBSERVADAS DE CARACTERÍSTICAS DAS RATAS E NINHADAS POR DOSE. ....	128
FIGURA 33 CORTE LONGITUDINAL DO ÁPICE DA RAIZ DE CEBOLA EM QUE A SETAS APRESENTAM AS CÉLULAS MERISTEMÁTICAS. ....	137
FIGURA 34 CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE <i>ALLIUM CEPA</i> . ....	138
FIGURA 35 EFEITO DOS DIFERENTES TRATAMENTOS NO ÍNDICE MITÓTICO RELATIVO (IMR) EM CÉLULAS DE <i>A. CEPA</i> . ....	139
FIGURA 36 EFEITO DOS DIFERENTES TRATAMENTOS NO ÍNDICE DE ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS RELATIVO (IACR) EM CÉLULAS DE <i>A. CEPA</i> . ....	141
FIGURA 37 ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS ENCONTRADAS EM CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE <i>ALLIUM CEPA</i> APÓS EXPOSIÇÕES ÀS CONCENTRAÇÕES DE AGNPs. ....	142

## Lista de Tabelas

TABELA 1 NOMENCLATURA E PROPORÇÃO COMPOSICIONAL ENTRE A RESINA E OS MASTERBATCHES EMPREGADOS. ....	37
TABELA 2 ANÁLISE DE TERMOGRAVIMETRIA (TGA) DOS FILMES ESTUDADOS. ....	47
TABELA 3 DADOS OBTIDOS PELA TÉCNICA DE CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC) DOS FILMES ESTUDADOS .....	49
TABELA 4. CRISTALINIDADE DOS FILMES A (SiO <sub>2</sub> ) E B (TiO <sub>2</sub> ) OBTIDA ATRAVÉS DA ANÁLISE DE DRX. ....	50
TABELA 5 COMPARAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS DE NANOCOMPÓSTIOS DE PRATA .....	51
TABELA 6. RESULTADOS DAS MÉDIAS E DESVIO PADRÃO PARA AS ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DOS FILMES ESTUDADOS DURANTE DEZ DIAS DE ARMAZENAMENTO. ....	85
TABELA 7 CONCENTRAÇÃO E RESPECTIVAS PORCENTAGENS DAS SOLUÇÕES DE AGNPs EMPREGADAS NOS ENSAIOS DE TOXICIDADE PARA OS ORGANISMOS ESTUDADOS. ....	95
TABELA 8 PESOS DOS ÓRGÃOS (G) E PESOS DOS ÓRGÃOS RELATIVOS AOS PESOS NO INÍCIO DA GESTAÇÃO E NO FINAL DA LACTAÇÃO EM (%). ....	124
TABELA 9 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DOS FILHOTES EM RELAÇÃO A DOSE .....	129
TABELA 10 ÍNDICE MITÓTICO (IM) E ÍNDICE MITÓTICO RELATIVO (IMR) DE CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE <i>A. CEPA</i> PARA AS DUAS CONCENTRAÇÕES DA SUBSTÂNCIA TESTE, CONTROLE NEGATIVO E CONTROLE POSITIVO. ....	139
TABELA 11 ÍNDICE DE ALTERAÇÃO CROMOSSÔMICO (IAC) E ÍNDICE DE ALTERAÇÃO CROMOSSÔMICO RELATIVO (IACR) DE CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE <i>A. CEPA</i> PARA AS DUAS CONCENTRAÇÕES DA SUBSTÂNCIA TESTE, CONTROLE NEGATIVO E CONTROLE POSITIVO. ....	140

## ABREVIATURAS

AgNPs (Nanopartículas de prata)

ATP (Adenosina Trifosfato)

DLS (Espalhamento Dinâmico de Luz) - (*Dynamic Light Scattering*)

DRX (Difração de Raio-X)

DSC (Calorimetria Diferencial de Varredura)

EDS (Espectrometria de Energia Dispersiva)

EPA (Agência de Proteção Ambiental dos EUA)

EU (União Europeia)

FTIR (Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier)

MET (Microscopia Eletrônica de Transmissão)

MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura)

NPs (Nanopartículas)

OMS (Organização Mundial de Saúde)

PE (Polietileno)

PEDB (Polietileno de Baixa Densidade)

PNUMA (Programa Ambiental das Nações Unidas)

PP (Polipropileno)

PS (Poliestireno)

PVA (Álcool Polivinílico)

PVC (Policloreto de vinilla)

ROS (Espécies reativas de oxigênio)

-SH (Grupos tiol)



TG (Termogravimetria)

UFC (Unidades Formadoras de Colônia)

UV-Vis (Ultravioleta Visível)

## RESUMO

BECARO, Aline Aparecida. Estudos de **Atividade Antimicrobiana, de Migração e de Toxicidade de Nanopartículas de Prata aplicadas em Filmes Poliméricos**. SP. 2014. 187p Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2014.

Avanços na área de nanotecnologia têm permitido o desenvolvimento de materiais que podem desempenhar diversas funções tecnológicas. Dentre esses materiais, os polímeros têm se destacado para a inovação na área de embalagens para alimentos, possibilitando proteção física combinada com atividade antimicrobiana, em especial no caso de polímeros aditivados com nanopartículas de prata, e que aumentam o tempo de vida de prateleira de alimentos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de aplicação de filmes poliméricos aditivados com nanopartículas de prata (AgNPs) para uso em alimentos, analisando a toxicidade *in vivo* e *in vitro* de AgNPs em organismos vivos, definindo os riscos e benefícios das partículas para o produto e usuário, considerando a possibilidade de migração destas para o meio ambiente. Nanopartículas foram sintetizadas com tamanho e forma variadas e utilizadas para aplicação em filmes. Diversas técnicas foram utilizadas para caracterização dos filmes e das AgNPs. Todos os testes utilizando organismos seguiram protocolos preestabelecidos. Os resultados demonstraram que os filmes estudados apresentaram boa atividade microbiana em todas as concentrações para ambos os microrganismos *S.aureus* e *E.coli*. Estes também mostraram que podem ser utilizados como embalagens de alimentos preservando qualidades físico-químicas desejáveis aos consumidores de cenouras minimamente processadas. Nos testes de migração realizados nos filmes estudados mesmo não sendo observado a possibilidade de migração de AgNPs nas concentrações mais baixas (2,5) há relatos na literatura de que estas podem migrar em outras condições em concentrações relativamente baixas, e como demonstrado nos testes de toxicidade a organismos aquáticos e terrestres há risco potencial de interferir na sobrevivência e mobilidade de invertebrados aquáticos de água doce e salgada e em algas, assim como podem também interferir no desenvolvimento de filhotes de ratos quando ingeridas na forma oral, além de causar alterações cito e genotóxica em organismos como *Allium cepa*.

**Palavras-chave:** Nanopartícula de prata, Toxicidade, Migração.

## ABSTRACT

BECARO, Aline Aparecida. **Studies of Antimicrobial Activity, of Migration And Toxicity of Silver Nanoparticles Applied In Polymeric Films.** SP. 2014. 187p Thesis (Doctorate in Biotechnology) - Federal University of São Carlos, São Carlos, SP, 2014.

Advances in nanotechnology have allowed the development of materials that can perform various technological functions. Among these materials, polymers have been noticed for innovation for food packaging, providing physical protection combined with antimicrobial activity, especially in the case of polymer additives with silver nanoparticles, which increase the time of shelf life of foods. In this context, the aim of this study was to evaluate the potential application of polymeric additives films with silver nanoparticles (AgNPs) for use in foods, analyzing toxicity *in vivo* and *in vitro* AgNPs in living organisms, defining the risks and benefits of the particles and for the product user, considering the possibility of migration of these to the environment. Nanoparticles were synthesized with varying size and shape and used for application in films. Several techniques were used to characterize the films and AgNPs. All tests using organisms followed established protocols. The results showed that the studied films showed good microbial activity at all concentrations for both microorganisms *S. aureus* and *E. coli*. The films also showed that can be used as food packaging maintaining desirable qualities chemical treasury consumers of minimally processed carrots. In the migration tests performed on the films was not observed even studied the possibility of migration of AgNP<sub>s</sub> at the lowest concentrations (2.5) have been reported in that they may migrate to other conditions at relatively low concentrations literature and as demonstrated in the tests toxicity to aquatic and terrestrial organisms there is potential risk of interfering with the survival and mobility of aquatic invertebrates fresh and salt water and algae, as well as can also interfere with the development of rat pups when ingested orally and causes changes cyto and genotoxic in organisms such as *Allium cepa*.

**Keywords:** Silver Nanoparticles, Toxicity, Migration.

# **CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO GERAL**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1. 1 Nanotecnologia

O prefixo “nano” é derivado do grego e significa “anão”. A palavra “tecnologia”, também derivada do grego, significa arte, ofício, prática (DURAN; MATTOSO; MORAIS, 2006) O termo nanotecnologia refere-se a uma área que envolve a manipulação, caracterização e o uso de materiais, dispositivos, sistemas e estruturas com tamanho que varia entre 1 e 100 nm em ao menos uma dimensão (MUSANTE; WHITE, 2012). Desta maneira, nanotecnologia significa a habilidade de manipular materiais na escala atômica e molecular para criar estruturas maiores com uma nova organização estrutural visando explorar suas propriedades físicas e químicas (DUTTA; HOFMANN, 2003).

A nanotecnologia é uma área recente e ampla, cujas ideias iniciais foram propostas em 1959 por Richard Feynman, um dos mais renomados cientistas do século XX e laureado com prêmio Nobel (DREXLER, 1990). Avanços na nanotecnologia têm facilitado o desenvolvimento de ferramentas e materiais que têm suprimido diversas necessidades da sociedade. O campo dos nanomateriais é uma área de crescimento rápido e tem recebido grande atenção por parte dos cientistas e engenheiros, devido à sua multifuncionalidade e inúmeras possibilidades de aplicações (LI et al, 2010). Permite à manipulação dos mais variados tipos de materiais, incluindo metais, cerâmica, polímeros, biomateriais, entre outros (DURAN; MATTOSO; MORAIS, 2006). Os materiais podem ser utilizados para aplicações em medicina, na agricultura, na área aeroespacial, ambiental (YAP et al, 2012) física, química, biologia, engenharia e tecnologia (AUGUSTIN; SANGUANSRI, 2009; THAKOR et al, 2011).

No ano de 2011, segundo inventários de mercado foram registrados 1317 produtos contendo em sua composição ou formulação nanotecnologias, representando um crescimento de 521% em relação ao ano de 2006 no qual apenas 212 produtos foram comercializados (LI et al, 2010; THAKOR et al, 2011).

### 1. 2. Polímeros e Nanopartículas de prata na área de embalagens

As empresas e indústrias da área de materiais neste ambiente globalizado e competitivo tem buscado desenvolver produtos com melhores propriedades e características que consigam atender a demanda dos consumidores e do mercado (FOOK et al, 1995). Ao longo dos anos, tem-se intensificado o desenvolvimento de materiais para embalagens que são mais resistentes (mecânica e termicamente), leves, biodegradáveis, recicláveis e que tenham propriedades funcionais como a permeabilidade seletiva de gases, permitindo o aumento de vida de prateleira de frutas e hortaliças (SIMON; CHAUDHRY; BAKOS, 2008). Estudos relatados na literatura mostram que as nanopartículas, quando aplicado a polímeros usados para embalagens, podem melhorar algumas de suas propriedades, tornando-os, por exemplo, mais resistentes (CHAUDHRY et al, 2008; GIANNAKAS et al, 2009; LE CORRE; BRAS; DUFRESNE, 2010).

O uso de embalagens é um fator importante para garantir a qualidade dos produtos. No mercado de embalagens, o plástico é a primeira opção na área do setor alimentício, sendo que embalagens podem ser produzidas na forma de garrafas, sacolas, filmes e caixas (SOARES et al, 2002). No entanto, os filmes e as embalagens plásticas laminadas estão cada vez mais presentes no mercado, pois atendem as necessidades de acondicionamento e apresentação dos alimentos exigidos pelos consumidores (SOARES et al, 2002). Materiais como Polietileno (PE), Polipropileno (PP), Poliestireno (PS), Poli(cloreto de vinila) PVC, Poli(tereftalato de etileno) (PET), destacam-se pela facilidade de processamento e baixo preço (MICHAELI, 1995; RODRIGUEZ, 1996).

A nanotecnologia tem possibilitado a manipulação e o desenvolvimento de nanopartículas que podem ser adicionados em embalagens, fornecendo-lhes novas funcionalidades. Os aditivos são componentes adicionados aos materiais poliméricos que permitem melhorar ou aperfeiçoar diversas propriedades de acordo com a aplicação desejada<sup>1</sup>. A incorporação de aditivos como nanopartículas é uma alternativa para melhorar propriedades mecânicas, estabilidade térmica e barreiras de gases (PAUL;

---

<sup>1</sup>[http://www.braskem.com.br/Portal/Principal/Arquivos/html/boletm\\_tecnico/Glossario\\_de\\_termos\\_aplicados\\_a\\_polimeros.pdf](http://www.braskem.com.br/Portal/Principal/Arquivos/html/boletm_tecnico/Glossario_de_termos_aplicados_a_polimeros.pdf)

ROBESON, 2008). O tipo e o teor da nanopartícula utilizada, assim como o grau de dispersão, tipo de processamento e a interação entre a nanopartícula e o polímero podem afetar a estrutura e as propriedades da embalagem (PAUL; ROBESON, 2008).

No contexto dos nanomateriais as nanopartículas exibem propriedades físicas, químicas e biológicas únicas quando comparadas com partículas na escala micro e macro (ABOU EL-NOUR et al, 2010). De acordo com a literatura (WIJNHOFEN et al, 2009; ABOU EL-NOUR et al, 2010) estas propriedades podem estar relacionadas a características como o aumento na razão da área superficial/volume, o que resulta em uma alta reatividade. Materiais poliméricos contendo nanopartículas inorgânicas são exemplos para uso em embalagem na indústria alimentícia (EMAMIFAR et al, 2010). Além de melhorar as propriedades físicas e mecânicas de nanocompósitos, alguns tipos de nanopartículas metálicas apresentam propriedades antimicrobianas (YANG et al, 2010; LLORENS et al, 2012), que podem aumentar o tempo de vida de prateleira de alimentos (AZEREDO, 2009). Uma das substâncias mais utilizadas em formulações são nanopartículas de prata (AgNPs) (CHEN; SCHLUESENER, 2008).

Nanopartículas podem ser produzidas por processos naturais como fogo e atividade vulcânica, enquanto partículas sintéticas são produzidas pela química e engenharia de nanomateriais, diferindo em muitos aspectos daquelas produzidas por processos naturais (AUGUSTIN; SANGUANSRI, 2009). Por exemplo, as nanopartículas metálicas podem ser obtidas por processos químicos, biológicos e físicos (DURÁN et al, 2010).

Diversas são as aplicações de AgNPs, incluindo seu uso em sensores ópticos, eletrônicos impressos, fotônica, revestimentos antimicrobianos e entre outras aplicações (THAKOR et al, 2011) como produtos de higiene pessoal, vestuário, indústria de alimentos, tintas, protetores solares, cosméticos e dispositivos médicos (ANKANNA et al, 2010). Em 2009, 30% dos produtos nanoestruturados lançados no mercado tinham em sua estrutura AgNPs (WIJNHOFEN et al, 2009). Em 2011, a prata foi o nanomaterial mais citado nos inventários de produtos de consumo como desodorantes, camisetas, painéis, revestimento de vidro, tintas de parede o que corresponde a 55,40% de todos os nanoproductos, embora sua toxicidade ainda não tenha sido investigada exaustivamente. No entanto, alguns estudos têm sido focados na avaliação do potencial tóxico de nanopartículas (NPs) para a saúde humana e o meio ambiente. O uso

indiscriminado destes produtos pode gerar riscos para a saúde devido à liberação acidental dessas nanopartículas no meio ambiente, ao final do ciclo de vida do produto (GAMBARDELLA et al, 2013).

Segundo (YANG et al, 2009), os compostos a base de íons de prata estão entre os agentes antibacterianos inorgânicos mais promissores, com alto efeito biocida para diversas espécies de bactérias, sendo, portanto de grande interesse na aplicação na área de embalagens para alimentos (BOSETTI et al, 2002; YANG et al, 2009). Entretanto, o regulamento de segurança da União Europeia (UE) que determina a quantidade de íons de prata em matrizes alimentares limita o seu valor a 0,05 mg de Ag/kg (FERNÁNDEZ et al, 2009).

O uso de nanopartículas dentro de uma matriz polimérica tem provado ser eficaz na preservação de alimentos, como no caso de embalagens contendo AgNPs. Em particular, os efeitos antimicrobianos destes materiais os tornam plataformas versáteis para serem utilizados em aplicações na área de saúde e ambiental (DALLAS; SHARMA; ZBORIL, 2011). Alguns estudos sobre o desenvolvimento e utilização de embalagem de alimentos contendo AgNPs demonstraram uma boa distribuição de AgNPs em polietileno de baixa densidade (PEBD) (ZAPATA et al, 2011) e uma diminuição da taxa de crescimento microbiano (EMAMIFAR et al, 2011). Por exemplo, (INCORONATO et al, 2011) avaliaram a eficácia da AgNPs sobre microrganismos que podem causar a deterioração dos alimentos e obtiveram resultados muito promissores. Outros estudos também relataram o aumento do tempo de vida de prateleira de alimentos (HU et al, 2011), além do benefício de um processamento simples e viabilidade de se tornar um produto industrializado (YANG et al, 2010).

### **1. 3. Embalagens aplicadas a produtos minimamente processados.**

No estado de São Paulo a Resolução SAA-42, de 19/06/2009, estabelece que os produtos minimamente processados são produtos hortícolas higienizados e embalados, que foram submetidos a processos técnicos, preservando suas características sensoriais naturais, tornando-os prontos para o consumo *in natura* ou para preparo culinário. As operações de lavagem, descascamento e corte, promovem uma alteração fisiológica, bioquímica e microbiológica que aceleram o processo de deterioração como escurecimento, descoloração, produção de odores e sabores desagradáveis que levam a



perda de textura e valor nutricional diminuindo o tempo de prateleira deste produto (EMMAMBUX; MINNAAR, 2003; RAGAERT; DEVLIEGHERE; DEBEVERE, 2007; MASTROMATTEO; CONTE; DEL NOBILE, 2012).

Os efeitos ocasionados pelos processos aos quais frutas e hortaliças minimamente processadas são submetidas tornam este um produto perecível com tempo de vida útil de dias em temperaturas quentes (AHVENAINEN, 1996). As modificações são ocasionadas porque durante os processos de produção muitas células do tecido vegetal são rompidas. Este rompimento libera enzimas oxidantes que induzem atividades fisiológicas, reações bioquímicas e/ou infecções por patógenos que resultam na deterioração do produto (AHVENAINEN, 1996; PORTE; MAIA, 2001).

Neste contexto, a nanotecnologia se destaca como uma área promissora na busca por novos materiais e técnicas visando prolongar a vida de prateleira de alimentos (DE AZEREDO, 2009), pois permite desenvolver embalagens de alimentos com sistemas ativos, como os agentes antimicrobianos. Estas embalagens ativas, além de atuar como um sistema de embalagem convencional que fornece uma barreira passiva e proteção do alimento contra o ambiente externo, ainda pode aumentar o tempo de prateleira de muitos produtos alimentícios (AHVENAINEN, 2003; DE AZEREDO, 2013).

O desenvolvimento de novas tecnologias aplicadas a embalagens promete minimizar os efeitos causados pelo processamento, buscando o aumento de vida útil de prateleira desses produtos. Por exemplo, o emprego de compósitos a base de íons de prata apresentam efeito biocida para diversas espécies de bactérias (YANG et al, 2009), além de promoverem modificações atmosféricas no interior das embalagens (baixos níveis de oxigênio e altas concentrações de dióxido de carbono) (SIMÕES *et al*, 2009). As indústrias alimentícias devem assegurar aos consumidores que seu produto é seguro e livre de qualquer contaminação (química, física e microbiológica), para isso, os produtos precisam de embalagens apropriadas durante o transporte e armazenamento que mantenham as condições adequadas para que esse produto se mantenha adequado até o consumo.

#### 1. 4. Ecotoxicidade

As nanopartículas têm propriedades de interesse em aplicações tecnológicas e na preservação da saúde humana, tais como inibição da atividade antimicrobiana, e na literatura vários são os estudos que demonstram as propriedades benéficas de nanopartículas metálicas (CHEN; SCHLUESENER, 2008; DURÁN et al, 2010).

No entanto, estas partículas metálicas podem apresentar características indesejáveis quando liberadas acima de concentrações específicas em ambientes aquáticos e terrestres, atingindo diversas espécies (JO et al, 2012; KWOK et al, 2012). O aumento da produção e consumo de produtos que contenham AgNP, podem levar à liberação dessas nanopartículas metálicas no ambiente, desde a etapa de síntese até no uso final do produto por parte dos consumidores (RIBEIRO et al, 2014).

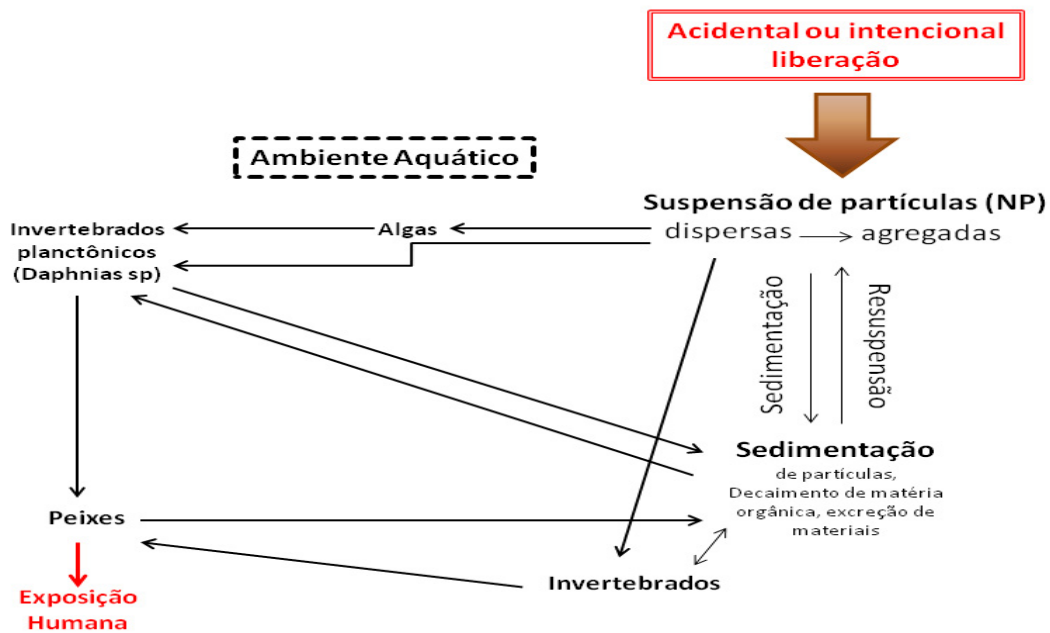
A prata em água doce natural pode ser encontrado na forma de cloreto de prata (AgCl), sulfeto de prata (Ag<sub>2</sub>S) e a forma iônica (Ag<sup>+</sup>), sendo esta a forma mais tóxica (RIBEIRO *et al*, 2014). Segundo uma pesquisa recente (BATLEY; KIRBY; MCLAUGHLIN, 2012) a concentração ambiental prevista de prata em água doce já chega a valores em torno de 0.03- 0.32µg L<sup>-1</sup>, porém esse valor está aumentando no ambiente aquático e pode vir a promover danos à biota (BATLEY; KIRBY; MCLAUGHLIN, 2012). Há muitas razões que podem explicar a toxicidade das AgNPs quando encontrada acima de níveis críticos no ambiente aquático. Um dos motivos é a elevada razão área superficial/volume das nanopartículas, o que resulta em uma maior taxa de dissolução, aumentando a toxicidade em ambiente aquático (ANGEL et al, 2013; RIBEIRO *et al*, 2014). Materiais orgânicos, incluindo alguns polímeros, são utilizados para estabilizar o tamanho e facilitar a dispersão das AgNP em soluções aquosas, o que pode influenciar na toxicidade ou na liberação de prata nestes ecossistemas (KWOK et al, 2012; RIBEIRO *et al*, 2014).

Um fator importante para a absorção e toxicidade das nanopartículas é a biodisponibilidade, a qual está relacionada com o comportamento de agregação e características referentes à superfície do material, influenciando diretamente a absorção das nanopartículas através da água e ingestão (FENT, 2010; ANGEL et al, 2013).

Portanto entender a rota de lançamento das AgNPs sobre o meio ambiente e os efeitos da sua exposição para os organismos aquáticos se faz necessária (GRIFFITT et al, 2012). No entanto, o pouco conhecimento sobre o comportamento das AgNPs no ambiente torna necessário estudos e avaliações da toxicidade de AgNPs de diferentes tamanhos e concentrações, para diferentes espécies aquáticas (RIBEIRO *et al*, 2014). A bioacumulação é um processo importante para avaliar os riscos e perigos de AgNPs.

Segundo Luoma, (2008), a forma iônica da Ag pode ser considerada o elemento mais bioacumulativo e tóxico, pois além de ser persistente no meio ambiente se acumula nos sedimentos, isso para pelo menos alguns invertebrados marinhos Segundo um estudo realizado por Buffet *et al*, (2014) ao estudar os efeitos de Ag solúvel e nanopartículas em duas espécies animais sendo um anelídeo (*Hediste diversicolor*) e o outro um molusco bivalve (*Scrobicularia plana*), observaram o efeito de bioacumulação significativa nas duas espécies para ambas as formas de Ag, não havendo portanto, diferenças significativas dos valores encontrados nos níveis de bioacumulação. Portanto, uma vez que introduzidas no compartimento aquático as AgNPs podem sofrer o processo de biomagnificação exercendo seus efeitos tóxicos nos diferentes níveis tróficos. Sendo que a principal via de exposição aos humanos seria através da ingestão de peixes contendo a presença de AgNPs, entretanto, o risco pelo consumo de crustáceos, moluscos, algas e outros organismos também deve ser considerado. Efeitos tóxicos de AgNPs podem acumular-se na cadeia alimentar (em ambientes aquáticos), o que cria o risco de um efeito direto sobre os organismos vivos (Figura 1).

Figura 1. Possíveis rotas da exposição de organismos aquáticos a nanopartículas.



Fonte: Figurada adaptada de (BAUN et al, 2008).

### 1. 5. Toxicidade em mamíferos

A respeito da bioacumulação e biodisponibilidade a principal dúvida que se tem quando relacionado à nanotecnologia é a respeito se existe ou não a possibilidade de nanopartículas penetrarem nos organismos ou serem retidas nas superfícies podendo ou não causar danos. Algumas formas de vida (plantas, bactérias e fungos) são cercadas por paredes celulares que são semipermeáveis, portanto, moléculas pequenas podem passar através da parede da célula. Essa mesma membrana pode proteger algumas formas de vida de animais superiores como, por exemplo, o córion que envolve embriões de vertebrados (FABREGA et al, 2011).

Atualmente há evidências de que as AgNPs podem danificar diretamente a membrana celular das bactérias, através da liberação de íons de prata seguido (individualmente ou em combinação) pelo aumento da permeabilidade da membrana, induzindo a ativação das células, o vazamento do conteúdo celular e ruptura dos cromossomos durante a replicação do DNA. Impactos semelhantes poderiam acontecer nas células eucarióticas como observado em um estudo realizado por Lee *et al* (2007) que utilizando imagens de MET (Microscopia Eletrônica de Transmissão) foi possível

mostrar que AgNP passaram através dos poros do córion em embriões de *Danio rerio* (peixe-zebra). E esta preocupação, dos possíveis efeitos da presença de NP, tem aumentado na comunidade científica, já que alguns estudos não provaram definitivamente quais seriam os impactos imediatos da AgNP para a saúde humana ou o ambiente (MARAMBIO-JONES; HOEK, 2010).

Alguns trabalhos na literatura abordam efeitos adversos ocasionados pelas AgNPs em diferentes níveis de integração biológica, incluindo sistemas de teste *in vitro* e *in vivo*. Os resultados de estudos *in vitro* indicam uma morte celular programada dose-dependente induzida pelo estresse oxidativo como principal via possível de toxicidade. Além disso, as AgNPs podem afetar enzimas celulares por interferência com grupos tiol livres e mimetismo de íons endógenos. Mecanismos estes que se assemelham aos efeitos antibacterianos ocasionados pelas AgNP (VÖLKER; OETKEN; OEHLMANN, 2013). Segundo (STRUŻYŃSKI et al, 2013) a exposição à AgNPs conduziu a um aumento dependente da concentração elevada na taxa de peroxidação lipídica e uma diminuição dos grupos tiol (-SH) ligado à proteína, o que indica a oxidação da proteína. Estes marcadores de estresse oxidativo foram acompanhados por diminuição dos níveis de tióis e atividade reduzida da glutathione redutase. Estes resultados indicam uma deficiência de glutathione reduzida e sugerem que os organismos expostos têm menos mecanismos eficientes antioxidantes disponíveis para combater estresse celular mediada por espécies reativas de oxigênio (ROS). As AgNPs também podem provocar a necrose de tecidos humanos além de distorcer a atividade dos componentes elementares em células humanas (PULIT; BANACH; KOWALSKI, 2011). Muitos aspectos da bioquímica das AgNPs são inexplorados como as interações com espécies de selênio, a fotoquímica de Ag, biocomplexos na zona próxima pele ou não são completamente compreendidos especialmente a dissolução no trato gastrointestinal (LIU et al, 2012).

A mobilidade e biodisponibilidade de AgNPs através da via da ingestão irá depender, em parte, de propriedades como o tamanho de partícula e a química da superfície, as quais irão influenciar na sua reatividade física e química durante o trânsito através do trato gastrointestinal. Geralmente, no fluido sintético do estômago, as menores AgNPs (<10 nm) apresentam maiores taxas de agregação e transformação física do que as partículas maiores (75 nm) (MWILU et al, 2013). No entanto, este fato ainda não é baseado em estudos *in vivo* e, portanto, a relevância clínica do estudo *in*

*vitro* permanece incerta. Embora haja poucos estudos sobre os efeitos provocados pelas AgNPs em mamíferos *in vivo*, resultados recentes mostram que estas nanopartículas tem potencial efeito tóxico em modelos animais (YU; YIN; LIU, 2013).

Em um estudo realizado em fibroblastos e células cancerígenas por Asharani et al, (2009) foi observado que as células quando tratadas com uma dose de 25 µg/mL de AgNP mostraram um aumento de 10% de aberrações identificadas pela presença de fragmentos cromossômicos acêntricos e cêntricos nas células do fibroblasto e resultados semelhantes foram observados nas células cancerígenas que apresentaram aumento de aberrações cromossômicas quando comparadas ao controle (sem tratamento). Em outro estudo realizado por Mei et al, (2012) sugerem que AgNP de 5nm nas doses entre 3 e 6µg/mL são mutagênicos em células de linfoma de rato e este fato é ocasionado pela indução do estresse oxidativo ocasionado pelas AgNP. Em contrapartida em um estudo realizado por Zhou e Wang, (2012) em células epiteliais do pulmão (carcinoma alveolar) tratadas com AgNP nas concentrações de 5, 10 e 20 µg/mL for 48 h, foi observado uma diminuição da viabilidade celular de 87,1%, 75,2% and 68,5%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle.

Sabe-se que a exposição prolongada à prata pode causar, entre outros efeitos, na sua deposição e acumulação no organismo, resultando em descoloração irreversível da pele ou olhos, a doença conhecida como argiria ou argyrosis. Aparentemente, elas pareceram ocorrer apenas após a ingestão de grandes quantidades de partículas de prata (normalmente coloidais). A toxicidade, portanto, pode ter consequências negativas para o desenvolvimento, havendo necessidade de examinar especialmente a toxicidade reprodutiva e de desenvolvimento em maiores detalhes (WIJNHOVEN et al, 2009).

### **1. 6. Citotoxicidade e Genotoxicidade em plantas**

Muitos agentes mutagênicos estão presentes em poluentes indevidamente lançados no meio ambiente, os quais geram um grave impacto negativo ao ecossistema, demandando, portanto alguma investigação quanto aos seus efeitos (JUCHIMIUK; MALUSZYNSKA, 2005). Testes de citotoxicidade e genotoxicidade são bem conhecidos e têm sido utilizados desde 1920s para a avaliação de frequência de aberrações cromossômicas, potencial mutagênico e quebras cromossômicas (RANK; NIELSEN, 1993; KANAYA et al, 1994). Órgãos ambientais nacionais e internacionais

como a EPA (Agência de Proteção Ambiental dos EUA), a OMS (Organização Mundial de Saúde) e a PNUMA (Programa Ambiental das Nações Unidas) recomendam o uso de plantas como organismos de ensaio para testes genéticos (MA et al, 1995). Segundo a literatura (RODRIGUES, 1998) a avaliação citogenética em *Allium cepa* é validada pelo Programa Internacional de Segurança Química (ICPS, OMS). Entre as plantas superiores, o *Allium cepa*, é a espécie mais sensível em estudos genotóxicos e mutagênicos de ambientes contaminados com poluentes ambientais e/ou substâncias tóxicas, além de apresentar alta correlação com outros bioensaios, característica que permite realizar extrapolações de resultados obtidos para outras espécies (MA et al, 1995; GRANT, 1999). Por exemplo, (GROVER; MALHI, 1988) observaram 75 a 91% de semelhança entre os testes vegetais e mamíferos, enquanto (RANK et al, 1993) observaram uma correlação em 82% com testes de carcinogenicidade em roedores.

O uso do *A. cepa*, como organismo-teste, é favorecido por apresentar um crescimento rápido de suas raízes, tolerância alta a condições de cultivos diferenciadas, ter um grande número de células em divisão, número de cromossomos pequeno, porém de grande tamanho, fácil disponibilidade e manuseio (MATSUMOTO et al, 2006). Tem sido muito utilizado em testes para avaliar a influência de contaminantes em recursos hídricos (CHRISTOFOLETTI; BETIOLLI; MARIN-MORALES, 2007) e solo (WHITE; CLAXTON, 2004) tais como cromo e corantes, derivados de petróleo (LEME; MARIN-MORALES, 2008) entre outros.

Os testes de citotoxicidade e genotoxicidade são baseados em parâmetros de padrões nucleares atípicos que consistem em um grande número de células com pareamento heteromórfico de nucléolos. Os resultados apresentados nestes testes podem ser considerados como um indicativo de que a amostra representa um perigo biológico também para outros organismos (FISKESJÖ, 1985).

A sua alta sensibilidade permite que nenhuma contaminação passe despercebida, mesmo em misturas complexas. Em um estudo realizado por PAKRASHI et al, (2014) foi constatado que a exposição a 12,5 ug/ml de NPs de TiO<sub>2</sub> células de *Allium cepa* mostrou ocorrência de várias anormalidades como: ruptura cromossômica, alterações na anáfase e formação de micronúcleos.

## REFERÊNCIAS

ABOU EL-NOUR, K. M. et al Synthesis and applications of silver nanoparticles. **Arabian journal of chemistry**, v. 3, n. 3, p. 135-140, 2010.

AHVENAINEN, R. New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruit and vegetables. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, n. 6, p. 179-187, 1996.

AHVENAINEN, R. **Novel Food Packaging Techniques**. CRC Press, 2003. 590 p.

ANGEL, B. M. et al The impact of size on the fate and toxicity of nanoparticulate silver in aquatic systems. **Chemosphere**, v. 93, n. 2, p. 359-365, 2013.

ANKANNA, S. et al Production of biogenic silver nanoparticles using *Boswellia ovalifoliolata* stem bark. **Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures (DJNB)**, v. 5, n. 2, 369–372, 2010.

ASHARANI, P.V.; HANDE, P.; VALIYAVEETTIL, S. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. **BMC Cell Biology**, v.10, p. 65, 2009.

AUGUSTIN, M. A.; SANGUANSRI, P. Nanostructured materials in the food industry. **Advances in food and nutrition research**, v. 58, p. 183-213, 183–213, 2009.

AZEREDO, H. Nanocomposites for food packaging applications. **Food Research International**, v. 42, n. 9, p. 1240-1253, 2009.

BATLEY, G. E.; KIRBY, J. K.; MCLAUGHLIN, M. J. Fate and risks of nanomaterials in aquatic and terrestrial environments. **Accounts of chemical research**, v. 46, n. 3, p. 854-862, 2012.

BAUN, A. et al Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing. **Ecotoxicology**, v. 17, n. 5, p. 387-395, 2008.

BOSETTI, M. et al Silver coated materials for external fixation devices: in vitro biocompatibility and genotoxicity. **Biomaterials**, v. 23, n. 3, p. 887-892, 2002.



BUFFET, P. E. et al A marine mesocosm study on the environmental fate of silver nanoparticles and toxicity effects on two endobenthic species: The ragworm *Hediste diversicolor* and the bivalve mollusk *Scrobicularia plana*. **Science of the Total Environment**, v.1, n.470–471, p. 1151–1159, 2014.

CHAUDHRY, Q. et al Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. **Food additives and contaminants**, v. 25, n. 3, p. 241-258, 2008.

CHEN, X.; SCHLUESENER, H. Nanosilver: a nanoproduct in medical application. **Toxicology letters**, v. 176, n. 1, p. 1-12, 2008.

CHRISTOFOLETTI, C. A.; BETIOLLI, J. V.; MARIN-MORALES, M. A. **Avaliação da influência de agentes contaminantes presentes nos recursos hídricos da região de Araras/SP, por meio do sistema-teste *Allium cepa***. In: SBMCTA 2007 - VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MUTAGÊNESE, CARCINOGENESE E TERATOGENESE AMBIENTALREVISTA BRASILEIRA DE TOXICOLOGIA: Mangaratiba-RJ 2007.

DALLAS, P.; SHARMA, V. K.; ZBORIL, R. Silver polymeric nanocomposites as advanced antimicrobial agents: classification, synthetic paths, applications, and perspectives. **Advances in colloid and interface science**, v. 166, n. 1, p. 119-135, 2011.

DE AZEREDO, H. Antimicrobial nanostructures in food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, v. 30, n. 1, p. 56-69, 2013.

DREXLER, E. K. **Engines of creation: the coming era of nanotechnology**. London: Forth Estate, 1990, 298p.

DURÁN, N. et al Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 6, p. 949-959, 2010.

DURAN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. **Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. São Paulo: Artiliber, 2006, 208p.

DUTTA, J.; HOFMANN, H. Nanomaterials. **Swiss Federal Institute of Technology**, p. 4, 2003.

EMAMIFAR, A et al Effect of nanocomposite packaging containing Ag and ZnO on inactivation of *Lactobacillus plantarum* in orange juice. **Food Control**, v. 22, n. 3, p. 408-413, 2011.

EMAMIFAR, A. et al Evaluation of nanocomposite packaging containing Ag and ZnO on shelf life of fresh orange juice. **Innovative food science & emerging technologies**, v. 11, n. 4, p. 742-748, 2010.

EMMAMBUX, N. M.; MINNAAR, A. The effect of edible coatings and polymeric packaging films on the quality of minimally processed carrots. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, n. 10, p. 1065-1071, 2003.

FABREGA, J. et al Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment. **Environement International**, v. 37, n. 2, p. 517-31, 2011.

FENT, K. Ecotoxicology of engineered nanoparticles. In: F.H Frimmel, R. Nieber (Eds.). **Nanoparticles in the water cycle**. Berlin: Springer, 2010. p.183-205.

FERNÁNDEZ, A. et al Preservation of aseptic conditions in absorbent pads by using silver nanotechnology. **Food research international**, v. 42, n. 8, p. 1105-1112, 2009.

FISKESJÖ, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985.

FOOK, M. et al Coleta seletiva de resíduos urbanos–Conscientização e importância da reciclagem. II Encontro de Extensão da UFPB. **João Pessoa**, 1995.

GAMBARDELLA, C. et al Developmental abnormalities and changes in cholinesterase activity in sea urchin embryos and larvae from sperm exposed to engineered nanoparticles. **Aquatic Toxicology**, v. 130, p. 77-85, 2013.

GIANNAKAS, A. et al Preparation and characterization of polymer/organosilicate nanocomposites based on unmodified LDPE. **Journal of applied polymer science**, v. 114, n. 1, p. 83-89, 2009.

GRANT, W. F. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations—a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 426, n. 2, p. 107-112, 1999.

GRIFFITT, R. J. et al Effects of chronic nanoparticulate silver exposure to adult and juvenile sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, n. 1, p. 160-167, 2012.

GROVER, I.; MALHI, P. Genotoxic effects of some organophosphorus pesticides. III: In vivo chromosomal aberration bioassay in root meristems of *Allium* and *Hordeum*. **Cytologia**, v. 53, n. 1, p. 181-191, 1988.

HU, Q. et al Effect of nanocomposite-based packaging on postharvest quality of ethylene-treated kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) during cold storage. **Food Research International**, v. 44, n. 6, p. 1589-1596, 2011.

INCORONATO, A. et al Agar hydrogel with silver nanoparticles to prolong the shelf life of Fior di Latte cheese. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 4, p. 1697-1704, 2011.

JO, H. J. et al Acute toxicity of Ag and CuO nanoparticle suspensions against *Daphnia magna*: The importance of their dissolved fraction varying with preparation methods. **Journal of hazardous materials**, v. 227, p. 301-308, 2012.

JUCHIMIUK, J.; MALUSZYNSKA, J. Transformed roots of *Crepis capillaries* a sensitive system for the evaluation of the clastogenicity of abiotic agents. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 565, n. 2, p. 129-138, 2005.

KANAYA, N. et al *Vicia faba* chromosomal aberration assay. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 310, n. 2, p. 231-247, 1994.

KWOK, K. W. et al Uptake of silver nanoparticles and toxicity to early life stages of Japanese medaka (*Oryzias latipes*): Effect of coating materials. **Aquatic Toxicology**, v. 120, p. 59-66, 2012.

LE CORRE, D.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Starch nanoparticles: A review. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 5, p. 1139-1153, 2010.

LEE, K. J. et al In vivo imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of zebrafish embryos. **ACS Nano**, v.1, p. 133-43, 2007.

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/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 650, n. 1, p. 80-86, 2008.

LI, T. et al Comparative toxicity study of Ag, Au, and Ag–Au bimetallic nanoparticles on *Daphnia magna*. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 398, n. 2, p. 689-700, 2010.

LIU, J. et al Chemical transformations of nanosilver in biological environments. **ACS nano**, v. 6, n. 11, p. 9887-9899, 2012.

LLORENS, A. et al Metallic-based micro and nanocomposites in food contact materials and active food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, v. 24, n. 1, p. 19-29, 2012.

LUOMA, S.N. **Silver nanotechnologies and the environment**: old problems or new challenges. Project on emerging nanotechnologies. Washington, DC: Woodrow Wilson International Centre for Scholars and PEW Charitable Trusts, 2008.

MA, T.-H. et al The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 334, n. 2, p. 185-195, 1995.

MARAMBIO-JONES, C.; HOEK, E. M. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 12, n. 5, p. 1531-1551, 2010.

MASTROMATTEO, M.; CONTE, A.; DEL NOBILE, M. A. Packaging strategies to prolong the shelf life of fresh carrots (*Daucus carota* L.). **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 13, p. 215-220, 2012.

MATSUMOTO, S. T. et al Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 1, p. 148-158, 2006.

MEI, N. et al Silver nanoparticle induced Mutations and Oxidative Stress in Mouse Lymphoma Cells. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 53, p. 409-419, 2012.

MICHAELI, W. **Tecnologia dos Plásticos**. São Paulo, 1995.

MUSANTE, C.; WHITE, J. C. Toxicity of silver and copper to *Cucurbita pepo*: Differential effects of nano and bulk-size particles. **Environmental toxicology**, v. 27, n. 9, p. 510-517, 2012.

MWILU, S. K. et al. Changes in silver nanoparticles exposed to human synthetic stomach fluid: Effects of particle size and surface chemistry. **Science of the Total Environment**, v. 447, p. 90-98, 2013.

PAKRASHI, S. et al. In Vivo Genotoxicity Assessment of Titanium Dioxide Nanoparticles by *Allium cepa* Root Tip Assay at High Exposure Concentrations. **PLoS One**, v. 9, n. 2, e87789, 2014.

PAUL, D.; ROBESON, L. Polymer nanotechnology: nanocomposites. **Polymer**, v. 49, n. 15, p. 3187-3204, 2008.

PORTE, A.; MAIA, L. H. **Alterações fisiológicas, bioquímicas e microbiológicas de alimentos minimamente processados**. *Boletim do CEPPA* 19: p.105-118, 2001.

PULIT, J.; BANACH, M.; KOWALSKI, Z. Nanosilver—making difficult decisions. **The International Council on Nanotechnologies**, v. 18, n. 2, p. 185-195, 2011.

RAGAERT, P.; DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J. Role of microbiological and physiological spoilage mechanisms during storage of minimally processed vegetables. **Postharvest biology and technology**, v. 44, n. 3, p. 185-194, 2007.

RANK, J. et al Genotoxicity testing of the herbicide Roundup and its active ingredient glyphosate isopropylamine using the mouse bone marrow micronucleus test, Salmonella mutagenicity test, and Allium anaphase-telophase test. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 300, n. 1, p. 29-36, 1993.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. A modified Allium test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. **Hereditas**, v. 118, n. 1, p. 49-53, 1993.

RIBEIRO, F. et al Silver nanoparticles and silver nitrate induce high toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*. **Science of The Total Environment**, v. 466–467, n. 0, p. 232-241, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969713007535>>. Acesso em: 12 de fevereiro de 2014.

RODRIGUES, A. F. Os Caminhos das Águas. **Agroanalysis**, p. 22-26. 1998.

RODRIGUEZ, F. **Principles of Polymer Systems**. London: Taylor and Francis, 1996, p.200.

SIMÕES, A. D. et al. Edible coatings containing chitosan and moderate modified atmospheres maintain quality and enhance phytochemicals of carrot sticks. **Postharvest biology and technology**, v. 51, n. 3, p. 364-370, 2009.

ŠIMON, P.; CHAUDHRY, Q.; BAKOŠ, D. Migration of engineered nanoparticles from polymer packaging to food--a physicochemical view. **Journal of Food & Nutrition Research**, v. 47, n. 3, p. 105–113, 2008.

SOARES, E. et al. Caracterização de Polímeros e Determinação de Constituintes Inorgânicos em Embalagens Plásticas Metalizadas. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 12, nº 3, p. 206-212, 2002.

STRUŻYŃSKI, W. et al. Markers of oxidative stress in hepatopancreas of crayfish (*Orconectes limosus*, raf) experimentally exposed to nanosilver. **Environmental toxicology**, 2013.

THAKOR, A. et al. Gold nanoparticles: a revival in precious metal administration to patients. **Nano letters**, v. 11, n. 10, p. 4029-4036, 2011.

VÖLKER, C.; OETKEN, M.; OEHLMANN, J. The biological effects and possible modes of action of nanosilver. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 223, p. 81-106, 2013.

WHITE, P. A.; CLAXTON, L. D. Mutagens in contaminated soil: a review. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 567, n. 2, p. 227-345, 2004.

WIJNHOFEN, S. W. 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.

YANG, F. et al. Effect of Nano-Packing on Preservation Quality of Fresh Strawberry (*Fragaria ananassa* Duch. cv Fengxiang) during Storage at 4° C. **Journal of food science**, v. 75, n. 3, p. C236-C240, 2010.

YANG, W. et al. Food storage material silver nanoparticles interfere with DNA replication fidelity and bind with DNA. **Nanotechnology**, v. 20, n. 8, p. 085102, 2009.

YAP, F. L. et al. Nanoparticle cluster arrays for high-performance SERS through directed self-assembly on flat substrates and on optical fibers. **ACS nano**, v. 6, n. 3, p. 2056-2070, 2012.

YU, S.-J.; YIN, Y.-G.; LIU, J.-F. Silver nanoparticles in the environment. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 15, n. 1, p. 78-92, 2013.

ZAPATA, P. A. et al Nanocomposites based on polyethylene and nanosilver particles produced by metallocenic “*in situ*” polymerization: synthesis, characterization, and antimicrobial behavior. **European Polymer Journal**, v. 47, n. 8, p. 1541-1549, 2011.

ZHOU, G.; WANG, W. Synthesis of Silver Nanoparticles and their Anti proliferation against Human Lung Cancer Cells In vitro, **Oriental Journal Of Chemistry**, v. 28, n. 2, p. 651-655, 2012.



## **CAPÍTULO 2. OBJETIVOS**

## 1. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

O objetivo principal desta tese de doutorado foi o de avaliar a toxicidade *in vivo* e *in vitro* de AgNPs em organismos, fornecendo subsídios para definições dos riscos e benefícios das partículas para o produto e usuário. Esta tese está inserida no projeto financiado pela CAPES 04/CII-2008 – Rede NANOBIOTEC-Brasil que tem como título: *Avaliação de Impactos de Aplicações da Nanotecnologia no Agronegócio*. Este trabalho visa contribuir no conhecimento da aplicação de AgNPs em embalagem para alimentos e dos seus potenciais efeitos na saúde humana e no meio ambiente, ocasionada por alterações em suas propriedades físico-químicas e biológicas, as quais diferem dos materiais *bulk* (macroescala), sendo que a probabilidade de consumo de nanopartículas depende da migração destas para o alimento.

### 2. 1. Objetivos Específicos

Entre os objetivos específicos destacam-se:

- i) Obtenção e caracterização de filmes poliméricos contendo AgNPs para embalagem de alimentos;
- ii) Processamento mínimo de cenoura embaladas com filmes poliméricos contendo AgNPs;
- iii) Avaliação dos efeitos físico-químico, microbiológicos e de permeabilidade a gases das embalagens contendo AgNPs, assim como, análise da possível migração da nanopartículas para o alimento;
- iv) Aplicação de teste de migração de nanopartículas metálicas seguindo normatização aprovada pela ANVISA;
- v) Síntese de AgNPs dispersas, com controle de forma, tamanho e estreita distribuição de tamanho semelhante ao aplicado a embalagens;
- vi) Realização de ensaios biológicos para avaliação da ecotoxicidade e toxicidade de AgNPs sintetizadas;

vii) Avaliar o efeito citotóxico de AgNP no crescimento das raízes de cebola e analisar a genotoxicidade sobre frequência de micronúcleos e de anormalidades da anáfase-telófase.

## **CAPÍTULO 3. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES**

Neste capítulo serão descritas a obtenção, caracterização estrutural e morfológica de filmes de polietileno de baixa densidade (PEDB) contendo AgNPs (em diferentes concentrações) inseridas em duas matrizes distintas: dióxido de silício (SiO<sub>2</sub>) e dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>). Os mesmos foram caracterizados por meio das técnicas de microscopia eletrônica de varredura, difração de raios-X, espectroscopia de infravermelho, análises térmicas e propriedades antimicrobianas, visando a aplicação em embalagens de alimentos.

### 3. 1 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3. 1.1 Materiais

Foram utilizados dois masterbatches<sup>2</sup> comerciais à base de polietileno de baixa densidade (PEBD), contendo em suas composições AgNPs dispersas em carreadores distintos. O primeiro máster foi denominado de A e continha 5% de SiO<sub>2</sub> (carreador das AgNPs) enquanto o segundo máster foi denominado de B e continha 15% de TiO<sub>2</sub> como carreador. Os masterbatches foram misturados a pellets de PEBD puro, obtidos da empresa Quattor® (PB 608), e homogeneizados por mistura manual em sacos plásticos durante 3 minutos, em porcentagem de massa conforme apresentado na Tabela 1.

**Tabela 1** Nomenclatura e proporção composicional entre a resina e os masterbatches empregados.

<b>Nomenclatura</b>	<b>Masterbatch: PEBD (%)</b>
A 2,5	2,5:97,5
A 50	50:50
A 100	100:0
B 2,5	2,5:97,5
B 50	50:50
B 100	100:0
PEDB	0:100

Fonte: elaborada pelo autor.

<sup>2</sup> Masterbatch: são concentrados de pigmentos, corantes ou aditivos que são dispersos em uma resina denominada resina veículo.

### **3.1. 2 Preparação dos Filmes**

Todas as composições foram obtidas na forma de filmes planos de  $5 \pm 0,8 \mu\text{m}$  de espessura e 18 cm de largura por meio de uma extrusora rosca simples de filmes planos (fabricante: AX plástico). As misturas mostradas na Tabela 1 foram processadas na extrusora utilizando os seguintes parâmetros: zonas de aquecimento com temperaturas de 160 °C (zona 1), 145 °C (zona 2) e 130 °C (zona 3) e a velocidade do parafuso de 35 rpm, para todas as formulações. O produto extrudado foi coletado somente após as três zonas atingirem a temperatura de equilíbrio. O material obtido apresentava-se homogêneo (sem a presença de bolhas e imperfeições na superfície).

### **3. 1. 3. Caracterização dos filmes**

#### **3.1.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi utilizada para identificar as características morfológicas do filme, bem como das AgNPs. As amostras foram preparadas por fratura criogênica e as imagens foram obtidas no modo de retroespalhamento, usando um microscópio FEI, modelo Inspecionar S50 com tensão de 25kV. Espectrometria de energia dispersiva de raios-X (EDS) foi realizada para analisar a composição química das amostras.

#### **3.1.3.2 Difração de raios X (DRX)**

Um difratômetro Shimadzu modelo DRX-6000 foi utilizado para as coleta dos difratogramas de raios X dos filmes. Amostras poliméricas foram colocados na câmara de raios X sob tensão de aceleração de 30 kV, corrente de 30 mA e velocidade de  $1^\circ\text{min}^{-1}$ . As amostras foram varridas com os valores  $2\theta$  de 5 a 80°. Os difratogramas foram ajustados usando uma curva de perfil gaussiano. O grau de cristalinidade ( $X_c$  %) foi estimado com base na área sob os picos cristalinos e amorfos após a correção da linha de base apropriada e aplicação da técnica de deconvolução.

#### **3.1.3.3 Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)**

Os filmes foram analisados por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), utilizando um espectrofotômetro Paragon 1000 da

Perkin-Elmer. Todas as medições foram obtidas utilizando 32 varreduras no intervalo 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ , com uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . As amostras dos filmes foram diretamente fixadas em um suporte, e os espectros de FTIR foram coletados no modo de transmissão. O software utilizado foi spectrumv5 3.1.

### 3.1.3.4 Análise térmica: Termogravimetria (TG) e Calorimetria diferencial de Varredura (DSC)

A análise termogravimétrica (TGA) dos filmes extrudados foi realizada em um analisador termogravimétrico TGA - Q500 (TA Instruments) no intervalo de temperatura de 10 a 800  $^{\circ}\text{C}$ , utilizando uma taxa de aquecimento de 10  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . O fluxo do nitrogênio e ar sintético foi mantido a 40  $\text{mL min}^{-1}$  e 60  $\text{mL min}^{-1}$ , respectivamente.

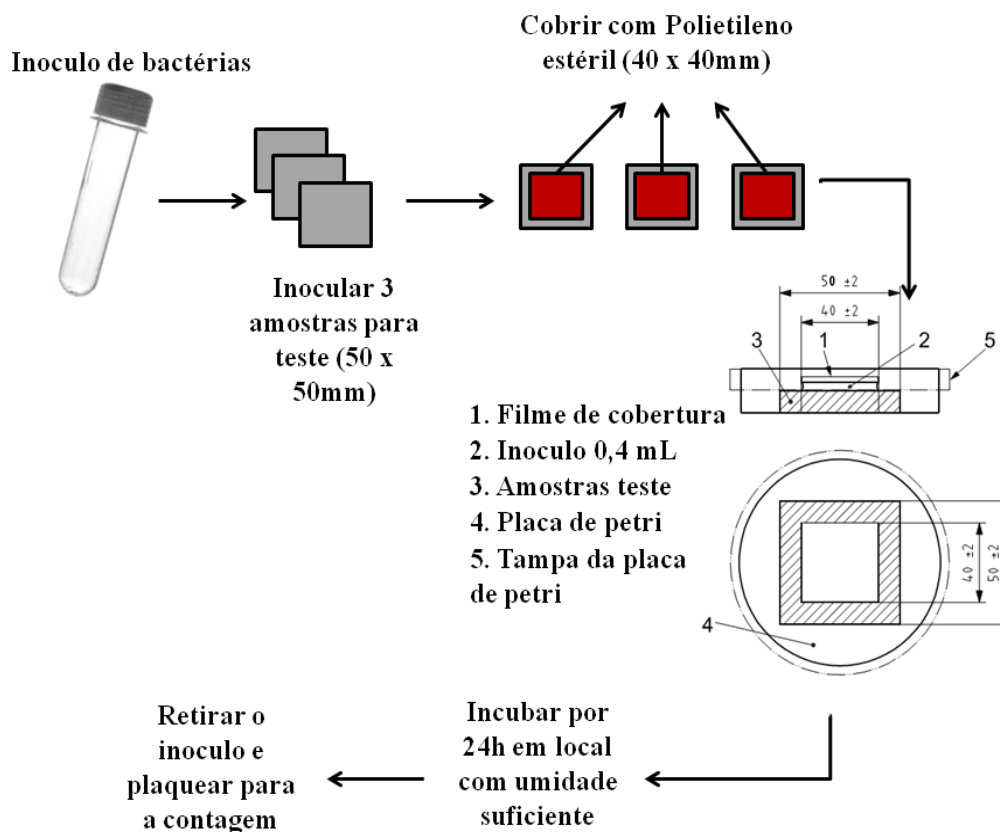
As curvas de calorimetria diferencial de varredura (DSC) foram obtidas no equipamento modelo Q100 (TA-Instruments). O experimento foi conduzido em temperaturas de 10 a 200  $^{\circ}\text{C}$ , utilizando uma taxa de aquecimento de 10  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , sob fluxo de nitrogênio de 60  $\text{mL min}^{-1}$ . Em seguida, as amostras foram resfriados a uma taxa de 10  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  até 10  $^{\circ}\text{C}$ .

### 3.1.3.5 Análise microbiológica

A atividade antimicrobiana dos filmes foi avaliada utilizando a norma japonesa (JIS) Z 2801:2000 - "produtos antimicrobianos" - teste de atividade e eficácia antimicrobiana (Figura 2). As cepas utilizadas foram: *Escherichia coli* (ATCC 8739) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Os microrganismos testados foram introduzidos em uma cultura líquida e padronizados para diluição em caldo nutritivo produzindo  $1 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Uma amostra foi utilizada como controle para determinar a capacidade de inibição do agente antimicrobiano presente nas amostras testadas. Os filmes, em triplicata, foram cortadas em amostras de dimensões de 5 x 5cm e inoculados com os microrganismos. Em seguida, todas as amostras foram incubadas a 37  $^{\circ}\text{C}$  para a *E. coli* e a 35  $^{\circ}\text{C}$  para *Staphylococcus aureus* com 90 % de umidade relativa. Após 24 horas de incubação foi realizada a contagem das colônias. O valor de atividade foi calculado a partir da diferença entre o número de unidades formadoras de colônias

(UFC) sobre a superfície das amostras contendo AgNPs com o valor medido na amostra controle, de acordo com JIS Z 2801:200015.

**Figura 2. Representação esquemática da Norma Jis Z (2801:2000).**



Fonte: Elaborada pelo autor

## 3. 2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.2.1 MEV

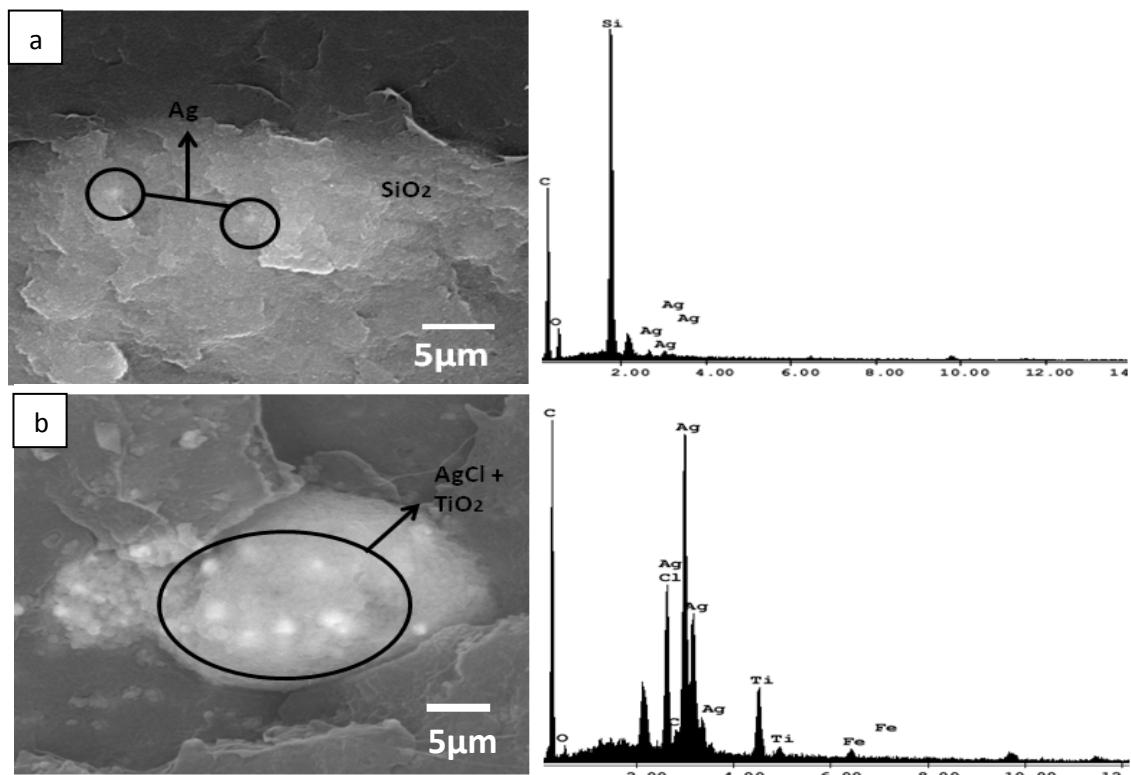
Microscopias eletrônicas de varredura (MEV) dos filmes fraturados A e B são mostradas na Figura 3a e b, respectivamente. Na Figura 3a observa-se pelo espectro de EDS realizado na área em destaque que o filme tem em sua estrutura aglomerados formados por Ag, Si, O e C. Observa-se na Figura 3b, que o filme apresenta formação de aglomerados contendo em sua composição Ag, Cl, Ti, Fe e C. Os círculos na Figura 3 a e b indicam as partículas de Ag contidas nos carreadores de SiO<sub>2</sub> (Figura 3a) e TiO<sub>2</sub> (Figura 3b), respectivamente. As AgNPs estão presentes em ambos os materiais, contudo, incorporados em partículas de dióxido de sílica nas amostras de A e de óxido



de titânio nas amostras de B. Segundo a literatura, sabe-se que materiais mesoporosos, tais como  $\text{SiO}_2$  e  $\text{TiO}_2$  são matrizes adequadas para o carregamento de AgNPs, devido à sua elevada área de superfície e de poros bem distribuídos que podem ser ajustados entre 2 e 20 nm (BOIS et al, 2008).

Além disso, o elemento C está presente no resultado de EDS (Figura 3 ab) devido à presença da matriz polimérica de polietileno. O Cl observado na Figura 3a tem sua origem do AgCl composto que foi detectada em análises de DRX (Figura 4a) das amostras B.

**Figura 3** Imagens de MEV (esquerda) e espectro EDS (direita) dos filmes contendo AgNPs: A contendo  $\text{SiO}_2$  (a) e B contendo  $\text{TiO}_2$ (b) em suas composição.



Fonte: Figura Elaborada pelo autor.

### 3.2.2 DRX

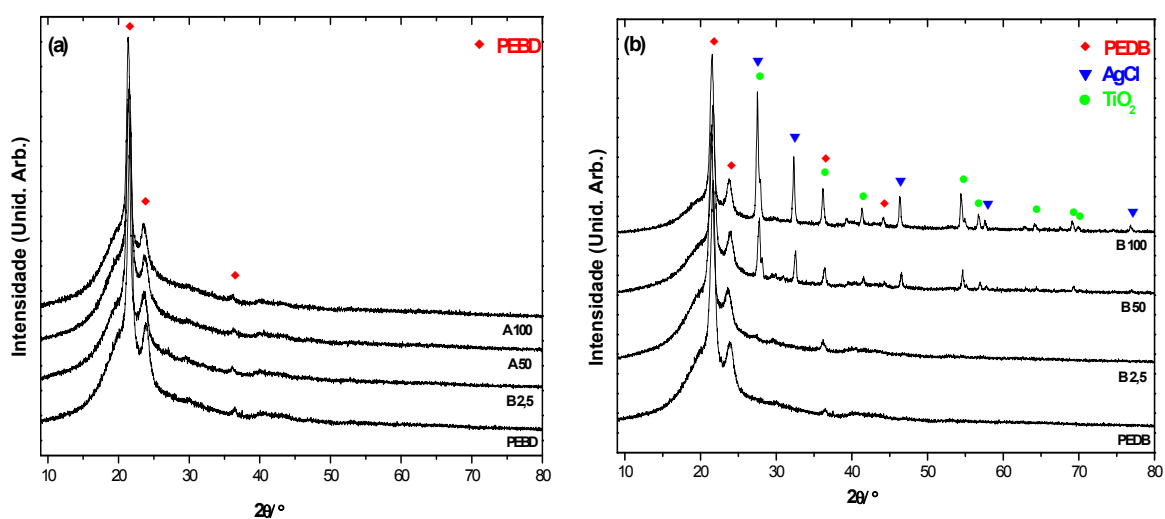
As Figuras 4a e b apresentam os resultados da análise de raios-X para os filmes A e B, respectivamente. Os nanocompósitos estudados mantiveram as características da estrutura cristalina ortorrômbica de polietileno (XIA et al, 2006; USHAKOV et al,

2008), que apresentam valores de pico de  $2\theta$  em  $21,5^\circ$  (110) e  $23,9^\circ$  (200) (Olmos *et al*, 2012). Além disso, a estrutura do polietileno obtido está de acordo com a fase ortorrômbica segundo ficha cristalográfica JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards) número 053-1859 para todas as amostras (Figura 4a e b).

Na Figura 4a apenas os picos de difração de polietileno estão presentes em todas as amostras. Este fato indica que o elemento de Si identificado nestas amostras por análise EDS (Figura 3a) pode estar em uma fase não cristalina, tais como,  $\text{SiO}_2$  amorfo. Ag (Figura 4a) não foi observada na análise de DRX, muito provavelmente devido à baixa concentração deste elemento nas amostras.

A análise da Figura 4b mostra que amostras contendo maior teor de B (B50 e B100) apresentam picos de  $\text{TiO}_2$  mais pronunciados, sendo determinado pela ficha JCPDS 021-1276 como a forma rutilo. De acordo com a literatura (Liu *et al*, 2009) o pico de difração do rutilo em  $2\theta = 27,4^\circ$  (110), como observado na Figura 4b, difere da forma anatase, que apresenta picos em  $2\theta = 25,2^\circ$  (101). Picos de AgCl foram observados nas amostras de B50 e B100 (Figura 4b), de acordo com o número da ficha JCPDS 031-1238. Picos de  $\text{TiO}_2$  e AgCl não foram encontrados para a amostra B 2,5, provavelmente devido à baixa concentração destes compostos na amostra, se encontrando portanto abaixo do limite de detecção do equipamento.

Figura 4. Difratogramas de raios-X dos compostos contendo: Ag/ $\text{SiO}_2$  (a); Ag/ $\text{TiO}_2$  (b).

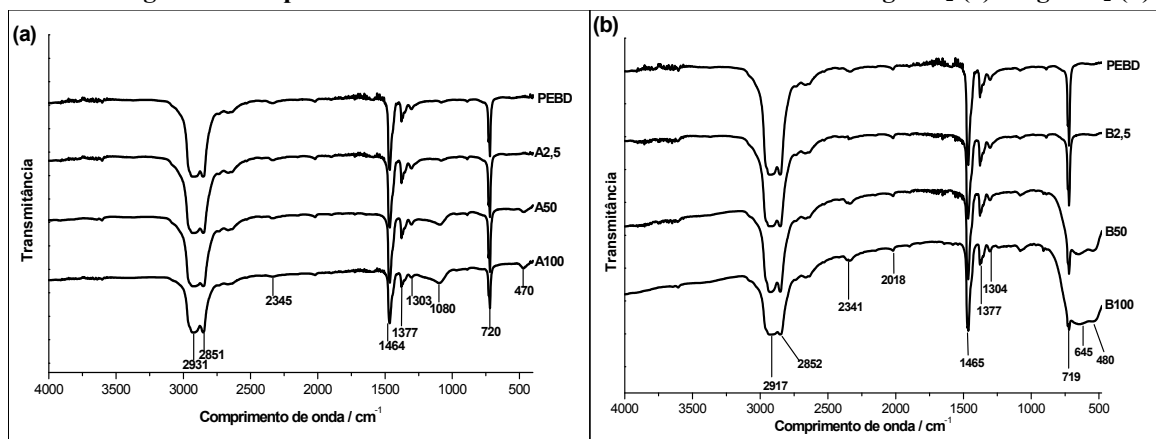


Fonte: Figura Elaborada pelo autor.

### 3.2.3 FTIR

As Figuras 5a e b mostram os espectros de FTIR das amostras contendo PEDB e PEBD com AgNPs, dispersas em SiO<sub>2</sub> e TiO<sub>2</sub>, respectivamente, de acordo com a nomenclatura apresentada Tabela 1. Os filmes nanocompósitos apresentam bandas características de PEDB puro, como a banda em 719 cm<sup>-1</sup> que corresponde à deformação angular assimétrica CH<sub>2</sub> (RAJANDAS et al, 2012) e a banda de 1308 cm<sup>-1</sup> que corresponde ao balanço CH<sub>2</sub> (MISHRA; LUYT, 2008). As vibrações em 1465 cm<sup>-1</sup> e 1377 cm<sup>-1</sup> correspondem à deformação angular de CH<sub>2</sub> (JEZIÓRSKA et al, 2012), enquanto que os picos em 2852 cm<sup>-1</sup> e 2920 cm<sup>-1</sup> estão atribuídos ao alongamento da banda CH<sub>2</sub> simétrica e assimétrica, respectivamente (LIU et al, 2009).

Na Figura 5(a), observa-se que os espectros de FTIR dos nanocompósitos são consistentes com o espectro de infravermelho do padrão de PEBD. Ainda na Figura 5(a) são apresentados os espectros de FTIR dos filmes contendo partículas de SiO<sub>2</sub>. Observa-se a presença de uma banda de baixa definição em 1080 cm<sup>-1</sup>, o que pode ser atribuído ao grupo Si-O-Si (GOWRI et al, 2012). As bandas correspondentes 1100-900 cm<sup>-1</sup> e 467 cm<sup>-1</sup> podem ser atribuídas ao grupo Si-O de partículas de óxido de silício (JEZIÓRSKA et al, 2012). O espectro de FTIR exibido na Figura 5(b) corresponde ao filme contendo partículas de TiO<sub>2</sub>. De acordo com a literatura (LIU et al, 2009) duas vibrações situadas em 425-475 cm<sup>-1</sup> e 600-625 cm<sup>-1</sup> estão relacionadas ao rutilo, que no caso da Figura 5(b) corresponde aos picos localizados em 480 cm<sup>-1</sup> e 645 cm<sup>-1</sup> para as amostras B 100 e B 50. Bandas de rutilo não foram observadas na amostra B 2,5, provavelmente devido à concentração elevada de PEDB que pode ter mascarado o baixo teor do masterbatch B na amostra estudada.

Figura 5 Os espectros de FTIR das amostras de PEBD contendo: Ag/SiO<sub>2</sub> (a) e Ag/TiO<sub>2</sub> (b).

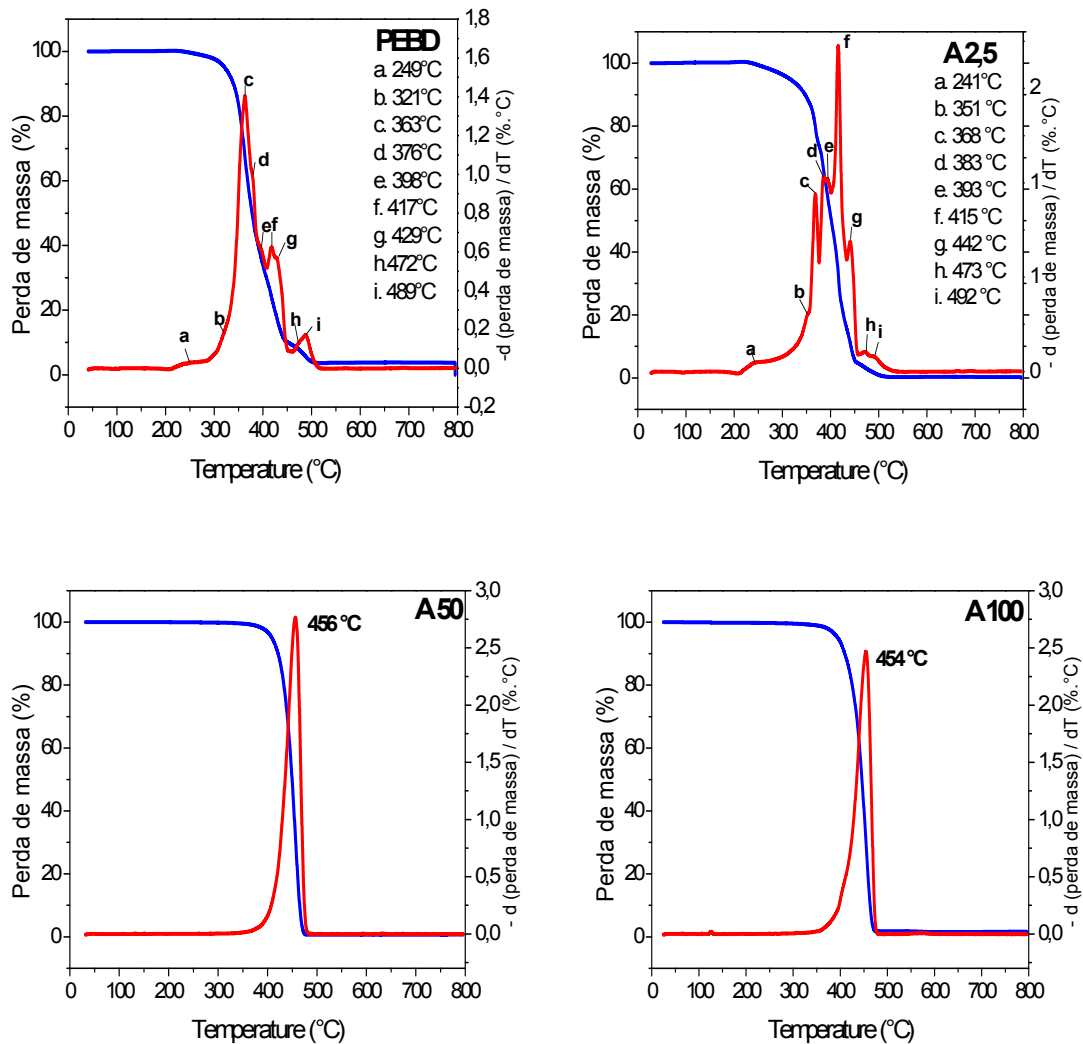
Fonte: Figura Elaborada pelo autor.

### 3.2.4 Análises térmicas: TGA e DSC

Os efeitos da presença das AgNPs sobre as propriedades térmicas dos filmes nanocompósitos foram comparados com o PEBD puro, utilizado como matriz, sob as mesmas condições. As Figuras 6 e 7 apresentam os gráficos de TGA e as curvas da derivada, DTG, para as diferentes composições de masterbatches/matriz.

Observa-se, na Figura 6, que os compósitos PEBD e A 2,5 apresentam várias fases de decomposição enquanto o A 50 e A 100 se decompõem em apenas uma única fase como observado nas curvas de DTG. No A 2,5 apesar do componente principal ser o PEBD observa-se uma mudança no comportamento da decomposição com a adição de nanopartículas tendo, portanto um perfil de degradação diferente do PEBD puro. Os compósitos de PEBD e A 2,5 apresentam nove etapas de degradação, como pode se observado na Figura 6 representado pelos picos da DTG, em que os picos "a" e "b" podem ter relação com a presença de compostos voláteis nas amostras estudadas. Uma antecipação no perfil de degradação do A 2,5 demonstrou que uma pequena quantidade de AgNPs pode promover essa alteração no filme provavelmente porque a prata metálica doa elétrons ao polímero, catalisando a degradação oxidativa (GORGHIU et al, 2004). No entanto, A 50 e A 100 têm etapas de degradação semelhantes com pico de temperatura de oxidação perto de 455 °C.

Figura 6 Análise termogravimétrica (TGA) e curvas DTG para A e atmosfera de ar sintético 10 a 800°C.



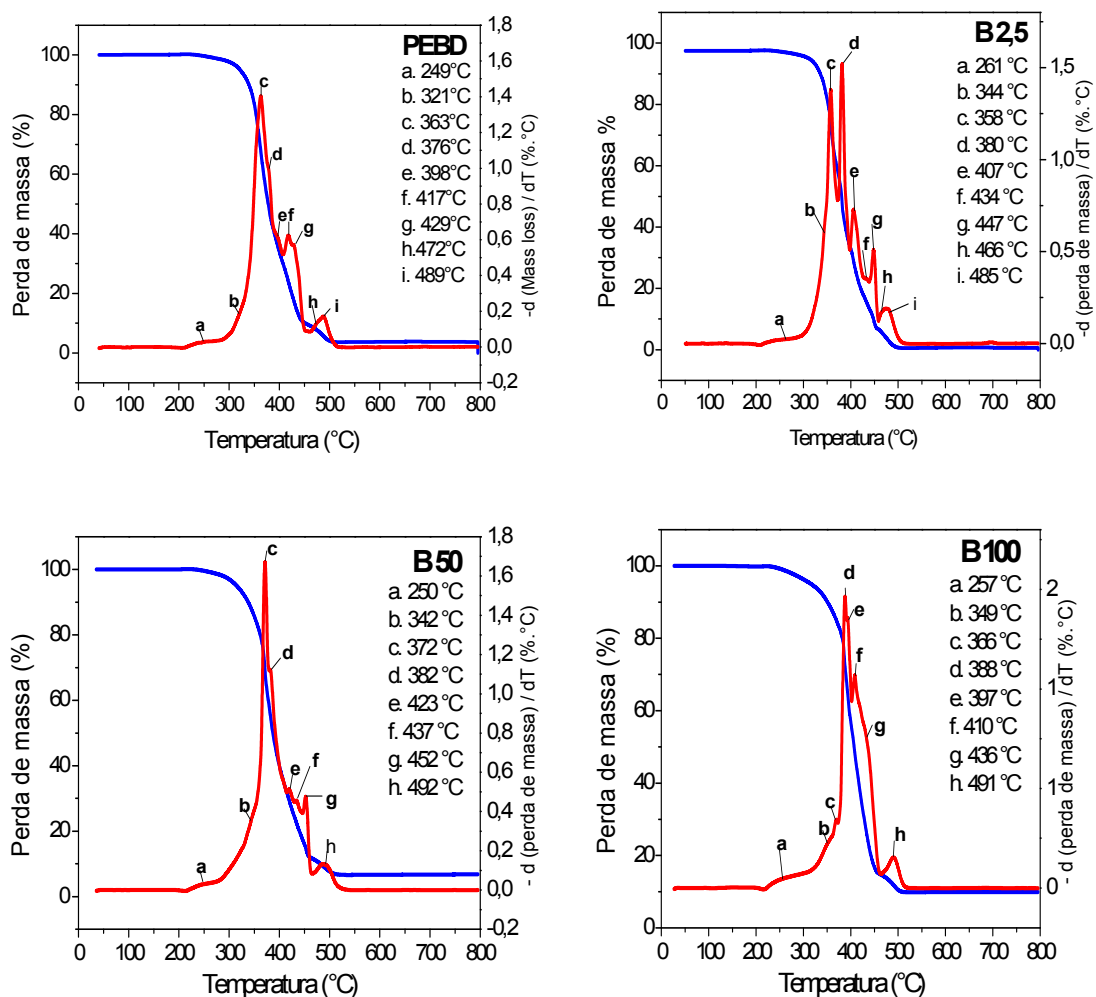
Fonte: Elaborada pelo autor.

O comportamento térmico da B 2,5 é similar ao do PEBD com nove etapas de degradação, enquanto a B 50 e B 100 teve oito etapas, diferente das amostras A 50 e A 100, que se degradaram em uma única etapa. A adição de masterbatches B em PEBD aumentou a temperatura de degradação das amostras, tal como pode ser visto na Figura 7, embora alguma atividade catalítica pudesse ser esperada nas amostras que contêm alto teor de  $TiO_2$  (FARROKHPAY, 2009). No entanto, o atraso na degradação das amostras de B 50 e B 100 pode ser devido ao aumento da presença de  $TiO_2$  na estrutura de rutilo, como mostrado no espectro de FTIR, o qual exibe uma elevada estabilidade térmica (ALLEN et al, 2004).

### CAPÍTULO 3- OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

De acordo com a Figura 6 e 7, o PEBD apresenta temperatura de início da decomposição ( $T_{onset}$ ) por volta de 430 °C, o que corrobora com resultados previamente reportados na literatura (GUPTA; KUMAR; SHARMA, 2010; MISHRA, 2012). B 2,5 e A 2,5 mostram  $T_{onset}$  próxima a 330 °C, enquanto  $T_{onset}$  do A 100 e B 100 amostras são 417 °C e 451 °C, respectivamente. Estes resultados podem indicar que a variação da estabilidade térmica para as amostras é devido às características distintas entre o PEBD do master e o PEBD utilizado para o processamento dos filmes. Tais características distintas podem ser originadas, por exemplo, de diferentes processamentos do PEBD (BOGDANOVIĆ; SRDANOVIĆ, 1986). Pela mesma razão, uma diferença na percentagem residual pode ser observada (Tabela 2). No entanto, a diferença de estabilidade térmica entre as amostras não comprometeu o processamento do filme, uma vez que a temperatura de extrusão não foi superior a 200 °C.

**Figura 7** Análise termogravimétrica (TGA) e curvas de DTG para B em atmosfera de ar sintético de 10 °C to 800 °C.



Fonte: Elaborada pelo autor.

### CAPÍTULO 3- OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

Em contraste, a adição do masterbatch B aumentou ligeiramente a estabilidade térmica dos filmes, causada principalmente por dois fatores: i) um teor mais elevado de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> proporciona uma maior difusão de calor no interior do compósito (DEKA; MAJI, 2011), o que atrasa a queima de material e ii) possibilidade de ocorrência de reação de intercrossamento entre os dois polímeros (PEBD) que compõem a mistura base e o matriz (HUI; CHATTOPADHYAY; CHAKI, 2010). A perda de massa ( $\Delta m$ ) das amostras variou entre 90,9% e 99,8% (Tabela 2). As composições intermédias (2,5 e 50) tinham valores intermédios para  $\Delta m$ , sugerindo uma homogeneização adequada do sistema polimérico, também observado em análises de DSC. Os resíduos deixados após a degradação de filmes poliméricos (superior a 600 °C) aumentou com a adição de ambos os masterbatches (A e B), que também pode ser devido ao PEBD (GUPTA; KUMAR; SHARMA, 2010).

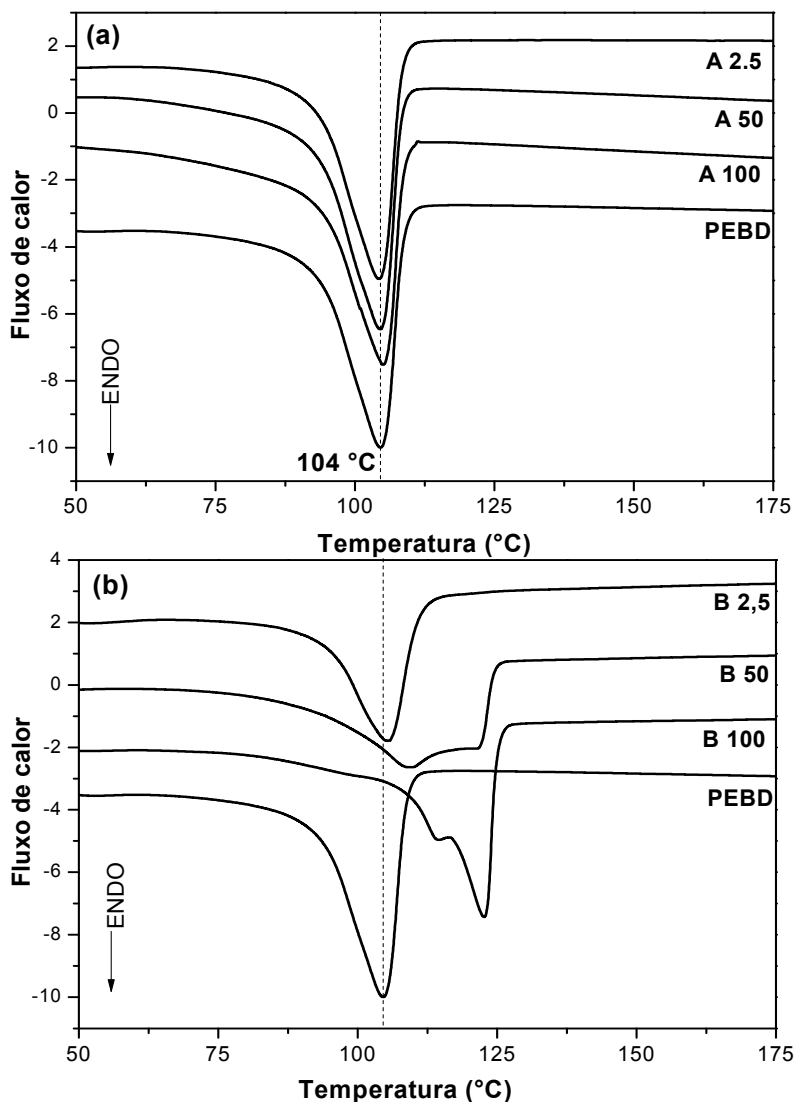
**Tabela 2 Análise de termogravimetria (TGA) dos filmes estudados.**

<b>Amostras</b>	<b>T<sub>onset</sub> (°C)</b>	<b>T<sub>peak</sub> (°C)</b>	<b>Resíduo (%)</b>	<b>Perda de massa (<math>\Delta m</math> %)</b>
PEBD	428.14	463	3.69	96.3
A 2.5	328.72	365	0.28	99.8
A 50	428.97	456	0.70	99.2
A 100	417.42	454	1.52	98.4
B 2,5	335.63	369	0.72	99.3
B 50	442.04	462	6.65	93.4
B 100	451.88	466	9.89	90.9

Fonte: Tabela elaborada pelo autor.

A Figura 8 apresenta as curvas de DSC utilizadas para calcular a temperatura de fusão ( $T_m$ ) e entalpias de fusão ( $\Delta H_m$ ), apresentada na Tabela 3. A temperatura de fusão ( $T_m$ ) de PEBD puro foi de 104 °C, similar a valores encontrados na literatura (ZAKY; MOHAMED, 2010). O filme A 100 apresentou temperatura de fusão de 105 °C. As amostras A 50 e A 2,5 apresentou  $T_m$  perto do apresentado pelo filme de PEBD puro.

Figura 8 Calorimetria diferencial de varredura (DSC) para os filmes: (a) A e (b) do B.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os filmes B 50 apresentaram reação endotérmica mais larga e com formação de três picos (Figura 8). O primeiro pico de temperatura, a 102 °C, é correspondente aos picos endotérmicos dos filmes de PEBD (Tpico 104 °C). O segundo e terceiro pico a 118 e 122 °C, respectivamente, correspondem aos dois picos 121 e 123 °C, observado nos filmes B 100. Os três picos de fusão de PEBD já foram reportados na literatura (GOFFIN et al, 2011), os quais possivelmente podem ser causados pela existência de diversas estruturas cristalinas, devido à presença de materiais com morfologias e composições diferentes. Observa-se na Figura 8 um deslocamento das curvas nas composições intermediárias para ambos os materiais, o que é mais evidente nas



amostras de B, confirmando a homogeneização do sistema. Este fato está de acordo com os resultados de TGA (Figura 6 e 7) que sugerem essa homogeneização.

**Tabela 3** Dados obtidos pela técnica de calorimetria diferencial de varredura (DSC) dos filmes estudados.

<b>Amostras</b>	<b>T<sub>m</sub> (°C)</b>	<b>ΔH<sub>m</sub> (J g<sup>-1</sup>)</b>
PEBD	104.6	105.4
A 2,5	104.4	91.7
A 50	104.5	79.6
A 100	105.0	89.5
B 2,5	105.5	72.3
B 50	109.85	97.72
B 100	122.61	106.8

Fonte: Elaborada pelo autor.

As entalpias de fusão ( $\Delta H_m$ ) dos filmes foram afetadas quando comparados com filme de PEBD puro, o que também foi observado na literatura (SPIRIDON et al, 2012). A diminuição da entalpia de amostras de A e B 2,5 e B 50 quando comparado com o PEBD puro, podem ser causadas por uma forte interação entre o máster e o polímero da matriz que forma uma mistura homogênea (QUENTAL et al, 2010).

Na Tabela 4 está representado o grau de cristalinidade ( $X_c\%$ ) de todas as amostras que foram calculados a partir dos difratogramas de DRX. Em princípio, a adição de sílica promoveu um aumento da cristalinidade do produto final para as matrizes poliméricas de PEBD, uma vez que as partículas de sílica podem atuar como núcleos para o crescimento de cristais (GIANNAKAS et al, 2009). No entanto, observou-se que a adição de masterbatch A para a matriz de PEDB não causou alterações significativas nas estruturas cristalinas de PEBD, tal como observado em trabalhos anteriores (BRUNA et al, 2012). A amostra B 2,5 mostrou uma redução de cristalinidade 50,0-42,0% em comparação com puro PEDB. Este é um efeito de inibição da cristalização que ocorre durante o processamento de polímeros, devido à presença de baixo teor de nanopartículas.

Tabela 4. Cristalinidade dos filmes A (SiO<sub>2</sub>) e B (TiO<sub>2</sub>) obtida por meio da análise de DRX.

Amostras	DRX X <sub>c</sub> (%)
PEBD	50.0
A 2,5	51.0
A50	49.0
A100	44.0
B 2,5	42.0
B50	56.0
B 100	63.0

Fonte: Elaborada pelo autor.

### 3.2.5 Atividade antimicrobiana de filmes contendo AgNPs

Os ensaios antimicrobianos realizados de acordo com a norma JIS Z 2801:2000 mostraram que os nanocompósitos de polietileno contendo AgNPs exibem intensas propriedades antimicrobianas contra os microrganismos testados. As propriedades antimicrobianas de AgNPs são conhecidas (AKHAVAN; GHADERI, 2010; BHATTACHARYA et al, 2012) por sua alta relação área superficial/ volume. Na literatura são reportados três possíveis mecanismos para a atividade antimicrobiana das AgNPs: i) O primeiro é resultado da capacidade das nanopartículas de Ag (CHALOUPKA, MALAM, SEIFALIAN, 2010; LALUEZA ET AL, 2011) em produzir buracos nas membranas celulares de bactéria, causando danos irreparáveis (EMAMIFAR *et al*, 2010); ii) O segundo ocorre quando as AgNPs metálica (não oxidadas) se ligam ao oxigênio e em seguida, atuam como catalisador para a oxidação (KUMAR et al, 2004). O oxigênio adsorvido na superfície da nanopartícula de prata irá facilmente reagir com os grupos sulfidrilas (-S-H) que compõe a superfície de bactérias, fazendo com que os átomos de enxofre formem uma ligação R-S-S-R, e, por conseguinte, impeçam a respiração bacteriana ocasionando a sua morte; iii) E o terceiro inibição da produção de trifosfato de adenosina (ATP) e replicação do DNA (DALLAS, SHARMA, ZBORIL, 2011). Os filmes nanocompósitos apresentaram atividade antimicrobiana maior contra o *S. aureus* do que *E.Coli*, para todos os nanocompósitos

estudados, conforme demonstrado na Tabela 5. Estes resultados estão de acordo com literatura (JOKAR et al, 2012), em que foi observado um melhor efeito inibitório sobre bactérias Gram-positivas *S. aureus* do que Gram-negativa *E. coli*. A ação antimicrobiana pode estar relacionada com as diferenças entre as membranas das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas devido à espessura da camada de peptidoglicano. Bactérias Gram-positivas têm camada de peptidoglicano de cerca de 30 nm, enquanto as bactérias Gram-negativas tem camada mais fina (2 a 3 nm), contudo apresentam uma membrana externa não encontrada nas Gram-positivas (MORONES et al, 2005).

**Tabela 5** Comparação das atividades antimicrobianas de nanocompósitos de prata.

	<i>S. aureus</i>			<i>E. coli</i>		
	Inóculo	Concentração 24 h (CFU/mL)	Redução (%)	Inóculo	Concentração o 24 h (CFU/mL)	Redução (%)
<b>PEBD</b>	$1.9 \times 10^4$	$1.9 \times 10^4$	0	$1.4 \times 10^7$	$1.4 \times 10^7$	0
<b>A 2,5</b>	$1.9 \times 10^4$	$3.7 \times 10^4$	0	$1.4 \times 10^7$	$1.6 \times 10^7$	0
<b>A 50</b>	$1.9 \times 10^4$	< 10	99.9	$1.4 \times 10^7$	$1.1 \times 10^6$	92
<b>A 100</b>	$1.9 \times 10^4$	< 10	99.9	$1.4 \times 10^7$	$5.2 \times 10^4$	99.6
<b>B 2,5</b>	$1.9 \times 10^4$	< 10	99.9	$1.4 \times 10^7$	$7.3 \times 10^4$	99.4
<b>B 50</b>	$1.9 \times 10^4$	< 10	99.9	$1.4 \times 10^7$	$4.2 \times 10^5$	97
<b>B 100</b>	$1.9 \times 10^4$	< 10	99.9	$1.4 \times 10^7$	$3.7 \times 10^3$	99.97

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os dados da Tabela 5 mostram a eficácia da prata na redução de microrganismos, tanto para as amostras A e B, exceto para A 2,5, provavelmente, devido à baixa concentração de prata. Em geral, as amostras B apresentaram um desempenho antimicrobiano ligeiramente superior às amostras de A, possivelmente devido à presença de AgCl (ver. Figura 3), uma vez que este composto também apresenta propriedade antimicrobiana (TOMŠIČ et al, 2009; NOCCHETTI et al, 2013). Além disso, o TiO<sub>2</sub> utilizado como carreador de prata em amostras B é altamente oxidativo sendo capaz de degradar compostos orgânicos, tais como membranas bacterianas (HUANG et al, 2000), e este efeito pode ser amplificado na presença de AgNPs (ZHANG; CHEN, 2009; AKHAVAN; GHADERI, 2010). Os resultados mostram que ambos os masterbatches A e B são bons candidatos para a produção de embalagens

antibacterianas de alimentos à base de nanopartículas PEDB/Ag, com o objetivo de aumentar o tempo de vida de prateleira do produto.

### 3. 3. CONCLUSÃO

Filmes de PEBD contendo dois masterbatches distintos com AgNPs foram produzidos e caracterizados por diferentes técnicas, incluindo MEV, DRX, FTIR, DSC, TGA e atividade antimicrobiana. O grau de cristalinidade de acordo com a análise de DRX mostrou a elevada dispersão de AgNPs incorporados em carreadores de SiO<sub>2</sub> e TiO<sub>2</sub>. Ambos compósitos A e B apresentaram boas propriedades antimicrobianas contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, de acordo a norma aplicada. Especificamente, em termos de propriedades antimicrobianas, B mostrou ser ligeiramente mais eficiente devido à presença de AgCl e TiO<sub>2</sub>. Os resultados evidenciam a possibilidade do uso de nanocompósitos à base de polietileno de baixa densidade e AgNPs dispersos em distintas plataformas para produzir filmes para embalagens de alimentos, uma vez que a atividade antimicrobiana é uma característica desejada para aumentar o tempo de vida de prateleira de alimentos.

### REFERÊNCIAS

ANONYMOUS. JIS Z 2801:2000. Antimicrobial products test for antimicrobial activity and efficacy. Japanese Standards Association, Tokyo, Japan, 2000.

AKHAVAN, O.; GHADERI, E. Self-accumulated Ag nanoparticles on mesoporous TiO<sub>2</sub> thin film with high bactericidal activities. **Surface and Coatings Technology**, v. 204, n. 21, p. 3676-3683, 2010.

ALLEN, N. S. et al Degradation and stabilisation of polymers and coatings: nano versus pigmentary titania particles. **Polymer degradation and stability**, v. 85, n. 3, p. 927-946, 2004.

BHATTACHARYA, D. et al Antibacterial activities of polyethylene glycol, tween 80 and sodium dodecyl sulphate coated silver nanoparticles in normal and multi-drug resistant bacteria. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 12, n. 3, p. 2513-2521, 2012.

BOGDANOVIĆ, V.; SRDANOVIĆ, J. Differences between low density polyethylenes synthesised at homogeneous and heterogeneous reacting conditions. **Journal of applied polymer science**, v. 31, n. 4, p. 1143-1145, 1986.

BOIS, L. et al Silver nanoparticles growth in a mesoporous silica film templated with the F127 triblock copolymer. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 325, n. 1, p. 86-92, 2008.

BRUNA, J. et al Development of MtCu<sub>2+</sub>/LDPE nanocomposites with antimicrobial activity for potential use in food packaging. **Applied Clay Science**, v. 58, p. 79-87, 2012.

CHALOUPKA, K.; MALAM, Y.; SEIFALIAN, A. M. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. **Trends in biotechnology**, v. 28, n. 11, p. 580-588, 2010.

DALLAS, P.; SHARMA, V. K.; ZBORIL, R. Silver polymeric nanocomposites as advanced antimicrobial agents: classification, synthetic paths, applications, and perspectives. **Advances in colloid and interface science**, v. 166, n. 1, p. 119-135, 2011.

DEKA, B. K.; MAJI, T. K. Effect of TiO<sub>2</sub> and nanoclay on the properties of wood polymer nanocomposite. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, v. 42, n. 12, p. 2117-2125, 2011.

EMAMIFAR, A. et al Evaluation of nanocomposite packaging containing Ag and ZnO on shelf life of fresh orange juice. **Innovative food science & emerging technologies**, v. 11, n. 4, p. 742-748, 2010.

FARROKHPAY, S. A review of polymeric dispersant stabilisation of titania pigment. **Advances in colloid and interface science**, v. 151, n. 1, p. 24-32, 2009.

GIANNAKAS, A. et al Preparation and characterization of polymer/organosilicate nanocomposites based on unmodified LDPE. **Journal of applied polymer science**, v. 114, n. 1, p. 83-89, 2009.

GOFFIN, A.-L. et al From interfacial ring-opening polymerization to melt processing of cellulose nanowhisker-filled polylactide-based nanocomposites. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 7, p. 2456-2465, 2011.

GORGHIU, L. et al The effect of metals on thermal degradation of polyethylenes. **Polymer degradation and stability**, v. 84, n. 1, p. 7-11, 2004.

GOWRI, V. S. et al Novel copolymer for SiO<sub>2</sub> nanoparticles dispersion. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 124, n. 2, p. 1553-1561, 2012.

GUPTA, A.; KUMAR, V.; SHARMA, M. Formulation and Characterization of Biodegradable Packaging Film Derived from Potato Starch & LDPE Grafted with

Maleic Anhydride—LDPE Composition. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 18, n. 4, p. 484-491, 2010.

HUANG, Z. et al Bactericidal mode of titanium dioxide photocatalysis. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 130, n. 2, p. 163-170, 2000.

HUI, S.; CHATTOPADHYAY, S.; CHAKI, T. Thermal and thermo-oxidative degradation study of a model LDPE/EVA based TPE system: Effect of nano silica and electron beam irradiation. **Polymer Composites**, v. 31, n. 8, p. 1387-1397, 2010.

JEZIÓRSKA, R. et al Structure and mechanical properties of low-density polyethylene/spherical silica nanocomposites prepared by melt mixing: The joint action of silica's size, functionality, and compatibilizer. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 125, n. 6, p. 4326-4337, 2012.

JOKAR, M. et al Melt production and antimicrobial efficiency of low-density polyethylene (LDPE)-silver nanocomposite film. **Food and bioprocess technology**, v. 5, n. 2, p. 719-728, 2012.

KUMAR, V. S. et al Highly efficient Ag/C catalyst prepared by electro-chemical deposition method in controlling microorganisms in water. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 223, n. 1, p. 313-319, 2004.

LALUEZA, P. et al Bactericidal effects of different silver-containing materials. **Materials Research Bulletin**, v. 46, n. 11, p. 2070-2076, 2011.

LIU, G. et al Synthesis of rutile–anatase core–shell structured TiO<sub>2</sub> for photocatalysis. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, n. 36, p. 6590-6596, 2009.

MISHRA, A.; LUYT, A. Effect of sol–gel derived nano-silica and organic peroxide on the thermal and mechanical properties of low-density polyethylene/wood flour composites. **Polymer Degradation and Stability**, v. 93, n. 1, p. 1-8, 2008.

MISHRA, A. K. **Effect of silica on the thermal properties of LDPE-WF-silica composites**. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, v. 40, p. 1-7, 2012.

MORONES, J. R. et al The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, n. 10, p. 2346, 2005.

NOCCHETTI, M. et al Ag/AgCl nanoparticle decorated layered double hydroxides: synthesis, characterization and antimicrobial properties. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, n. 18, p. 2383-2393, 2013.

OLMOS, D. et al Uniformly dispersed submicrometre BaTiO<sub>3</sub> particles in PS based composites. Morphology, structure and dielectric properties. **Polymer Testing**, v. 31, n. 8, p. 1121-1130, 2012.

QUENTAL, A. C. et al Blendas de PHB e seus copolímeros: miscibilidade e compatibilidade. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 438-446, 2010.

RAJANDAS, H. et al A novel FTIR-ATR spectroscopy based technique for the estimation of low-density polyethylene biodegradation. **Polymer Testing**, v. 31, n. 8, p. 1094-1099, 2012.

SPIRIDON, I. et al Assessment of changes due to accelerated weathering of low-density polyethylene/feather composites. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 51, n. 21, p. 7279-7286, 2012.

TOMŠIČ, B. et al Antimicrobial activity of AgCl embedded in a silica matrix on cotton fabric. **Carbohydrate polymers**, v. 75, n. 4, p. 618-626, 2009.

USHAKOV, N. M. et al Nanocomposites based on the cerium oxide nanoparticles and polyethylene matrix: Syntheses and properties. **Acta Materialia**, v. 56, n. 10, p. 2336-2343, 2008.



XIA, X. et al Water absorption characteristics of novel Cu/LDPE nanocomposite for use in intrauterine devices. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 79, n. 2, p. 345-352, 2006.

ZAKY, M. T.; MOHAMED, N. H. Influence of low-density polyethylene on the thermal characteristics and crystallinity of high melting point macro-and micro-crystalline waxes. **Thermochimica Acta**, v. 499, n. 1, p. 79-84, 2010.

ZHANG, H.; CHEN, G. Potent antibacterial activities of Ag/TiO<sub>2</sub> nanocomposite powders synthesized by a one-pot sol– gel method. **Environmental science & technology**, v. 43, n. 8, p. 2905-2910, 2009.

## **CAPÍTULO 4. QUALIDADE PÓS-COLHEITA DE CENOURAS**

Neste capítulo serão descritos os efeitos do contato dos filmes PEBD contendo dois masterbatches distintos com AgNPs reportados no **Capítulo III**, sendo filme A utilizando como carreador SiO<sub>2</sub> e B com TiO<sub>2</sub> em suas composições, em cenouras minimamente processadas, visando avaliar riscos e benefícios potenciais da presença de nanopartículas de prata em embalagens de alimentos para conservação do alimento. Desta forma, as seguintes análises foram realizadas: MEV, permeabilidade a O<sub>2</sub> e análises físico-química de qualidade: perda de massa, textura, pH, acidez titulável, ácido ascórbico, sólido solúveis, ratio e atividade antimicrobiana.

A cenoura foi escolhida dentre as hortaliças por ser uma das mais consumidas no Brasil<sup>3</sup>, e a mais utilizada na forma minimamente processada que, devido às operações de lavagem, descascamento e corte, promovem alterações fisiológicas, bioquímicas e microbiológicas, as quais aceleram o processo de deterioração. Entre os efeitos negativos, destacam-se o escurecimento, descoloração, produção de odores e sabores desagradáveis que levam a perda de textura e valor nutricional, diminuindo o tempo de prateleira deste produto (EMMAMBUX; MINNAAR, 2003; RAGAERT, DEVLIEGHERE; DEBEVERE, 2007; MASTROMATTEO; CONTE; DEL NOBILE, 2012). A cenoura (*Daucus carota* L.) é uma hortaliça da família Apiaceae de alto valor econômico e nutritivo por ser uma das principais fontes de pró-vitamina A (beta-caroteno) (FILGUEIRA, 2006; DA SILVA TEÓFILO et al, 2008). Esta hortaliça é originada do Sudoeste Asiático, mas com produção em diversos países. No mundo, os três principais produtores de cenoura são China, EUA e Rússia (FAOSTAT, 2010). No Brasil as principais regiões produtoras são Sudeste, Nordeste e Sul do Brasil (MORAES, 2006). No ano de 2001 o valor da produção foi de U\$\$ 143 milhões, o equivalente a 5% do valor total de hortaliças (VIEIRA<sup>1</sup> et al, 2005). Em 2012, a região de Minas Gerais concentrou 85,7% da colheita de 415 mil toneladas (CARVALHO et al, 2013).

---

<sup>3</sup> [http://www.cnph.embrapa.br/paginas/produtos/cultivares/cenourete\\_catetinho.htm](http://www.cnph.embrapa.br/paginas/produtos/cultivares/cenourete_catetinho.htm)

## 4. 1. MATERIAS E MÉTODOS

### 4. 1.1 Processamento dos filmes

Os filmes obtidos pelo processamento descrito no **Capítulo III** foram nomeados como: PEBD; A 2,5; A 50; A 100, B 2,5; B 50 e B 100 (ver Tabela 1, item 3.1 Materiais) e utilizados como embalagem.

### 4.1.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A técnica de microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para identificar a morfologia da superfície dos filmes utilizados. As amostras foram preparadas por corte transversal e as imagens obtidas no equipamento FEI modelo Inspect S50 e 25kV.

### 4.1.3. Análise de permeabilidade de O<sub>2</sub>

O ensaio foi realizado pelo CETEA (Centro de Tecnologia de Embalagem) em que as taxas de permeabilidade ao oxigênio foram determinadas por método coulométrico, segundo procedimento descrito na norma D3985-05 (ASTM INTERNATIONAL, 2005), em equipamento OXTRAN, modelo 2/20, da MOCON, operando com oxigênio puro como gás permanente. As amostras foram submetidas a uma temperatura de 23°C a seco (ambiente desumidificado com sílica gel), durante 46-49h e 30 minutos. A área efetiva de permeação de cada corpo de prova foi de 100 cm<sup>2</sup>. Os resultados obtidos foram corrigidos para 1 atm de gradiente de pressão parcial de oxigênio. Uma vez determinada a TPO<sub>2</sub>, calculou-se o coeficiente de permeabilidade ao oxigênio (P) a partir da taxa de permeabilidade, como segue:

$$P = TPO_2 \times e/p \quad (2)$$

Onde:

P= coeficiente de permeabilidade ao oxigênio (mL(CNTP). μm. m<sup>-2</sup>. dia<sup>-1</sup>. Atm<sup>-1</sup>);

TPO<sub>2</sub>= taxa de permeabilidade ao oxigênio (mL(CNTP). m<sup>-2</sup>. dia<sup>-1</sup>);

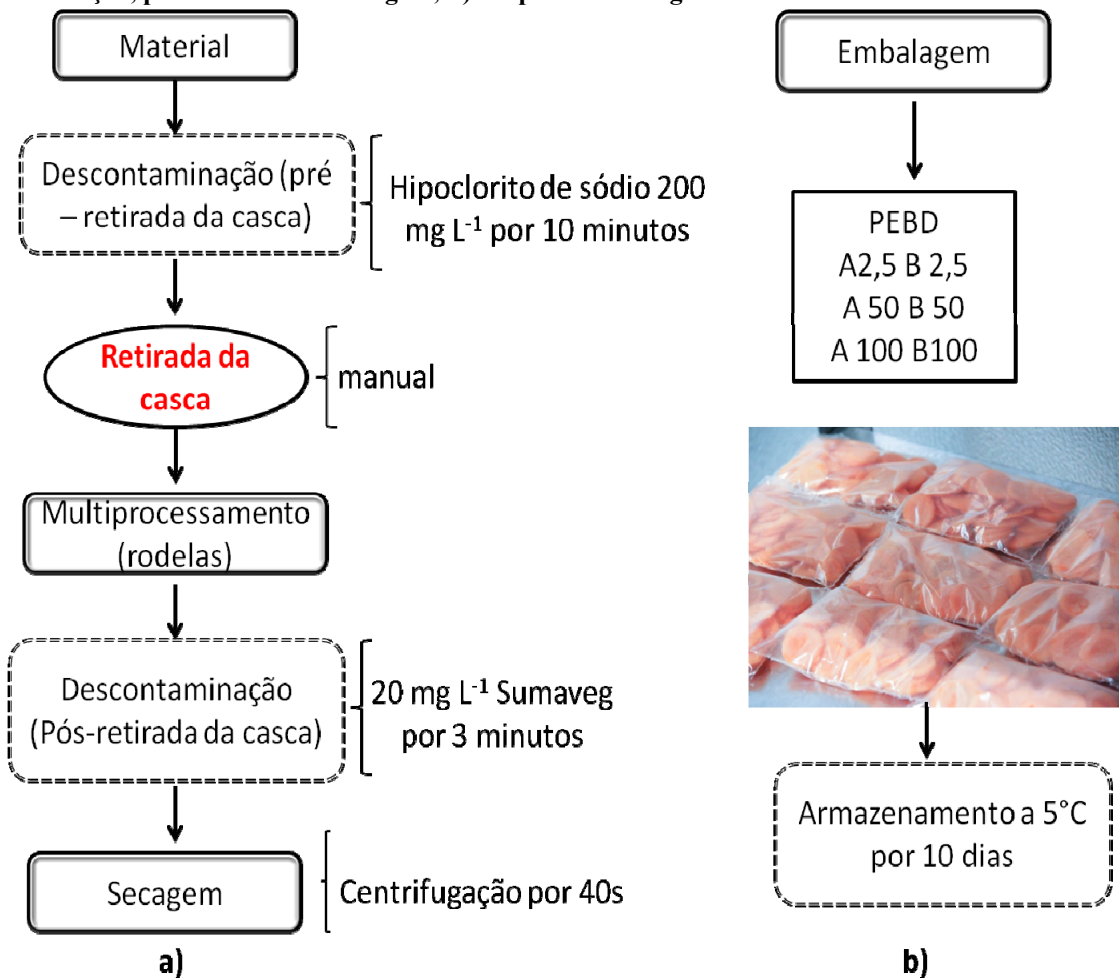
e= espessura média do corpo de prova (μm);

p= pressão parcial de oxigênio no lado do gás permeante na célula de difusão (1 atm), visto que a pressão parcial de O<sub>2</sub> no lado do gás de arraste (N<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>) é considerada nula.

### 4.1.4. Processamento mínimo de cenoura

Cenouras (*Daucus Carota* L) da cultivar Brasília, provenientes de sistema orgânico de um produtor rural do município de Rio Claro, estado de São Paulo, Brasil foram utilizadas para processamento. Em laboratório de pós-colheita, as raízes foram selecionadas quanto a integridade física, tamanho e cor e em seguida lavadas em água corrente para retirada de sujidades e na sequência inseridas em um recipiente contendo hipoclorito de sódio  $200 \text{ mgL}^{-1}$  por 10 minutos. Após este procedimento, as cenouras foram descascadas manualmente, cortadas em rodela ( $\pm 3 \text{ mm}$  diâmetro médio) utilizando um multiprocessador (Philco<sup>®</sup>, AllmOne PR2) e logo após sanitizadas em uma solução de  $20 \text{ mg L}^{-1}$  de Sumaveg<sup>®</sup> (Dicloroisocianurato de Sódio Dihidratado e coadjuvante) por 3 minutos. As amostras foram então centrifugadas em uma centrífuga de alimentos (Consul, Brazil) por 40 segundos e divididas em porções de 50g para serem embaladas manualmente em filmes de Polietileno de Baixa Densidade (PEBD), sem e com aditivos, nas seguintes concentrações 2,5; 50 e 100 (A e B). Em seguida foram armazenados em câmara fria a  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ) a  $\pm 90\%$  de umidade durante 10 dias. Na Figura 9 encontra-se a representação esquemática do fluxograma de processamento mínimo realizado para cenoura.

Figura 9 Esquema representativo do processamento mínimo de cenouras. a) Etapa de seleção, sanitização, processamento e secagem; b) Etapa de embalagem e armazenamento.



Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4. 1.5. Análises físico-químicas

##### 4.1.5.1 Perda de massa fresca

A porcentagem da perda de massa foi determinada de acordo com a seguinte equação:

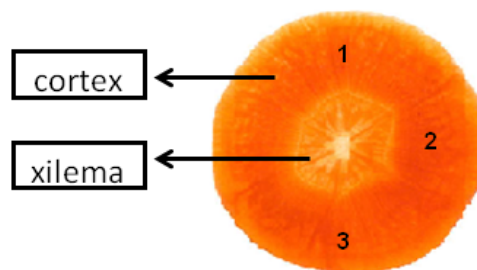
$$1) \quad \%ML_{(t)} = \frac{M_0 - M_{(t)}}{M_0} \times 100,$$

Onde: %ML(t) é a porcentagem de perda de massa no tempo t; M<sub>0</sub> é a massa inicial e M<sub>(t)</sub> é a massa no tempo t. As amostras foram determinadas por uma balança digital de precisão (±0.1 g) Marte AS 2000C.

### 4.1.5.2. Firmeza

Foi determinada com auxílio de um texturômetro digital de bancada TA. XT. Plus Texture Analyser® e com os seguintes parâmetros: sonda de 2mm de diâmetro, velocidade 10mm/s e distância de penetração de 2mm. Três regiões no córtex das rodela de cenoura, conforme representado na Figura 10, foram selecionadas para a perfuração e os resultados foram expressos em Newton (N) (COELHO, 1994). A análise foi feita em triplicada para cada tratamento obtendo 9 resultados.

**Figura 10** Imagem representativa das rodela de cenoura e identificação de suas partes.



Fonte: Elaborada pelo autor.

### 4.1.5.3. pH

Os valores foram determinados em potenciômetro de bancada Quimis Q400A a partir do suco obtido de 50 g de cenoura batidas em liquidificador (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

### 4.1.5.4. Acidez titulável (AT)

O teor de acidez titulável (AT) foi determinado utilizando 10 mL do suco de cenoura diluído em 50 mL de água destilada por titulação com NaOH 0,1N. Os resultados foram expressos em gramas de ácido cítrico por 100 mL (AOAC, 1997-método 942.15).

### 4.1.5.5. Ácido ascórbico (AA)

O teor de ácido ascórbico foi determinado por titulometria utilizando-se solução de 2,6 diclofenol-indofenol (DCFI) a 0,1% até obtenção de coloração róseo claro permanente, utilizando-se 10 ml de suco de cenoura diluído em 50 mL de ácido oxálico

0,5 % a 5°C, de acordo com Rangana, (1977). Os resultados foram expressos em mg por 100 mL de suco.

### **4.1.5.6. Teor de sólidos solúveis (SST)**

A concentração de sólidos solúveis totais (SST) foi determinado no suco homogeneizado em refratômetro digital de bancada Atago RX-5000cx. Os resultados foram expressos em °Brix (AOAC, 1997 - método 932.12).

### **4.1.5.7. Ratio (SST/AT)**

A Relação SST/AT: determinada pelo quociente entre as duas variáveis.

### **4.1.6. Análises microbiológicas**

A cada 2 dias aproximadamente 50g de cenoura foram removidas assepticamente das embalagens e colocadas em sacos contendo água peptonada diluída 1% (w/v) de homogeneizado. Diluições em série com solução de TSB (Tryptona de soja) foram realizadas e seguidas às condições do teste. Placas Petrifilm™ (3M Company, St. Paul, MN, EUA) para Aeróbios, Psicotróficos, Fungos e Coliformes totais e fecais foram inoculadas com alíquotas de 1,0 ml das diferentes diluições. Em seguidas as placas foram incubadas a 35°C por 24 h para mesófilos e 48 h para Coliformes e *E.coli*, a 5°C por 24h para psicotróficos e 45°C para contagem de fungos. O resultado foi obtido pela contagem das colônias e expresso em unidade formadora de colônias (UFC/g). Cada tratamento foi realizado em triplicada e as análises microbiológicas foram realizadas a cada 2 dias (ABADIAS et al, 2012).

### **4.1.7. Análises estatísticas**

A comparação dos tratamentos para os dados de percentual de perda de massa, textura, pH, AT, AA, SS e ratio (SS/AT) foi realizada no programas SPSS versão 19, como medidas repetidas e o nível de significância adotado foi de 0,05. Os gráficos foram feitos no programa Statistica versão 8.0.

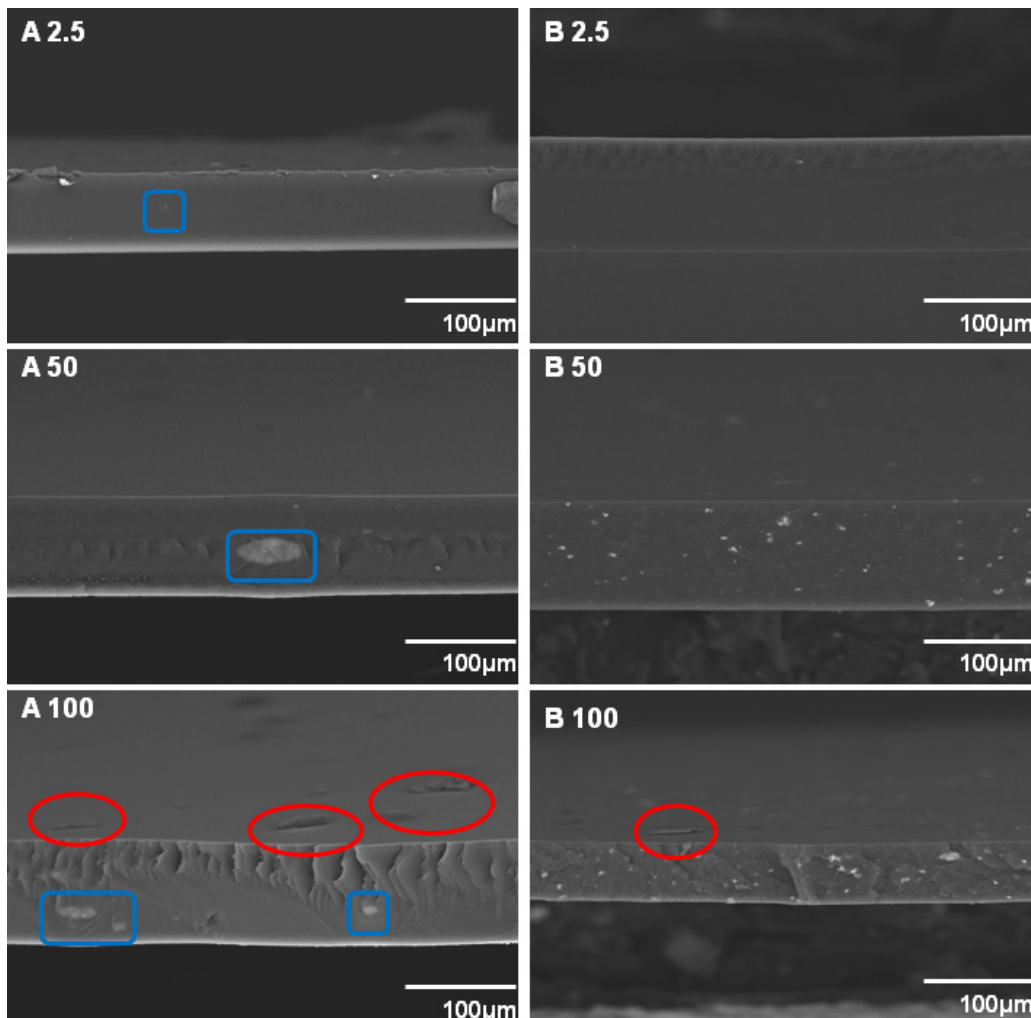


### 4. 2. RESULTADOS

#### 4.2.1. MEV

Na Figura 11, é apresentada a morfologia da superfície, bem como a vista das secções transversais dos filmes estudados. Os Filmes A (masterbatch A) apresentam áreas mais claras (retângulos azuis) que foram determinados por EDS como correspondendo a Si, O e elementos de Ag (dados apresentados no capítulo III, Caracterização dos filmes). Desta forma, com o aumento da concentração do masterbatch A há um aumento das áreas mais claras (retângulos azuis). Foi notada para a amostra A100 a presença de depressões (círculos vermelhos) na superfície da amostra A100 (Figura 11). Para o masterbatch B as amostras também apresentam áreas mais claras, que determinadas por EDS, correspondem aos elementos Ti, O e de Ag (dados apresentados no capítulo III, Caracterização dos filmes). Com o aumento da concentração para o masterbatch B ocorre também um aumento das áreas claras para amostras B2.5, B50 a B100. Uma depressão não regular na amostra B100 é observada (circulo vermelho), semelhante ao mostrado na amostra A100.

**Figura 11.** Imagens de MEV obtidas do masterbatch A e B em diferentes concentrações. Os círculos vermelhos indicam depressões na superfície dos filmes e os retângulos azuis representam o aumento da presença de sílica nas amostras A.

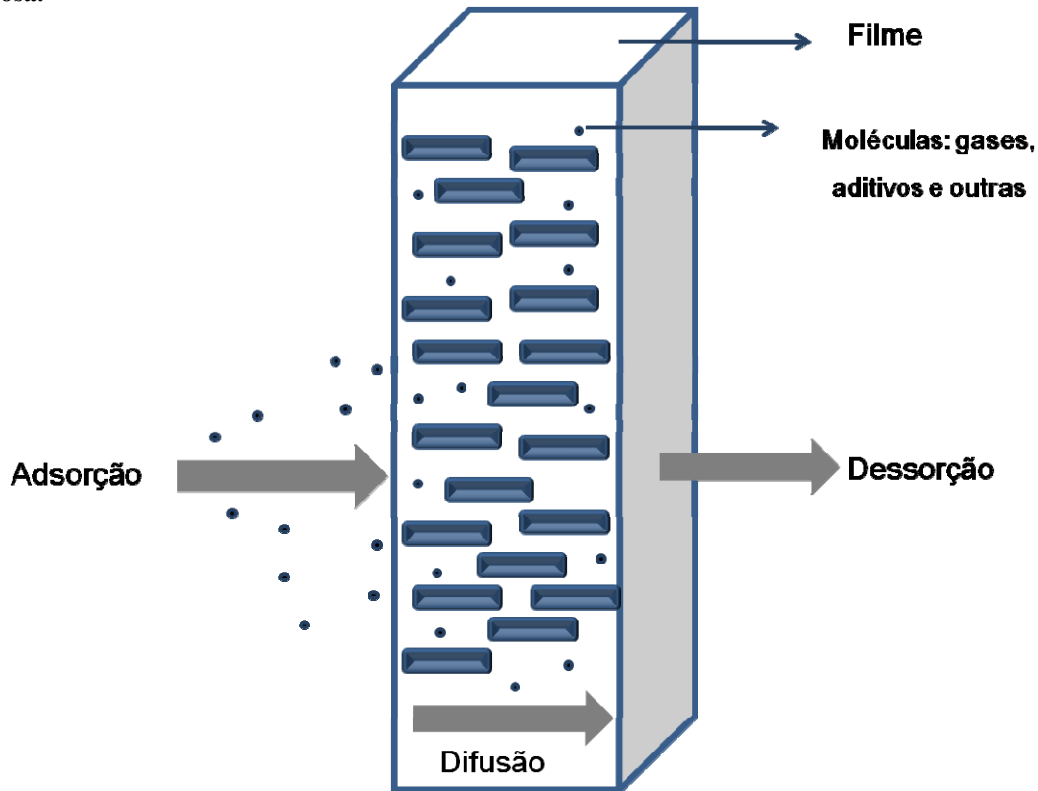


Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.2. 2 Ensaio de Permeabilidade

De acordo com Siracusa, (2012), existem três mecanismos envolvidos na permeabilidade: (1) a adsorção do permeado que é inicialmente dissolvido no material (lado de maior concentração). (2) A difusão do permeado em que a quantidade difundida é dependente da forma, tamanho, polaridade, grau de reticulação e cristalinidade do material utilizado como barreira. (3) E a dessorção que acontece do outro lado da superfície do material utilizado como barreira (Figura 12).

Figura 12. Modelo representativo dos mecanismos envolvidos no processo de permeabilidade gasosa.



Fonte: Elaborada pelo autor.

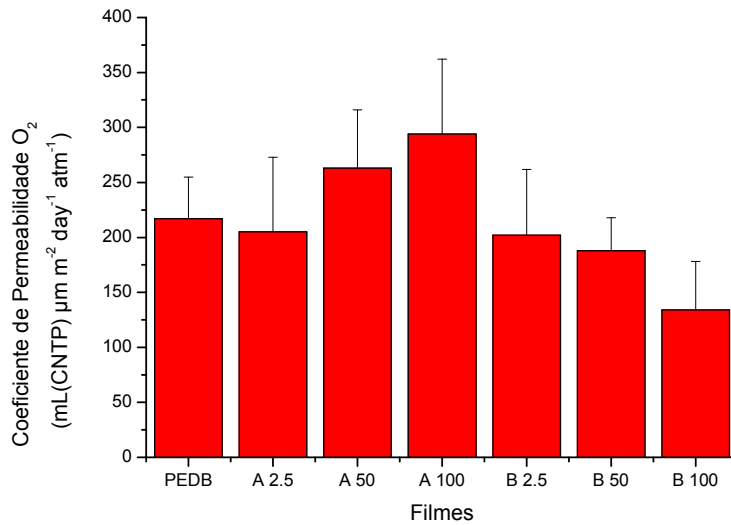
Os recipientes de polietileno podem diminuir a taxa de respiração dos vegetais, retardando assim o amadurecimento e a senescência (BRAR; SINGH; RAI, 2011). A Figura 13 mostra o coeficiente de permeabilidade dos filmes estudados. Os fenômenos de difusão e adsorção ocorrem nas zonas amorfas do polímero. A taxa de permeabilidade está relacionada com a presença de cristais, pois a parte cristalina aumenta o caminho de difusão de gás, ou seja, diminui a taxa de permeabilidade (WEINKAUF; PAUL, 1990; OLKHOV et al, 2003; SIRACUSA, 2012). Como demonstrado pelos resultados de cristalinidade obtidos pela análise de DSC, na Tabela 4 (Capítulo III, item 3.2.4 Análises térmicas), as amostras A são menos cristalinas do que as amostras B, portanto, podem apresentar os maiores valores de coeficiente de permeabilidade, como observado na Figura 13, em que as amostras A50 e A100 apresentaram os maiores coeficientes de permeabilidade sendo, respectivamente 263 e 294 mL mM m<sup>-2</sup> dia<sup>-1</sup> atm<sup>-1</sup>.

Nota-se que ocorre um progressivo aumento da permeabilidade com o incremento na concentração de adição do masterbatch A contendo dióxido de silício. Contudo, na indústria da embalagem, o uso de silício amorfo (SiOx) é de grande

interesse para diminuir a permeação dos gases através do material, tal como o oxigênio, dióxido de carbono ou vapor de água, apesar de não haver estudos específicos que expliquem como o Si-O pode atuar como uma barreira (SIRACUSA, 2012). Todavia, o que se observou foi que com o aumento do masterbatch A que contém SiO<sub>2</sub> em sua composição, houve um aumento do coeficiente de permeabilidade. Segundo (SIRACUSA, 2012) quando SiOx é usado para melhorar as propriedades de barreira a gases, outros fatores podem influenciar na permeabilidade tais como defeitos, buracos e microfissuras. Na amostra A 100 pode se observar por análise de MEV a presença de depressões na superfície desse material. É importante relatar que essa amostra A100 apresentou o maior coeficiente de permeabilidade (294 mL mM de m<sup>-2</sup> dia<sup>-1</sup> atm<sup>-1</sup>).

Para as amostras "B" foram observados menores coeficientes de permeabilidade. Uma das razões para esta resposta pode estar relacionada com o grau de cristalinidade como já citado acima. A adição de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> pode aumentar o grau de cristalinidade de nanocompósitos (ALI; NOORI, 2014), como observado nas amostras (Tabela 4, capítulo III, item 3.2.4 Análises Térmicas). Este fato contribui para o aumento da barreira ao oxigênio, então, com o aumento na concentração de TiO<sub>2</sub> nas amostras de 2,5, 50 até 100 houve uma diminuição no coeficiente de permeabilidade de 202, 188 e 134 mL mM de m<sup>-2</sup> dia<sup>-1</sup> atm<sup>-1</sup>, respectivamente. (NASIRI; SHARIATY-NIASAR; AKBARI, 2012) obtiveram resultados semelhantes ao comparar a permeabilidade de gás de filmes PEBD contendo ou não TiO<sub>2</sub>. Segundo os autores, à medida que a concentração de TiO<sub>2</sub> (1,2,3 e 4 %) aumentou foi observado um aumento da barreira de permeabilidade ao oxigênio. Recentemente (ALI; NOORI, 2014) investigaram a adição de nanopartículas de titânio em ácido polilático (PLA) observando aumento da propriedade de barreira do PLA puro de 20 para 14 cm<sup>3</sup>mm/m<sup>2</sup>.dias.atm, diferente do resultado encontrado por (MOGHADAM et al, 2011) que investigaram o efeito de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> no transporte de gás em membranas feitas de Matrimid – 5218, sendo que os resultados obtidos pelos autores mostraram que uma mistura de TiO<sub>2</sub> aumentou a permeabilidade das membranas de gás, possivelmente devido à formação de espaços vazios, agrupamentos de nanopartículas e à uma interrupção da cadeia polimérica.

**Figura 13.** Valores do coeficiente de permeabilidade ao O<sub>2</sub> e coeficiente de variação (em barra) dos filmes estudados.



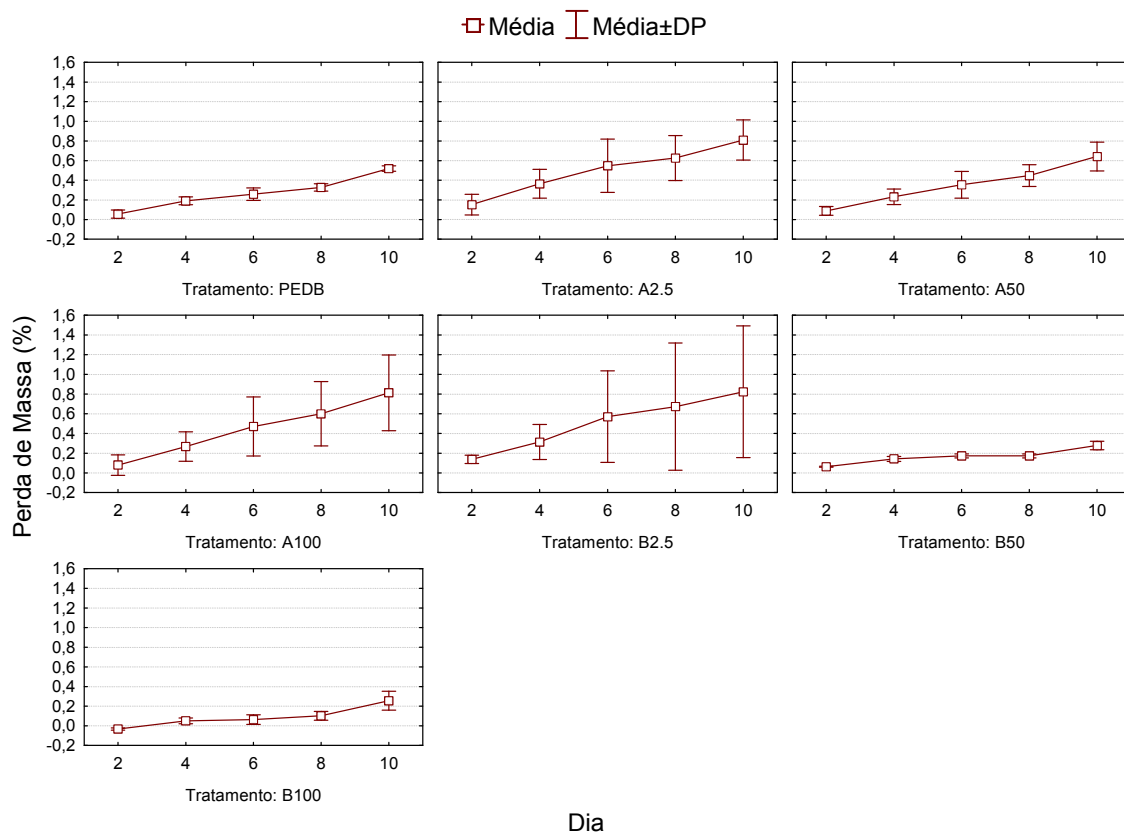
Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.2.3. Análises físico-químicas

A perda de massa da raiz é um das características físicas que refletem na aceitabilidade do alimento pelo consumidor. Os valores médios da perda de massa observada para cenouras orgânicas avaliadas neste trabalho estão apresentados na Tabela 6 (Anexo 1). Foram obtidos como resultados uma perda de massa fresca máxima de 0,63 % e de 0,81 % para as amostras A2,5, A50 e A100, B2,5, respectivamente, para um período de 10 dias (Figura 14). Este resultado é esperado, pois foram os filmes que apresentaram maior coeficiente de permeabilidade a O<sub>2</sub>. Uma das estratégias para prolongar a vida de prateleira de alimentos é a utilização de embalagens com barreira moderada a permeabilidade de gases (CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>), pois o oxigênio está envolvido em várias reações (crescimento de organismos, escurecimento enzimático, formação de gorduras, perda de vitaminas, etc), as quais aceleram a degradação dos alimentos. Assim, é desejável, menores concentrações de O<sub>2</sub> e altas de CO<sub>2</sub>, condições consideradas ideais para manter a qualidade e prolongar a vida de prateleira de frutas e legumes segundo (IQBAL et al, 2008). Esta maior perda de massa para a amostra A2,5, A50 e A100, B2,5, portanto, pode ser explicada pela alta transpiração e permeação de gases do interior da embalagem para o exterior (KADER, 2002). Na análise de perda de massa das cenouras foi observado um aumento nos valores para todos os tratamentos ao longo do período de armazenamento, como também relatado por (MASTROMATTEO;

CONTE; DEL NOBILE, 2012), quando investigaram estratégias de embalagem para prolongar a vida de prateleira de cenouras frescas. Em todos os casos, a perda máxima foi alcançada no 10º dia de armazenamento (Figura 14). Pode-se verificar que não houve influência significativa ( $p=0,457$ ) da interação entre dias de armazenamento e tipo de embalagem utilizada. Portanto, não houve influência significativa da adição de nanopartículas nas embalagens empregadas para a análise de perda de massa.

**Figura 14.** Perfil dos valores médios e desvio padrão para a perda de massa nas cenouras embaladas nos filmes A e B nas concentrações 2,5, 50 e 100 durante 10 dias de armazenamento.

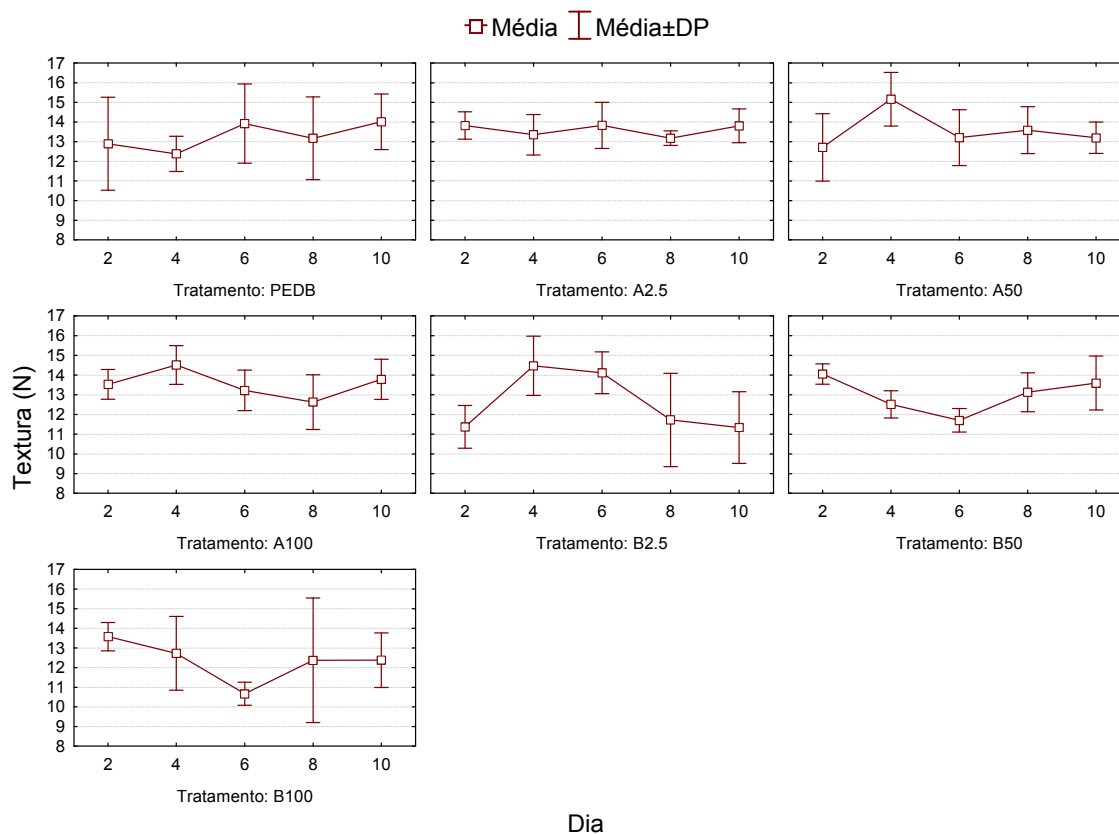


Fonte: Elaborada pelo autor.

Assim como a perda de massa, a textura é uma qualidade muito apreciada pelos consumidores (SPILIMBERGO et al, 2013). Os valores médios de textura obtidos para as amostras de cenoura minimamente processada ao longo do período de armazenamento estão apresentados na Tabela 6 (Anexo 1). Foram obtidos como resultados para a força máxima de perfuração no floema das cenouras valores que variaram de 15,16N a 12,63 N para as amostras A e de 14,47 N a 11,34 N para as amostras B (Figura 15). Por meio da análise estatística pode-se verificar que não houve efeito significativo ( $p=0,993$ ) para a interação dias de armazenamento e tipos de

tratamento. Houve influência significativa de variação de textura apenas para os dias de armazenamento ( $p < 0,001$ ). Para todas as análises ocorreu uma diminuição no segundo dia de armazenamento (Anexo 1) fato que pode ser justificado pelo processamento mínimo (descascamento e corte). Segundo (GREVE et al, 1994) uma perda de firmeza rápida pode ser decorrente da ruptura da membrana celular, reduzindo a pressão de turgescência celular.

**Figura 15. Perfil dos valores médio para textura das cenouras embaladas nos filmes A e B nas concentrações 2,5, 50 e 100 durante 10 dias de armazenamento.**



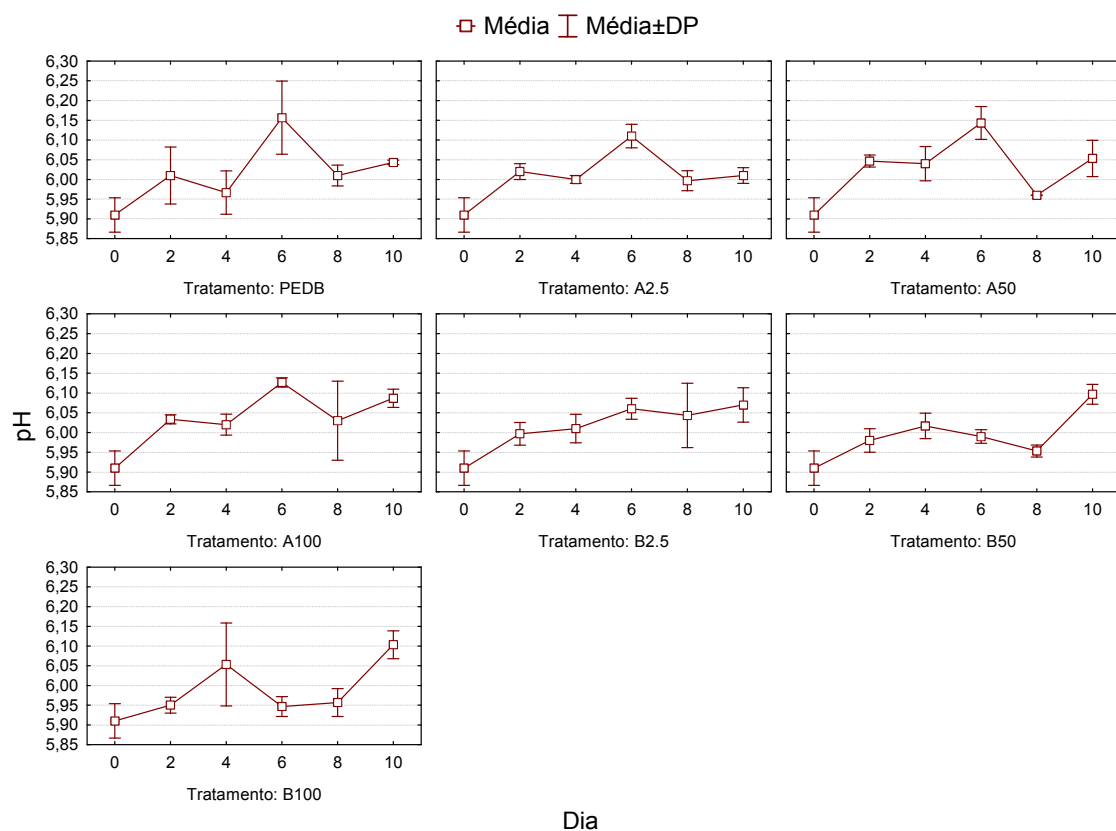
Fonte: Elaborada pelo autor.

Para a amostra PEDB, pode-se notar um ligeiro aumento da textura no décimo dia de armazenamento (Figura 15). Resultado também observado por (LIMA *et al*, 2003), o qual atribuiu esse aumento de textura a um possível aumento da área superficial das frutas e hortaliças, podendo ser originado da desidratação e síntese enzimática de lignina. As amostras A2,5, A50, A100 e B2,5 apesar de ocorrer um aumento ao longo dos dias (4 e/ou 6) os valores de textura no décimo dia ficaram muito próximos ao segundo dia de armazenamento (Figura 15). Para os mesmos dias as amostras B50 e B100 apresentaram queda nos valores de textura, sendo que a amostra B50 reestabeleceu os valores até o décimo dia de armazenamento, entretanto a amostra

B100 foi à única que no décimo dia apresentou o menor valor de textura quando comparado ao segundo dia de armazenamento (Figura 15).

Os valores médios do pH são apresentado na Tabela 6 (Anexo 1) e estão de acordo com os valores relatados na literatura, já que a cenoura é considerada um alimento levemente ácido ( $pH > 4,5$ ) (STUMBO, 1965; LIMA et al, 2001). Nota-se que os valores de pH foram afetados significativamente ( $p < 0,001$ ) pelo tempo de armazenamento e os filmes empregados. Os filmes PEDB e A apresentaram perfil semelhante passando de 5,90 e atingindo o valor máximo de pH próximo a 6,0. Os filmes B50 e B100 foram os que conseguiram controlar melhor a variação do aumento do pH até o oitavo dia de armazenamento. Observa-se que há um aumento nos valores de pH ao longo do período de armazenamento para todas as amostras avaliadas atingindo no décimo dia de armazenamento valores que variaram de 6,00 a 6,10 (Figura 16).

**Figura 16 Perfil dos valores médios obtidos para análise de pH nas cenouras embaladas nos filmes A e B nas concentrações 2,5, 50 e 100 durante 10 dias de armazenamento.**



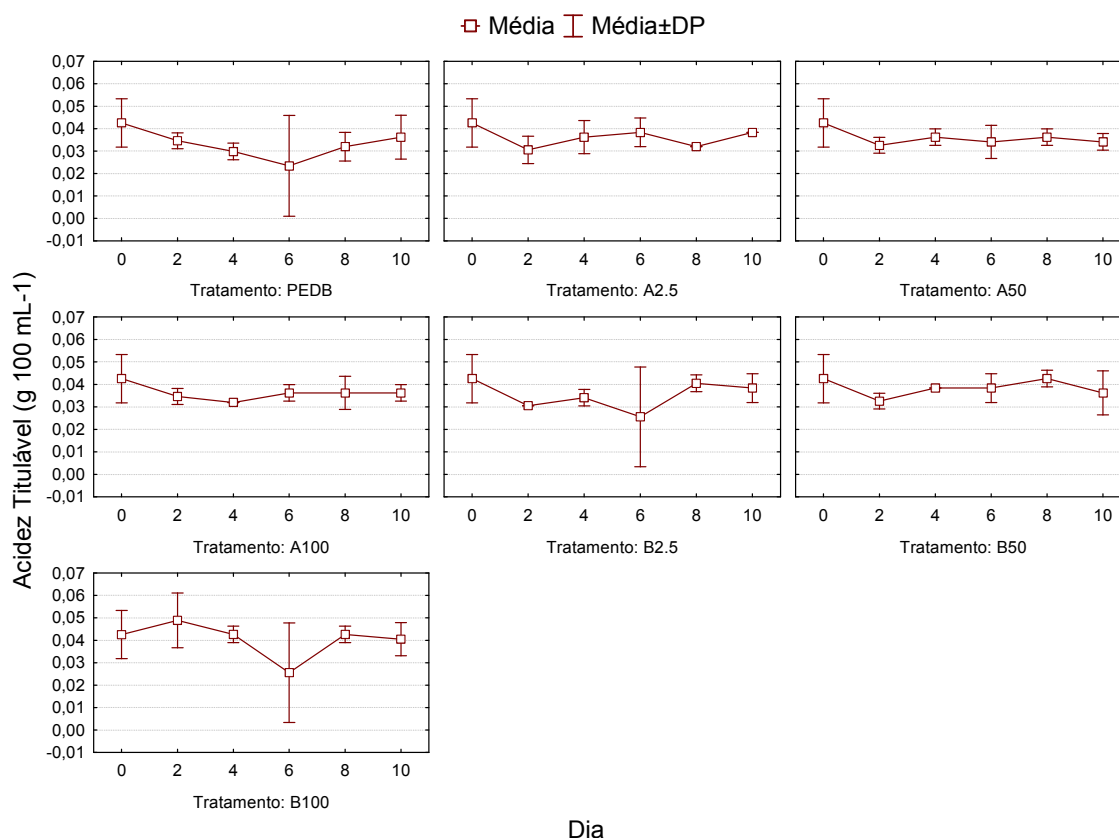
Fonte: Elaborada pelo autor.



Este comportamento está de acordo com os resultados obtidos para acidez total titulável. Os valores de amostras de pH foram semelhantes ao encontrado por (MASTROMATTEO; CONTE; DEL NOBILE, 2012) (cerca de pH 6,0) que relaciona o fato a menores concentrações de ácidos orgânicos.

A Tabela 6 (Anexo 1) mostra os valores médios obtidos para a análise de AT. Não houve alterações significativas ( $p=0,783$ ) para a interação dias de armazenamento e tipo de embalagens. A variável AT foi afetada significativamente ( $p=0,009$ ) apenas pelo tempo de armazenamento. Dentre os ácidos orgânicos o que está presente em maior percentagem, em cenouras é o ácido cítrico. Segundo os dados apresentados todas as amostras apresentaram uma queda nos valores de AT no segundo dia de análise, exceto a amostra B100 (Figura 17). Brody, (1996) relatou que o teor de ácidos orgânicos diminui durante o processo de oxidação dos ácidos em decorrência do processo de respiração, dado que poderia explicar os baixos valores encontrados no décimo dia de armazenamento. Dentre os filmes estudados, o A2,5 foi o que apresentou maior teor de ácidos orgânicos no sexto dia de armazenamento, atingindo valor de 0,038 g de ácido cítrico 100 mL<sup>-1</sup>. Resultados semelhantes para cenoura 'Brasília' revestida com filme de polietileno foram observados por (ALMEIDA, 2011).

**Figura 17. Perfil dos valores médios encontrados para a análise AT nas cenouras embaladas nos filmes A e B nas concentrações 2,5, 50, 100 durante 10 dias de armazenamento.**

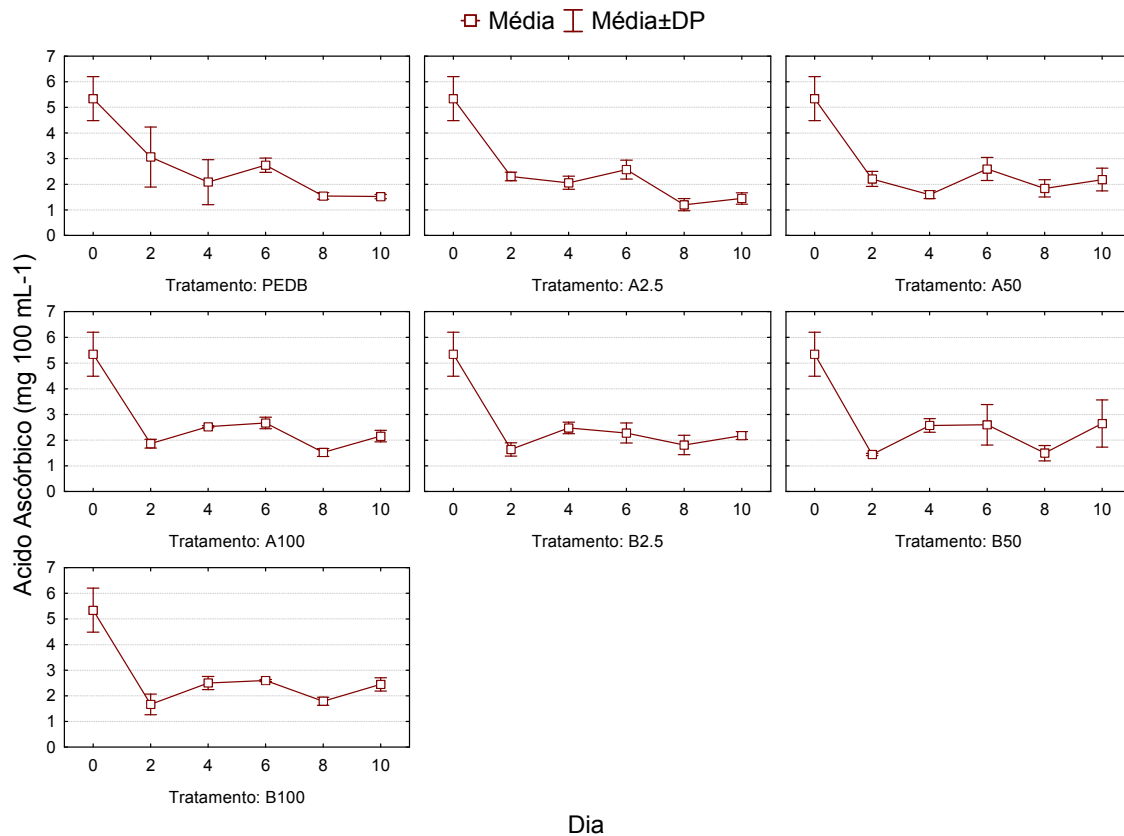


Fonte: Elaborada pelo autor.

Os valores médios de ácido ascórbico estão apresentados na Tabela 6 (Anexo 1). Para os dados de AA houve efeito significativo para a interação dia de armazenamento e tipo de tratamento ( $p=0,024$ ). Observa-se na Figura 18 que as amostras apresentaram comportamento semelhante ao longo do tempo de armazenamento, ou seja, ascendência seguida de queda e ascendência. Para todas as amostras os valores médios ficaram abaixo de  $3,0 \text{ mg AA mL}^{-1}$ . Os resultados indicados na Figura 18 mostraram que, no segundo dia de armazenamento, foi observada uma redução drástica do teor de AA em todos os tratamentos, provavelmente, isto ocorre devido à resposta fisiológica ao estresse sofrido pelas cenouras durante o processamento. Em hortaliças submetidas a cortes, como os produtos minimamente processados, ocorre uma aceleração do processo de senescência após a colheita e armazenamento, liberando espécies reativas de oxigênio (ROS) (RASEETHA et al, 2013). Observa-se que nos dias 4 e/ou 6 ocorre um aumento dos teores, sendo estes maiores nos filmes B, pois em atmosferas de armazenamento com baixos teores de  $\text{O}_2$ , a quebra do ácido ascórbico em ácido desidroascórbico é inibida. Contudo, em altas concentrações de  $\text{O}_2$  esta quebra é

acelerada o que poderia justificar a queda nos teores de ácido ascórbico (PORTE; MAIA, 2001) para as amostras A que são mais permeáveis ao O<sub>2</sub>.

**Figura 18** Perfil dos valores médios encontrados para a análise AA nas cenouras embaladas nos filmes A e B nas concentrações 2,5, 50, 100 durante 10 dias de armazenamento.



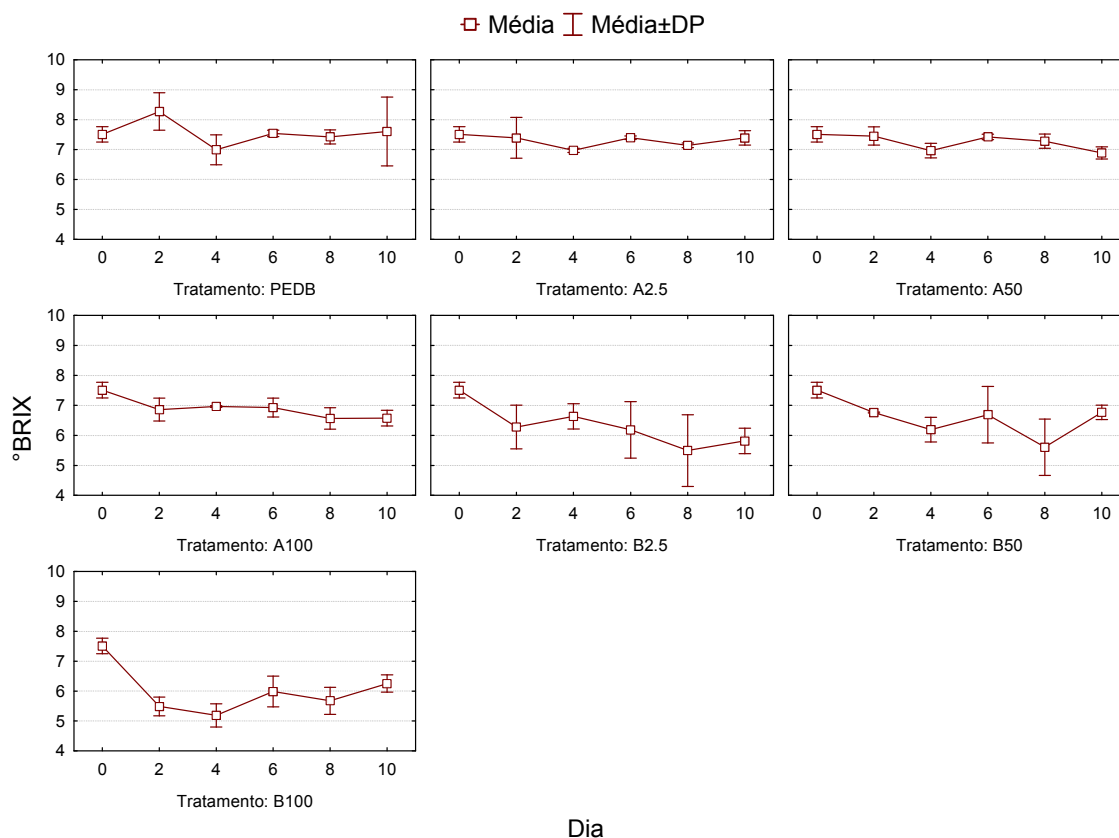
Fonte: Elaborada pelo autor.

Para as análises de sólido solúveis (SS) pode-se observar, a partir dos resultados obtidos, significativa interferência da interação dia de armazenamento e tipo de embalagem utilizada ( $p=0,003$ ). De acordo com (CHITARRA; CARVALHO, 1984) o sabor das cenouras é determinado pelo açúcar livre com predominância da sacarose. Assim, um baixo °Brix pode interferir no sabor e, portanto, na aceitação do consumidor. Os valores de sólidos solúveis (SS) encontrados oscilaram entre 5,19 a 8,27 °Brix, valores inferiores, quando comparados com o valor médio encontrado por (ALEGRIA et al, 2009) (5,7 ° Brix) e (DE ARAUJO FERREIRA et al, 2011) (9,9 °Brix), em cenoura 'Brasília' (Tabela 6, Anexo 1).

Pode-se observar na Figura 19 que A 2.5 apresentou um comportamento semelhante ao PEBD, valores próximos a 7,5 ° Brix no décimo dia de armazenamento. Assim como as amostras A50 e A100 que apresentaram comportamento semelhante até

o décimo dia de armazenamento, em que se observa uma queda nos valores de 7,51 para 6,89 e 6,58 ° Brix, respectivamente. Para as amostras B, comportamentos diferentes foram observados dependendo da composição do filme. Enquanto a amostra B2,5 apresentou comportamento semelhante ao observado pelas amostras A50 e A100, em que se observa uma quedas nos valores (7,51 para 5,82° Brix), as amostras B50 e B100 apresentaram uma queda nos primeiros dias de armazenamento e no oitavo dia de armazenamento ocorre um aumento nos valores de sólido solúveis de 5,61 para 6,77 °Brix e 6,25° para 6,62 Brix, respectivamente. Segundo (CHITARRA, 2001) um aumento nos teores de sólidos solúveis pode ocorrer devido à síntese de compostos secundários em resposta às etapas do processamento mínimo.

**Figura 19 Perfil dos valores médios obtidos para análise de sólido solúvel nas cenouras embaladas nos filmes A e B nas concentrações 2,5, 50 e 100 durante 10 dias de armazenamento.**

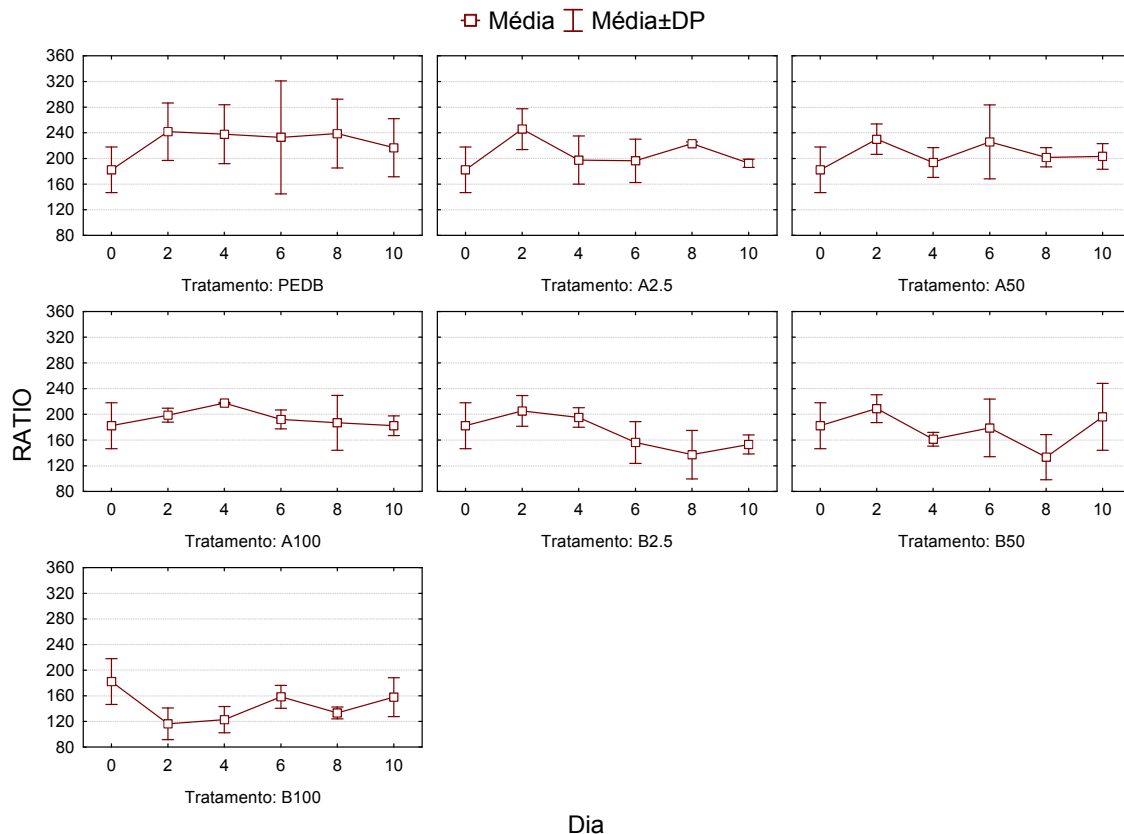


Fonte: Elaborada pelo autor.

De acordo com (CHITARRA; CHITARRA, 1990) a relação SS/ATT nos vegetais pode ser considerada como um critério de avaliação do "flavor" e um aumento pode significar incremento de sabor, além de ser indicativo do nível de amadurecimento. Não houve influência significativa da interação dia de armazenamento e filmes utilizados ( $p=0,122$ ). Porém, segundo os dados estatísticos houve influência

significativa para os tipos de tratamento utilizados ( $p=0,004$ ). Os filmes A foram os que apresentaram os melhores resultados para a relação SS/AT quando comparados aos filmes B, sendo o A50 o que apresentou o maior valor no último dia de armazenamento (Figura 20).

**Figura 20. Perfil dos valores médios obtidos para a análise ratio das cenouras embaladas nos filmes A e B nas concentrações 2,5, 50 e 100 durante 10 dias de armazenamento.**



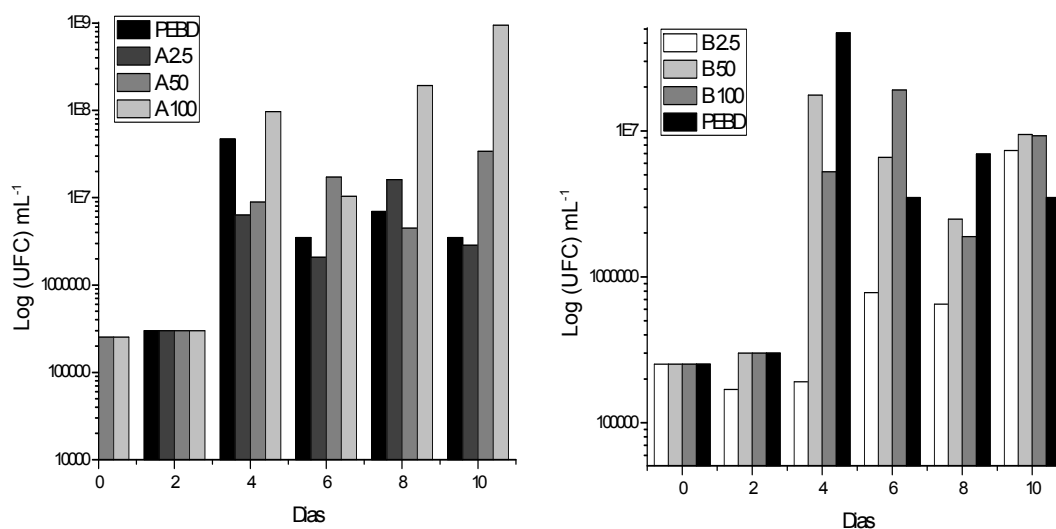
Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.2.4 Análises microbiológicas

Em produtos minimamente processados, devido ao manuseio e corte durante a preparação, há um aumento dos danos na superfície de células liberando certos nutrientes que podem favorecer o crescimento microbiano. Portanto, a contaminação pode ser influenciada pelo tempo de processamento, uma vez que é ponto de infiltração para microrganismos patogênicos (O'BEIRNE et al, 2014). Especialmente para as cenouras frescas, que são consumidas cruas, uma boa higienização, gestão de temperatura e embalagem são fatores que podem controlar o crescimento microbiano sobre estes produtos (KADER, 2002).

A atividade antimicrobiana dos filmes “A e B” é mostrada nas Figuras 21 e 22. A variação na contagem de aeróbios mesófilos (AM) nas cenouras foi de  $8,35 \times 10^3$  a  $4,45 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Este resultado está de acordo com (ABADIAS et al, 2012) que encontraram para AM valores entre  $10^4$  a  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Observou-se que A 2,5 mostrou menor concentração durante quase todos os dias de armazenamento para os microrganismos AM (Figura 21). De maneira geral, os filmes B apresentaram atividade antimicrobiana melhor quando comparado aos filmes A. O comportamento dos filmes B foi semelhante, sendo que a amostra B 2.5 apresentou um efeito inibidor significativo sobre o crescimento microbiano (Figura 21).

**Figura 21** Efeitos dos filmes empregados no crescimento de microrganismos mesófilos aeróbios.



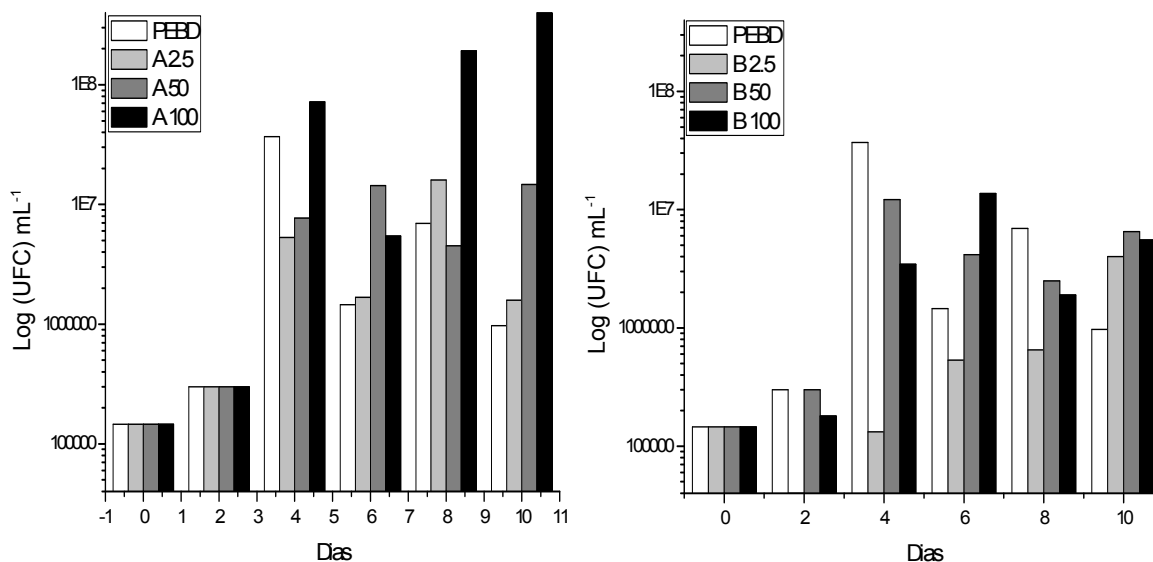
Fonte: Elaborada pelo autor.

Até o oitavo dia, B 2,5 mostrou uma boa atividade antimicrobiana, embora no último dia de armazenamento esta capacidade foi diminuindo, provavelmente porque a população AM estava muito alta e o contato superficial das AgNP não foi suficiente para controlar o crescimento bacteriano. A temperatura pode ter contribuído para esse crescimento. Segundo (ABADIAS et al, 2012) a temperatura de crescimento ideal dos AM é em torno de 35 °C, porém estes microrganismos são capazes de crescer a uma temperatura baixa, embora a uma taxa de crescimento reduzida.

O comportamento da atividade antimicrobiana de filmes contra coliformes é mostrado na Figura 22. Os valores de coliformes totais (CT) variaram de  $1,33 \times 10^5$  a  $4,45 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Este resultado está dentro dos limites aceitáveis descritos na

literatura (MOHÁCSI-FARKAS et al, 2014). Os filmes A 2,5 e B 2,5 foram os que exibiram a melhor atividade, quando comparado com as outras proporções de AgNP.

**Figura 22** Efeito dos filmes empregados no crescimento de microrganismos *E. coli* e coliformes totais.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Para todos os filmes testados, não foi observado a presença de *E. coli*. A amostra A 100 mostrou um aumento no crescimento bacteriano tanto para AM como para CT ao longo dos dias de armazenamento, atingindo  $4,5 \times 10^8$  e  $4,45 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, respectivamente. A principal fonte de energia para microrganismos crescerem é a presença de açúcares, ou seja, uma diminuição nos níveis de SS durante o armazenamento pode indicar microrganismos em desenvolvimento (LIMA et al, 2003). Este resultado está de acordo com os resultados obtidos para SS uma vez que o A 100 apresentaram valores mais baixos para SS que PEBD, A 2,5 e A50. Outra explicação para que A100 tenha apresentado maior população bacteriana pode estar relacionada à maior permeabilidade do A100, conforme evidenciado nos testes de permeabilidade, resultado confirmado com os valores observados para perda de peso. Observou-se também que as formulações 2,5 mostraram a melhor atividade antimicrobiana, o que pode ser indicativo de que o uso de aditivos de baixa concentração em masterbatches com AgNPs se mostram suficientes para inibir o crescimento microbiano, reduzindo o custo para a fabricação de embalagens de alimentos.

Não houve contagem suficiente de leveduras nas condições apresentadas. É comum em vegetais encontrar uma baixa contagem da população de leveduras (ABADIAS et al, 2012).

### 4.3. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados, a permeabilidade dos filmes empregados é de fundamental importância para a manutenção da qualidade das cenouras, uma vez que essa variável influencia diretamente em outras variáveis como a textura, ácido ascórbico e aspectos microbiológicos. Os filmes A foram os que apresentaram melhores resultados para textura. Enquanto os filmes B apresentaram melhores resultados em reduzir a taxa microbiana, principalmente o filme B 2,5. Apesar de algumas diferenças peculiares nos resultados das análises descritas ambos os filmes aditivados com nanopartículas de prata apresentaram potencial de aplicação como embalagens para preservar características importantes para o consumo *in natura* de cenouras minimamente processadas.



## REFERÊNCIAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists International**. 16 ed. Washington: Ed. Patrícia Cunniff, 1997.v.2.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists International**. 16 ed. Washington: Ed. Patrícia Cunniff, 1997.v.2.

ASTM INTERNACIONAL. **ASTM D 3985-05**: standard test method for oxygen transmission rate through plastic film and sheeting using a coulometric sensor. Philadelphia, 2005. 7p.

CARVALHO, C. et al. Anuário brasileiro de hortaliças 2013 - Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2013. 88 p.

ABADIAS, M. et al Growth potential of *Escherichia coli* O157: H7 on fresh-cut fruits (melon and pineapple) and vegetables (carrot and escarole) stored under different conditions. **Food control**, v. 27, n. 1, p. 37-44, 2012.

ALEGRIA, C. et al Quality attributes of shredded carrot (*Daucus carota* L. cv. Nantes) as affected by alternative decontamination processes to chlorine. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 10, n. 1, p. 61-69, 2009.

ALI, N. A.; NOORI, F. T. M. Gas Barrier Properties of Biodegradable Polymer Nanocomposites Films. **Chemistry and Materials Research**, v. 6, n. 1, p. 44-51, 2014.

ALMEIDA, E. I. B. Análise da eficiência de biofilmes e filme de PVC sobre o aumento da vida útil pós-colheita de cenoura. **REVISTA AGROPECUÁRIA TÉCNICA**, v. 32, n. 1, p. 1-6, 2011.

BRAR, S.; SINGH, G.; RAI, D. R. Modified atmosphere packaging of minimally processed carrot (*Daucus carota* L.). **Journal of Dairying, Foods and Home Sciences**, v. 30, n. 4, p. 290-298, 2011.

BRODY, A. L. **Envasado de alimentos em atmosferas controladas, modificadas y vazio**. Zaragoza: Acribia, 1996. p. 220.

CHITARRA, M.; CARVALHO, V. D. Cenoura: qualidade e industrialização. **Informe Agropecuário**, v. 10, n. 120, p. 82-89, 1984.

CHITARRA, M. I. F. **Alimentos minimamente processados**. Local: UFLA/FAEPE, 2001.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Esal/Faepe Lavras, 1990.

COELHO, A. Qualidade pós-colheita de pêssegos. **Informe Agropecuário**, v. 17, n. 180, p. 31-39, 1994.

DA SILVA TEÓFILO, T. M. et al. Crescimento de cultivares de cenoura nas condições de Mossoró-RN. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 1, p. 168-174, 2008.

DE ARAUJO FERREIRA, R. M. et al. Qualidade pós-colheita de cenoura durante o desenvolvimento em monocultivo e consorciada com rabanete1. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 2, p. 423-428, 2011.

EMMAMBUX, N. M.; MINNAAR, A. The effect of edible coatings and polymeric packaging films on the quality of minimally processed carrots. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, n. 10, p. 1065-1071, 2003.

FAOSTAT. **Production quantieis for country**. Disponível em:< <http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 22 de março de 2014.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças.** Universidade Federal de Viçosa: Empresa Júnior de Agronomia, 2006.

GREVE, C. et al Impact of heating on carrot firmness: contribution of cellular turgor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 2896–2899, 1994.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. **Normas analíticas, métodos químicos e físicos para análise de alimentos.** 3. ed. São Paulo: El Instituto, 1985. v. 1. p. 533.

IQBAL, T. et al Effect of minimal processing conditions on respiration rate of carrots. **Journal of food science**, v. 73, n. 8, p. E396-E402, 2008.

KADER, A. A. **Postharvest technology of horticultural crops.** University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, CA 2002, p. 135–144.

LIMA, K. S. C. et al EFEITO DA IRRADIAÇÃO IONIZANTE  $\gamma$  NA QUALIDADE. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 21, n. 2, p. 202-208, 2001.

\_\_\_\_\_. Cenouras minimamente processadas em embalagens com atmosferas modificadas e tratadas com radiação gama: avaliação microbiológica, físico-química e química. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 240-250, 2003.

MASTROMATTEO, M.; CONTE, A.; DEL NOBILE, M. A. Packaging strategies to prolong the shelf life of fresh carrots (*Daucus carota* L.). **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 13, p. 215-220, 2012.

MOGHADAM, F. et al The effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on gas transport properties of Matrimid5218-based mixed matrix membranes. **Separation and Purification Technology**, v. 77, n. 1, p. 128-136, 2011.

MOHÁCSI-FARKAS, C. et al Improving microbiological safety and maintaining sensory and nutritional quality of pre-cut tomato and carrot by gamma irradiation. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 99, p. 79-85, 2014.

MORAES, I. V. M. **Conservação de hortaliças. Dossiê Técnico.** Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas – SBRT, 2006. Disponível em: <<http://www.sbrt.ibict.br>>. Acesso em: 17 de outubro de 2011.

NASIRI, A.; SHARIATY-NIASAR, M.; AKBARI, Z. Synthesis of LDPE/Nano TiO<sub>2</sub> Nanocomposite for Packaging Applications. **International Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 8, n. 3, p. 165-170, 2012.

O'BEIRNE, D. et al Effects of processing and storage variables on penetration and survival of *Escherichia coli* O157: H7 in fresh-cut packaged carrots. **Food Control**, v. 40, p. 71-77, 2014.

OLKHOV, A. et al. Water transport, structure features and mechanical behavior of biodegradable PHB/PVA blends. **Journal of applied polymer science**, v. 90, n. 6, p. 1471-1476, 2003.

PORTE, A.; MAIA, L. H. **Alterações fisiológicas, bioquímicas e microbiológicas de alimentos minimamente processados.** *Boletim do CEPPA* 19: 105-118. p. 2001.

RAGAERT, P.; DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J. Role of microbiological and physiological spoilage mechanisms during storage of minimally processed vegetables. **Postharvest biology and technology**, v. 44, n. 3, p. 185-194, 2007.

RASEETHA, S. et al. Understanding the degradation of ascorbic acid and glutathione in relation to the levels of oxidative stress biomarkers in broccoli (*Brassica oleracea* L. cv. Bellstar) during storage and mechanical processing. **Food chemistry**, v. 138, n. 2, p. 1360-1369, 2013.

SIRACUSA, V. Food packaging permeability behaviour: A report. **International Journal of Polymer Science**, v. 2012, 1-11, 2012.

SFILIMBERGO, S. et al. High pressure carbon dioxide pasteurization of fresh-cut carrot. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 79, p. 92-100, 2013.

STUMBO, C. R. Thermo-Bacteriology. **Food Processing**, 1965. p. 236.

STUMBO, C.R. **Thermobacteriology in food processing**. New York: Academic Press, 1965. p. 329,

VIEIRA<sup>1</sup>, J. V. et al. Seleção de progênies de meio-irmãos de cenoura baseada em características de sementes. **Hortic. bras**, v. 23, n. 1, p. 44-47, 2005.

WEINKAUF, D.; PAUL, D. Effects of Structural Order on Barrier Properties. ACS Symp. Ser., 423, 60-91

CAPÍTULO 4 - PROCESSAMENTO MÍNIMO DE CENOURA

ANEXO1

**Tabela 6. Resultados das médias e desvio padrão para as análises físico-químicas dos filmes estudados durante dez dias de armazenamento.**

Análises físico-química								
	Tratamentos	Perda de massa (%)	AA (mg/100mL)	AT (g/100mL)	pH	°Brix	Ratio	Textura (N)
Dia 0	PEBD	0	5,343	0,043	5,910	7,510	182,289	36,602
	A2,5	0	5,343	0,043	5,910	7,510	182,289	36,602
	A50	0	5,343	0,043	5,910	7,510	182,289	36,602
	A100	0	5,343	0,043	5,910	7,510	182,289	36,602
	B2,5	0	5,343	0,043	5,910	7,510	182,289	36,602
	B50	0	5,343	0,043	5,910	7,510	182,289	36,602
	B100	0	5,343	0,043	5,910	7,510	182,289	36,602
	<b>Média ± DP</b>	<b>0</b>	<b>5,343±0,72</b>	<b>0,043±0,009</b>	<b>5,91±0,036</b>	<b>7,51±0,22</b>	<b>182,29±29,82</b>	<b>36,60±16,64</b>
Dia 2	PEBD	0,056	3,064	0,035	6,010	8,273	241,812	12,895
	A2,5	0,153	2,304	0,031	6,020	7,393	245,855	13,825
	A50	0,089	2,206	0,033	6,047	7,453	230,127	12,713
	A100	0,080	1,863	0,035	6,033	6,860	198,690	13,530
	B2,5	3,502	1,642	0,031	5,997	6,280	205,413	11,372
	B50	0,063	1,446	0,033	5,980	6,763	208,957	14,052
	B100	-0,032	1,667	0,049	5,950	5,490	116,354	13,581
	<b>Média ± DP</b>	<b>0,56±2,2</b>	<b>2,03±0,67</b>	<b>0,035±0,008</b>	<b>6,005±0,042</b>	<b>6,93±0,95</b>	<b>206,74±47,63</b>	<b>13,14±1,49</b>
Dia 4	PEBD	0,136	2,083	0,030	5,967	6,993	237,839	12,382
	A2,5	0,213	2,059	0,036	6,000	6,977	197,485	13,354
	A50	0,143	1,593	0,036	6,040	6,967	193,611	15,161
	A100	0,187	2,525	0,032	6,020	6,963	217,604	14,516
	B2,5	0,157	2,475	0,034	6,010	6,633	195,191	14,475
	B50	0,079	2,574	0,038	6,017	6,193	161,285	12,514
	B100	0,083	2,500	0,043	6,053	5,190	122,817	12,729
	<b>Média ± DP</b>	<b>0,143±0,07</b>	<b>2,26±0,47</b>	<b>0,036±0,005</b>	<b>6,015±0,051</b>	<b>6,56±0,70</b>	<b>189,40±41,90</b>	<b>13,59±1,58</b>
Dia 6	PEBD	0,068	2,745	0,023	6,157	7,543	232,924	13,921
	A2,5	0,183	2,574	0,038	6,110	7,397	196,337	13,829
	A50	0,122	2,598	0,034	6,143	7,423	225,825	13,208
	A100	0,206	2,672	0,036	6,127	6,930	192,014	13,224
	B2,5	0,195	2,279	0,026	6,060	6,183	156,120	14,120
	B50	0,031	2,598	0,038	5,990	6,690	178,844	11,706
	B100	0,013	2,598	0,026	5,947	5,990	158,464	10,671
	<b>Média ± DP</b>	<b>0,117±0,13</b>	<b>2,58±0,38</b>	<b>0,032±0,014</b>	<b>6,076±0,085</b>	<b>6,880±0,75</b>	<b>193,00±45,20</b>	<b>12,95±1,67</b>
Dia 8	PEBD	0,068	1,544	0,032	6,010	7,423	238,924	13,173
	A2,5	0,079	1,201	0,032	5,997	7,143	223,229	13,182
	A50	0,094	1,838	0,036	5,960	7,280	201,753	13,587
	A100	0,129	1,520	0,036	6,030	6,567	186,845	12,628
	B2,5	0,068	1,814	0,041	6,043	5,497	137,314	11,727
	B50	0,000	1,495	0,043	5,953	5,607	133,433	13,129
	B100	0,039	1,789	0,043	5,957	5,677	133,333	12,371
	<b>Média ± DP</b>	<b>0,068±0,07</b>	<b>1,60±0,31</b>	<b>0,037±0,006</b>	<b>5,993±0,056</b>	<b>6,456±0,96</b>	<b>179,26±50,72</b>	<b>12,83±1,87</b>
Dia 10	PEBD	0,193	1,520	0,036	6,043	7,607	216,834	14,013
	A2,5	0,185	1,446	0,038	6,010	7,393	192,535	13,806
	A50	0,195	2,181	0,034	6,053	6,890	203,229	13,199
	A100	0,214	2,157	0,036	6,087	6,577	182,326	13,785
	B2,5	0,148	2,181	0,038	6,070	5,817	153,120	11,336
	B50	0,105	2,647	0,036	6,097	6,770	196,019	13,594
	B100	0,154	2,451	0,041	6,103	6,253	157,887	12,382
	<b>Média ± DP</b>	<b>0,171±0,05</b>	<b>0,05±21</b>	<b>0,037±0,009</b>	<b>6,066±0,041</b>	<b>6,758±0,73</b>	<b>185,99±38,91</b>	<b>13,16±1,52</b>



# CAPÍTULO 5. TESTES DE MIGRAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS

Neste capítulo, serão reportados os estudos de migração de AgNPs contidas em embalagens para alimentos (cenoura) e simulantes estabelecidos por normas que possibilitam a realização de testes de migração para metais pesados, as quais seguem as condições experimentais estabelecidas de armazenamento e ensaio. Estes ensaios visam garantir a segurança no consumo de alimentos armazenados em embalagens contendo nanopartículas.

## 5. 1. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1.1 Teste de migração<sup>4</sup> de metais pesados nos filmes poliméricos sem contato com alimento

Para a avaliação de migração de AgNPs de embalagens foi utilizado a **RDC n° 105, de 19 de maio de 1999** da ANVISA, que estabelece limites de migração de metais pesados. Foram utilizadas amostras dos filmes A 2,5 e B 2,5, com superfície de contato de 600 cm<sup>2</sup>, as quais foram lavadas inicialmente em água corrente e em seguida com água destilada. Essas amostras foram secas em temperatura ambiente e colocadas em contato com 300 mL dos seguintes simulantes<sup>5</sup>: A (água destilada), B (ácido acético 3%) e C (etanol 15%) por 10 dias. Transcorrido o tempo dos ensaios de migração, as amostras foram retiradas dos béqueres e lavadas no mesmo simulante. Em seguida, o simulante foi evaporado em banho-maria até um volume reduzido e transferido para uma cápsula de porcelana, previamente tarada, para terminar o processo de evaporação em banho-maria e depois em estufa a 100 °C ± 5 °C a fim de garantir total evaporação. As cápsulas foram então resfriadas a temperatura ambiente em dessecador e pesadas. O

---

<sup>4</sup>Migração é a transferência de componentes do material em contato com alimentos para estes produtos, devido a fenômenos físicos e químicos;

<sup>5</sup> Simulante é o produto que imita o comportamento de um grupo de alimentos que tem características semelhantes;



resíduo foi resuspenso em água deionizada e avaliado pela técnica de Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente ICP-OES (Perkin Elmer, modelo Optima 7000DV).

### **5.1.2 Teste de migração de metais pesados nos filmes poliméricos em contato com alimento (cenoura)**

Para o teste de contato dos filmes contendo nanopartículas com alimentos, 50 gramas de rodela de cenoura (devido à elevada superfície de contato), foram embaladas nas amostras de filmes nas diferentes concentrações (A 2,5; A 50; A 100 e B 2,5; B 50; B 100) em triplicata e deixadas em contato por 10 dias, a 10 °C ( $\pm 2$  °C) e UR próximo a 90%. Em seguida, 5-8 gramas de cada amostra foram retiradas e colocadas em tubo digestor, no qual foi adicionado 5 mL da mistura de ácido nítrico e ácido perclórico na proporção de (2:1). As amostras foram levadas para o bloco digestor a temperatura de 150°C por aproximadamente 1 hora. A temperatura foi em seguida elevada para 220°C e mantida por 2 horas. As amostras foram então retiradas da chapa, e água deionizada foi adicionada no recipiente até completar o volume de 75 mL, o qual foi então tampado com papel parafilme. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas e transferidas para frascos de 50 mL de armazenamento de extrato. Para quantificar/detectar a presença de nanopartículas nas amostras, as mesmas foram analisadas pela técnica de ICP-OES (Perkin Elmer, modelo Optima 7000DV).

## **5.2. RESULTADOS**

### **5.2.1. Teste de migração de metais pesados nos filmes poliméricos sem contato com alimento**

A migração de nanopartículas para alimentos e bebidas é a principal rota de entrada destas partículas no intestino (ECHEGOYEN; NERÍN, 2013). O estudo realizado por (WALCZAK *et al*, 2012) demonstrou a importância de se avaliar a possibilidade de migração de AgNPs de embalagens para alimentos pois a prata coloidal pode permanecer intacta após a digestão. (SONG *et al*, 2011) relatou a migração total de AgNPs inseridas na matriz de polietileno usando simulantes como ácido acético 3% (w/v) e etanol 95% (v/v). Segundo (ECHEGOYEN; NERÍN, 2013) os íons de prata ( $\text{Ag}^+$ ) são a principal forma (química) encontrada em soluções de migração induzidas por um ataque oxidativo dos reagentes. Essas taxas de liberação podem aumentar com a

influência da temperatura 0-37 °C (ŠIMON; CHAUDHRY; BAKOŠ, 2008) e do pH (LIU; HURT, 2010).

Através da análise de ICP-OES não foi possível encontrar prata nas amostras em contato com os simulantes A, B e C, nas condições estudadas. As amostras A2,5 e B2,5, portanto se enquadram dentro do regulamento da UE (EFSA, 2006) no qual o limite permitido de migração é de 0,05 mg Ag/kg para o alimento, mesmo não existindo uma legislação específica que limita valores de migração para nanopartículas.

Os resultado diferem do encontrado por (ECHEGOYEN; NERÍN, 2013) e realizaram testes de migração em embalagens de poliolefinas comercializadas nos EUA, na forma rígida e em forma de sacos plásticos de PEBD, contendo AgNP. Para os testes de migração, os autores utilizaram dois tipos de simulantes: etanol 50% v/v e ácido acético 3% v/v, e encontraram maiores concentrações de migração de prata para as amostras colocadas em contato com ácido acético na forma de embalagens rígidas.

### **5.2.2. Teste de migração de metais pesados nos filmes poliméricos em contato com alimento (cenoura)**

Em maio de 2011 a EFSA (Associação Europeia de Segurança Alimentar) publicou um guia de orientação para avaliar os riscos potenciais do uso da nanotecnologia em relação à questão dos alimentos seguros. Esta publicação ocorreu devido às questões e incertezas sobre os possíveis efeitos toxicológicos destes nanomateriais com propriedades químicas, fisiológicas, farmacológicas e toxicológicas de natureza distinta (ECHEGOYEN; NERÍN, 2013). As investigações mais atualizadas sobre nanomateriais (COCKBURN et al, 2012) tratam de aplicações em que o nanomaterial mantém contato direto com alimentos, como o caso da nanosílica (melhorando as propriedades de barreira) e nanoprata (antimicrobiano).

(ŠIMON; CHAUDHRY; BAKOŠ, 2008) realizaram um estudo teórico sobre o risco potencial de migração de nanopartículas de embalagens para alimentos. O estudo relata que esse risco é possível no caso de nanopartículas extremamente pequenas (cerca de 1 nm) em matrizes poliméricas de baixa viscosidade, como por exemplo: polietileno de baixa densidade (PEBD), polietileno de alta densidade (PEAD) e polipropileno (PP). O estudo foi baseado em três temperaturas: 25 °C (ambiente), 4 °C (refrigerador) e -18 °C (freezer), em dois períodos (1 mês e 1 ano) de contato. Os valores de migração para amostras de PEBD durante um ano de contato a 25 °C foi 0,26 mg.

Nas condições analisadas neste trabalho, em nenhuma das amostras de cenoura mantidas em contato com os filmes nanoparticulados foi detectada prata, o que é bastante desejável. Alguns fatores podem ter contribuído para a não migração destas partículas para o alimento, como: temperatura, tempo de contato entre o alimento e a embalagem. Segundo (SONG et al, 2011) o tempo é um fator muito importante, pois como relatado pelos autores, logo no primeiro dia de contato com o alimento pode ocorrer uma redução na taxa de migração devido a um processo de estabilização ao longo do tempo de contato. Fato comprovado em um estudo recente, realizado por (CUSHEN et al, 2014) ao fazerem uma simulação para avaliar o risco potencial de migração de nanopartículas de prata e cobre (contidos em filmes de polietileno) para alimentos. Neste estudo os autores relataram não haver um efeito significativo para o tempo e temperatura nas amostras analisadas ( $p > 0,1$ ), pois pode ter ocorrido uma estabilização dos níveis de migração durante o período de estudo, não sendo, portanto significativas estas variáveis.

Outro fator que podem ter contribuído para a não detecção de prata foi o limite de resolução da técnica empregada de 10 ppb. Ou mesmo não podemos desconsiderar o fato de simplesmente não ter ocorrido migração de partículas para o alimento nas condições empregadas, contudo, este fato não exclui a possibilidade de que partículas possam migrar em outras condições de teste, como demonstrado por (CUSHEN et al, 2014) que encontrou valores médios de prata de  $0,0041 \text{ mg/dm}^2$  em amostras que tiveram contato com o compósito de polietileno (PE) e nanoprata, valor este significativamente diferente das amostras controle.

Segundo estudo recente, a concentração de partículas presente nos compósitos é considerada o parâmetro mais importante na influência da migração de partículas quando comparado aos parâmetros de tempo, temperatura e tamanho de partículas (CUSHEN et al, 2013). Portanto, outra hipótese que deve ser levado em consideração para a não detecção de prata nas amostras estudadas pode ser devido à baixa concentração de nanopartículas empregadas nas amostras de filmes aqui estudadas.

### 5.3. CONCLUSÃO

Nos testes de migração dos filmes não foi detectada prata em nenhuma das amostras analisadas nas condições estudadas, porém, é importante relatar que pode ter ocorrido migração de partículas, mas em concentrações abaixo do limite de detecção da

técnica utilizada. Estudos de migração de nanopartículas para alimentos são demasiadamente importantes, especialmente no que se refere aos estabelecimentos de valores limites seguros, já que atualmente não existe uma legislação específica que limita valores de nanopartículas de prata.

## REFERÊNCIAS

COCKBURN, A. et al. Approaches to the safety assessment of engineered nanomaterials (ENM) in food. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 6, p. 2224-2242, 2012.

CUSHEN, M. et al. Migration and exposure assessment of silver from a PVC nanocomposite. **Food chemistry**, v. 139, n. 1, p. 389-397, 2013.

CUSHEN, M. et al. Evaluation and simulation of silver and copper nanoparticle migration from polyethylene nanocomposites to food and an associated exposure assessment. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62 , , n. (6), p. 1403–1411, 2014.

ECHEGOYEN, Y.; NERÍN, C. Nanoparticle release from nano-silver antimicrobial food containers. **Food and Chemical Toxicology**, v. 62, p. 16-22, 2013.

EFSA Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request related to a 12th list of substances for food contact materials. **The EFSA Journal**, v.395, p. 401, 1-21, 2006.

LIU, J.; HURT, R. H. Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids. **Environmental science & technology**, v. 44, n. 6, p. 2169-2175, 2010.

RDC. Resolução nº 105, de 19 de maio de 1999. Aprova o Regulamento Técnico “**Disposições Gerais para Embalagens e Equipamentos Plásticos em contato com Alimentos**”. Disponível em:< <http://portal.anvisa.gov.br> >. Acesso em: 15 de fevereiro de 2014.

SONG, H. et al. Migration of silver from nanosilver–polyethylene composite packaging into food simulants. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 28, n. 12, p. 1758-1762, 2011.

WALCZAK, A. P. et al. Behaviour of silver nanoparticles and silver ions in an in vitro human gastrointestinal digestion model. **Nanotoxicology**, v. 7, n. 7, p. 1198-1210, 2012.

ŠIMON, P.; CHAUDHRY, Q.; BAKOŠ, D. Migration of engineered nanoparticles from polymer packaging to food--a physicochemical view. **Journal of Food & Nutrition Research**, v. 47, n. 3, p. 105-113, 2008.

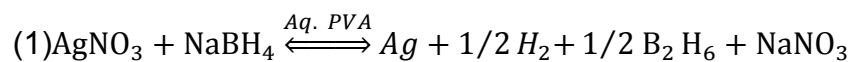
## **CAPÍTULO 6. ECOTOXICIDADE**

Neste capítulo serão descritos os testes de ecotoxicidade, realizados em parceria com a Embrapa Meio Ambiente, utilizando como organismos de estudo a alga da espécie *Pseudokirchneriella subcapitata* e os microcrustáceos de água doce *Daphnia similis* e água salgada *Artemia salina*. Estes testes visam ampliar os conhecimentos a respeito dos níveis de toxicidade causados por AgNPs obtidas seguindo a síntese descrita neste capítulo. Foram avaliadas 5 concentrações diferentes visando obter a concentração de inibição de crescimento algáceo e a imobilidade dos invertebrados aquáticos em 50% da população (CE<sub>50</sub>), nas condições de ensaio e período de exposição estabelecidos pelas normas.

## 6. MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1 Preparação das AgNPs

Para se obter dispersões estáveis e concentradas de AgNPs foi empregada a técnica de redução química a partir do nitrato de prata em meio aquoso. Água deionizada foi utilizada para preparar as soluções de álcool polivinílico (PVA - agente estabilizador) e nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>), utilizando borohidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>) como agente redutor (BERNI NETO et al, 2008). A reação de redução da prata está demonstrada a seguir:



Alíquotas desta solução foram retiradas e diluídas em água deionizada obtendo-se as concentrações mostradas na Tabela 7. Os reagentes utilizados foram obtidos da Aldrich® e usados sem purificação adicional. A síntese pode ser resumida da seguinte maneira: 60 mM de PVA foi adicionado em 10 ml de uma solução de 5 mM de nitrato de prata, cuja mistura foi mantida em agitação durante 5 min. Em seguida, foi adicionado 5 ml de uma solução de NaBH<sub>4</sub>, e deixada sob agitação magnética durante 15 min. No final da síntese, obteve-se uma solução de cor amarela, a qual é um indicativo da formação de nanopartículas. As soluções de concentrações variadas mostradas na Tabela 7 foram na sequência colocadas em contato com os organismos aquáticos. As mesmas concentrações de uma solução de NaBH<sub>4</sub> foram utilizadas como controle.

**Tabela 7** Concentração e respectivas porcentagens das soluções de AgNPs empregadas nos ensaios de toxicidade para os organismos estudados.

<b>Concentração das soluções de AgNP</b>	
<b>(%)</b>	<b>(mgL<sup>-1</sup>)</b>
0,0	0,0
0,001	$1,5 \times 10^{-4}$
0,01	$1,5 \times 10^{-3}$
0,1	$1,5 \times 10^{-2}$
1,0	$1,5 \times 10^{-1}$
10	1,5

Fonte: Elaborada pelo autor.

## **6.2. Caracterização das nanopartículas obtidas na síntese**

### **6.2.1 Espectroscopia UV-vis**

As propriedades óticas de AgNPs em solução foram monitorizadas por espectroscopia de absorção UV-Vis utilizando um equipamento Perkin-Elmer UV-Vis Lambda 6. As amostras diluídas em água deionizada foram colocadas numa célula de quartzo de 2 cm<sup>3</sup> para a obtenção de espectros de absorção na região de 200 a 800nm.

### **6.2.2 Análise de distribuição do tamanho da partícula e potencial zeta**

O tamanho das partículas foi avaliado usando o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Inc., USA) que usa dispersão dinâmica da luz para medir o tamanho de partícula e espalhamento de luz eletroforético para determinar o potencial zeta. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### **6.2.3 Medição do tamanho das partículas**

As AgNPs também foram analisadas por um Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET) - (FEI Tecnai G2 F20), utilizando tensão de aceleração de 200 kV. Uma gota de solução AgNP foi adicionado em uma grade de cobre revestida de carbono e o excesso de solução foi removido com papel de filtro. A grade permaneceu protegida da luz com o auxílio de uma folha de papel de alumínio e mantido em condições de



temperatura ambiente. O programa *Image J* foi utilizado para determinar o tamanho e a polidispersão de AgNP.

### 6.3 Organismos testes expostos as diferentes concentrações de AgNP

#### 6.3.1. *Pseudokirchneriella subcapitata*

A alga unicelular *Pseudokirchneriella subcapitata* (antigamente chamada de *Selenastrum capricornutum*) foi utilizada como organismo teste. As algas foram cultivadas em conformidade com a metodologia recomendada pela Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD), de 1984, em câmaras climáticas com temperatura controlada de  $20 \pm 2$  °C e luminosidade de  $\sim 1.300$  lux. A suspensão de algas foi distribuída em placas de Petri (volume final de 15 mL), obtendo-se uma concentração de aproximadamente  $10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ . As algas foram expostas durante 7 dias nas concentrações da solução AgNP (Tabela 7), sendo também avaliadas soluções isentas de AgNP, como controle. Periodicamente, alíquotas foram retiradas das suspensões de algas para medidas de absorvância em 750 nm utilizando um espectrofotômetro UV-Vis1650 PC Shimadzu, uma vez que a absorvância é proporcional à concentração de células. O cálculo da concentração que inibe o crescimento de algas em 50% ao longo de 7 dias ( $\text{CE}_{50-7\text{d}}$ ) baseou-se na inibição relativa da taxa de crescimento em função da concentração ( $\text{mgL}^{-1}$ ) de AgNPs. Foi montada a curva de acordo com o modelo de regressão linear do tipo  $y = 0,0867 - 0,0411 \sqrt{x}$ . A  $\text{CE}_{50}$  é a concentração efetiva do composto tóxico que resulta em 50% de redução da taxa de crescimento da população algácea testados em relação ao controle em um determinado período de tempo (CHUNG et al, 2007).

##### 6.3.1.1. Análise Estatística

Para o cálculo das taxas de crescimento específico foram utilizados os valores da inclinação linear das respectivas curvas de aumento da absorvância em função do tempo (log Abs vs dias, OECD, 1984). Os dados foram tratados pelo módulo de regressão simples utilizando o software Statgraphics Plus (MANUGISTICS, 2001), o que permitiu o cálculo de  $\text{CE}_{50-7\text{d}}$  e intervalo de confiança de 95%, determinando o modelo de regressão que melhor representa os resultados. Os valores  $\text{EC}_{50-7\text{d}}$  foram

comparados e considerados significativamente diferentes um do outro quando os seus intervalos de confiança não mostraram sobreposição (YANG et al, 2002).

### 6.3.2. *Artemia salina*

Indivíduos jovens de *A. salina* foram utilizados no ensaio de toxicidade. Aproximadamente 24 horas antes do ensaio, 900 ml de água de mar sintética foram colocados em um Erlenmeyer de 1L, a qual foi preparada por adição de 30 g de sal "Sera Premium<sup>®</sup>" (Sera GmbH, Heinsberg) em 1000 mL de água (pH = 7.2; conductivity = 110  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Neste recipiente foi adicionado cerca de 50 mg de cistos de Artemia (INVE Aquicultura Inc, Ogden). A suspensão de cistos foi mantida sob intensa aeração por meio de uma pedra porosa, a uma temperatura de  $25 \pm 1$  °C e luminosidade de  $\sim 6300$  lux. Os náuplios obtidos foram expostos a concentrações apresentadas na Tabela 1 durante 48 horas a  $20 \pm 2$  °C. Por meio da utilização de uma micropipeta, 10 organismos foram transferidos para béqueres contendo as soluções de ensaio (volume final de 30 ml) em duplicata. Após 48 horas, foram registrados o número de organismos e a concentração que afetou a mobilidade em 50 % da população ( $\text{CE}_{50}$  - 48h), juntamente com o seu intervalo de confiança de 95 % (USEPA, 1991).

### 6.3.3. *Daphnia similis*

Teste de toxicidade aguda de imobilização foi realizado em conformidade com OECD Guideline Parte I (OECD 1984). Culturas de *Daphnia similis* foram mantidas em aquários de vidro (40 x 25 x 15 cm) contendo água de um poço artesiano, como descrito no protocolo. Os organismos foram colocados em uma sala climatizada com temperatura controlada de  $20 \pm 2$  °C e luminosidade de aproximadamente 1.000 lux. Eles foram alimentados diariamente com microalgas (*Chlorella pyrenoidosa* e *Pseudokirchneriella subcapitata*) (PRESTES et al, 2012).

Testes de toxicidade aguda foram realizados em neonatos (menos de 24h de vida) de *D. similis*, usando as concentrações de solução AgNP mostrados na Tabela 7. Seis ou sete recém-nascidos foram colocados em um béquer (unidade experimental), contendo 30 ml de solução de teste preparada com a água, como descrito acima. Um total de 20 organismos foi testado para cada concentração de teste, divididos em três repetições. A imobilização foi determinada visualmente e registrada após 24h e 48h

para cada concentração, e os respectivos valores de  $CE_{50}$  foram determinados juntamente com o intervalo de confiança de 95%. As Daphnias foram examinadas e fotografadas, a fim de avaliar o seu conteúdo interno usando um estereoscópico (Modelo SMZ 2 LED, Optika).

### **6.3.2.1 Análises Estatísticas para Artemia e Daphnia**

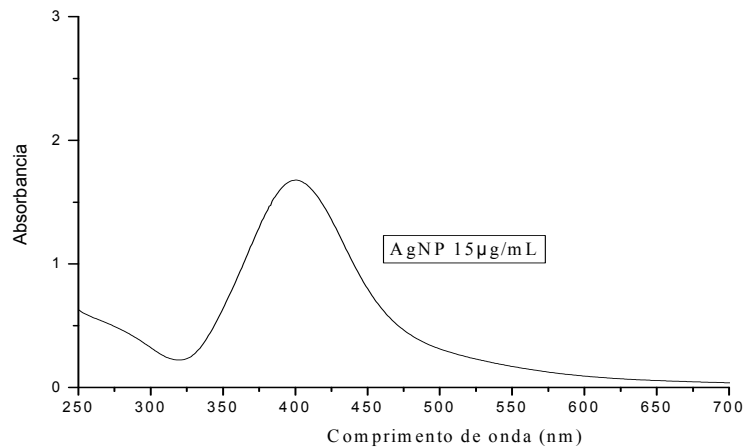
A  $CE_{50}$  24h e 48h foram calculadas pelo software Probit Analysis do Statgraphics Plus 5.1 (MANUGISTICS, 2001). Por meio dos mesmos procedimentos, também foi avaliada a toxicidade da solução de borohidreto, de modo a compreender a contribuição de toxicidade deste composto, já que está presente nas soluções testes de AgNPs.

## **6. 2. RESULTADOS**

### **6.2.1. UV-vis**

O espectro de absorção de UV-Vis da solução de nitrato de prata e de AgNPs é mostrada na Figura 23. Segundo (WHELAN et al, 2004) e (KRKLJEŠ et al, 2007) AgNPs apresentam espectro de absorção entre 400-410 nm. O espectro apresentado na Figura 23 mostra um pico único e bem definido com absorção máxima em 400 nm. A posição do pico de absorção de soluções de nanopartículas metálicas depende de vários fatores, tais como tamanho, forma e polidispersão das partículas (MOCK et al, 2002). A banda relativamente estreita indica que a síntese obtida de AgNP apresenta uma distribuição uniforme do tamanho, como confirmado pela análise de MET. O pico bem definido combinado com a coloração amarela da solução coloidal é uma evidência da não-oxidação de AgNP (VARKEY; FORT, 1993). O sal de prata também analisado pela técnica não mostrou absorção nesta faixa espectral.

**Figura 23** Espectro de absorção das AgNPs obtidas pela síntese detalhada na seção experimental.

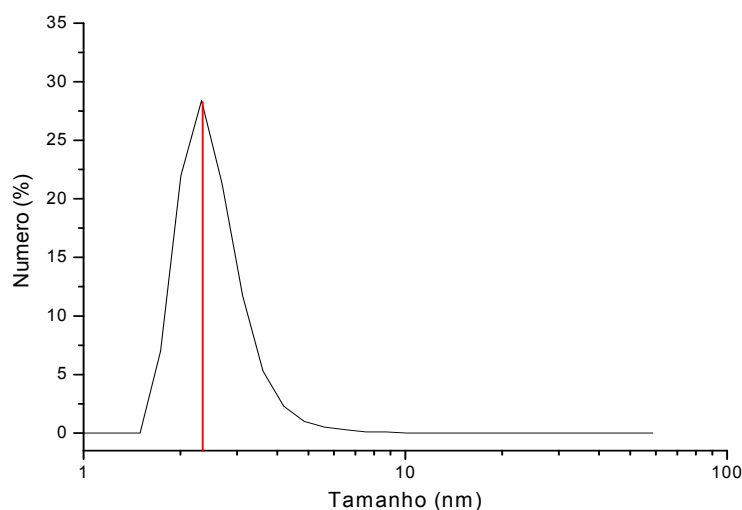


Fonte: Elaborada pelo autor.

### 6.2.2 Análise do tamanho das partículas e potencial zeta

A distribuição de tamanho de partícula de AgNP é mostrado na Figura 24. Como pode ser visto, os diâmetros de exibição da AgNP são de 1,5 a 4 nm, com dimensão média de 2,5 nm. O potencial zeta das nanopartículas sintetizadas estava em torno de -1mV em pH de 6,2. Um valor baixo de potencial zeta para AgNP também foi relatado por (LOESCHNER et al, 2011), que utilizou PVP como um estabilizador.

**Figura 24** Distribuição do tamanho das nanopartículas de prata obtidas pela síntese detalhada na seção experimental.



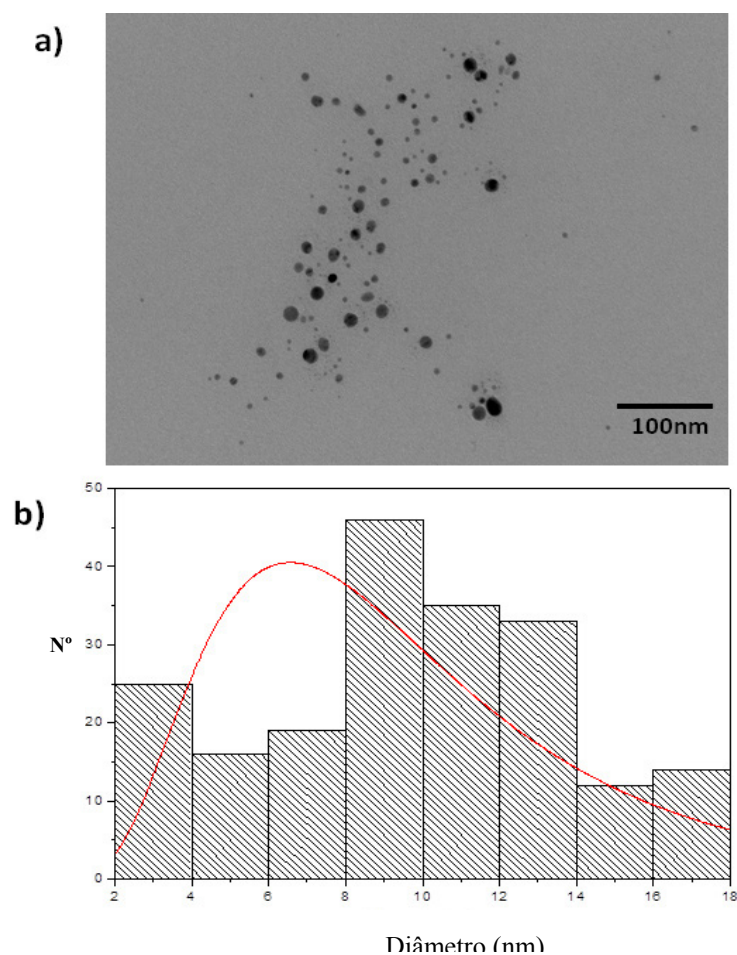
Fonte: Elaborada pelo autor.

De acordo com os autores, a estabilidade da suspensão de AgNPs, neste caso, baseia-se unicamente na estabilização estérica promovido pelas grandes moléculas do polímero, sem contribuição da estabilização eletrostática.

### 6.2.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A imagem de MET das AgNP é mostrada na Figura 25a, revelando que a morfologia primária das nanopartículas é esférica. Pode ser observado que as nanopartículas estão bem dispersas, sem agregação e possuem tamanho de partícula entre 2 e 18 nm (Figura 25b). A maioria das nanopartículas de diferentes tamanhos não é agregada devido à estabilização fornecida pelo polímero PVA.

Figura 25 a) Imagem de MET das nanopartículas de Ag e (b) histograma de tamanho das AgNP.



Fonte: Elaborada pelo autor.

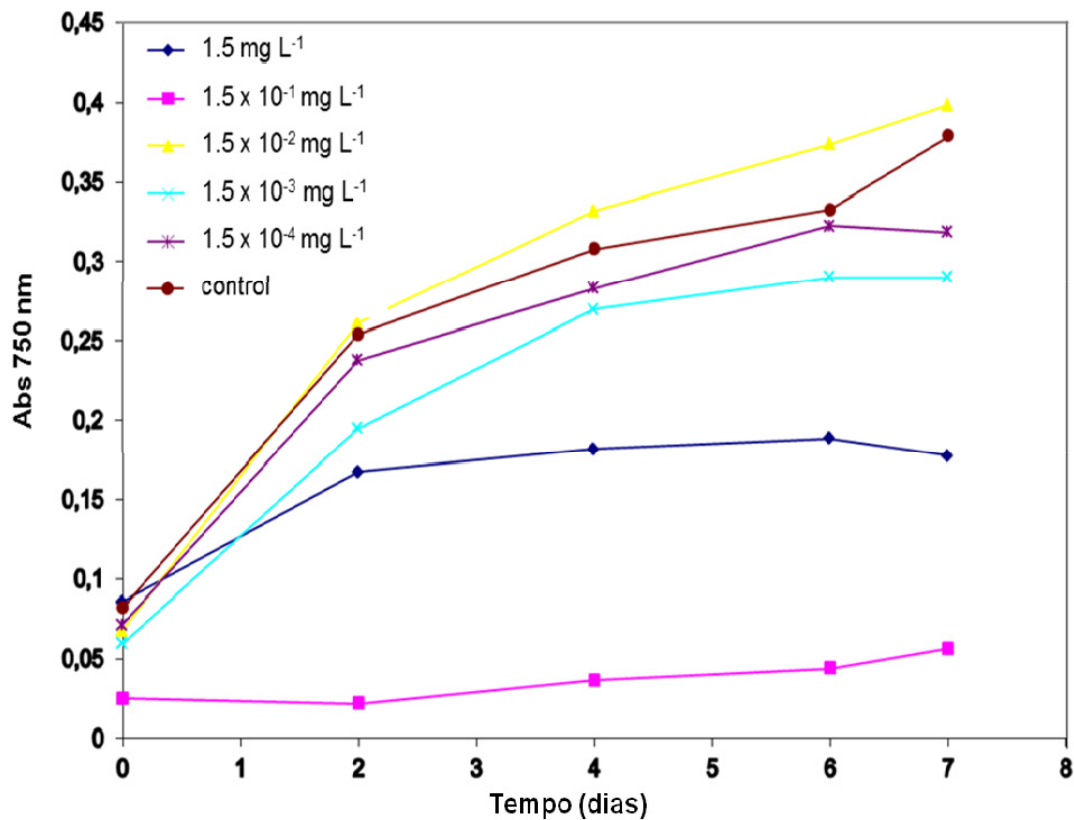
O histograma de distribuição de tamanho de partícula de AgNP correspondentes são dadas na Figura 25b. A linha sólida é o ajuste log normal de dados, o que resultou em diâmetros de 8,62 e desvio de 0,52.

## 6.2.4 Ensaios de Toxicidade

### 6.2.4.1 *Pseudokirchneriella subcapitata*

A Figura 26 apresenta a absorvância em 750 nm da suspensão de algas em função do tempo de exposição (7 dias) para as diferentes concentrações de AgNP. Na comparação das curvas é sugerido que a solução de concentração  $1,5 \times 10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$  foi a que mais afetou *P. subcapitata*, inibindo o crescimento da alga substancialmente quando comparado com as outras concentrações. Os dados mostram que em dois dias de exposição há um decréscimo no valor de absorvância e nos dias que se seguem há um aumento destes valores de absorvância (e conseqüentemente do crescimento de *P. subcapitata*), mas não excedendo 0,05. No entanto, quando foi calculada a taxa de crescimento específico, obtida pela inclinação da curva de log Abs versus tempo (OECD, 1984), a menor taxa de crescimento específico foi observado para a concentração de  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  comparativamente com  $1,5 \times 10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$ . Assim, as taxas de crescimento específicas calculados foram 0,039 e 0,054  $\log \text{ Abs}_{750\text{nm}} \text{ d}^{-1}$ , respectivamente. As concentrações de  $1,5 \times 10^{-2} \text{ mg L}^{-1}$ ,  $1,5 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$  e  $1,5 \times 10^{-4} \text{ mg L}^{-1}$  mostraram comportamento semelhante ao controle, não interferindo na taxa de crescimento específica da alga, apresentando taxas na ordem de 0,08-0,09  $\log \text{ Abs}_{750\text{nm}} \text{ d}^{-1}$ .

Figura 26 Curvas de crescimento de *P. subcapitata* exposta a diferentes concentrações ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de AgNPs. Os valores foram realizados em triplicata.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Como proposto, foi feito o cálculo de  $CE_{50-7d}$  em relação a taxa de crescimento específico em função da concentração, mesmo esta não seguindo rigorosamente uma curva de dose resposta. No caso do presente estudo a  $CE_{50-7d}$  para a solução de AgNP foi de  $1,09 \text{ mg L}^{-1}$  ( $0,59-3,15 \text{ mg L}^{-1}$  no intervalo de confiança de 95%).

Similarmente, foi calculada a  $CE_{50}$  para a solução de borohidreto de sódio livre de AgNP, em termos de % de solução. A  $CE_{50-7d}$  foi de 61,56%, sendo muito menos tóxica do que a solução contendo AgNP ( $CE_{50-7d} = 7,29\%$ ) quando avaliado a toxicidade deste material em termos de % de solução. Portanto, a contribuição da solução de borohidreto para a toxicidade foi de apenas 11,8%.

A AgNP utilizado neste trabalho mostrou baixa toxicidade em comparação com (RIBEIRO et al, 2014), que obteve  $CE_{50} 3,24 \times 10^{-2} \text{ mg L}^{-1}$  de AgNP com 7,5 nm para *P. subcapitata*. ANGEL e colaboradores (ANGEL et al, 2013) obtiveram  $CE_{50}$  de  $1,95 \times 10^{-2} \text{ mg L}^{-1}$  ao se usar AgNP revestidas com PVP e dimensões entre 9,9 e 20 nm. Neste

estudo, os autores chegaram à conclusão de que íons de  $\text{Ag}^+$  são mais tóxicos do que AgNP, e indicam como possível causa a presença da matéria orgânica no meio, a qual pode ter aumentado a reatividade na superfície de AgNP, diminuindo assim a biodisponibilidade no sistema.

A toxicidade encontrada para *P. subcapitata* pode ter sido influenciada pelo revestimento da AgNP. A AgNP utilizada foi revestida por poli (álcool vinílico) (PVA), sendo que estes 2 componentes apresentam elevada compatibilidade interfacial, devido à formação de ligações não-covalentes na superfície de AgNP (LIN et al, 2012). Os grupos hidroxilas ( $\text{OH}^-$ ) do PVA interagem fortemente com as moléculas de água e  $\text{OH}^-$  vizinhos do meio ambiente, aumentando deste modo a mobilidade molecular (GONZÁLEZ-CAMPOS et al, 2012). Estes resultados podem permitir uma maior mobilidade das AgNP expondo-as ao meio ambiente, uma vez que o polímero PVA é considerado seguro (DE MERLIS; SCHONEKER, 2003).

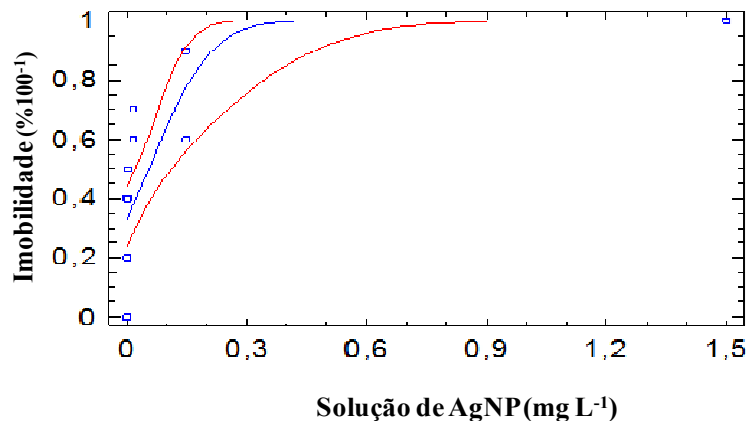
Segundo Kwok et al (2012) AgNPs com revestimento de diferentes materiais orgânicos, utilizados para melhorar a sua dispersão em água, tiveram diferentes graus de toxicidade para uma espécie de peixe. Por exemplo, (ANGEL et al, 2013) investigaram AgNP revestidas por camadas de polímeros, e observaram que estes podem aumentar a repulsão eletrostática e a estabilidade em suspensão. Os mesmos autores atribuíram à toxicidade AgNP revestidas com PVP a uma carga de superfície positiva encontrada na superfície do polímero, resultando em uma maior interação com a água doce das *P. subcapitata*. Além disso, as interações químicas entre a cobertura da superfície do polímero com o ambiente aquático pode influenciar na liberação de AgNP.

#### **6.2.4.2 *Artemia Salina***

Os resultados sobre à exposição de *A. salina* em diferentes concentrações da solução de teste podem ser observados na Figura 27.



Figura 27 Dose-resposta (azul) e intervalo de confiança 95% (vermelho) para *A. salina* para diferentes concentrações de AgNP.



Fonte: Elaborada pelo autor.

O valor de  $CE_{50-48h}$  foi de  $5,5 \times 10^{-2} \text{ mg L}^{-1}$  ( $2,2 \times 10^{-2}$ - $11,2 \times 10^{-2} \text{ mg L}^{-1}$  e 95% de intervalo de confiança). Este valor parece ser maior do que o encontrado por (FALUGI et al, 2013) para avaliar a toxicidade de AgNP de 1-10 nm usando diluições em série (de  $1,0 \times 10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$  até  $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) em *Artemia*, o qual resultou numa  $CL_{50-48h}$  (concentração letal) com valor de  $7,3 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$ . Na literatura existem poucos estudos sobre a ecotoxicidade de AgNPs para *A. salina*. (KUMAR et al, 2012) obteve o valor de  $CL_{50}$  de  $10 \text{ nM mL}^{-1}$  para avaliar a toxicidade de AgNPs com tamanho médio de 33-44 nm para *A. salina*. (KOWALSKA - GÓRALSKA et al, 2011) relataram que as *Artemias* expostas por seis horas em nitrato de prata apresentam capacidade de sobrevivência média aproximadamente de 50%.

Ates et al, (2013) descobriram que nanopartículas de  $TiO_2$ , quando ingeridas, ficam impregnadas no intestino de *A. salina* adultos e de náuplios (larvas de crustáceos). Os autores notaram a formação de aglomerados de nanopartículas no intestino, e quando o lavaram com ácido determinaram redução no teor de  $TiO_2$  de 3-12%. Estes fatos sugerem que nanopartículas de compostos inorgânicos podem aglomerar no intestino de organismos aquáticos e impedir a absorção de nutrientes por interferir na captura de alimentos uma vez que estes organismos são filtradores, devido a este fenômeno, a bioacumulação destas partículas em microcrustáceas se torna evidente. No presente trabalho, soluções contendo borohidreto, livre de AgNPs, não mostrou nenhuma toxicidade à mobilidade dos organismos, pois foi semelhante a encontrado no grupo controle.

### 6.2.4.3. *Daphnia similis*

Em testes de ecotoxicologia, crustáceos de água doce do gênero *Daphnia* são considerados bons indicadores, antecipando resultados de toxicidade em mamíferos (MARTINS et al, 2007). Por ser um organismo muito sensível a tóxicos químicos, tais como íons metálicos, pode ser usado como organismo-teste utilizando um protocolo padrão da OCDE segundo a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA), e da International Standards Organization (ISO) (BAUN et al ., 2008; LI et al, 2010; OECD, 2004).

Foi observado que a solução AgNP interferiu na sobrevivência de *Daphnia*. O cálculo para CE<sub>50</sub>-24 h para solução AgNP foi  $3.42 \times 10^{-4}$  mg L<sup>-1</sup> ( $4.86 \times 10^{-4}$  a  $2.52 \times 10^{-4}$  mg L<sup>-1</sup> e intervalo de confiança de 95%). Para 48 h de exposição, o cálculo de CE<sub>50</sub> foi  $2.62 \times 10^{-4}$  mg L<sup>-1</sup> ( $1.80 - 4.03 \times 10^{-4}$  mg L<sup>-1</sup> e intervalo de confiança de 95%). Além disso, determinou-se a toxicidade da solução de borohidreto livre AgNP usada como controle e concluiu-se que ela contribuiu em apenas 0,92% da toxicidade global da solução contendo AgNP.

O valor baixo de CE<sub>50</sub> 48h de  $2.62 \times 10^{-4}$  mg L<sup>-1</sup> para *D. similis* é de certa maneira consistente com os valores encontrados na literatura, em que os valores de CE<sub>50</sub> 48h para nanopartículas metálicas são inferiores a  $1 \times 10^{-1}$  mg L<sup>-1</sup>. Por exemplo, Li et al (2010) encontraram o valor de  $2 \times 10^{-3}$  mg L<sup>-1</sup>, e indicaram que pode ocorrer a liberação de íons de Ag nas condições experimentais utilizadas para *D. magna*. Asghari et al (2012) obtiveram o mesmo valor de CE<sub>50</sub> para *D. magna* utilizando AgNP esféricas e tamanho médio de 16.6 nm.

O valor inferior de CE<sub>50</sub> encontrado neste trabalho para *D. similis* quando comparado aos valores de CE<sub>50</sub> para *D. magna* relatados na literatura pode ser explicado pela maior sensibilidade da *D. similis* a substância tóxica, a qual pode variar por uma fator de 10 vezes (VILA et al, 2008; ROMANHOLO FERREIRA et al, 2011). De acordo com o sistema de classificação e rotulagem de produtos químicos (ONU, 2009) para os organismos aquáticos do gênero *Daphnia*, substâncias com CE/CL<sub>50</sub> menor que 1mg/L podem ser classificadas na categoria aguda 1 (muito tóxica).

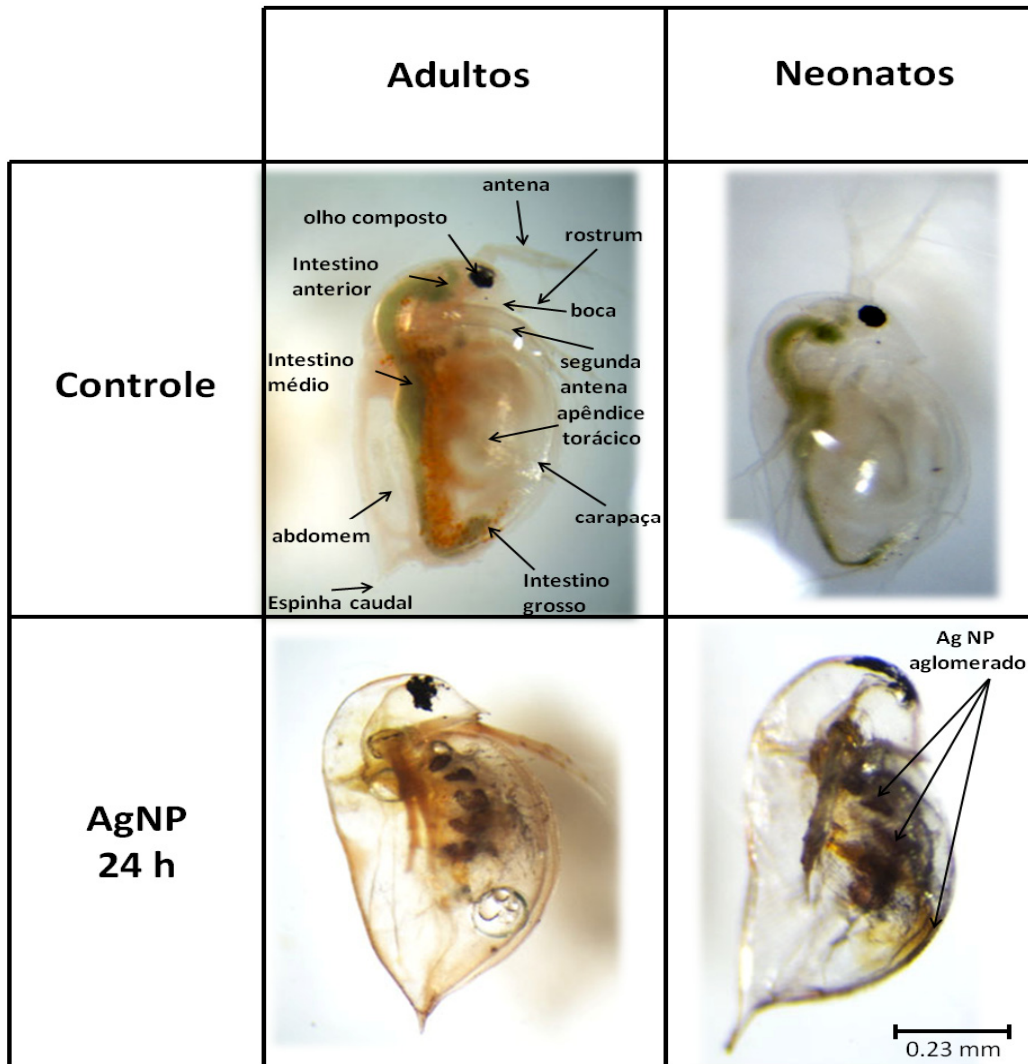
Trabalhos anteriores mostram que a  $\text{Ag}^+$  inibe o fluxo de íons de sódio ( $\text{Na}^+$ ), ao bloquear o funcionamento das enzimas de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e ATPase, causando um distúrbio na regulação de íons destes organismos aquáticos (ALLEN et al, 2010; BIANCHINI; WOOD, 2003; ZHAO; WANG, 2010). As AgNPs quando expostas ao meio aquático sofrem oxidação, liberando a prata iônica ( $\text{Ag}^+$ ) na água, a qual apresenta maior toxicidade (ALLEN et al, 2010; ANGEL et al, 2013; LEE et al, 2005). ANGEL et al, (2013) mostraram em seu trabalho com *P. subcapitata* que a prata em forma iônica liberada das nanopartículas foi três vezes mais tóxica, em comparação com a prata na escala micro (JO et al, 2012) que também gerou alta toxicidade com algumas das suas formulações (24h- $\text{CE}_{50}$  9,0-14,3  $\times 10^{-3}$  mg L<sup>-1</sup>) para *Daphnia* atribuindo o efeito tóxico dos íons  $\text{Ag}^+$  liberados a partir da superfície de AgNPs.

Além da sensibilidade aos contaminantes, a *Daphnia* compõe os níveis inferiores da cadeia alimentar em ecossistemas de água doce aquáticos. Uma mudança sutil na qualidade e quantidade da população de microcrustáceos afeta outras populações de organismos aquáticos, resultando em grandes impactos ambientais (MARTINS et al , 2007).

A Figura 28 mostra as mudanças sofridas por adultos *Daphnia* e neonatos expostos por 24 horas à solução com AgNPs. A coloração escura observada nas linhas do intestino indica que estes organismos ingeriram a solução de AgNPs. Pode-se observar que, para adultos e recém-nascidos, a solução AgNP modificou a morfologia dos olhos. Observa-se também que existem aglomerados de AgNP impregnados na carapaça, antênulas e outras partes do corpo. Além disto, o acúmulo de AgNP nos apêndices torácicos pode prejudicar a mobilidade de *Daphnia*, bem como podem interferir na disponibilidade de alimento e influenciar a dificuldade de excreção de resíduos pelo intestino. (ZHAO; WANG, 2011) também reportaram coloração marrom no intestino dos organismos expostos a concentrações elevadas (200 e 500 mg L<sup>-1</sup>) de nanopartículas. Asghari et al, (2012) observaram em seus resultados o acúmulo de AgNPs em intestino de *D. magna* e com isso os autores sugeriram que essa exposição poderia representar um risco de bioacumulação para organismos aquáticos especialmente para copépodes que são filtradores como as *D. magna*. Resultados semelhantes foram encontrados (ATES et al, 2013) para outras nanopartículas,

mostrando também que *Daphnias* apresentaram essa disfunção intestinal depois da ingestão de nanopartículas de TiO<sub>2</sub>.

**Figura 28** Alterações observadas em *Daphnia* adultos e neonatos depois de 24 h de exposição a AgNPs.



Fonte: Elaborada pelo autor.

De acordo com os valores CE<sub>50</sub>s obtidos neste trabalho para AgNP, a ordem de toxicidade para os organismos-teste é *D. similis* > *A. salina* > *P. subcapitata*. Esta diferença na sensibilidade é estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) uma vez que os intervalos de confiança de 95 % dos CE<sub>50</sub>s não se sobrepõem uns aos outros (YANG et al, 2002). Geralmente, a toxicidade dos sais de Ag é superior em comparação com AgNP, no entanto AgNP pode ter efeitos tóxicos mais elevados do que o esperado de acordo com a concentração de prata iônica dissolvida, provavelmente devido aos efeitos adicionais destas partículas e aglomerações sobre as membranas das células. Este fato

depende de vários fatores como os meios utilizados, moléculas orgânicas, condições de luz e tamanho de partícula ou revestimento utilizado na síntese das NP (BOENIGK et al, 2014). Neste contexto, Vannini et al (2013) compararam os efeitos de AgNO<sub>3</sub> e AgNPs sobre *Eruca sativa* (rúcula) e observou-se que a exposição à AgNP provoca a alteração de algumas proteínas relacionadas com o retículo endoplasmático e vacúolo, indicando estas duas organelas como alvos da ação das AgNPs. De acordo com os autores, esses dados adicionais oferecem mais evidências de que os efeitos da AgNPs não são simplesmente devido à liberação de íons Ag.

No Brasil, o limite de concentração de Ag no compartimento aquático está definido pelo decreto CONAMA 357/05 (BRASIL, 2005) que estabelece 0,01 mg L<sup>-1</sup> para águas doces e 0,005 mgL<sup>-1</sup> para as águas salinas. De acordo com nossos resultados, a concentração efetiva (CE<sub>50</sub>-48h) para o organismo mais sensível é cerca de 20 a 40 vezes menor do que o descrito pelo decreto CONAMA. Considerando-se a toxicidade aguda (CE<sub>50</sub>) para o organismo mais sensível e um fator de aplicação de 100, a fim de evitar os efeitos adversos crônicos em tais espécies e proteger outras espécies (GHERARDI-GOLDSTEIN, 1990), uma concentração de 2,62×10<sup>-6</sup> mgL<sup>-1</sup> foi considerada (2,62×10<sup>-4</sup> mg L<sup>-1</sup>/100) para essa finalidade. Para alcançar esta concentração, como relatado por Zagatto (2006) e Crane et al (2003), no intuito de avaliar e estabelecer parâmetros seguros, seria necessária uma aplicação direta equivalente a 7,86 mg de AgNP sobre uma área equivalente a 1 ha, com coluna de água 30 cm de profundidade. Assim, segundo as considerações acima, os limites de concentração de AgNP devem ser revistos para um adequado manuseio e descarte de AgNP, evitando contaminação e efeitos tóxicos em ambientes aquáticos.

### 6.3. CONCLUSÃO

Os efeitos tóxicos de AgNPs estabilizadas com PVA, para algas *P. subcapitata*, e para os invertebrados aquáticos *Artemia salina* e *Daphnia similis* foram investigados, representando esses organismos diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar. As AgNPs obtidas mostraram-se dispersas sem agregação e com tamanho entre 2 e 18 nm. Entre os organismos estudados, a AgNP mostrou menor toxicidade para *Artemia salina* e *P. subcapitata* comparando com os dados da literatura. A AgNPs apresentaram alta toxicidade para *Daphnia similis*, estas nanopartículas ficaram impregnadas no intestino e na carapaça, bem como nos apêndices, incluindo morfologia alterada no olho. É

interessante notar que as condições físicas e biológicas de sistemas aquáticos são complexas e compostas de muitas variáveis e, portanto, são impossíveis de se reproduzir todas as condições *in vitro*. A toxicidade dos metais, em especial das nanopartículas metálicas, é largamente afetado por parâmetros de qualidade de água, tais como pH, temperatura e composição orgânica. Considerando as aplicações tecnológicas de AgNP, as investigações sobre os seus efeitos para organismos aquáticos são importantes para estabelecer protocolos para o uso e descarte adequado de AgNP sobre o meio ambiente, minimizando assim possíveis efeitos tóxicos.

## REFERÊNCIAS

ALLEN H. J. et al. Effects from filtration, capping agents, and presence/absence of food on the toxicity of silver nanoparticles to *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.29, p. 2742-2750, 2010.

ANGEL B. M. et al. The impact of size on the fate and toxicity of nanoparticulate silver in aquatic systems. **Chemosphere**, v.93, p. 359-365, 2013.

ASGHARI S. et al. Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions in *Daphnia magna*. **Journal of Nanobiotechnol**, v.10, p. 1-14, 2012.

ATES M. et al. Effects of aqueous suspensions of titanium dioxide nanoparticles on *Artemia salina*: assessment of nanoparticle aggregation, accumulation, and toxicity. **Environmental monitoring and assessment**, v.185, p. 3339-3348, 2013

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 de março de 2005.

BAUN, A. et al. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing. **Ecotoxicology**, v.17, p.387-395, 2008.

BERNI NETO, E.; RIBEIRO, C.; ZUCOLOTTI, V. Síntese de nanopartículas de prata para aplicação na sanitização de embalagens. Embrapa Instrumentação Agropecuária. **Comunicado Técnico**, 2008.

BIANCHINI, A.; WOOD, C.M. Mechanism of acute silver toxicity in *Daphnia magna*. **Environmental toxicology and chemistry**, v.22, p.1361-1367, 2003.

BOENIGK, J. et al. Effects of Silver Nitrate and Silver Nanoparticles on a Planktonic Community: General Trends after Short-Term Exposure, **PloS one** **9**, v. 9, n.4 p. e95340, 2014.

CRANE, M. et al. Evaluation of probabilistic risk assessment of pesticides in the UK: chlorpyrifos use on top fruit. **Pesticides Management Science**, v.59, p.512–526, 2003.

CHUNG, M. et al.. Comparative toxicity of hydrophobic contaminants to microalgae and higher plants. **Ecotoxicology**, v.16, p.393-402, 2007.

DEMERLIS, C.; SCHONEKER, D. Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). **Food and Chemical Toxicology**, v.41, p.319-326, 2003.

FALUGI, C. et al. Dose dependent effects of silver nanoparticles on reproduction and development of different biological models. **EQA-International Journal of Environmental Quality**, v.8, p.61-65, 2013.

GHERARDI-GOLDSTEIN, E. et al. **Procedimentos para a utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos**. São Paulo: CETESB, 1990. 17p. (Série Manuais/Secretaria do Meio Ambiente).

GONZÁLEZ-CAMPOS, J.B. et al. Molecular dynamics analysis of PVA-AgNP composites by dielectric spectroscopy. **Journal of Nanomaterials**, v.2010, p. 12, 2012.

JO, H.J. et al. Acute toxicity of Ag and CuO nanoparticle suspensions against *Daphnia magna*: The importance of their dissolved fraction varying with preparation methods. **Journal of hazardous materials**, v.227, p.301-308, 2012.

KOWALSKA-GÓRALSKA, M.; LAW, P.; SENZE, M. Impact of silver contained in the nano silver preparation on the survival of brine shrimp (*Artemia salina* leach 1819) larvae. 18. **Ecological Chemistry and Engineering A**, p. 371-375, 2011.

KRKLJEŠ, A.N. et al. Radiolytic synthesis and characterization of Ag-PVA nanocomposites. **European Polymer Journal**, v.43, p. 2171-2176, 2007.



KUMAR, P. et al. Antibacterial activity and in-vitro cytotoxicity assay against brine shrimp using silver nanoparticles synthesized from sargassum ilicifolium. **Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures (DJNB)**, v.7, n.4, p. 1447 - 1455, 2012.

KWOK, K.W. et al. Uptake of silver nanoparticles and toxicity to early life stages of Japanese medaka (*Oryzias latipes*): **Effect of coating materials. Aquatic Toxicology**, v.120, p. 59-66, 2012.

LEE, D.; COHEN, R.E.; RUBNER, M.F. Antibacterial properties of Ag nanoparticle loaded multilayers and formation of magnetically directed antibacterial microparticles. **Langmuir**, v.21, p.9651-9659, 2005.

LI, T. et al. Comparative toxicity study of Ag, Au, and Ag–Au bimetallic nanoparticles on *Daphnia magna*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.398, p. 689-700, 2010.

LIN, J.J. et al.. The cellular responses and antibacterial activities of silver nanoparticles stabilized by different polymers. **Nanotechnology**, v.23, n.6, 065102, 2012.

LOESCHNER, K. et al. Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate. Part **Fibre Toxicol**, v.8, n.1, p.18, 2011.

MANUGISTICS SP. In: Group RM, editor. Rockville: Manugistics Group, 2001.

MARTINS, J.; OLIVA TELES, L.; VASCONCELOS, V. Assays with *Daphnia magna* *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. **Environment International**, v.33, p.414-425, 2007.

MOCK, J. et al. Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles. **The Journal of Chemical Physics**, v.116, p. 6755-6759, 2002.

OECD. Organization for Economic Co-operation and Development. **Guidelines for the testing of chemicals: 201 – Alga, growth inhibition test**. Paris (1984).

OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals. **Daphnia sp., acute Immobilization Test 202**, Paris, France, 2004.

RIBEIRO, F. et al. Silver nanoparticles and silver nitrate induce high toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*. **Science of The Total Environment**, v.466-467, n.1, p.466–467: 232-241, 2014.

ONU United Nation. **Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)**. New York and Geneva, 2009.

PRESTES, E. B.; JONSSON, C. M.; CASTRO, V. L. S. Avaliação da toxicidade aguda de piraclostrobin, epoxiconazol e sua mistura em *Daphnia similis*. **Pesticidas (UFPR)**, v.22, p.43-50, 2012.

ROMANHOLO FERREIRA, L.F. et al. Evaluation of sugar-canevinasse treated with *Pleurotussajor-caju* utilizing aquatic organisms as toxicological indicators, **Ecotoxicology Environment Safety**, v.74, p.132–137, 2011.

VANNINI, C. et al. Morphological and proteomic responses of *Eruca sativa* exposed to silver nanoparticles or silver nitrate, **PLoS One** **8**, v.8, n.7, e68752, 2013.

VARKEY, A.J.; FORT, A.F. Some optical properties of silver peroxide (AgO) and silver oxide (Ag<sub>2</sub>O) films produced by chemical-bath deposition. **Solar Energy Materials and Solar Cells**, v.29, p.253-259, 1993.

WHELAN, A.M. et al. Enhanced third-order optical nonlinearity of silver nanoparticles with a tunable surface plasmon resonance. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v.4, p. 66-8, 2004.

WHO. Silver in drinking-water, Background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality. 2, 2003.

USEPA. **Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms.** Fourth edition. EPA/600-/4-90/027. United States Environmental Protection Agency: Washington (1991) 293.

ZAHIR A.A. et al. Efficacy of plant-mediated synthesized silver nanoparticles against *Sitophilus oryzae*. **Journal of Biopesticides**, v.5, p. 95, 2012.

ZAGATTO, P. A. et al. Avaliação de risco e do potencial de periculosidade ambiental de agentes químicos para o ambiente aquático. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Ed.). **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações.** São Carlos: Editora Rima, 2006. 478 p.

ZHAO, C.M, WANG, W.X. Biokinetic uptake and efflux of silver nanoparticles in *Daphnia magna*. **Environmental science & technology**, 44: 7699-7704, 2010.

ZHAO, C.M.; WANG, W.X. Comparison of acute and chronic toxicity of silver nanoparticles and silver nitrate to *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.30, p.885-892, 2011.

YANG, X. et al. Susceptibility and detoxifying enzyme activity in two spider mite species (Acari: Tetranychidae) after selection with three insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v.95, p.399-406, 2002.

**CAPÍTULO 7. AVALIAÇÃO DA  
REPRODUÇÃO E DESENVOLVIMENTO  
ANIMAL**

Neste capítulo será discutido o efeito da exposição de AgNP na reprodução e no desenvolvimento animal de rata. A exposição de AgNPs se deu em três diferentes concentrações de (1, 3 e 5µg/ml por kg/dia), cujas nanopartículas foram sintetizadas e caracterizadas conforme descrição no capítulo VI Ecotoxicidade. Os testes nos animais foram realizados em colaboração com a Embrapa Meio Ambiente (cidade de Jaguariuna). As análises histopatológicas foram realizadas na Embrapa Suínos e Aves enquanto a determinação de prata foi realizada em colaboração com a Embrapa Gado de Leite. Todas as análises estatísticas empregadas nos resultados foram realizadas pela estatística Luzia Pedroso de Oliveira (USP-Piracicaba).

## **7. 1. MATERIAL E MÉTODOS**

Os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Embrapa Meio Ambiente (protocolo 006/2012).

### **7.1.1 Animais**

Foram utilizadas 10 ratas fêmeas nulíparas por grupo de estudo, da linhagem Wistar com idade de  $120 \pm 29$  dias com pesos de  $245 \pm 31$ g, do biotério da Embrapa Meio Ambiente, São Paulo, Brasil. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ( $22 \pm 2$  °C) a 70 % de umidade e ciclo de luz claro/escuro de 12 horas. As matrizes foram obtidas do Biotério Central (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório - CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, o qual é representante do ICLAS (International Council for Laboratory Animal Science - Conselho Internacional para Laboratório de Ciência Animal) na América Latina. Os dados do estado de saúde gerais para a colônia foram controlados por procedimentos operacionais padrão (ISO 9001:2000) no biotério do Laboratório de Ecotoxicologia e Biossegurança da Embrapa Meio Ambiente.

### **7.1.2. Delineamento experimental**

Esfregaços vaginais foram obtidos e analisados por 12 dias consecutivos antes do acasalamento e exposição às nanopartículas. Os esfregaços foram preparados para avaliar a frequência e a duração do ciclo estral. Fêmeas com anomalias no ciclo estral

foram excluídas do experimento. Machos previamente determinados como férteis foram colocados em contato durante a noite com as fêmeas. Após o acasalamento as fêmeas foram alojadas individualmente em gaiolas de policarbonato contendo maravalha<sup>6</sup> e tiveram acesso livre ao alimento (Nuvital Lab Chow) e a água. Foi considerado o dia 0 da gestação aquele no qual foi encontrado espermatozoides no esfregaço vaginal.

As fêmeas prenhes (n=10) foram divididas aleatoriamente em grupos para ingestão oral de AgNP por via oral nas concentrações de 1, 3 e 5 µg/mL por kg/dia durante a prenhez, valores que se encontram dentro do limite de migração específico 0,05mg/kg/dia permitido pela União Européia (EU). Os animais do grupo controle receberam solução salina. A partir do 21º dia da prenhez a fêmea foi examinada duas vezes ao dia (9:00 e às 17:00h) a fim de identificar o dia do nascimento dos filhotes. O dia do parto foi definido como dia pós-natal (PND) 1. Para as ninhadas nascidas após as 17:00h, o dia seguinte foi considerado PND 1. Após o acasalamento e durante a gestação, todas as ratas prenhes foram pesadas e examinadas quanto a sinais de toxicidade diariamente. Algumas das ratas que foram acompanhadas, ainda que ganhando peso, mas identificadas como não prenhas, foram substituídas por outras, até completar 10 ratas por dose.

#### **7.1.2.1 Características observadas nas ratas**

##### **7.1.2.1.1 Influência da dose no peso das ratas**

O ganho de peso durante a gestação corresponde à diferença entre os pesos no 20º e no 1º dia de gestação. Considerou-se o 20º dia de gestação uma vez que o tempo mínimo padrão de gestação foi de 21 dias e assim garantiu-se que todas as ratas tivessem o seu peso medido ao 20º dia. Foi realizada uma análise de variância considerando a variável transformada (logaritmo na base 10).

##### **7.1.2.1.2 Avaliação da influência das concentrações de AgNP durante o número de dias de gestação**

---

<sup>6</sup>Maravalha são raspagens ou aparas de madeiras utilizadas principalmente em centros de criações, para fins de evitar o contato direto com o solo e fornecer uma maior higienização do local. Serve também como substrato para absorção da água, incorporação das fezes e contribui para a redução das oscilações de temperatura no local de abrigo.

Para a variável, número de dias de gestação, as ratas foram acompanhadas até o dia do nascimento dos filhotes e o número de dias de gestação foi relacionado com a dose utilizada no grupo.

#### **7.1.2.1.3 Histopatologia e determinação da concentração de Ag tecidos das fêmeas adultas**

Todas as fêmeas adultas do estudo foram submetidas à necropsia. A superfície externa do corpo, as cavidades torácica e abdominal e seus conteúdos foram examinados. No final do estudo, para cada um dos animais eutanasiados, amostras dos seguintes órgãos foram retirados e pesados individualmente: cérebro, fígado, intestino e útero.

Para análise histopatológica, uma metade do fígado e intestino foram fixados em  $\pm 2$  ml usando uma solução tampão neutra a 10%, embebidos em parafina e cortado em secções de 5  $\mu$ m de espessura. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina, analisados sob um microscópio de luz, e microfotografias foram obtidas.

Para a quantificação de prata, foram usadas metade do fígado e do intestino, bem como de todo o cérebro e útero. As amostras foram congeladas e enviadas para análise. Cada uma das amostras após descongelamento foi cortado em pedaços utilizando um bisturi, até cerca de 1 grama. A amostra foi então seca num forno a 105 °C durante 12 horas e, em seguida, colocado em um dissecador, durante 1 hora. Próximo passo foi colocar as amostras em um tubo digestor submetido a uma temperatura de 150 °C durante 1 hora: para 5 ml de digestão da amostra foi usado uma mistura de ácido cítrico e de ácido perclórico na proporção (1: 2). Em seguida, a amostra foi deixada a 220 °C durante 2 horas. O volume foi, em seguida, preenchido até 75 ml com água dea ionizada. Foi preparada uma curva de calibração e medição foi realizada no comprimento de onda de 328,06nm por Espectrometria de Emissão Óptica por plasma indutivamente acoplado ICP-OES (Perkin Elmer Optima 7000DV).

#### **7.1.3 Características observadas nas ninhadas**

Os filhotes foram contados, examinados com relação a malformações graves e pesados individualmente. Do primeiro até o 23º dia, os filhotes tiveram seus pesos corporais registrados diariamente durante a lactação. A ninhada foi considerada a

unidade experimental. Cada ninhada foi examinada diariamente para verificação de qualquer alteração na aparência ou no comportamento. A sobrevivência também foi observada e as mortes foram registradas.

#### **7.1.3.1 Características físicas dos filhotes**

Cada filhote foi acompanhado diariamente para a observação do desenvolvimento das seguintes características físicas: aparecimento de penugens; descolamento das orelhas; aparecimento de pelos, aparecimento de dentes incisivos; abertura dos ouvidos; abertura dos olhos, descida dos testículos; abertura da vagina.

#### **7.1.4. Análises Estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas no pacote SAS/STAT, versão 9.3 para windows. Quando apropriado, utilizou-se a análise de variância usual (ANOVA) para comparar os valores médios das características estudadas nas diferentes doses. A ANOVA foi realizada usando o procedimento Generalized Linear Models (GLM). As suposições dos modelos de ANOVA foram checadas e em alguns casos, foi necessário transformar a variável resposta para que as suposições do modelo fossem satisfeitas. A transformação apropriada foi encontrada pelo método de Box-Cox (BOX; COX, 1964), sendo obtidas pelo procedimento TRANSREG (DRAPER; SMITH, 1998). Nos casos em que a hipótese de igualdade das médias nas diferentes doses foi rejeitada foram feitas as comparações duas a duas, usando o teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer (MONTGOMERY, 2008; ANDERSEN; SKOVGAARD; GRAVERSEN, 2010).

No caso das variáveis discretas, o efeito da dose foi avaliado usando modelo linear generalizado, o que possibilitou representar de forma mais apropriada a distribuição dos dados de contagem e de proporções. Dessa forma, ajustou-se dois modelos encaixados, um contendo e o outro não contendo o efeito da dose e usando o teste da razão de verossimilhanças verificou-se a igualdade entre os dois modelos, considerando a distribuição  $\chi^2$  com 3 graus de liberdade (níveis de dose -1). O efeito da dose foi considerado significativo quando houve diferença entre os modelos (LINDSEY, 1997; ANDERSEN; SKOVGAARD; RAVERSEN, 2010). Os testes foram realizados usando o procedimento GENMOD do SAS (DEMÉTRIO, 2001). As



variáveis relacionadas às ninhadas: número de filhotes nascidos vivos, natimortos e mortos durante a lactação foram analisados usando modelo linear generalizado, assumindo, respectivamente, distribuição de Poisson com função de ligação log e distribuição binomial com função de ligação Logit.

No caso das variáveis “dias até o aparecimento de uma determinada característica” os efeitos das doses foram avaliados utilizando o teste log-rank que é uma técnica não paramétrica usual para comparar duas ou mais distribuições dos tempos de ocorrência de um evento (VITTINGHOFF; SHIBOSKI; MCCULLOCH, 2005; KLEINBAUM; KLEIN, 2012). A ANOVA usual não foi apropriada nesses casos, uma vez que essas variáveis são do tipo discreto, apresentando resíduos que não seguem a distribuição normal e algumas delas apresentando ainda variâncias diferentes com relação às doses. Uma vez que essas variáveis são relacionadas com o tempo até a falha, o uso de técnicas de análise de sobrevivência foi o mais adequado. As distribuições acumuladas dos tempos até as ocorrências foram estimadas a partir das somas das probabilidades observadas em cada tempo, uma vez que não houve censura. Nos casos em que a hipótese de igualdade das distribuições nas diferentes doses foi rejeitada, foram feitas as comparações duas a duas, também usando log-rank, mas incluindo a correção de Sidak para obter o nível de significância conjunto de 5% para as comparações múltiplas. Os testes foram realizados usando o procedimento LIFETEST.

## 7. 2. RESULTADOS

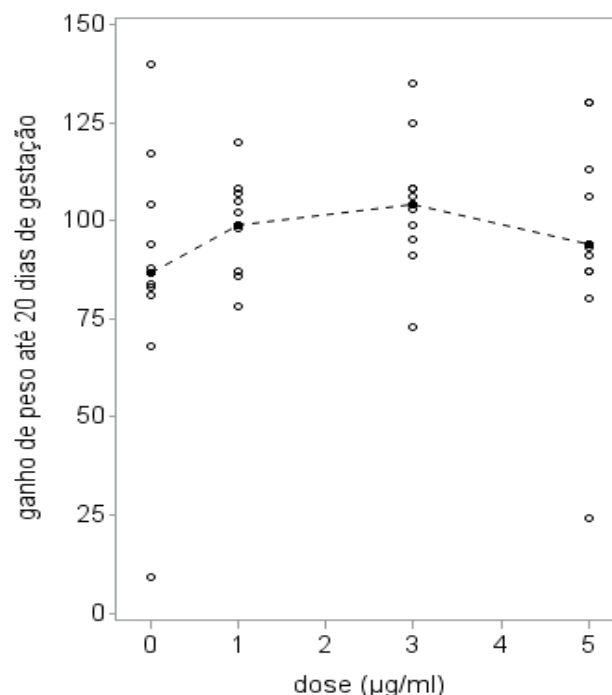
Segundo Lansdown, 2010 baixas concentrações de prata podem ser encontradas no corpo humano, devido à contaminação de alimentos e água. A prata é considerada inerte em contato com tecidos humanos, porém na presença de fluidos e secreções corporais pode liberar  $Ag^+$  e se ligar a grupos pelos quais apresenta grande afinidade como grupos sulfidrilos, amina e carboxilatos normalmente presentes nos alimentos (BURRELL, 2003). Por exemplo, em um estudo realizado por (MWILU et al, 2013), ao simularem o fluido estomacal observaram que a elevada acidez do estômago resulta em transformações significativas em AgNPs como a liberação de íons e agregação.

### 7.2.1 Influência da dose no número de dias de gestação e no peso corporal das ratas

Não houve evidências para rejeitar a hipótese de igualdade entre as distribuições acumuladas dos tempos de gestação nas diferentes doses ( $p=0,1397$ ), ou seja, não houve efeito de dose nos tempos de gestação. Para a análise da influência das doses nos pesos da rata também não foi observado diferenças significativas entre os ganhos de pesos médios nas diferentes doses da AgNP ( $p=0,6102$ ) (Figura 29).

Segundo (BEYER et al, 2011) o peso corporal materno deve ser considerado como um dos parâmetros mais importantes na avaliação da toxicidade no desenvolvimento materno, pois para um animal em desenvolvimento, se a perda de peso for o único efeito adverso, o agente utilizado como teste pode ser considerado tóxico. A toxicidade neste animal pode ser apresentada através da redução de ingestão dos alimentos, reduzindo, portanto, o ganho de peso materno.

**Figura 29** Influência das doses no ganho de peso das ratas durante a gestação. Os pontos representam os valores de ganho de peso até 20 dias de gestação de cada modelo animal estudado. E a linha central a média desses pesos.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Resultados semelhantes foram obtidos pelos seguintes autores em doses diferentes da empregada neste estudo. (KIM et al, 2008) relatou que não ocorreu morte e nenhuma mudança no peso corporal em ratos que receberam doses orais de AgNP

1000 mg/kg durante 28 dias. O mesmo foi observado por (PHILBROOK et al, 2011) que estudaram AgNPs administradas oralmente em camundongos grávidas no nono dia de gestação em uma única dose de 10, 100 ou 1000 mg/kg. O tratamento com qualquer uma das três doses não conferiu toxicidade materna, incluindo mudanças de comportamento ou a perda de peso durante os 10 dias após a exposição.

Porém (ZHANG et al, 2013) observaram em seu estudo que o peso corporal foi bastante sensível ao tratamento intravenoso de AgNPs. Em todos os grupos de tratamento (5 e 10 mg/kg, e 45 mg/kg/dia) foi observado perda de peso após a primeira injeção. Relataram também que um único tratamento com 10 mg/kg ou 3 dias consecutivos com 45 mg/kg de AgNPs foi suficiente para diminuir o peso corporal acentuadamente no dia 3. Resultados semelhantes foram obtidos por (SHAHARE; YASHPAL, 2013), os quais utilizaram nanopartículas de 3-20nm e doses de 5, 10, 15 e 20mg/kg durante 21 dias em ratos machos e observaram perda de peso em todos os grupos de tratamento, sendo a maior perda para a dose de 10 mg/kg.

### **7.2.2 Necropsia**

Todos os animais sobreviveram até a data da necropsia agendada após o período de ingestão. Observações diárias quanto ao aparecimento de sinais durante a exposição não mostraram nenhuma toxicidade externa evidente relacionada ao tratamento em animais de ambos os sexos em todos os grupos avaliados.

### **7.2.3. Peso dos órgãos**

Na literatura é relatado que AgNPs quando absorvidas na circulação sanguínea podem se acumular em diversos tecidos que incluem o fígado, intestino, baço e outros órgãos (KIM et al, 2008; TANG et al, 2009; PARK; BAE, et al, 2010).

A relação entre o peso dos órgãos das ratas fêmeas tratadas com AgNP são mostrados na Tabela 8. Não houve diferenças significativas a 5% entre os pesos médios dos fígados ( $p=0,0679$ ), cérebros ( $p=0,3973$ ) e úteros ( $p=0,6146$ ) nas diferentes doses de AgNPs. Com relação ao intestino, a hipótese de igualdade de médias foi rejeitada a 5% ( $p=0,0419$ ), entretanto, ao comparar as médias duas a duas por meio do teste de Tukey-Kramer não se detectou diferenças significativas entre os pares. Essa controvérsia pode ocorrer em algumas situações, uma vez que o teste de comparações

## CAPÍTULO 7 – AVALIAÇÃO DA REPRODUÇÃO E DESENVOLVIMENTO ANIMAL

múltiplas corrigido para um nível de significância conjunto tende a ser mais conservativo. Mesmo resultado foi obtido por (EBABE ELLE et al, 2013) que também não observou diferenças significativas nos pesos médios dos órgãos analisados (fígado, rim, baço e coração) para uma ingestão de AgNP de 20nm durante 81 dias.

Os pesos dos órgãos relativos aos pesos das ratas no início da gestação e no final da lactação, também foram comparados usando ANOVA usual. Em ambos os casos os pesos relativos dos fígados e dos úteros foram transformados usando logaritmo na base 10 e dessa forma as suposições dos modelos de ANOVA foram satisfeitas.

Com relação aos pesos dos órgãos relativos aos pesos das ratas no início da gestação, não houve diferenças significativas a 5% entre os pesos médios relativos dos fígados ( $p=0,1148$ ), dos cérebros ( $p=0,9129$ ) e dos úteros ( $p=0,4554$ ) nas diferentes doses da AgNP (Tabela 8). Assim como no caso do peso do intestino, a hipótese de igualdade de médias dos pesos relativos dos intestinos foi rejeitada a 5% ( $p=0,0483$ ), e ao comparar as médias duas a duas por meio do teste de Tukey-Kramer não se detectou diferenças significativas entre os pares. Resultados esses que diferem do encontrado por (HONG et al, 2014) que estudaram o efeito tóxico das nanopartículas de prata no desenvolvimento e reprodução em ratos machos e fêmeas em dosagens de 62,5, 125 e 250 mg/kg e verificaram que ocorreu um aumento estatisticamente significativo nos pesos absoluto e relativo do fígado nos machos, enquanto nas fêmeas um aumento nos pesos absoluto de rins e glândula adrenal foi observado.

Com relação aos pesos dos órgãos relativos aos pesos das ratas no final da lactação, também não houve diferenças significativas a 5% entre os pesos médios relativos dos fígados ( $p=0,0683$ ), dos cérebros ( $p=0,6788$ ) e dos úteros ( $p=0,6363$ ) nas diferentes doses da AgNP (Tabela 8). Nesse caso, a hipótese de igualdade de médias dos pesos relativos dos intestinos também foi rejeitada a 5% ( $p=0,0410$ ) e ao comparar as médias duas a duas por meio do teste de Tukey-Kramer não se detectou diferenças significativas entre os pares.

**CAPÍTULO 7 – AVALIAÇÃO DA REPRODUÇÃO E DESENVOLVIMENTO ANIMAL**

**Tabela 8 Pesos dos órgãos (g) e pesos dos órgãos relativos aos pesos no início da gestação e no final da lactação em (%).**

Informações ratas	doses (µg/ml)				p
	0	1	3	5	
<b>Média ± desvio padrão</b>					
peso órgão (g)					
fígado	11,77 ± 3,15	13,51 ± 2,10	16,43 ± 5,10	13,34 ± 3,38	0,0679
intestino	17,86 ± 5,59	25,13 ± 5,98	25,46 ± 7,86	21,49 ± 6,29	0,0419
cérebro	1,54 ± 0,18	1,52 ± 0,44	1,67 ± 0,30	1,81 ± 0,60	0,3973
útero	0,82 ± 0,39	1,04 ± 0,39	0,88 ± 0,66	0,93 ± 0,55	0,6146
<u>peso órgão</u>					
<u>peso início gestação</u>					
×100					
fígado	5,29 ± 1,59	5,74 ± 0,84	6,57 ± 2,02	4,99 ± 1,20	0,1148
intestino	8,05 ± 2,77	10,73 ± 2,69	10,12 ± 2,79	8,02 ± 2,14	0,0483
cérebro	0,70 ± 0,16	0,64 ± 0,18	0,67 ± 0,12	0,68 ± 0,21	0,9129
útero	0,36 ± 0,17	0,45 ± 0,19	0,35 ± 0,24	0,34 ± 0,19	0,4554
<u>peso órgão</u>					
<u>peso final lactação</u>					
×100					
fígado	4,36 ± 1,16	4,74 ± 0,62	5,81 ± 1,93	4,44 ± 0,88	0,0683
intestino	6,63 ± 2,10	8,83 ± 1,98	8,95 ± 2,69	7,12 ± 1,65	0,0410
cérebro	0,58 ± 0,12	0,53 ± 0,15	0,59 ± 0,08	0,61 ± 0,18	0,6788
útero	0,30 ± 0,14	0,37 ± 0,15	0,30 ± 0,20	0,31 ± 0,17	0,6363

Fonte: Elaborada pelo autor.

#### **7.2.4. Análises histopatológicas e de determinação de prata por ICP-OES**

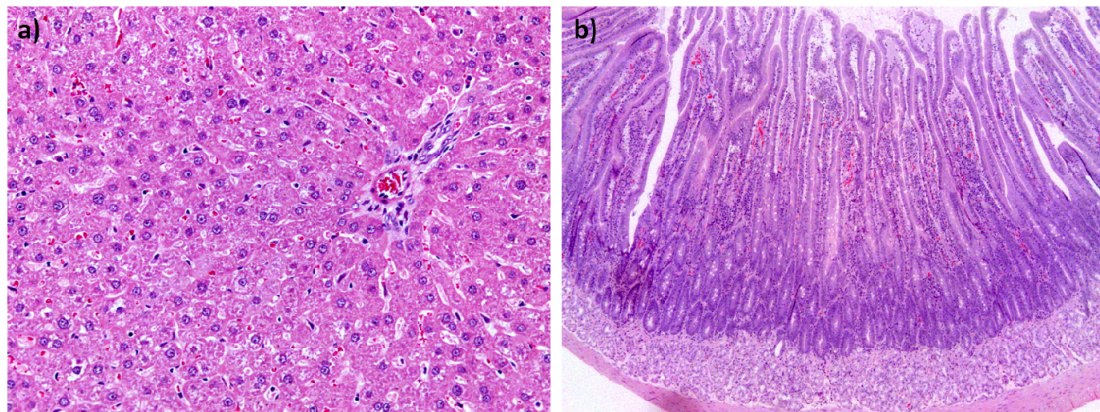
É descrito na literatura que nanopartículas são capazes de serem transportadas por todo o corpo e de se depositarem em órgãos específicos. Então elas penetram através das membranas celulares e se alojam nas mitocôndrias, desencadeando respostas prejudiciais ao organismo (GURR et al, 2005; NEL et al, 2006). Segundo (PARK; YI, et al, 2010) relatam apoptose em células do fígado na concentração de 1µg/ml.

Nossos resultados evidenciam que as alterações microscópicas observadas nas amostras de fígado e intestino não sugeriram efeitos de hepato ou enterotoxicidade, respectivamente (Figura 30). O único tipo de lesão observada, e mesmo assim considerada mínima, foram múltiplos infiltrados de linfócitos nos espaços periportais do fígado. Resultado semelhante foi encontrado por (CHA et al, 2008) que encontraram

## CAPÍTULO 7 – AVALIAÇÃO DA REPRODUÇÃO E DESENVOLVIMENTO ANIMAL

evidências de inflamação no fígado com influxo de linfócitos após 3 dias da ingestão de 2,5mg de nanopartículas de prata (15nm). Os autores ainda relatam que este fato pode ser ocasionado devido ao acúmulo de partículas no órgão ou a um mecanismo indireto mediado pela ação de mediadores humorais ou neurais. (ESPINOSA-CRISTOBAL et al, 2013) também não observaram alterações histopatológicas tanto no controle quanto nos tecidos das ratas que receberam por ingestão oral doses de 535µg/mL de nanopartículas de prata durante 55 dias, com diâmetros de 14 e 36nm. Foi observado apenas um infiltração de células no intestino delgado para AgNP de 36nm.

**Figura 30. Fotomicrografias da análise histopatológica das células normais do a) fígado e b) duodeno.**



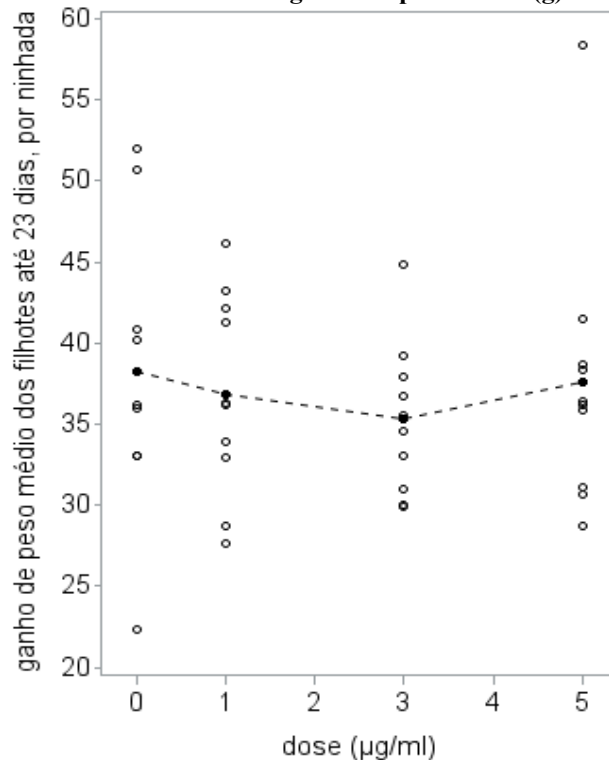
Fonte: Elaborada pelo autor.

Tanto no fígado quanto no intestino não foram observadas alterações degenerativas ou de morte celular (necrose ou apoptose) que pudessem corroborar o efeito tóxico. Em nenhum dos órgãos analisados pela técnica de ICP-OES foi encontrada a presença de prata. (ESPINOSA-CRISTOBAL et al, 2013) observaram através da técnica de Espectrometria de massa com fonte de plasma induzido (ICP-MS) a presença de AgNP, onde as mais altas concentrações foram obtidas no intestino seguido do rim, fígado e cérebro. (KIM et al, 2010) já havia relatado distribuição de nanopartículas de prata em altas concentrações em rins, seguidos do fígado, pulmão e cérebro, para ingestão oral 125 mg/kg durante 28 dias. (LOESCHNER et al, 2011) observaram alta concentração de Ag no intestino, estômago, rim e fígado a partir da ingestão oral de 450µg/mL durante 28 dias, dose essa quase 100 vezes maior do que a maior dose oferecida neste estudo (5µg/mL).

### 7.2.5 Influência das doses no peso médio dos filhotes

Não houve diferenças significativas entre os ganhos de pesos médios dos filhotes nas diferentes doses do nanocomposto ( $p=0,8833$ ) (Figura 31). Em um estudo realizado por Park et al, 2010 verificaram que a ingestão oral de nanopartículas de platinum nas doses de 0.25 mg/kg, 0.5 mg/kg, and 1 mg/kg em fêmeas de ratas durante a gestação e lactação promoveram diminuição no ganho de peso de filhotes após 4 dias depois do parto.

Figura 31 Influência da dose no ganho de peso médio (g) dos filhotes.



Fonte: Elaborada pelo autor.

### 7.2.6 Número de filhotes nascidos, natimortos e mortos durante a lactação

Estudos anteriores demonstram que nanomateriais como nanotubos de carbono,  $\text{SiO}_2$  e  $\text{TiO}_2$ , podem ultrapassar a barreira placentária e se acumular no feto, causando toxicidade no desenvolvimento a partir do estresse oxidativo ocasionado pela liberação de íons metálicos (WANG et al, 2013). O mesmo foi observado com AgNP quando administrada em animais prenhes por (KULVIETIS et al, 2011) que relataram que estas partículas podem ser transferidas para os fetos.

## CAPÍTULO 7 – AVALIAÇÃO DA REPRODUÇÃO E DESENVOLVIMENTO ANIMAL

Resultado confirmado por (LEE et al, 2012) trataram ratos com 250 mg/kg de AgNPs por 14 dias antes do acasalamento e as fêmeas foram tratadas durante a gestação e 4 dias depois do parto. Os filhotes foram sacrificados 4 dias depois do nascimento e os órgãos (fígado, intestino, pulmão e cérebro) foram retirados. Em todos os órgãos foram encontrados níveis de prata sendo o intestino o órgão que apresentou o mais alto valor de acúmulo de prata. Estes resultados sugerem que AgNP pode ultrapassar a barreira placentária em ratas prenhes ou em menor quantidade através da amamentação.

(WANG et al, 2013) tratou ratos com AgNP e íons de Ag por via intraperitoneal três vezes por semana durante 30 dias. Após a última dose ocorreu o acasalamento e com 14 dias de gestação os embriões foram retirados do útero. Não houve alterações histológicas evidentes nas placentas das ratas tratadas com AgNP, porém houve uma profunda redução na concentração de hemoglobina o que ocasionou anemia nos embriões.

Em um estudo realizado por (MELNIK et al, 2013) relataram que houve um acúmulo de nanopartículas de prata em fetos de 0,85-0,147% da dose administrada (aproximadamente de 2mg/kg) comparável à acumulação no fígado, sangue e carcaça do músculo de animais adultos. Os dados confirmam a viabilidade de transferência de AgNP passar do trato gastrointestinal da mãe para os filhotes durante a gravidez e a lactação.

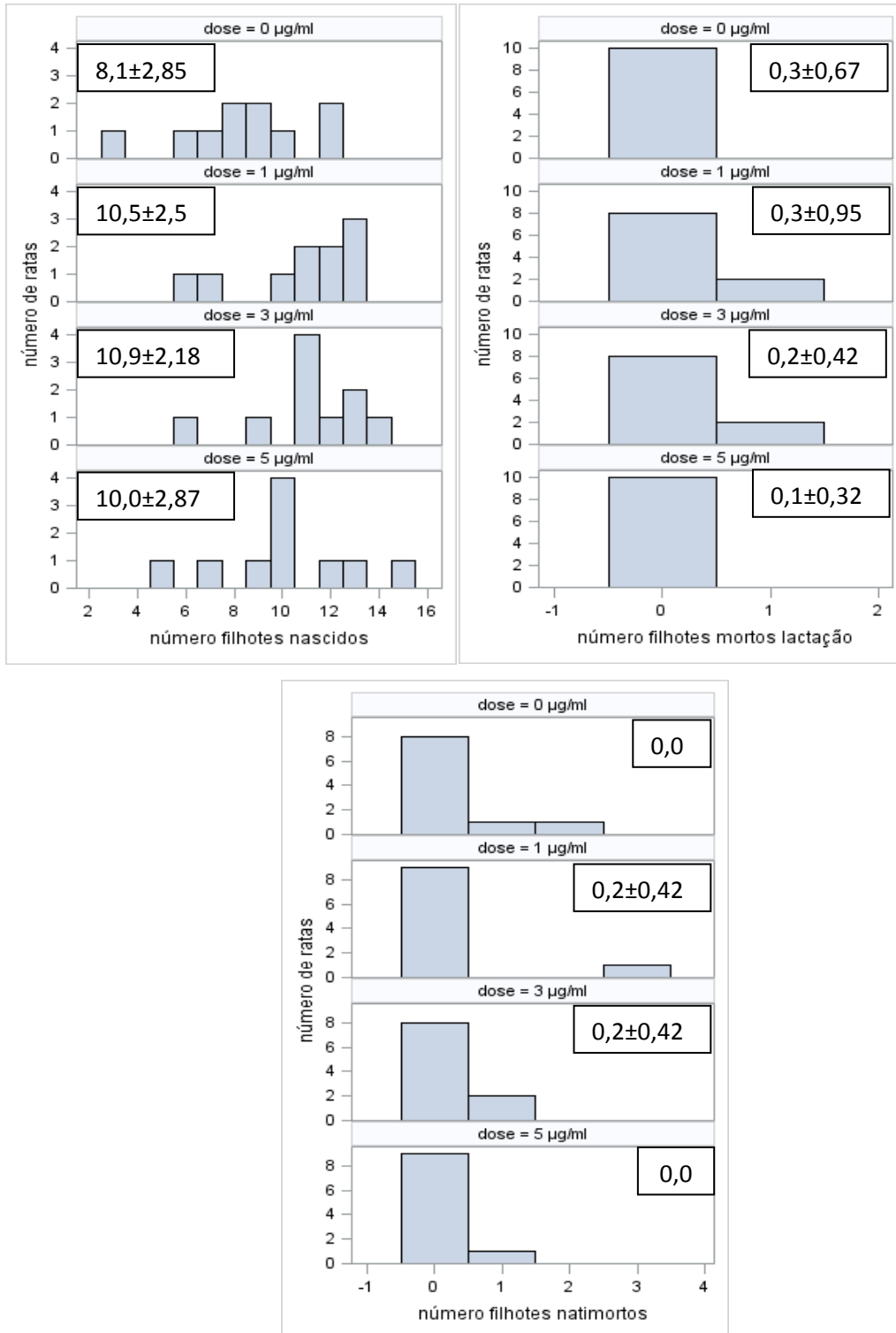
Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a administração oral de AgNP em ratas fêmeas durante o período de gestação nas concentrações de 1, 3 e 5µg/mL não provocou nenhum sinal de toxicidade que pudesse afetar a viabilidade do nascimento dos filhotes ou o processo durante o aleitamento (Figura 32). Resultados semelhantes foram observados por (HONG et al, 2014). Não houve evidências para rejeitar as hipóteses de igualdade de médias dos números de filhotes nascidos nas diferentes doses e de igualdade das proporções de filhotes nascidos vivos. A variável proporção de filhotes natimortos equivale a variável proporção de filhotes nascidos vivos. Com relação a variável proporção de filhotes desmamados (que equivale a proporção de filhotes mortos durante a lactação), devido ao fato de seu valor ser igual a zero para todas as ninhadas do grupo controle e do grupo que recebeu a dose 5, não foi possível ajustar um modelo para testar a hipótese de igualdade entre as proporções nas



## CAPÍTULO 7 – AVALIAÇÃO DA REPRODUÇÃO E DESENVOLVIMENTO ANIMAL

diferentes doses, entretanto, de acordo com a análise gráfica houve indicativos para não rejeitar essa igualdade.

**Figura 32** Freqüências observadas de características das ratas e ninhadas por dose.



Fonte: Elaborada pelo autor.

### 7.2.7. Desenvolvimento Físico dos filhotes

Quanto às características físicas avaliadas em dias para o aparecimento da característica em todos os filhotes da ninhada, os seguintes dados foram significativos: aparecimento de penugem; aparecimento de pelos, descida dos testículos e abertura da vagina. Observa-se na Tabela 9 que para a característica dias até o aparecimento de penugens houve evidências para rejeitar a hipótese de igualdade entre as distribuições ( $p=0,0377$ ), sendo detectadas diferenças entre as distribuições do grupo controle e do grupo que recebeu a dose 1 ( $p=0,0345$ ), sendo o valor médio igual a 3,9 e 3,2 respectivamente. Para a característica de aparecimento de pelos, houve evidências para rejeitar a hipótese de igualdade entre as distribuições ( $p=0,0043$ ), sendo detectadas diferenças entre as distribuições dos grupos que receberam as doses 1 e 3 ( $p=0,0021$ ), sendo o valor médio igual a 5,3 e 6,1 dias, respectivamente

Em relação à característica do descolamento das orelhas houve uma pequena evidência para rejeitar a hipótese de igualdade das distribuições ( $p=0,0559$ ), sendo que nos testes de comparações múltiplas foi detectada uma diferença significativa entre o grupo controle e o que recebeu a dose 5 ( $p=0,0424$ ), com valores médio igual a 4 dias e 3,3, respectivamente. Não foi observada diferença significativa entre as seguintes características dos filhotes: aparecimento de dentes incisivos ( $p=0,3916$ ), abertura dos ouvidos ( $p=0,6042$ ), abertura dos olhos ( $p=0,1375$ ).

**Tabela 9 Características físicas dos filhotes em relação a dose**

Características físicas filhotes (dias até)	Doses ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	0 (Média e desvio)	1 (Média e desvio)	3 (Média e desvio)	5 (Média e desvio)
aparecimento penugens	3,9 $\pm$ 0,74*	3,2 $\pm$ 0,42*	3,7 $\pm$ 0,48	3,7 $\pm$ 0,48
descolamento orelhas	4,0 $\pm$ 0,67*	3,5 $\pm$ 0,53	3,6 $\pm$ 0,52	3,3 $\pm$ 0,48*
aparecimento pelos	5,7 $\pm$ 0,48	5,3 $\pm$ 0,48*	6,1 $\pm$ 0,32*	5,8 $\pm$ 0,42
aparecimento dentes incisivos	8,0 $\pm$ 0,00	8,0 $\pm$ 0,00	8,1 $\pm$ 0,32	8,0 $\pm$ 0,00
abertura ouvidos	12,0 $\pm$ 1,05	12,3 $\pm$ 0,82	12,5 $\pm$ 0,85	12,1 $\pm$ 0,57
abertura olhos	15,2 $\pm$ 1,55	15,5 $\pm$ 0,71	15,8 $\pm$ 0,79	16,2 $\pm$ 0,92
descida testículos	22,7 $\pm$ 0,82*	23,5 $\pm$ 1,35	23,0 $\pm$ 0,00	24,5 $\pm$ 1,65*
abertura vagina	37,1 $\pm$ 1,10*	38,9 $\pm$ 1,45*	39,3 $\pm$ 0,82*	39,0 $\pm$ 1,25*

\*dados significativos

Fonte: Elaborada pelo autor.

## CAPÍTULO 7 – AVALIAÇÃO DA REPRODUÇÃO E DESENVOLVIMENTO ANIMAL

Para a característica descida dos testículos houve evidências para rejeitar a hipótese de igualdade entre as distribuições ( $p=0,0089$ ), sendo o controle diferente da dose 5 ( $p=0,0068$ ). Os filhotes machos do grupo que receberam a dose 5 tiveram em média um retardo de aproximadamente dois dias na descida dos testículos comparado com o grupo controle. Para a abertura da vagina houve evidências para rejeitar a hipótese de igualdade entre as distribuições ( $p<0,0001$ ), sendo o controle diferente das doses: 1 ( $p=0,0155$ ), 3 ( $p=0,0033$ ) e 5 ( $p=0,0113$ ). As filhotes fêmeas das ratas que receberam as doses apresentaram um atraso médio de aproximadamente 2 dias na abertura da vagina comparado com o grupo controle. Segundo (Rockett *et al*, 2006) a maturação sexual é um evento dependente do estrógeno e marcado com a abertura da vaginal. Portanto, o resultado indica um atraso no desenvolvimento sexual, ou seja, a presença de AgNP pode estar afetando o sistema endócrino, interferindo na produção ou ação dos hormônios, comprometendo a identidade sexual, fertilidade, ou o comportamento dos animais aqui estudados. Porém há necessidade de que estudos sejam mais aprofundados para descobrir os possíveis mecanismos deste efeito.

### 7.3. CONCLUSÃO

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as variáveis avaliadas nas progênies de ratos Wistar tratados com nanopartículas de prata nas concentrações de 1, 3 e 5 $\mu\text{g/mL}$ . Assim, podemos concluir que os tratamentos empregados não interferiram na reprodução (tempo de gestação, peso, número de filhotes nascidos, natimortos e mortos durante a lactação) das ratas nas condições testadas. Entretanto, foram observadas alterações em algumas características do desenvolvimento físico (dias até o aparecimento de penugens; aparecimento de pelos, descida dos testículos e abertura da vagina) que podem afetar o desenvolvimento dos filhotes.

## REFERÊNCIAS

ANDERSEN, P. K.; SKOVGAARD, L. T.; GRAVERSEN, T. **Regression with linear predictors**, p.494, Springer, 2010.

BEYER, B. K. et al ILSI/HESI maternal toxicity workshop summary: Maternal toxicity and its impact on study design and data interpretation. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 92, n. 1, p. 36-51, 2011.

BOX, G. E.; COX, D. R. An analysis of transformations. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)**, n.2, p. 211-252, 1964.

BURRELL, R. E. A scientific perspective on the use of topical silver preparations. **Ostomy Wound Management**, v. 49, n. 5; SUPP, p. 19-24, 2003.

CHA, K. et al Comparison of acute responses of mice livers to short-term exposure to nano-sized or micro-sized silver particles. **Biotechnology letters**, v. 30, n. 11, p. 1893-1899, 2008.

DEMÉTRIO, C. G. B. **Modelos lineares generalizados em experimentação agrônômica**. Piracicaba: USP/ESALQ, 2001.

DRAPER, N. R.; SMITH, H. **Applied Regression Analysis Wiley Series in Probability and Statistics**. Wiley, 1998.

EBABE ELLE, R. et al Dietary exposure to silver nanoparticles in Sprague–Dawley rats: Effects on oxidative stress and inflammation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 297-301, 2013.

ESPINOSA-CRISTOBAL, L. et al Toxicity, distribution, and accumulation of silver nanoparticles in Wistar rats. **Journal of nanoparticle research**, v. 15, n. 6, p. 1-12, 2013.

GURR, J.R. et al Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. **Toxicology**, v. 213, n. 1, p. 66-73, 2005.

HONG, J.S. et al Combined repeated-dose toxicity study of silver nanoparticles with the reproduction/developmental toxicity screening test. **Nanotoxicology**, v. 8, n. 4, p. 349-362, 2014.

KIM, Y. S. et al Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. **Inhalation toxicology**, v. 20, n. 6, p. 575-583, 2008.

\_\_\_\_\_. Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. **Particle and fibre toxicology**, v. 7, n. 1, p. 20, 2010.

KLEINBAUM, D. G.; KLEIN, M. Kaplan-Meier survival curves and the log-rank test. In: **Survival analysis**. 3 edição, New York: Springer, 2012. p.55-96

KULVIETIS, V. et al Transport of nanoparticles through the placental barrier. **The Tohoku journal of experimental medicine**, v. 225, n. 4, p. 225-234, 2011.

LANSDOWN, A. B. A pharmacological and toxicological profile of silver as an antimicrobial agent in medical devices. **Advances in pharmacological sciences**, v. 2010, p. 1- 16, 2010.

LEE, Y. et al A Transfer of Silver Nanoparticles from Pregnant Rat to Offspring. **Toxicological research**, v. 28, n. 3, p. 139, 2012.

LINDSEY, J. K. **Applying generalized linear models**. Verlag: Springer, 1997, 256p.

LOESCHNER, K. et al Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate. **Part Fibre Toxicol**, v. 8, n. 1, p. 18, 2011.

MELNIK, E. et al Transfer of Silver Nanoparticles through the Placenta and Breast Milk during in vivo Experiments on Rats. **Acta naturae**, v. 5, n. 3, p. 107, 2013.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. John Wiley & Sons, 2008.

MWILU, S. K. et al Changes in silver nanoparticles exposed to human synthetic stomach fluid: Effects of particle size and surface chemistry. **Science of the Total Environment**, v. 447, p. 90-98, 2013.

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

PARK, E.J. et al Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 30, n. 2, p. 162-168, 2010.

\_\_\_\_\_. Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 3, p. 872-878, 2010.

PARK, E. J. et al Effects of Platinum Nanoparticles on the Postnatal Development of Mouse Pups by Maternal Exposure. **Environmental Health And Toxicology**, v. 25, n. 4, p. 279-286, 2010.

PHILBROOK, N. A. et al The effect of TiO<sub>2</sub> and Ag nanoparticles on reproduction and development of *Drosophila melanogaster* and CD-1 mice. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 257, n. 3, p. 429-436, 2011.

ROCKETT, J. C. et al Effect of conazole fungicides on reproductive development in the female rat. **Reproductive Toxicology**, v. 22, n. 4, p. 647-658, 2006.

SHAHARE, B.; YASHPAL, M. Toxic effects of repeated oral exposure of silver nanoparticles on small intestine mucosa of mice. **Toxicology mechanisms and methods**, v. 23, n. 3, p. 161-167, 2013.

TANG, J. et al Distribution, translocation and accumulation of silver nanoparticles in rats. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 9, n. 8, p. 4924-4932, 2009.

VITTINGHOFF, E.; SHIBOSKI, S.; MCCULLOCH, C. E. **Regression methods in biostatistics**. New York: Springer, 2005.

WANG, Z. et al Silver nanoparticles induced RNA polymerase-silver binding and RNA transcription inhibition in erythroid progenitor cells. **ACS nano**, v. 7, n. 5, p. 4171-4186, 2013.

ZHANG, Y. et al Silver nanoparticles decrease body weight and locomotor activity in adult male rats. **Small**, v. 9, n. 9-10, p. 1715-1720, 2013.

## **CAPÍTULO 8. CITOXICIDADE E GENOTOXICIDADE EM CÉLULAS DE CEBOL**



Neste capítulo são descritos os ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade utilizando como organismo teste *Allium cepa*. Raízes de cebola foram colocadas em contato com AgNPs obtidas pela síntese descrita no **Capítulo V**. Duas concentrações diferentes foram utilizadas como parâmetro de estudo com o objetivo de determinar os potenciais efeitos toxicológicos destas partículas no DNA do organismo teste.

## 8. 1. METODOLOGIA

Sementes de *Allium cepa* L. ( $2n = 16$ ), foram selecionadas e germinadas em água ultrapura em temperatura ambiente (25°C). Depois de atingirem de 1,5 a 2 cm de comprimento, as raízes foram removidas da caixa de germinação e dez raízes foram selecionadas e colocadas em contato com uma solução coloidal de nanopartícula de prata com concentrações de 1,5 ppm (A) e 15 ppm (B) durante 24 horas. Água ultrapura foi utilizada como controle negativo e trifluralina (0,075g/L), como controle positivo. Depois de 24 horas de contato com as soluções, as raízes foram fixadas com reagente de Carnoy (álcool etílico e ácido acético, em uma proporção de 3:1, em volume) por 6 horas em temperatura ambiente. Decorrido o tempo de fixação, um novo fixador preparado no mesmo dia, foi adicionado e as radículas foram mantidas em geladeira. Após a fixação, as raízes foram removidas do reagente, lavadas com água e submetidas à hidrólise ácida com uma solução de 1 mol/L de HCl a 60 °C durante 9 minutos. Em seguida, as amostras foram lavadas em água destilada e colocadas em contato com o reagente de Schiff durante 2 horas em um frasco de vidro âmbar e em local sem luz. O corante em excesso foi removido com o uso de água destilada. A região meristemática (Figura 33) das raízes foi cortada com auxílio de uma lâmina de aço inoxidável, colocada sobre uma lâmina de vidro, e após adição de duas gotas de 2% de ácido carmim acético, a amostra foi coberta com uma lamínula, utilizada para pressionar e espalhar as células. Para as análises, 10 lâminas foram preparadas, sendo selecionadas 5 nas quais uma média de 1000 células foram contadas, totalizando 5000 células, examinadas ao microscópio óptico (Olympus, modelo BX 50 DP2BSW). Os resultados foram utilizados para calcular o Índice Mitótico<sup>7</sup> (IM, Equação 1), o Índice Mitótico

---

<sup>7</sup> Índice mitótico é o percentual de células que se encontram em uma das quatro fases da mitose.

Relativo<sup>8</sup> (IMR, Equação 2), Índice de Aberração Cromossômica (IAC, Equação 3) e o Índice de Aberração Cromossômica Relativo ( IACR, equação 4) (Parida, Bindhani e Nayak, 2011).

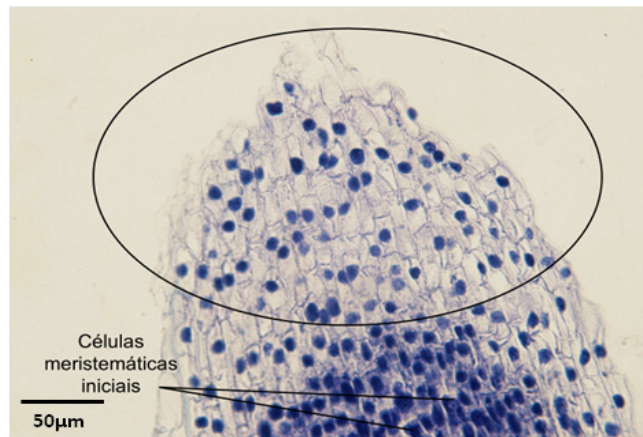
$$IM = \left( \frac{\text{Número total de células em divisão}}{\text{Total de células observadas}} \right) \times 100 \text{ (Equação 1)}$$

$$IMR = \left( \frac{IM}{IM \text{ controle negativo}} \right) \text{ (Equação 2).}$$

$$IAC = \left( \frac{\text{Número total de células alteradas}}{\text{Total de células observadas}} \right) \times 100 \text{ (Equação 3).}$$

$$IACR = \frac{IAC}{IAC \text{ controle negativo}} \text{ (Equação 4).}$$

**Figura 33** Corte longitudinal do ápice da raiz de cebola em que a setas apresentam as células meristemáticas<sup>9</sup>.



Fonte: [http://www.icb.furg.br/botanica/index\\_arquivos/Page977.htm](http://www.icb.furg.br/botanica/index_arquivos/Page977.htm)

### 8.1.2. Análise Estatística dos dados

Os resultados do ensaio de citotoxicidade e genotoxicidade foram analisados utilizando o programa BioEstat 3.0 e o teste não paramétrico Mann-Withney. A análise de significância estatística foi definida como  $p < 0.05$  (AMBRÓSIO, 2012).

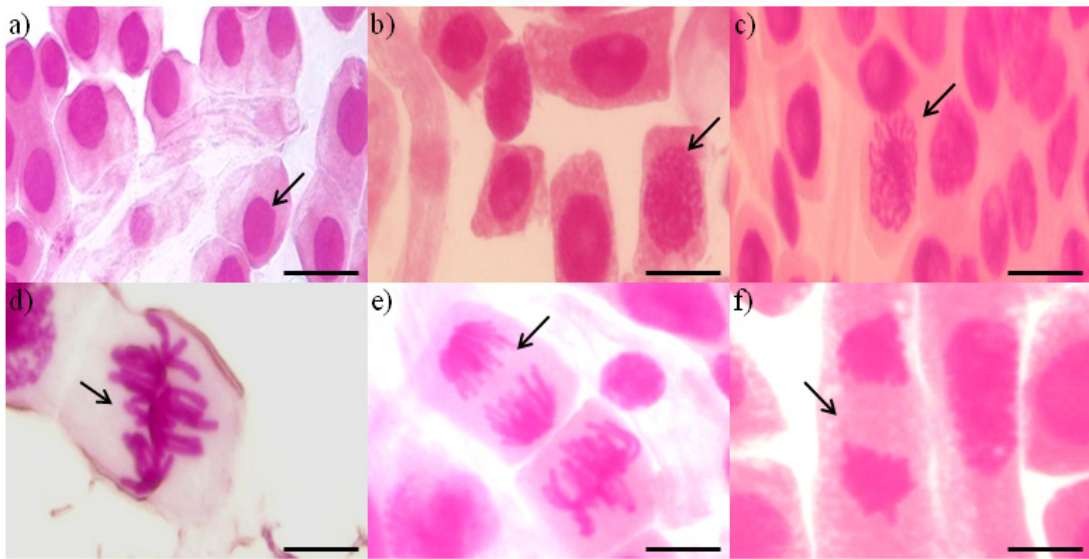
<sup>8</sup> Índice mitótico relativo indica as alterações observadas no crescimento da raiz, induzidas pela substância (ou material) teste, em relação ao controle negativo.

<sup>9</sup> [http://www.icb.furg.br/botanica/index\\_arquivos/Page977.htm](http://www.icb.furg.br/botanica/index_arquivos/Page977.htm)

## 8. 2. RESULTADOS

Após os tratamentos, foram realizadas contagens do número de células nas diferentes fases do ciclo de divisão celular: prófase, metáfase, anáfase e telófase (Figura 34), assim como o número de células portadoras de aberrações cromossômicas (Figura 37). Os resultados dos testes foram utilizados para calcular o IM (Equação 1), o IMR (Equação 2 ) (Tabela 10), o IAC (Equação 3) e o IACR (Equação 4) (Tabela 11).

**Figura 34** Células meristemáticas de *Allium cepa*. A) Interfase (seta); B-C) prófase (seta); D) metáfase (seta); E) anáfase (seta); F) telófase (seta). Aumento: 400 vezes. A barra corresponde a 100µm.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A tabela 10 e a Figura 35 trazem os resultados das análises de IM e IMR, obtidos em células de *A. cepa*, após exposição de 24 horas nas soluções contendo AgNP. Observa-se que, após exposição às nanopartículas, houve indução de efeito citotóxico para ambas as concentrações (1,5µg/mL e 15µg/mL), pois as células apresentaram uma diminuição significativa nos seus IM em relação ao controle negativo ( $p=0,01$  e  $p=0,04$ , respectivamente) (Figura 35). O índice mitótico foi mais baixo para a concentração A, apresentando valor de 5,0.

Com o aumento da concentração das nanopartículas, foi notado um aumento independente no índice mitótico. Todavia, (KUMARI; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2009),

ao estudar a citotoxicidade de diferentes concentrações de AgNPs (25, 50, 75 e 100 ppm), relataram que o efeito citotóxico é dependente do aumento da concentração, ou seja, com o aumento da concentração há uma diminuição no número de divisões celulares. Alguns autores demonstraram que alterações no número de divisões celulares ocorrem devido às mudanças provocadas no tempo de duração do ciclo mitótico, como o aumento na fase S da divisão celular (Macleod, 1969); (Webster e Davidson, 1969).

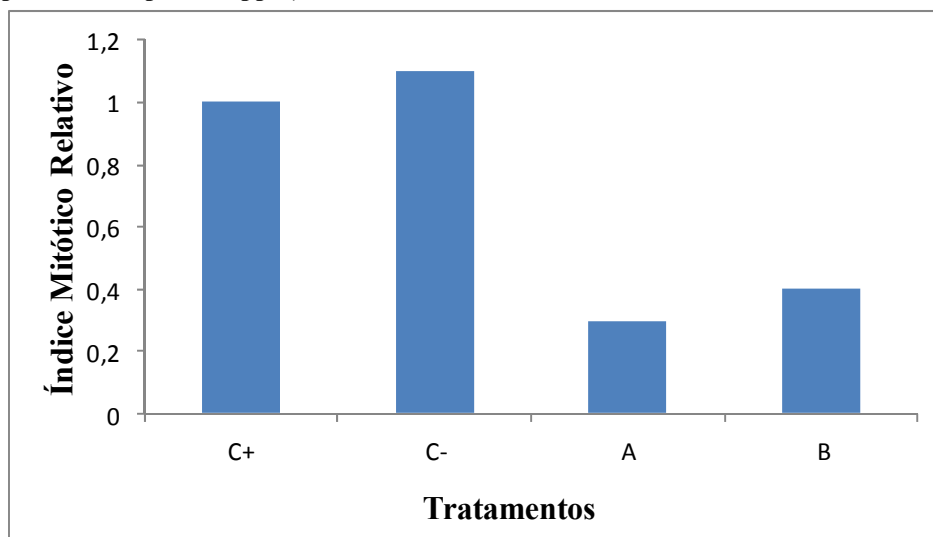
**Tabela 10 Índice Mitótico (IM) e Índice Mitótico Relativo (IMR) de células meristemáticas de *A. cepa* para as duas concentrações da substância teste, Controle Negativo e Controle Positivo.**

Amostras	Número de células analisadas	Média e DP de células em divisão	IM (%)	IMR
Controle Negativo	5235	194±52	14,1	1.1
Controle Positivo	5182	148±20	13,3	1.0
A (1,5ppm)	5058	43±16	5,0*	0.4
B (15ppm)	5572	59±22	6,4*	0.5

\* estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle negativo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

**Figura 35 Efeito dos diferentes tratamentos no Índice Mitótico Relativo (IMR) em células de *A. cepa*. Em que C<sup>+</sup> (trifluralina 0,075g/L); C<sup>-</sup> (água ultrapura); A (nanopartícula de prata 1,5ppm) e B (nanopartícula de prata 15ppm).**



Fonte: Elaborada pelo autor.

Assim como ocorreram efeitos citotóxicos, também foram observados danos significativos no DNA, como mostrados pelos valores de IAC e IACR (Tabela 11 e

Figura 36) em relação ao controle negativo, caracterizando efeito genotóxico. Porém esse efeito só foi estatisticamente significativo para a concentração A ( $p=0.006$ ), não sendo observado na concentração B ( $p=0.06$ ). Observa-se que o valor de IAC da concentração B (2,0) é maior que o IAC do controle positivo (1,61), indicando que houve grande indução de AC para a concentração B, porém a não significância dos resultados pode estar relacionado ao desvio padrão encontrado na média, fugindo do intervalo de variação do controle negativo. Para a concentração A (26,8), a média do número de AC (alterações cromossômicas) encontrada foi quase duas vezes maior do que para a concentração B (17,2). Os tipos e as quantidades de AC encontradas após a exposição estão indicados na Figura 37. Segundo (Barbério, 2013) contaminantes podem causar dois tipos de alterações: a clastogênica que se caracteriza pela quebra do material genético (pontes, por exemplo) e a aneugênica caracterizadas por comprometer a segregação dos cromossomos durante a divisão celular (C-metáfase e aderência, por exemplo). Como mostrado na Figura 37, foram encontradas AC do tipo clastogênica (pontes) e do tipo aneugênica (perdas cromossômicas, C-metáfase e aderência cromossômica).

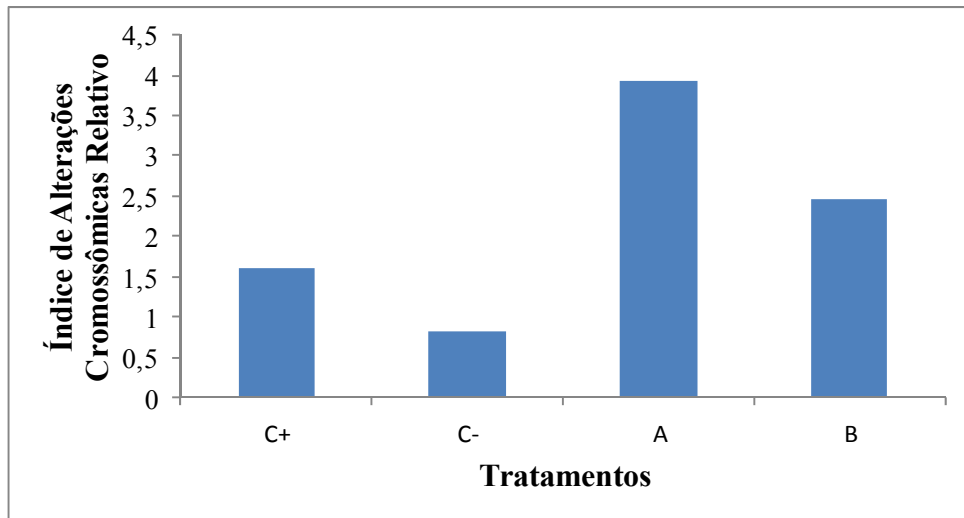
**Tabela 11 Índice de Alteração Cromossômico (IAC) e Índice de Alteração Cromossômico Relativo (IACR) de células meristemáticas de *A. cepa* para as duas concentrações da substância teste, Controle Negativo e Controle Positivo.**

<b>Amostras</b>	<b>Número de células analisadas</b>	<b>Média e DP de células com alterações</b>	<b>IAC %</b>	<b>IACR</b>
Controle Negativo	5235	8,4±3,9	0,85	1,0
Controle Positivo	5182	16,8±4,1	1,61*	2,0*
A (1,5 ppm)	5058	26,8±13,9	3,2*	3,9*
B (15 ppm)	5572	17,2±11,7	2,0	2,4

\* estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle negativo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

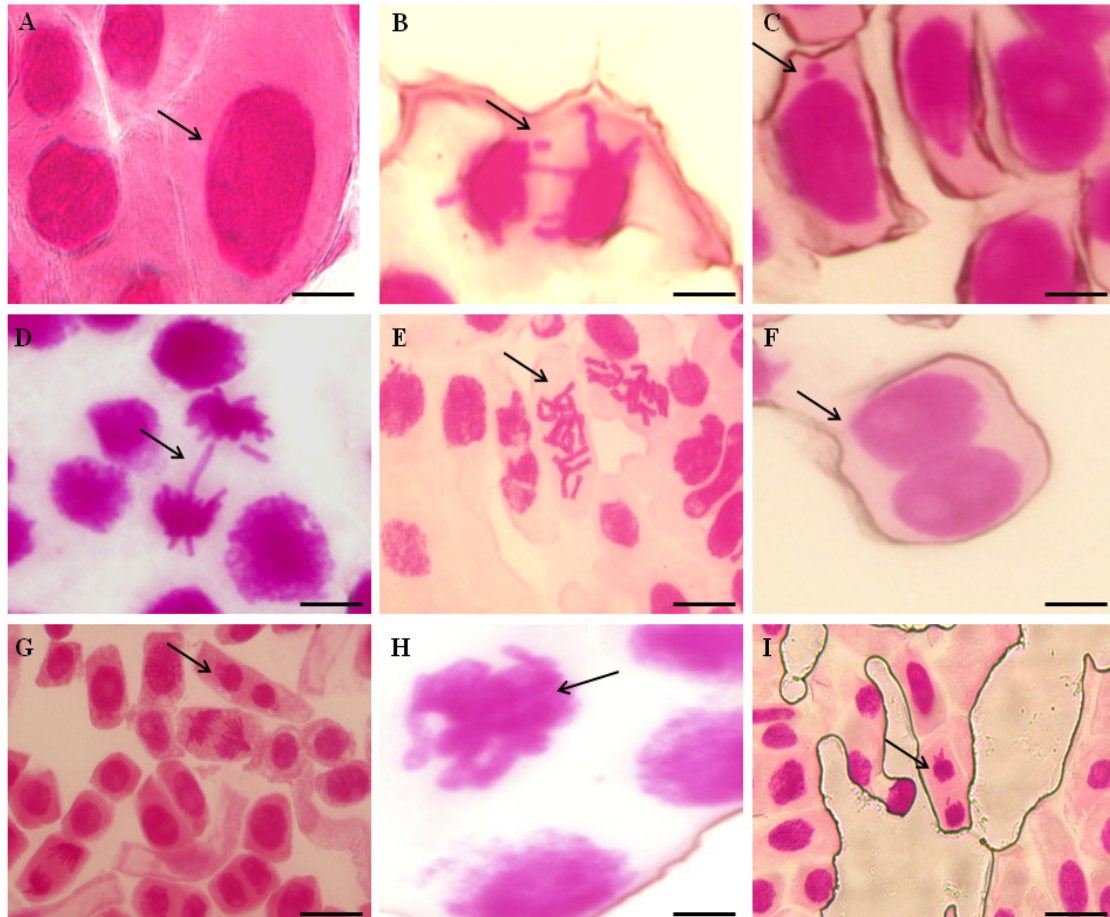
**Figura 36** Efeito dos diferentes tratamentos no Índice de Alterações Cromossômicas Relativo (IACR) em células de *A. cepa*. Em que: C<sup>+</sup> (trifluralina 0,075g/L); C<sup>-</sup> (água ultrapura); A (nanopartícula de prata 1,5ppm) e B (nanopartícula de prata 15ppm).



Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 37 apresenta as principais alterações cromossômicas observadas para as duas concentrações estudadas. A alteração denominada C-metáfase (Figura 37E), segundo (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007), é resultante da ação de agentes aneugênicos que promovem uma inativação completa do fuso mitótico, sendo que essa alteração pode gerar alterações tipo células poliplóides, multinucleadas e células com micronúcleos (KIRSCH-VOLDERS et al, 2002). Segundo (KURIYAMA; SAKAI, 1974) o comprometimento do fuso mitótico é ocasionado pela interação das AgNPs com o grupo tubulina-SH.

**Figura 37** Aberrações cromossômicas encontradas em células meristemáticas de *Allium cepa* após exposições às concentrações de AgNPs. A) célula poliploide (seta); B) anáfase com ponte e fragmento cromossômico (seta); C) célula com micronúcleo; D) anáfase com atraso e quebra cromossômica; E) C- metáfase; F) célula binucleada; G) telófase com broto (seta); H) célula com aderência cromossômica (seta); I) telófase com quebra de cromossomo (seta). Aumento: 400 vezes. A barra corresponde a 100µm.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Pontes cromossômicas (Figura 37B) podem ser resultantes de aderências cromossômicas (Figura 37H), as quais em alguns casos podem ser múltiplas e persistir até a telófase (Marcano *et al*, 2004). Segundo (KUMARI; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2009), a aderência cromossômica pode ser relacionada ao efeito causado pelo entrelaçamento intercromossomal das fibras de cromatina e a presença deste tipo de alteração é claramente um sinal comum de influência tóxica, além de ser considerado um efeito irreversível.

Os fragmentos cromossômicos (Figura 37B) podem ser resultado de interrupções de pontes cromossômicas (FISKESJÓ, 1993), sendo que as quebras cromossômicas (Figura 37D e I) e os micronúcleos (MN) (Figura 37C) são excelentes *endpoints* de mutagenicidade, uma vez que são alterações do material genético que não podem ser reparadas pelas células, podendo, portanto, serem transmitidas às novas gerações de

células (DE CAMPOS VENTURA; DE ANGELIS; MARIN-MORALES, 2008). Portanto, os MN são raramente reincorporados ao conjunto cromossômico após a divisão ou pela inativação do fuso mitótico (evento aneugênico – perda de cromossomos inteiros) ou quebras cromossômicas (evento clastogênico perda de fragmentos acêntricos)<sup>10</sup> (FENECH, 2000). A indução de quebras cromossômicas por AgNP indica o seu potencial clastogênico podendo gerar uma perda de material genético (CUICAI; YUAN; JINLING, 1992).

(PULATE; GHURDE; DESHMUKH, 2011) ao estudarem os efeitos de AgNPs em *A. cepa* encontraram uma frequência elevada de alterações como C-metáfase e distúrbios nas fases mitóticas metáfase e anáfase, ocasionadas pelo contato com AgNPs na concentração de 5ppm. Assim como os resultados obtidos neste trabalho, as AgNP foram consideradas potencialmente citotóxica e genotóxica devido a diminuição no IM e aumento no IAC.

Segundo (KUMARI; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2009) e (NAIR et al, 2010) há a necessidade de que avaliações sobre os potenciais efeitos citotóxicos ou genotóxicos das AgNPs sejam realizados, considerando as propriedades das nanopartículas (absorção, distribuição e translocação) nos tecidos celulares de plantas. Por exemplo, em determinadas plantas, poucos efeitos negativos são observados, como diminuição da biomassa vegetal e da transpiração, conforme observado por (STAMPOULIS; SINHA; WHITE, 2009) ao estudar a germinação e crescimento de sementes de abobrinha em uma solução hidropônica alterada com AgNPs. Em contrapartida, efeitos relacionados à necrose, senescência e morte celular também são observados em plantas devido ao efeito ocasionado pela presença de Ag<sup>+</sup> (NAVABPOUR et al, 2003).

Em 2011, (PARK et al, 2011) verificaram que os efeitos citotóxicos e genotóxicos ocasionados por AgNPs têm correlação com os tamanhos apresentados por estas partículas, resultado esse que corrobora o apresentado por (LIMA et al, 2013) que relataram que AgNPs de 20nm mostraram efeitos mais tóxicos do que AgNPs com tamanhos de 80 e 113nm. No caso do presente trabalho, as nanopartículas estudadas

---

<sup>10</sup> Fragmentos cromossômicos sem centrômero



foram menores, com tamanhos variando entre 2-18nm, e se mostraram potencialmente cito e genotóxicas para o organismo *A. cepa*.

### **8. 3. CONCLUSÃO**

AgNPs, nas condições estudadas, apresentam potencial citotóxico para ambas as concentrações (1,5 ppm e 15 ppm) e genotóxico (1,5 ppm) mesmo em baixas concentrações. Esta toxicidade pode interferir nos componentes intracelulares causando diversos problemas durante a divisão celular, sendo indutoras tanto de alterações clastogênicas quanto aneugênicas. Devido à possibilidade de indução de efeitos prejudiciais ao material genético do organismo em estudo, nossos estudos indicam que há necessidade de um controle intenso no uso de AgNPs, tanto nas etapas de produção de materiais e embalagens aditivadas com nanopartículas, como no descarte destes materiais.

## REFERÊNCIAS

AMBRÓSIO, J. B. **Avaliação Dos Efeitos Citotóxicos, Genotóxicos e Mutagênicos de 2 Classes de Agrotóxicos Utilizados em Cultura de Cana-de-Açúcar no Estado de São Paulo-Brasil**. 2012. 128 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2012.

BARBÉRIO, A. **Bioassays with Plants in the Monitoring of Water Quality**. 2013.

CUICAI, R.; YUAN, L.; JINLING, L. Application of Micronuclues Test in Vicia Faba Root Tips in the Rapid Detection of Mutagenic Environmental Pollutants.[J]. **Environmental Science**, v. 4, p. 015, 1992.

DE CAMPOS VENTURA, B.; DE ANGELIS, D. D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (*Perciformes, Cichlidae*) detected by the micronuclei test and the comet assay. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 90, n. 1, p. 42-51, 2008.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1, p. 81-95, 2000.

FERNANDES, T. 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, n. 3, p. 252-259, 2007.

FISKESJÓ, G. Allium test I: a 2–3 day plant test for toxicity assessment by measuring the mean root growth of onions (*Allium cepa* L.). **Environmental Toxicology and Water Quality**, v. 8, n. 4, p. 461-470, 1993.

KIRSCH-VOLDERS, M. et al Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 504, n. 1, p. 137-148, 2002.

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 functional-Sh groups in tubulin for polymerization. **Journal of biochemistry**, v. 76, n. 3, p. 651-654, 1974.

LIMA, R. et al Cytotoxicity and genotoxicity of biogenic silver nanoparticles. *Journal of Physics: Conference Series*, 2013.

MACLEOD, R. Some effects of 2, 4, 5-trichlorophenoxyacetic acid on the mitotic cycle of lateral root apical meristems of *Vicia faba*. **Chromosoma**, v. 27, n. 3, p. 327-337, 1969.

MARCANO, L. et al Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental research**, v. 94, n. 2, p. 221-226, 2004.

NAIR, R. et al Nanoparticulate material delivery to plants. **Plant science**, v. 179, n. 3, p. 154-163, 2010.

NAVABPOUR, S. et al Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 391, p. 2285-2292, 2003.

PARIDA, U. K.; BINDHANI, B. K.; NAYAK, P. Green synthesis and characterization of gold nanoparticles using onion (*Allium cepa*) extract. **World Journal of Nano Science and Engineering**, v. 1, p. 93, 2011.

PARK, M. V. et al The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, n. 36, p. 9810-9817, 2011.

PULATE, P.; GHURDE, M.; DESHMUKH, V. Cytological effects of the biological and chemical silver-nanoparticles in *Allium cepa* L. **International Journal of Innovations in Bio-Sciences**, v. 1, p. 32-35, 2011.

STAMPOULIS, D.; SINHA, S. K.; WHITE, J. C. Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. **Environmental science & technology**, v. 43, n. 24, p. 9473-9479, 2009.

WEBSTER, P.; DAVIDSON, D. Changes in the duration of the mitotic cycle induced by colchicine and indol-3yl-acetic acid in *Vicia faba* roots. **Journal of experimental botany**, v. 20, n. 3, p. 671-685, 1969.

## CONCLUSÃO

- Os filmes aditivados com AgNPs obtidos e caracterizados apresentaram boas propriedades e características antimicrobianas;
- Quando utilizados como embalagens em cenouras minimamente processadas conseguiram manter características desejáveis ao consumidor;
- Os filmes nas condições estudadas não promoveram migração de nanopartículas de prata condição muito desejada para a indústria de alimentos;
- AgNPs em baixas concentrações apresentaram alta toxicidade:
  - á organismos aquáticos como a *Daphnia similis*;
  - quando administrada por ingestão oral pode causar alterações no desenvolvimento de filhotes de ratas;
  - potencial cito e genotóxico com alterações cromossômicas irreversíveis em *Allium cepa*;

O progresso da nanotecnologia é um evento necessário e inevitável. Através deste estudo pode-se perceber que existe um grande risco potencial de contaminação de diferentes ambientes através da migração de nanopartículas de prata mesmo em baixas concentrações, podendo causar toxicidade em diferentes espécies tanto animais quanto vegetais e em muitos casos com efeitos irreversíveis. Esse fato mostra a importância de se instaurar leis que determinam valores para migração e utilização de nanopartículas em contato com alimentos e outras tecnologias.

Como demonstrado neste estudo as AgNPs são capazes de induzir diferente níveis de toxicidade (cito, geno e ecotoxicidade), porém apesar dos inúmeros estudos já realizados, os mecanismos de como essas partículas se tornam tóxicas para as células são pouco definidos. Por esta razão novos estudos ainda se fazem necessários para se

desvendar, por exemplo, os mecanismos de ação, em relação à toxicidade, de AgNPs e seus íons  $\text{Ag}^+$ .

Como também relatado, os eventos tóxicos dependem muito do tamanho e forma das nanopartículas, o que dificulta a definição de limites específicos para apenas um tipo geral de classe de nanopartículas. É necessário, portanto, que se sejam estabelecidas rotas de síntese que produzam AgNP de forma, tamanho e outras características específicas, mas com menor nível de toxicidade, e que ainda preservem as propriedades benéficas das nanopartículas, como a propriedades bactericidas.

Seria de grande importância também definir o meio de recuperação de materiais que tem em sua composição o emprego da nanotecnologia. O descarte de maneira não regular facilita a contaminação de outros ambientes. E verificar se existe a possibilidade de uma ação conjunta das AgNPs e outras moléculas ou metais de modo a verificar se há sinergismo ou seja potencialização dos efeitos tóxicos.