

CAPACIDADE CITOTÓXICA DA PRATA COLOIDAL EM CÉLULAS DE FÍGADO

Palavras-Chave: CITOTOXICIDADE; PRATA COLOIDAL; NANOPARTÍCULAS DE PRATA

RAFAEL VIANNA PORTO [E.E RUY RODRIGUEZ]

THIAGO MOITA PAIM [E.E DOM JOÃO NERY]

VERÔNICA MARTINS SOARES [E.E PROF. JOAQUIM FERREIRA LIMA]

Prof. Dr. MARCELO BISPO DE JESUS (orientador) [UNICAMP/IB]

INTRODUÇÃO:

A prata coloidal corresponde a nanopartículas e íons de prata suspensos em um líquido coloidal, situando-se em escala nanométrica (1 nm - 100 nm).¹ A prata é o metal que apresenta a menor taxa de toxicidade, no entanto se for ingerido em altas concentrações, pode ocasionar alguns efeitos colaterais, como problemas neurológicos, renais, dores de cabeça, indigestão e argiria (doença causada pela exposição da prata ao corpo).^{2,3} Uma questão ainda investigada por pesquisadores é acerca da toxicidade da nanopartícula de prata e conseqüentemente da prata coloidal sobre organismos e células humanas, dessa forma, ainda há indagações sobre se a prata coloidal pode ou não ser utilizada para fins medicinais.

Assim, o uso da prata coloidal pode significar riscos, uma vez que não há um conhecimento firmado acerca dos efeitos tóxicos contra organismos e sistemas biológicos e efeitos citotóxicos contra células.⁴ Por sua vez, a citotoxicidade é considerada como a capacidade que uma substância possui de inibir a propagação celular, ou causar danos e lesões às células. As alterações celulares causadas por substâncias podem consistir em morte celular, perda da viabilidade celular, mudanças na morfologia, danos nas organelas e danos ao material genético.³

Diante do apresentado, buscamos estudar o efeito da prata coloidal nas células de fígado, mais precisamente, células de hepatocarcinoma humano (linhagem Huh-7). Para isso, algumas pratas coloidais disponíveis no mercado, das marcas Prata Real, Vida e Almacura foram adquiridas e testadas acerca de seu potencial citotóxico. As informações fornecidas pelos fabricantes também foram averiguadas por meio de caracterização físico-química, a fim de investigar a presença de nanopartículas, o seu tamanho, a quantidade de prata e concentração que eles alegam ter no produto, bem como sua citotoxicidade frente às células Huh-7 de hepatócitos humano.

MATERIAIS E MÉTODOS:

Caracterização das Nanopartículas de Prata

As soluções de prata coloidal foram caracterizadas quanto ao seu diâmetro hidrodinâmico, concentração (ppm), potencial zeta (ZP) e índice de polidispersividade (PDI). Foram realizadas análises de espalhamento dinâmico de luz – DLS (do inglês, Dynamic light scattering).

Análise DLS:

Foi utilizado o equipamento ZetaSizer Nano ZS90, e as medições foram realizadas em cubetas de poliestireno com comprimento de trajeto de 10 mm, a 25° C, em um ângulo de espalhamento de 90°. As soluções-estoque de AgNPs foram diluídas em água deionizada em proporção 1:100 e levadas ao aparelho para a medida do diâmetro hidrodinâmico.

Quantificação da prata:

A medição e quantificação das nanopartículas de prata em suspensão foram realizadas em um espectrômetro de ICP-MS, equipado com um nebulizador concêntrico de vidro, câmara de nebulização ciclônica de vidro e cone do tipo hiper-skimmer (NexION 300D, Perkin Elmer, Massachusetts, EUA). O ICP-MS foi operado no modo de detecção de partícula individual - SP, com potência RF de 1600 W e vazões de gás no nebulizador, plasma, e auxiliar de: 1,1 L min⁻¹; 13 L min⁻¹; e 0,7 L min⁻¹, respectivamente. O tempo de análise por replicata foi de 100 s, o “dwell time” de 50 µs e a vazão de amostra de 0,20 mL min⁻¹. Para obtenção da água desionizada, utilizada nos ensaios, foi utilizado o sistema de purificação de água modelo Simplicity (Merck, Darmstad, Alemanha). Soluções de trabalho foram preparadas medindo-se as alíquotas apropriadas de uma solução intermediária de 100 µg L⁻¹ de prata dissolvida. As soluções de trabalho foram preparadas em água deionizada, em sete níveis de concentração entre 1,5 e 20 µg L⁻¹. Em seguida, as soluções de trabalho foram analisadas no ICP-MS e, com os dados obtidos para os padrões analisados, foi construída uma curva analítica de prata dissolvida, que é convertida, pelo software do equipamento, na relação entre a intensidade de sinal (counts) e fluxo de massas (µg mL⁻¹).

Citotoxicidade de amostras de prata coloidal por ensaio de MTT:

As células Huh-7 foram semeadas em 3 placas de 96 poços (Corning Inc.,EUA) na densidade de $1,0 \times 10^5$ células por poço em 100 µL em meio DMEM e incubadas durante 24 horas. As células foram tratadas com as AgNPs diluídas em meio DMEM sem soro e antibióticos e as células foram tratadas em diferentes tempos a 37° C e 5% de CO₂. O composto dimetil sulfóxido (DMSO) foi utilizado na concentração de 10% como controle positivo de danos e morte celular. Após 24 horas de tratamento, foi adicionado ao tratamento 10 µL de (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-brometo de difeniltetrazólio) solução de tetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich, EUA) na concentração de 5 mg/mL. Após 3 horas de incubação, o meio de tratamento foi substituído por 100 µL de DMSO para dissolver os

cristais de formazan. A absorbância foi determinada pelo leitor de microplaca Cytation 5 (Biotek Instruments, EUA) em $\lambda = 570$ nm e a porcentagem de viabilidade das células foi expressa em relação ao controle de três experimentos independentes.

RESULTADOS:

Tabela 1: Caracterização físico-química de soluções comerciais de prata coloidal

Nanopartículas	Diâmetro Hidrodinâmico (nm) por DLS	PDI	Potencial Zeta (mV)	Concentração (partículas/mL)
AgNP ⁶	101,7 ± 3,8	0,267 ± 0,009	-26,7 ± 11,1	7,77 ¹¹ ± 2,69 ¹⁰
NPsAg Prata Real	180,5 ± 52,8	0,200	-10,7 ± 0	-
NPsAg Prata Vida	265,6 ± 143,9	0,020	-14,4 ± 0,3	-
NPsAg Prata Almacura	325,3 ± 202,0	0,220	-15,0 ± 6,5	-

Com a quantificação das amostras foi possível observar que a reta obtida foi $Intensidade = 163 \times Concentração + 94$ por meio de um coeficiente de correlação de 0,9996. A partir da curva de calibração apresentada na Figura 1 foi possível obter a concentração em mg/L das amostras, sendo elas: Prata Real 19,4 mg/L, Vida 22,9 mg/L e Almacura 5,4 mg/L. As concentrações que são citadas no rótulo das formulações comerciais constam 20 ppm. (1 ppm = 1 mg/L).

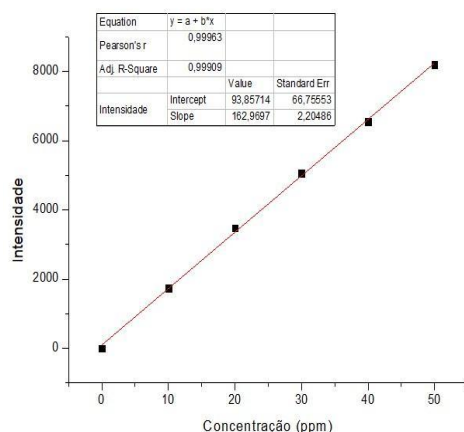


Figura 1: Curva de calibração de prata para quantificação das amostras.

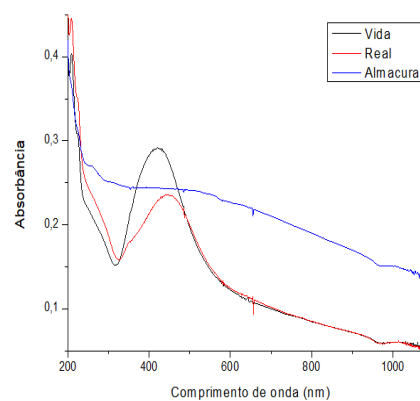


Figura 2: Espectro de absorvância das amostras Prata Real, Vida e Almacura.

Após a comprovação do conteúdo das formulações comerciais, nós passamos para os testes de toxicidade em células de fígado *in vitro*. Foi feito um experimento utilizando células de fígado (Huh-7) por meio MTT, na Figura 3 a), b) e c) é possível observar que conforme foi aumentando a concentração de AgNP, houve perda de viabilidade celular.

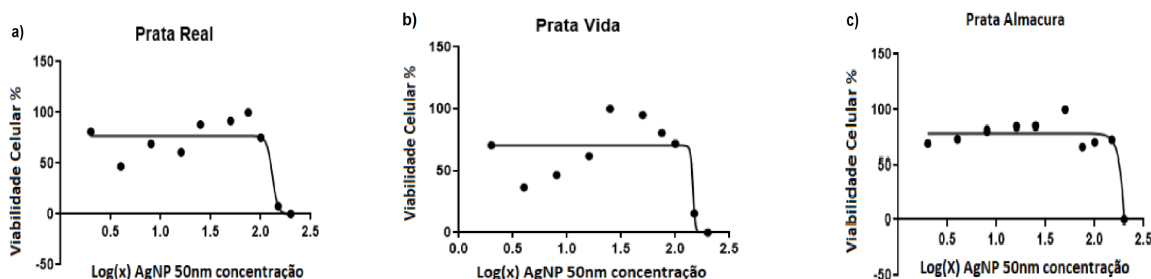


Figura 3: Viabilidade da Huh-7 (células de hepatocarcinoma humano) sob aumento da citotoxicidade da AgNP, nas quais as células foram tratadas com uma concentração de 50 nm de AgNP, sendo as pratas utilizadas, a) Prata Real, b) Prata Vida e c) Prata Almacura.

DISCUSSÃO:

Ao idealizar a pesquisa, buscamos compreender se a ingestão da prata coloidal traria algum efeito tóxico às células de nosso organismo, e se as marcas que as comercializam dão informações reais de seus produtos. Assim, analisamos três amostras de formulações comerciais dispostas à venda. Após obtermos os resultados das análises de prata (Tabela 1) observamos que parte das formulações comerciais, realmente possuem em sua composição nanopartículas de prata. Parte dessas evidências vem com os resultados das análises quantitativas (Figura 1). Nos é sabido, que para ser caracterizado como nanopartículas, a prata deve encontrar-se em um diâmetro de 1 nm a 100 nm, o que foi observado em três das nossas amostras. O PDI nos revela o quão heterogêneas as partículas são, ou seja, se o PDI estiver com seu valor muito baixo quer dizer que a maioria das partículas possuem o mesmo diâmetro, já se estiver com seu valor muito alto os diâmetros serão diferentes. Já o Potencial Zeta, refere-se às cargas das partículas, indicando a predominância de cargas positivas ou negativas ao redor das mesmas. Um novo experimento da banda plasmônica (Figura 2), que visa uma interação entre a luz e a matéria em escala nanométrica, reforçou parte dos dados da (Tabela 1), indicando que as amostras são compostas por nanopartículas, no entanto, houve um resultado contraditório em relação a Prata Almacura.

Após efetuarmos as análises da viabilidade celular pelo ensaio MTT (Figura 3), observamos o surgimento de curvas, evidenciando a viabilidade celular de cada amostra na presença e na ausência do tratamento com nanopartículas de prata coloidal.

CONCLUSÕES:

Através da caracterização físico-química, pudemos concluir que as pratas presentes nas formulações comerciais, são nanopartículas de prata (AgNP), seguindo os parâmetros da escala nanométrica. Após isso analisamos o espectro da banda plasmônica, observamos informações contraditórias em relação a prata Almacura, nos indicando dados diferentes do resultado obtido com a caracterização físico-química. A mesma possui nanopartículas, porém notamos que há uma grande quantidade de íons de prata em sua composição, para isso, mais estudos seriam necessários para a comprovação desse dado.

É possível concluir que conforme houve o aumento da concentração da prata coloidal, a viabilidade celular começou a ceder até se tornar não viável. Essa informação nos mostra que a prata coloidal em grandes concentrações apresenta citotoxicidade.

BIBLIOGRAFIA:

¹BERNAUER, Ulrike *et al.* SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety) Opinion on the safety of the presence of Bisphenol A in clothing articles-2, 2-bis (4-hydroxyphenyl) propane (CAS Number 80-05-7), preliminary version of 16 October 2020, final version of 30-31 March 2021, SCCS/1620/20. 2021.

²BERNI NETO, Elias Antonio; RIBEIRO, Caue; ZUCOLOTTI, Valtencir. Síntese de nanopartículas de prata para aplicação na sanitização de embalagens. Embrapa Instrumentação Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2008.

³DOS SANTOS, Carlos E. Matos; COLASSO, Camilla; MONERÓ, Tatiana Oliveira. Aspectos toxicológicos da exposição à prata. RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade, v. 7, n. 1, p. 05-23, fev. 2014.

⁴LEINO, Veera *et al.* Toxicity of colloidal silver products and their marketing claims in Finland. Toxicology reports, v. 8, p. 106-113, 2021.

⁵BELCAVELLO, Luciano *et al.* Citotoxicidade e danos ao DNA induzidos pelo extrato de Zornia diphylla, uma planta medicinal. Natureza on-line, v. 10, n. 3, p. 140-145, 2012.

⁶Ferreira, L.A.B., Reis, Dos, S.B., do Nascimento da Silva, E., Cadore, S., Bernardes, J.D.S., Durán, N., *et al.* (2020) Thiol-antioxidants interfere with assessing silver nanoparticle cytotoxicity. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 24 102130.