



**ESTUDOS SOBRE O EFEITO TOXICOLÓGICO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
SOBRE *Chironomus sancticaroli***

Letícia Aliberti Galego Alves **da Silva**¹; Claudio Martin **Jonsson**²; Mariana Silveira Guerra
Moura e **Silva**³

Nº 19416

RESUMO – Nanopartículas provém de materiais amplamente utilizados, como os metais. Esse processo de transformação dos elementos é uma consequência do desenvolvimento atual da nanotecnologia. Este trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade de nanopartículas de prata (AgNPs) e determinar o valor da Concentração de Efeito Não Observado sobre o organismo-teste bioindicador aquático *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae). O composto se apresentou como “praticamente não-tóxico” aos indivíduos, ao se obter uma CL_{50} de 186 mg L^{-1} AgNP após exposição aguda de 48 horas. Para a exposição crônica, também foi calculado um valor de CL_{50} (95 mg L^{-1}) e um de CL_{10} (35 mg L^{-1}). Sendo que a partir da CL_{10} foi obtido o valor da Concentração de Efeito Não Observado que pode, juntamente com os valores calculados para outros organismos, auxiliar a determinar uma quantidade permissível na água de AgNPs por órgãos governamentais reguladores.

Palavras-chaves: Nanotecnologia, ecotoxicologia, Chironomidae, bioindicador

¹ Autor: Bolsista CNPq (ITI), Graduação em Ciências Biológicas, PUC-Campinas, SP, leticia.aliberti@hotmail.com

² Colaborador: Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; claudio.jonsson@embrapa.br

³ Orientador: Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; mariana.silveira@embrapa.br



ABSTRACT – Nanoparticles come from widely used materials, as metals. This process of element transformation is a consequence of the current development of nanotechnology. The aim of this work was to evaluate the toxicity of silver nanoparticles (AgNPs) on the aquatic bioindicator test-individual *Chironomus sancticarloi*. The compound showed “almost non-toxic” behavior to the individuals by obtaining a LC_{50} of 186 mg L^{-1} AgNP after acute exposure. For the chronic exposure a LC_{50} (95 mg L^{-1}) and a LC_{10} (35 mg L^{-1}) were calculated. The value of No Observed Effect Concentration was obtained from the LC_{10} , which can, along with values from other organisms, help to determine an allowed concentration of AgNPs in water by governmental regulated agencies.

Keywords: nanotechnology, ecotoxicology, aquatic, Chironomidae and bioindicator

1 INTRODUÇÃO

Os testes de ecotoxicidade representam métodos para constatar e qualificar a capacidade de uma substância tóxica em causar efeitos danosos ou fatais, a partir da resposta de bioindicadores que compõem os grandes grupos de uma cadeia ecológica (CONAMA, 2011). De forma geral, insetos aquáticos representantes da família Chironomidae (Diptera) são considerados bioindicadores de impactos ambientais, pois passam por seu estágio larval no sedimento, interagindo assim com possíveis contaminantes nele acumulados. Esses indivíduos possuem ampla distribuição e sensibilidade a inúmeros poluentes, além de apresentarem um curto ciclo de vida, viabilizando sua utilização em estudos ecotoxicológicos (PARK; CHOI, 2009).

Atualmente, diferentes trabalhos acadêmicos têm sido realizados com a utilização do quironomídeo *Chironomus sancticarloi* como organismo-teste para experimentos relacionados à toxicologia, onde pode ser usado ou não o sedimento original, tendo como substituintes água/sedimento reconstituído (BARBOSA, 2008; PUSCEDDU, 2009; SALES, 2009; BONANI, 2010).

Essa espécie foi selecionada como organismo-teste para a realização de experimentos de ecotoxicidade com as amostras de sedimento da rede de monitoramento da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB). Posteriormente, a



metodologia de ensaio aplicada para o ensaio com o quironomídeo baseou-se na descrita do EPA (UNITED STATES, 2000) e da ABNT (2007), para observação do efeito agudo ou crônico por diferentes tipos de ingredientes ativos sobre a sobrevivência, como efeito subletal, uma vez que não há a padronização do ensaio.

O recente desenvolvimento da nanotecnologia proporcionou o aparecimento de novos materiais, que se tornaram fonte de liberação de nanopartículas no ambiente. O impacto ambiental das mesmas ainda é pouco conhecido e estudado. A estabilidade dessas partículas em suspensões coloidais define sua mobilidade em ecossistemas aquáticos, que depende da difusão, convecção e de forças externas para atravessar membranas celulares de indivíduos pertencentes à esses biosistemas. Nanopartículas de prata são atualmente utilizadas como bactericidas pois podem provocar alterações em organismos procariontes, impedindo que bactérias regulem o transporte transmembrana de substâncias essenciais (NAVARRO *et al.*, 2008).

O objetivo desse estudo foi estimar a concentração da toxicidade de AgNP e sua concentração de efeito não observado por meio de exposições agudas e crônicas, sobre o quironomídeo bioindicador *Chironomus sancticarli*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultivo e manutenção de *C. sancticarli* em laboratório

Os organismos foram cultivados em bandejas plásticas (47cm de comprimento x 32,5cm de largura x 8,5cm de altura) contendo até 0,5cm de areia tratada como substrato. Sobre as bandejas foi colocado um suporte telado (50cm de comprimento x 34,5cm de largura x 51cm de altura) para evitar a fuga dos adultos alados.

Foram utilizados seis litros de água reconstituída em cada bandeja, proveniente de poço da Embrapa Meio Ambiente, previamente ajustada em relação ao pH (7,0 a 7,6), dureza (40 a 48 mg L⁻¹ de CaCO₃), condutividade (72 a 212 μS cm⁻¹) e oxigênio dissolvido acima de 5,0 mg L⁻¹, com intensidade luminosa de aproximadamente 1.000 lux. As bandejas foram colocadas em ambiente aclimatado, com temperaturas entre 24 e 26°C, 16 horas de luz e aeração branda.

A alimentação diária fornecida constituiu-se de 7 mL de solução de ração de peixe



(20g de Tetramin® para cada litro de água reconstituída, com validade de 07 dias sob refrigeração e sólidos totais entre 16,2 e 20,4 g L⁻¹).

A troca de 50% da água foi realizada semanalmente, tomando-se o cuidado de manter a diferença da temperatura da água reconstituída em apenas 1°C. Durante a troca de água, todos os resíduos (restos de alimento, organismos mortos e exúvias) foram sifonados. Com o auxílio de uma gaze limpa, as laterais das bandejas foram higienizadas.

Nas bandejas cujos organismos entraram na fase reprodutiva, foram retiradas as desovas produzidas em cada bandeja um dia antes da manutenção semanal, no dia efetivo e um dia após, garantindo assim, jovens com idade adequada (entre 2º e 3º ínstar) para o ensaio.

2.2 Obtenção de organismos jovens

As desovas produzidas foram separadas e dispostas em nova bandeja com pelo menos 4 litros de água, uma fina camada de areia peneirada no fundo (<500 µm) e aeração branda. Foram fornecidos 3 mL de solução de ração de peixe (20 g L⁻¹) diariamente, após 48 horas da retirada das desovas (período para início da eclosão). As características da qualidade da água e do ambiente foram idênticas às adotadas nos cultivos. As bandejas com as desovas permaneceram incubadas por oito dias para o amadurecimento das larvas até atingirem a idade adequada para o uso nos ensaios. Essas larvas constituíram o lote de organismos teste.

Após um período de incubação de 7 dias, a bandeja foi cuidadosamente agitada para a separação dos organismos dos grãos de areia facilitando, assim, a contagem e a manipulação das larvas. A identificação dos ínstars dessa espécie baseou-se apenas na duração (dias), de cada ínstar conforme descrito por Fonseca (1997).

2.3 Sensibilidade ao ingrediente ativo por exposição aguda

O ingrediente ativo (AgNP 3850 mg L⁻¹) foi diluído com água reconstituída em recipientes de 100 mL de solução teste, nas concentrações (0,01; 0,1; 1; 10 e 100 mg L⁻¹) e controle. Os volumes foram distribuídos em um total de 6 placas (uma para cada diluição e mais uma para o controle), com 24 poços cada, sendo que para cada poço, foi pipetado 2,5 mL de cada diluição de AgNP e cobertos com tampa. A água reconstituída foi a mesma



utilizada nos cultivos, sem o uso de substrato.

Em cada poço foi colocado um organismo do lote semanal de jovens e incubados por 7 dias (procedimento 2.2) a temperatura de 25 ± 1 °C, 16 h luz, de acordo com a diretriz da OECD 235 (OECD, 2011). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis tratamentos (concentrações) e 4 repetições, sendo que cada repetição continha seis poços de placa com uma larva cada.

Ao final de cada período (24 e 48 horas de exposição), os organismos vivos foram recuperados e contados, sendo os mortos classificados como imóveis ao momento do toque com o estilete.

2.4 Sensibilidade ao ingrediente ativo por exposição crônica

A solução de AgNP (3850 mg L^{-1}) foi diluída em frascos de 200 mL com água reconstituída nas seguintes concentrações: 2, 6, 18, 58 e 186 mg L^{-1} , calculadas e determinadas a partir do experimento anterior (teste agudo). O uso somente da água representou o controle.

Anteriormente à disposição das larvas, foram transferidos 50 mL de cada diluição para béqueres de 100 mL, que foram mantidos na sala de criação para atingirem a temperatura ambiente, a qual correspondia à temperatura da sala de criação (25 ± 1 °C). Após isso, cada diluição foi transferida para 4 béqueres de 10mL.

Então, foram separadas 120 larvas da bandeja de jovens previamente incubados por 192h a temperatura de 25 ± 1 °C, 16h luz, de acordo com a diretriz da OECD 235. Em cada béquer de 10 mL foram utilizadas 5 larvas. O delineamento experimental foi completamente casualizado em seis concentrações com 4 repetições, sendo cada réplica um béquer de 10 mL contendo 5 larvas. Somente no primeiro dia foi fornecido 0,5 mL de alimentação (Tetramin® 20 g L^{-1}).

O experimento teve uma duração de 9 dias (216 horas), sendo que a cada 48 horas eram pipetados 8 mL de cada diluição, para análise físico-química da água e contagem dos indivíduos imóveis e/ou mortos ao toque. Os volumes retirados das soluções eram utilizados para estimar dados físico-químicos das mesmas, que ao final apresentaram médias de $7,27 \text{ mg L}^{-1}$ para o oxigênio dissolvido, 8,24 para o pH e $0,75 \mu\text{S cm}^{-1}$ para a condutividade elétrica.



2.5 Determinação de parâmetros de toxicidade

Para ser considerado “muito tóxico” a um organismo aquático, um composto deve apresentar uma CL₅₀ entre 0,1 e 1 mg L⁻¹; “moderadamente tóxico” entre 1 e 10 mg L⁻¹; “levemente tóxico” de 10 a 100 mg L⁻¹ e “praticamente não tóxico” maior que 100 mg L⁻¹ (UNITED STATES, 2019).

Os dados utilizados para calcular a Concentração Letal Média (CL₅₀), ou seja, concentração que tem efeito em 50% da população (HAMILTON; RUSSO; THURSTON, 1977), foram a quantidade de larvas vivas e mortas em 24 horas, 48 horas (exposição aguda) e 9 dias (exposição crônica). Ela foi determinada pelos módulos “Probit Analysis” e “Simple Regression” do programa Statgraphics Centurion XVII, Versão 1.17.04 (STATGRAPHICS TECHNOLOGIES, 2014).

No caso do estudo de exposição crônica, devido à alta mortalidade observada nos recipientes que serviram como controle, a taxa de mortalidade foi corrigida através da fórmula de Abbott (Equação 1) (RAO *et al.*, 2007)

$$P = P_{obs} - P_c / 1 - P_c \quad (1)$$

onde P é a mortalidade ajustada; P_{obs} é a mortalidade observada no tratamento e P_c é a mortalidade observada no controle.

A Concentração Letal que afeta 10% dos organismos da população no final do estudo de exposição crônica (CL_{10-9d}) foi determinada para efeito de estimativa da Concentração de Efeito Não Observado (CENO) (WARNE; VAN DAM, 2008). Entretanto, um valor mais coerente deste também foi estimado pela relação CL_{50-9d} / 10 (OECD, 1995; REBECHI *et al.*, 2014).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de mortalidade de *C. sancticaroli* em relação ao teste agudo, obtidos após 24 e 48 horas, são apresentados nas figuras 1 e 2, respectivamente. A CL₅₀ para o primeiro período foi estimada em 202,3 mg L⁻¹ AgNP. Após 48 horas, a CL₅₀ foi de 186 mg L⁻¹ AgNP. Este valor classifica o material-teste para o organismo-teste em estudo, como “praticamente não-tóxico” (UNITED STATES, 2019). Essa redução no valor se deve ao

término do experimento ter ocorrido em 48 horas e demonstra que o aumento do tempo de exposição acarreta um aumento da toxicidade.

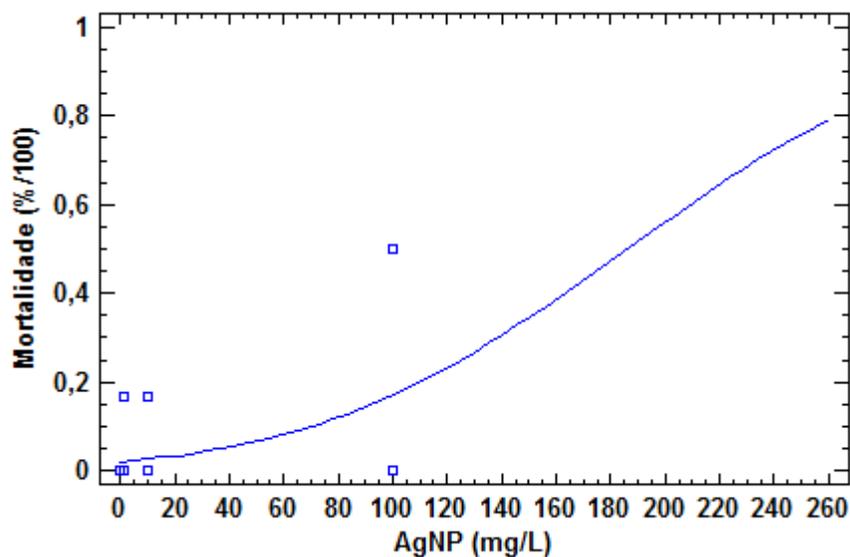


Figura 1. Mortalidade de *Chironomus sanctlicaroli* em relação à concentração de AgNP após 24 horas de exposição.

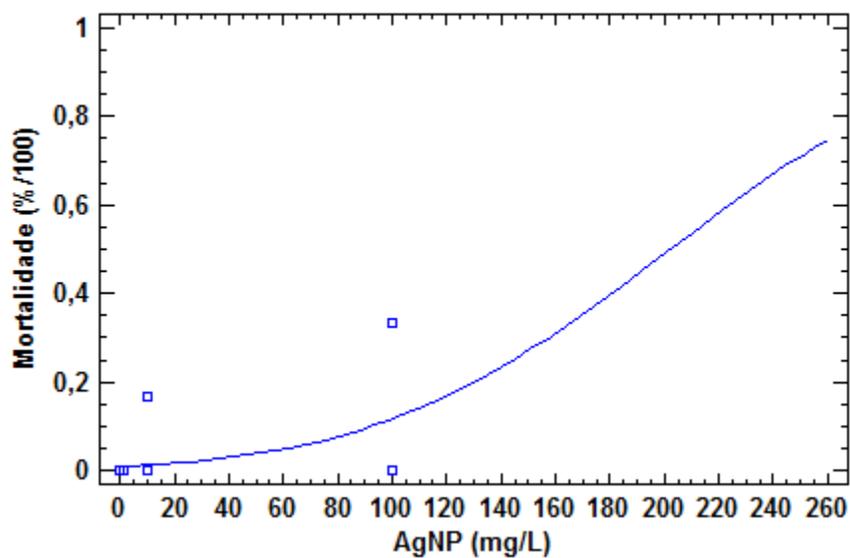


Figura 2. Mortalidade de *Chironomus sanctlicaroli* em relação à concentração de AgNP após 48 horas de exposição.

A figura 3 apresenta os resultados referentes à exposição de longo prazo (9 dias) onde observou-se também, tal como constatado para as outras exposições, uma relação concentração-efeito. A partir desses dados calculou-se uma CE_{50-9d} equivalente a 95 mg L^{-1} e uma CE_{10-9d} de 35 mg L^{-1} . Sendo que último corresponderia ao valor de CENO (Concentração de Efeito Não Observado). Entretanto, o valor deste parâmetro, quando obtido pela relação $CE_{50-9d}/10$, foi equivalente a $9,5 \text{ mg L}^{-1}$, um valor mais coerente para essa concentração. Portanto, para efeito de adoção de um valor de CENO este último valor seria elegido como nível de concentração com maior proteção ao organismo e a um possível ecossistema.

Resultados diferentes foram observados por Becaro *et al.* (2015) em *Artemia salina* e *Daphnia similis*, sendo as concentrações para ambos os artrópodes aquáticos menores que a observada nas 48 h no presente estudo, com valores de CE_{50-48h} equivalentes a $0,055$ e $0,00026 \text{ mg L}^{-1}$. Isto representa um aumento de toxicidade nesses microcrustáceos da ordem de 3.380 a 715.300 vezes, em relação ao inseto aquático em estudo. Esta discrepância no efeito tóxico também foi constatada para o nanomaterial óxido de grafeno, onde se registrou um valor de $CE_{50-96 h}$ equivalente a $0,58 \text{ mg L}^{-1}$ em *D. magna*, enquanto que foi marcadamente superior em *C. sancticaroli* ($CE_{50-9d} > 100 \text{ mg L}^{-1}$) (CASTRO *et al.*, 2018).

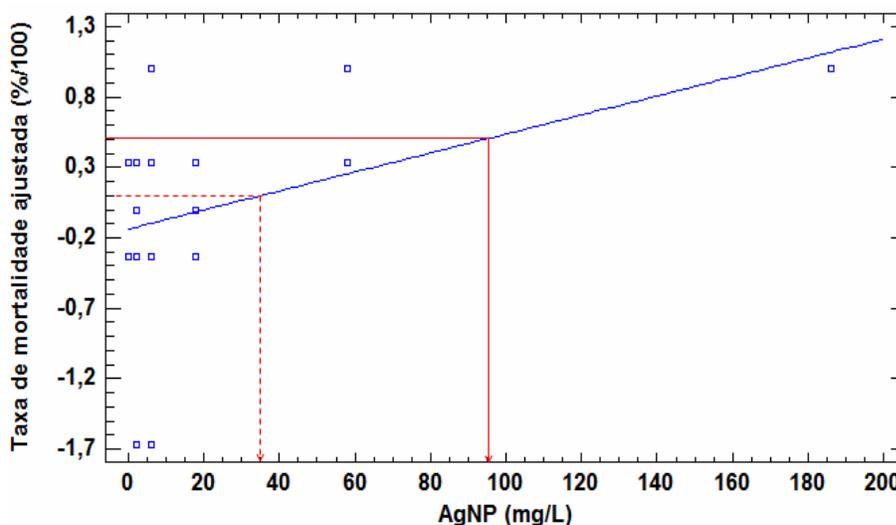


Figura 03. Relação dose-efeito da exposição de *Chironomus sancticaroli* a AgNP durante 9 dias. A intersecção das linhas vermelhas contínua e tracejada no eixo das abscissas representa, respectivamente, os valores de CL_{50-9d} e CL_{10-9d} .



A toxicidade de AgNPs é relacionada a sua área superficial. Quanto maior a mesma for, maior será a liberação de íons Ag^+ , que estão relacionados ao seu nível tóxico (DURÁN *et al.*, 2019). Yoo-iam, Chaichana e Satapanajaru (2014) obtiveram os valores da CL_{50} de AgNPs e Ag^+ em *Chlorella* sp., *Moina macrocopa*, *Chironomus* spp. e *Barbonymus gonionotus*. Assim, comprovaram que os íons Ag^+ obtidos por meio da dissociação de AgNO_3 são mais tóxicos aos organismos estudados do que as AgNPs. Com as soluções de AgNPs em concentrações entre 3,88 e 0 mg L^{-1} , a $\text{CL}_{50-48\text{h}}$ para *Chironomus* spp. foi $1,08 \pm 1,21$, diferente da encontrada no presente estudo em *C. sancticaroli* ($\text{CL}_{50-48\text{h}} > 100 \text{ mg L}^{-1}$).

No estudo de Park *et al.* (2015) com AgNPs cobertas por materiais orgânicos e não cobertas provocaram efeitos como danos ao DNA e expressão de genes relacionadas a estresse oxidativo em *C. riparius*. Nair e Choi (2012), relataram que a desregulação de receptores EcR no gênero *C. riparius* foi causada pela exposição a AgNP após 48 e 72 horas. Esses receptores são destinados a ecdisteróides, hormônios que interferem no crescimento, desenvolvimento e na muda de larvas de *C. riparius*. A ativação do gene proteico do anel de Balbiani (CrBR2.2) foi observada como mecanismo de defesa desta espécie à exposição de AgNPs (NAIR *et al.*, 2011).

4 CONCLUSÃO

As nanopartículas de prata avaliadas no presente estudo são consideradas “praticamente não tóxicas” a *Chironomus sancticaroli* comparativamente às avaliadas em outros artrópodes aquáticos, como dafnídeos e artêmias. Os resultados permitiram calcular um parâmetro toxicológico proveniente de uma relação-dose efeito em diferentes períodos de exposição. Apesar de ter ocorrido uma mortalidade natural maior do que a esperada na exposição a longo prazo, um valor de CENO incipiente foi determinado no organismo-teste em estudo. Este valor de concentração, juntamente com valores de CENO de outras espécies, pode auxiliar na determinação de um valor máximo permissível de AgNP a ser estabelecido por órgãos legisladores para fins de proteção das comunidades aquáticas.



5 AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq pela concessão da bolsa ITI e oportunidades proporcionadas. Também ao Cristiano Mattioli pela colaboração na descrição da metodologia, à Ana Lúcia Marigo pelo auxílio na sala de criação de *Chironomus sancticarioli*, ao Dr. Marcos David Ferreira (Embrapa Instrumentação) pelo fornecimento do material-teste e à minha orientadora Mariana Silveira Guerra Moura e Silva pela confiança e ajuda proporcionada.

REFERÊNCIAS

ABNT. **Ecotoxicologia aquática: toxicidade em sedimentos: método de ensaio com *Hyalella* ssp (Amphipoda)**. Rio de Janeiro: ABNT, 2007.

BARBOSA, D. S. **Análise da interação entre substâncias húmicas e xenobióticos através de estudos ecotoxicológicos: proposta para a geração de tecnologias de detoxificação aquática**. 2008. 193 p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

BECARO, A. A. *et al.* Toxicity of PVA-stabilized silver nanoparticles to algae and microcrustaceans. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, Amsterdam, v. 3, p.22-29, may, 2015.

BONANI, F. **Avaliação de deformidades morfológicas em larvas de *Chironomus* (Diptera, Chironomidae) na bacia do rio Piracicaba e sua aplicação no biomonitoramento**. 2010. Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

CASTRO, V. L. *et al.* Nanoecotoxicity assessment of graphene oxide and its relationship with humic acid. **Environmental Toxicology And Chemistry**, Medford, MA, v. 37, n. 7, p.1998-2012, 4 June 2018.

CONAMA. Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 16 maio 2011. p. 89.

DURÁN, N. *et al.* Nanotoxicologia de nanopartículas de prata: toxicidade em animais e humanos. **Química Nova**, São Paulo, SP, v. 42, p. 206-213, 2019.

FONSECA, A. L. **Avaliação da qualidade da água na bacia do Rio Piracicaba/SP através de testes de toxicidade com invertebrados**. 1997. 211 p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

HAMILTON, M.; RUSSO, R.; THURSTON, R. **Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays**. Washington, DC.: U.S. Environmental Protection Agency, 1977. (EPA/600/J-77/178, NTIS PB81191918).



NAIR, P. M. G.; CHOI, J. Modulation in the mRNA expression of ecdysone receptor gene in aquatic midge, *Chironomus riparius* upon exposure to nonylphenol and silver nanoparticles. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 33, n. 1, p.98-106, Jan. 2012.

NAIR, P. M. G. *et al.* Differential expression of ribosomal protein gene, gonadotrophin releasing hormone gene and Balbiani ring protein gene in silver nanoparticles exposed *Chironomus riparius*. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 101, n. 1, p.31-37, 17 Jan. 2011.

NAVARRO, E. *et al.* Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. **Ecotoxicology**, Heidelberg, v. 17, n. 5, p.372-386, 7 May 2008.

OECD. **Chironomus sp., acute immobilization test**. Adopted 28 July 2011. 17 p. (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, 235).

OECD. **Report of the OECD workshop on environmental hazard/risk assessment**. Paris: OECD, 1995. 96 p. (Environment Monograph n. 92, Guidance Document for Aquatic Effects Assessment).

PARK, S. *et al.* Ecotoxicity of bare and coated silver nanoparticles in the aquatic midge, *Chironomus riparius*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Medford, MA, v. 34, n. 9, p. 2023-2032, 27 Aug. 2015.

PARK, S.; CHOI, J. Genotoxic effects of nonylphenol and bisphenol: a exposure in aquatic biomonitoring species: freshwater crustacean, *Daphnia magna*, and aquatic midge, *Chironomus riparius*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, California, CA, v. 83, n. 4, p.463-468, 28 May 2009.

PUSCEDDU, F. H. **Avaliação ecotoxicológica do fármaco Triclosan para invertebrados de água doce com ênfase em ensaios com sedimento marcado (“spiked sediment”)**. 2009. 126 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Universidade de São Paulo, São Paulo.

RAO, J. V. *et al.* Toxicity of organophosphates on morphology and locomotor behavior in brine shrimp, *Artemia salina*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, US, v. 53, n. 2, p.227-232, Aug. 2007.

REBECHI, D. *et al.* Low malathion concentrations influence metabolism in *Chironomus sancticaroli* (Diptera, Chironomidae) in acute and chronic toxicity tests. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, SP, v. 58, n. 3, p.296-301, set. 2014.

SALES, S. C. M. **Reavaliação ecotoxicológica da qualidade da água e do sedimento do reservatório da Pampulha (MG) e seus principais tributários**. 2009. 120 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

STATGRAPHICS TECHNOLOGIES. Statgraphics Centurion XVII (Version 17.1.04). Herndon, VI: StatPoint Technologies, 2014.

UNITED STATES. Environmental Protection Agency. **Technical overview of ecological risk assessment**: analysis phase: ecological effects characterization. Disponível em:



<www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/technical-overview-ecological-risk-assessment-0>. Acesso em: 28 jun. 2019.

UNITED STATES. Environmental Protection Agency. **Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates**. 2. ed. Washington, D.C.: USEPA, 2000. 213 p. (EPA 600/R-99/064 March 2000).

WARNE, M. S. J.; VAN DAM, R. NOEC and LOEC data should no longer be generated or used. **Australasian Journal of Ecotoxicology**, Medford, MA v. 14, n. 10, p.1-5, Feb. 2008.

YOO-IAM, M.; CHAICHANA, R.; SATAPANAJARU, T. Toxicity, bioaccumulation and biomagnification of silver nanoparticles in green algae (*Chlorella* sp.), water flea (*Moina macrocopa*), blood worm (*Chironomus* spp.) and silver barb (*Barbonymus gonionotus*). **Chemical Speciation & Bioavailability**, Florida, USA, v. 26, n. 4, p.257-265, Jan. 2014.