

Perfil de citotoxicidade da prata coloidal em células de hepatocarcinoma humano (Huh-7)

Cytotoxicity profile of colloidal silver in human hepatocellular carcinoma cells (Huh-7)

Bruno Losi Menna¹, Ljubica Tasic², Marielton dos Passos Cunha³, Marcelo Bispo de Jesus¹

1. Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil. 2. Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil. 3. Departamento de Genética, Evolução, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil.

Resumo

Objetivo: avaliar a citotoxicidade de uma formulação de prata coloidal em células de carcinoma hepatocelular Huh-7. **Métodos:** a formulação foi caracterizada por técnicas complementares, incluindo espalhamento dinâmico de luz (DLS), análise de nanopartículas por rastreamento (NTA) e microscopia eletrônica de transmissão (TEM). A concentração inibitória média (IC50) foi determinada por uma abordagem ortogonal, utilizando o ensaio de MTT e a coloração dupla Hoechst 33342/propídio iodeto (PI). Além disso, foi realizada uma análise de alto conteúdo baseada em microscopia de fluorescência com o ensaio Live Cell Painting. **Resultados:** a caracterização indicou a presença de nanopartículas de prata (AgNPs) e íons de prata na formulação. A avaliação da citotoxicidade revelou valores de IC50 de 0,54 mg/L pelo ensaio de MTT e de 1,13 mg/L pela coloração dupla Hoechst 33342/PI. Observou-se, ainda, que o sobrenadante, enriquecido em íons de prata foi o principal responsável pela toxicidade observada (IC50 = 0,64 mg/L). A análise de alto conteúdo identificou alterações morfológicas no nucléolo como possíveis marcadores moleculares do dano induzido pela formulação. **Conclusão:** nossos dados indicam que a prata coloidal pode representar um risco potencial à saúde humana.

Palavras-chave: nanopartículas de prata; prata coloidal; nanotoxicidade; citotoxicidade; análise de alto conteúdo; perfil fenotípico.

Abstract

Objective: to evaluate the cytotoxicity of a colloidal silver formulation in Huh-7 hepatocellular carcinoma cells. **Methods:** the formulation was characterized using complementary techniques, including dynamic light scattering (DLS), nanoparticle tracking analysis (NTA), and transmission electron microscopy (TEM). The half-maximal inhibitory concentration (IC50) was determined using an orthogonal approach, combining the MTT assay with dual staining using Hoechst 33342/propidium iodide (PI). In addition, a high-content analysis based on fluorescence microscopy was performed using the Live Cell Painting assay. **Results:** physicochemical characterization confirmed the presence of both silver nanoparticles (AgNPs) and silver ions in the formulation. Cytotoxicity evaluation revealed IC50 values of 0.54 mg/L (MTT) and 1.13 mg/L (Hoechst 33342/PI). The supernatant, enriched in silver ions, was identified as the primary contributor to cytotoxicity (IC50 = 0.64 mg/L). High-content analysis detected nucleolar alterations as potential molecular markers of damage induced by the colloidal silver formulation. **Conclusion:** our findings suggest that colloidal silver may pose a potential risk to human health.

Keywords: silver nanoparticles; colloidal silver; nanotoxicity; cytotoxicity; high-content analysis; phenotypic profiling.

INTRODUÇÃO

As nanopartículas de prata (AgNP) têm sido reconhecidas por sua notável atividade antibacteriana desde a Idade Média, o que contribuiu para a sua ampla utilização em diversas áreas, incluindo, por exemplo, a área alimentícia,^{1,2} cosmética³ e médica^{4,5}. A sua facilidade de síntese levou a criação de um produto comercial de uso oral chamado prata coloidal, composto por AgNP e íons de prata (Ag⁺) em um coloide aquoso. Esse produto se encontra disponível em lojas de medicina alternativa e mercados online no Brasil e pode ser adquirido por qualquer pessoa sem a necessidade de receita ou prescrição médica⁶, tendo seu consumo intensificado durante a pandemia do SARS-CoV-2⁷. Contudo, esse aumento no consumo, associado à disseminação de possíveis efeitos terapêuticos da prata coloidal, levanta sérias preocupações quanto a um possível aumento nas intoxicações

causadas pelas AgNP.

O mecanismo de citotoxicidade das AgNP, particularmente a contribuição dos íons Ag⁺ e de Ag⁰ da forma nanométrica, é objeto de intenso debate. Alguns estudos indicam que os efeitos citotóxicos das AgNP são menores quando comparados aos causados pelos íons Ag⁺²⁸, enquanto outros trabalhos sugerem que concentração de íons Ag⁺ não influenciam a citotoxicidade^{9,10}. Apesar dessa discussão, é possível atribuir diferentes mecanismos moleculares às formas da prata nanométrica e iônica. Às AgNP são atribuídos efeitos como a peroxidação lipídica, o estresse proteotóxico e a morte celular por necrose; aos íons Ag⁺ atribuem-se efeitos como aumento dos níveis de H₂O₂, desencadeando estresse oxidativo e levando

Correspondente: Marcelo B. de Jesus. Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-970 Campinas – SP, Brasil, Rua Monteiro Lobato, 255 – Cidade Universitária, Campinas - São Paulo, 13083-862, Brasil. e-mail: dejesus@unicamp.br

Conflito de interesse: Os autores declaram não haver conflito de interesse

Recebido em: 11 Fev 2025; Revisado em: 28 Abr 2025; Aceito em: 4 Maio 2025

2 Citotoxicidade da prata coloidal em células de hepatocarcinoma humano

à morte celular por apoptose⁴¹. Apesar de esses mecanismos terem sido reportados, ainda existem lacunas significativas na literatura sobre o efeito exato dessas espécies em células humanas. Em particular, são escassos os estudos que avaliam os mecanismos de toxicidade das formulações comerciais de prata coloidal, fortalecendo a necessidade urgente de aprofundar os conhecimentos dos riscos associados ao uso dessas formulações.

Neste trabalho, investigamos os perfis citotóxicos de uma formulação comercial de prata coloidal em células de hepatocarcinoma humano (Huh-7). A caracterização físico-química foi realizada por UV-Vis, DLS, NTA e ICP-OES. Posteriormente, avaliamos a citotoxicidade utilizando coloração dupla Hoechst 33342/PI e técnicas avançadas, incluindo análise de alto conteúdo (HCA) baseada em imagem, por meio do ensaio de Live Cell Painting. Essa abordagem permitiu identificar diferenças fenotípicas sutis, contribuindo para a compreensão dos mecanismos de toxicidade e da influência relativa de AgNPs e íons Ag⁺ presentes na formulação.

Métodos

Obtenção da formulação coloidal

Neste estudo, empregou-se uma formulação de prata coloidal da marca Prata Real. De acordo com o rótulo do produto, as características fornecidas pelo fabricante incluem: densidade 13 mg, diâmetro médio de 1 a 10 nm, dose diária recomendada 5 mL, composição água deionizada 220 mL e prata elementar 13 mg, com concentração de 295 µg/5 mL.

Caracterização físico-química da formulação comercial de prata coloidal

A caracterização físico-química da formulação comercial de prata coloidal foi avaliada por diversas técnicas. O espectro de absorção UV-Vis foi obtido na faixa de comprimento de onda de 300 a 700 nm, utilizando o leitor multidetecção híbrido Cytation 5 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

A morfologia das AgNP foi observada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM), utilizando um Microscópio Eletrônico de Transmissão Tecnai G2 Spirit BioTWIN. A amostra da solução de prata coloidal foi colocada na superfície de uma grade de cobre com 200 malhas recobertas com Formvar (*Electron Microscopy Sciences*), seguida de contrastação negativa com acetato de uranila a 1%, sendo, posteriormente, seca antes da análise no microscópio.

O tamanho médio, potencial zeta e polidispersidade das AgNP, presentes na formulação coloidal foram determinadas por DLS, com medições realizadas em triplicata e sem diluição da amostra, utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments) a um ângulo de 90° e temperatura de 25 °C. A distribuição de tamanho e a concentração das AgNP foram obtidas pelo rastreamento de nanopartículas (NTA)

em uma diluição 1:2 (v/v) em água bidestilada, utilizando o equipamento NanoSight NS300 (Malvern). A concentração total de prata na formulação foi quantificada por Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES).

Obtenção do sobrenadante e pellet da formulação comercial

Para os estudos mecanísticos, frações da formulação comercial de prata coloidal foram preparadas por meio de centrifugação, processo que permitiu a obtenção de um pellet, fração enriquecida em nanopartículas, e de um sobrenadante, fração enriquecida em íons Ag⁺. Amostras de 1 mL da formulação foram centrifugadas a 4 °C, a uma força centrífuga de 5200 ×g (RCF), por 40 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi cuidadosamente removido, deixando 500 µL no tubo para preservar o *pellet*, que foi, então, separado, e ambos foram imediatamente utilizados para as análises subsequentes.

Linhagem celular

Foram utilizadas células da linhagem de hepatocarcinoma humano (Huh-7, No. JCRB0403) obtidas da *Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank* (JCRB), Japão. As células foram cultivadas em frascos de cultura com meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), contendo 1% de penicilina e streptomina, e 10% de soro fetal bovino desativado, referido aqui como meio suplementado. Os frascos foram mantidos em estufa, com atmosfera úmida, a 37 °C, com 5% de CO₂ em incubadora Panasonic COM-170AICUVL-PA. Periodicamente, as culturas foram testadas para garantir a ausência de micoplasma. Para isso, as células foram cultivadas durante três dias sem antibióticos e inspecionadas sob microscopia de fluorescência, utilizando o método de coloração direta de DNA com Hoechst 33342 (1 µmol L⁻¹, Invitrogen, EUA).

Plaqueamento celular

O plaqueamento celular foi realizado em uma densidade de 7500 células/poço em placas de 96 poços, utilizando meio DMEM suplementado. As células plaqueadas na placa foram incubadas a 37 °C, com 5% de CO₂ por 24 h antes do tratamento (Forma Scientific, EUA).

Avaliação da citotoxicidade

Determinação do IC₅₀

Para a determinação do IC₅₀ da formulação coloidal, diluições seriadas foram preparadas em uma razão de 1:2 (v/v), em que, a cada diluição, uma alíquota da solução foi diluída em meio DMEM não suplementado, resultando em concentrações que variaram de 0,15 a 9,7 mg/L de prata. As células permaneceram expostas por 24 h, sendo incubadas a 37 °C e 5% de CO₂. Como controle negativo, foram utilizados poços incubados com lactose (0,34 mg/mL), e, como controle positivo, foram incubadas com amiodarona (10 mmol L⁻¹).

As células foram incubadas com o sobrenadante, fração

3 Citotoxicidade da prata coloidal em células de hepatocarcinoma humano

enriquecida em íons Ag^+ , em volumes correspondentes a concentrações que variaram de 0,15 a 9,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AgNP na formulação original, e pellet, fração enriquecida em AgNPs, em volumes correspondentes a concentrações que variaram de 0,30 a 19,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AgNP na formulação original. Após a incubação, as células foram mantidas na estufa a 37 °C e 5% de CO_2 por 24h. As concentrações foram produzidas por diluição seriada, como descrito acima. Tanto os tratamentos seguintes com os IC50 quanto os controles foram diluídos em meio DMEM suplementado. Após a incubação, as células foram mantidas na estufa a 37 °C e 5% de CO_2 por 24 h.

Ensaio de viabilidade celular

Ensaio de viabilidade celular por MTT

Após 24h de incubação, foram adicionados 20 μL da solução de MTT (1 mg/mL, Sigma-Aldrich, EUA) em cada poço e incubou-se a 37 °C com 5% de CO_2 por 2,5h. Em seguida, o meio foi substituído por 100 μL de solvente orgânico (DMSO) para solubilizar o formazan formado. As placas foram agitadas por 15 min, e a absorbância foi aferida a $\lambda = 570$ nm, usando o leitor de microplacas VERSAmix (Molecular Devices, CA, USA).

Ensaio de viabilidade celular por dupla marcação de Iodeto de Propídio/ Hoechst 33342

Para o ensaio de viabilidade celular por dupla marcação de Iodeto de Propídio (PI) e Hoechst 33342, 24h após a incubação, foram adicionados, em cada poço, 50 μL de uma solução de marcação contendo Hoechst 33342 (1 μmol L-1, Thermo Fisher Scientific) e PI (1 μmol L-1, Thermo Fisher Scientific) em meio FluoroBrite™ DMEM (Gibco, USA) não suplementado. As células foram incubadas por 40 min a 37 °C com 5% de CO_2 . Após a incubação, a fluorescência foi lida, e as imagens foram adquiridas usando o Leitor Multidetecção Híbrido Cytation 5 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). Foram adquiridas 10 imagens por poço, utilizando a objetiva de 10× com os cubos DAPI ($\lambda_{\text{Ex/Em}} = 377/447$) e PI d ($\lambda_{\text{Ex/Em}} = 531/647$).

Ensaio do Live Cell Painting

O ensaio do *Live Cell Painting* é uma análise de alto conteúdo (High content imaging) baseada em imagens de células vivas, marcadas com o corante laranja de acridina (AO, sigla do inglês acridine orange)¹². Este corante possui a propriedade de metacromasia, permitindo a visualização do citoplasma e do material genético das células, como a dupla hélice do DNA, no canal verde, e vesículas ácidas (endossomos tardios e lisossomos) no canal vermelho. Para realizar o ensaio, as células foram incubadas com o IC50 da formulação e do sobrenadante a 37 °C e 5% de CO_2 , por 24 h. Após a exposição, as células foram marcadas com AO (20 μM) em meio DMEM não suplementado e incubadas a 37 °C e 5% de CO_2 10 min. Em seguida, o meio foi substituído por 100 μL FluoroBrite™ DMEM (Gibco, USA) suplementado, e as imagens foram adquiridas usando uma objetiva de 20× em 10 sítios diferentes por poço, usando o Leitor Multidetecção Híbrido Cytation 5 (BioTek Instruments,

Inc., Winooski, VT, USA). Foram usados os cubos GFP ($\lambda_{\text{Ex/Em}} = 469/525$) e PI ($\lambda_{\text{Ex/Em}} = 531/647$). Os períodos de exposição, a intensidade do LED e os parâmetros de ganho foram ajustados e permaneceram constantes ao longo de todo o processo de aquisição de imagens.

Análise de imagens

Obtenção e tratamento de dados

A análise de alto conteúdo utilizada neste artigo seguiu o fluxo de trabalho (pipeline) demonstrado na figura 1S ([material suplementar](#)). As ferramentas desempenham funções distintas e complementares, como a identificação e caracterização precisas das células e compartimentos intracelulares, além da manipulação dos dados para remover artefatos experimentais e melhorar a qualidade da análise.

Após o tratamento e a aquisição das imagens descritos anteriormente, as imagens foram primeiramente submetidas a um controle de qualidade utilizando o software CellProfiler Analyst¹³. Nesse processo, um modelo foi treinado para identificar imagens sem relevância ou significado biológico (e.g., imagens fora de foco, com intensidade fora da escala de fluorescência ou contendo artefatos). Em seguida, as imagens passaram por um pipeline de análises no software CellProfiler¹⁴, que excluiu as imagens identificadas no processo anterior. O pipeline do CellProfiler usa módulo do Cellpose¹⁵, ferramenta baseada em deep learning, usada para a segmentação (i.e., identificação) do núcleo das células, a partir do qual é expandido o contorno das células (figura 1S). Após identificar núcleo e citoplasma, outros módulos do CellProfiler foram usados para extrair características como intensidade, textura, granulação, forma e tamanho em cada célula. Esses dados foram, então, armazenados em um arquivo formato .csv, com as linhas representando as células, e as colunas as características (*features*) de cada célula, e, ao final desse processo, obtivemos uma tabela de dados contendo 3251 colunas.

Essa tabela de dados foi processada usando o pacote Pycytominer¹⁶, que foi usado para agregar, normalizar e selecionar as *features* das células. Foram excluídas *features* sem variância e as altamente correlacionadas (coeficiente de correlação acima de 0,9). Além disso, o pacote foi utilizado para combinar informações de diferentes células e normalizar os dados¹⁷. Ao final desse processo de filtragem, obtivemos uma tabela de dados contendo 522 colunas. Por fim, o PyComBat foi utilizado para remover o efeito de lote (*batch effect*) nos dados¹⁸.

Processamento de dados

Para análise dos dados coletados, foram utilizados os algoritmos Análise Discriminante Linear (LDA, do inglês *Linear Discriminant Analysis*) e Random Forest. O LDA foi aplicado com o objetivo de maximizar a separação entre os grupos e identificar as variáveis mais discriminativas¹⁹. Em paralelo, foi utilizado o algoritmo Random Forest, uma técnica baseada em árvores

4 Citotoxicidade da prata coloidal em células de hepatocarcinoma humano

de decisão que constrói múltiplos modelos independentes e combina seus resultados²⁰, e, a partir desse modelo, as variáveis mais relevantes foram selecionadas com base na importância média das variáveis ao longo das árvores. Essas variáveis foram organizadas em categorias funcionais: núcleo, citoplasma e célula, e também classificadas de acordo com o tipo de variável, como área e formato (*AreaShape*), textura (*Texture*), granularidade (*Granularity*), correlação (*Correlation*), distribuição radial (*RadialDistribution*), intensidade (*Intensity*) e vizinhança (*Neighbors*). Após a aplicação dos algoritmos LDA e do Random Forest, foi realizada uma análise para identificar as variáveis mais importantes em cada um dos algoritmos (*feature importance*). Em particular, foi dado foco às 50 variáveis mais relevantes de cada abordagem, buscando entender quais delas eram comuns entre os dois métodos.

Análise Estatística dos resultados

Os resultados de viabilidade celular foram analisados utilizando o software GraphPad PRISM (versão 8), por meio de regressão linear no modo “log(inibidor) vs. resposta – declive variável (quatro parâmetros)”. As análises de alto conteúdo baseadas em imagem foram realizadas no ambiente Jupyter Notebook, acessado por meio do Visual Studio Code. Para verificar a distribuição dos dados, utilizamos o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. A homogeneidade das variâncias foi avaliada pelo teste de Levene. Caso os dados apresentassem distribuição normal e variâncias homogêneas, aplicamos a Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey. Quando as suposições de normalidade ou homogeneidade não foram atendidas, optamos pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn para comparações múltiplas. Para todas as análises, foi considerado

estatisticamente significativo o valor de p inferior a 0,05.

Os testes de Shapiro-Wilk, Levene, ANOVA e Kruskal-Wallis foram realizados com o pacote *scipy* (versão 1.13.1). Para o teste de Tukey, utilizamos o pacote *statsmodels* (versão 0.14.2), e o teste de Dunn foi executado com o pacote *scikit-posthocs* (versão 0.9.0).

RESULTADOS

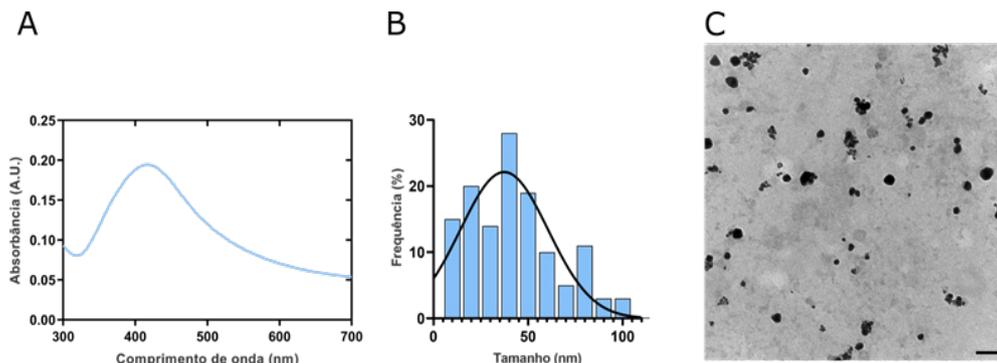
Caracterização físico-química da formulação comercial de prata coloidal

A caracterização físico-química da formulação usando a técnica de UV-Vis revelou uma banda plasmônica bem definida, com absorção máxima entre 414 e 420 nm (figura 1A), sugerindo a presença de nanopartículas de prata (AgNP) (figura 1C). Para detalhar o tamanho das nanopartículas, foram usadas as técnicas de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA) (tabela 1). E, para avaliar a morfologia da formulação, foi usada a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET, Figura 1B, C). Tanto o DLS ($122,39 \pm 8,07$ nm) quanto a NTA ($97,8 \pm 2,9$ nm) indicaram um tamanho médio de cerca 100 nm, enquanto a MET revelou partículas menores ($44,9 \pm 23,1$ nm) (figura 1B e C). A formulação apresentou-se relativamente homogênea, conforme sugerido pela análise de imagem de TEM e confirmada pelos valores de PDI ($\sim 0,3$) e SPAN (~ 1) (tabela 1). O potencial zeta medido foi de -15 mV. A concentração de nanopartículas foi estimada em 2×10^9 partículas/mL, e a concentração de prata na amostra foi determinada em $19,4$ mg/L por ICP-OES. Esses resultados confirmaram que a formulação comercial de prata coloidal é composta por nanopartículas de prata.

Tabela 1. Características físico-químicas da formulação comercial de prata coloidal determinadas pelas técnicas DLS e NTA

Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)		Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)	
Diâmetro hidrodinâmico	122 ± 8 nm	Tamanho	98 ± 3 nm
PDI	$0,32 \pm 0,04$	Span	1,08
Potencial Zeta	$-15,5 \pm 0,9$	Concentração	$2,24 \times 10^9 \pm 4,04 \times 10^8$ partículas/mL

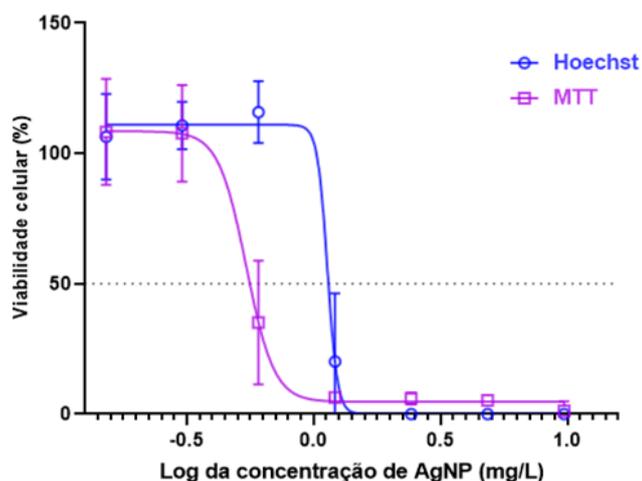
Figura 1. Características físico-químicas das nanopartículas contidas na Prata Real. (A) UV-Vis. (B) Distribuição do tamanho das AgNP. (C) Imagem adquirida por microscopia eletrônica de transmissão, em escala de 100 nm (aumento de 23,000).



Perfil citotóxico

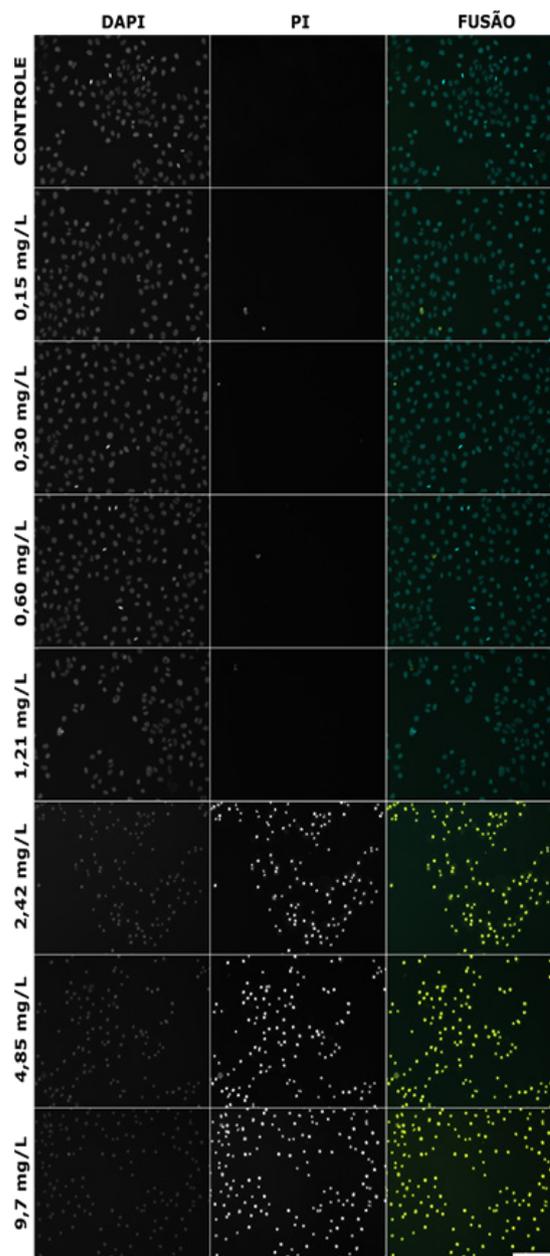
A viabilidade celular em presença da formulação de prata coloidal comercial foi estimada utilizando dois métodos ortogonais, o ensaio de MTT e a dupla marcação de PI/Hoechst, para aumentar a robustez dos dados (figura 2). Os valores de IC50, que representam a dose responsável pela redução de 50% da viabilidade celular, foram de 0,54 mg/L (R²: 0,940) pelo ensaio de MTT e 1,13 mg/L (R²: 0,959) pelo método de dupla marcação de PI/Hoechst (figura 2). Além disso, o ensaio de dupla marcação permitiu uma avaliação morfológica do núcleo nas células expostas à formulação comercial de prata coloidal (figura 3). Nas células controle, os núcleos apresentam uma morfologia, predominantemente, de intensidade de fluorescência baixa, caracterizando as células em interfase, além de apresentar alguns núcleos menores, mais intensos, condensados e alongados, característicos de células em divisão. A inspeção visual indicou que esse padrão de células saudáveis foi mantido até concentrações de 1,21 mg/L de prata coloidal. No entanto, após a exposição a concentrações maiores, observou-se intensa condensação nuclear, com manutenção da forma arredondada, distinta das células em divisão, sugerindo morte celular, corroborada a marcação com PI (evidenciada na coluna fusão). Esses resultados indicam que a formulação comercial de prata coloidal exibe citotoxicidade de forma dose-dependente.

Figura 2. Determinação do IC50 para células Huh-7 tratadas com formulação comercial de prata coloidal utilizando o ensaio de MTT e dupla marcação de PI/Hoechst.



Legend: Células foram incubadas com concentrações crescentes de prata coloidal (0,15–9,7 mg/L) por 24 h. Cada valor representa a média ± DP de três experimentos independentes, cada um com três replicatas experimentais (n = 3). A viabilidade das células não tratadas foi estabelecida como 100%. Os valores de IC50 foram determinados utilizando o software GraphPad Prism.

Figura 3. Imagens representativas do ensaio de dupla marcação de PI/Hoechst em células de Huh-7 na presença da prata coloidal, obtidas por microscopia de fluorescência no Cytation 5.

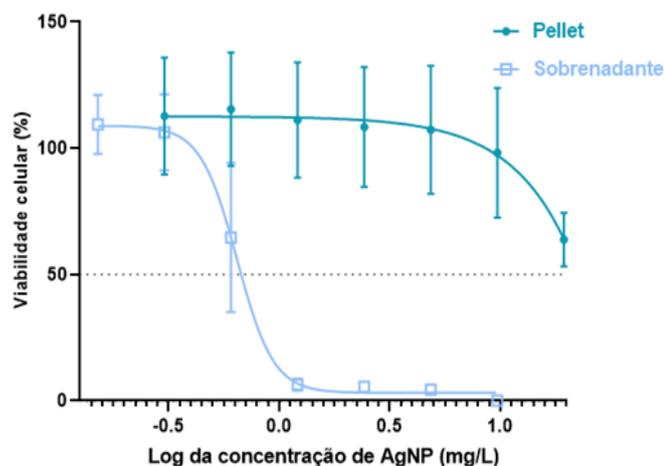


Legend: As imagens foram adquiridas com a objetiva de 10x. As linhas representam um dos poços tratados com o controle contendo meio DMEM suplementado ou uma das concentrações de prata coloidal. As colunas representam, respectivamente, imagens do corante Hoechst 33342 obtidas no canal DAPI, imagens no filtro PI, células (núcleos) coradas com Iodeto de Propídio (células não viáveis, com danos à membrana plasmática), e imagens da fusão dos dois filtros: DAPI e PI. Barra de escala = 200 µm.

6 Citotoxicidade da prata coloidal em células de hepatocarcinoma humano

A formulação estudada neste trabalho demonstrou uma alta toxicidade em comparação com outras pesquisas utilizando AgNP com tamanho igual ou inferior a 100 nm²¹⁻²³. Por meio desses resultados, hipotetizamos a possibilidade da formulação conter íons de prata, os quais estariam contribuindo para a citotoxicidade. Para investigar essa hipótese, realizamos a separação do sobrenadante e do *pellet* através da centrifugação das amostras e testamos a toxicidade de cada fração. Utilizando o ensaio de MTT (figura 4), obtivemos um IC₅₀ de 0,645 mg/L (R²: 0,9463) para o sobrenadante, enquanto não foi possível determinar o IC₅₀ para o *pellet*. Esses resultados indicam que o sobrenadante, que contém predominantemente íons, apresenta uma toxicidade significativamente maior em comparação ao *pellet*, composto principalmente por AgNP.

Figura 4. Determinação do IC₅₀ de células Huh-7 expostas ao *pellet* e sobrenadante da formulação de prata coloidal.



Legend: Ensaio de MTT em células tratadas com o sobrenadante e *pellet* da Prata Real. Células foram incubadas com concentrações crescentes de sobrenadante (0,15–9,7 mg/L) e *pellet* (0,30–19,4 mg/L) por 24 h. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A viabilidade das células não tratadas foi estabelecida como 100%. A obtenção dos valores de IC₅₀ foi realizada utilizando o software GraphPad Prism.

Perfil fenotípico

Usando o ensaio do *Live Cell Painting*, foi traçado o perfil fenotípico das células, utilizando métricas relativas aos núcleos, nucléolos, citoplasma e vesículas ácidas. A LDA foi usada para reduzir a dimensionalidade dos dados e agrupar as amostras de acordo com os tratamentos (classes) (figura 2SA). É possível observar uma sobreposição parcial dos grupos formados pelas células do controle não tratado e o controle negativo (lactose), além de um agrupamento (*cluster*) referente ao controle positivo (amiodarona). Esses dados demonstram que o perfil fenotípico separou, de forma correta, os controles, negativo e positivo. No caso dos tratamentos, a formulação de prata coloidal formou outro grupo independente, sugerindo que os efeitos da prata coloidal diferem da citotoxicidade induzida pela amiodarona. Além disso, os resultados da LDA revelaram

uma sobreposição parcial entre as células tratadas com o sobrenadante da formulação da prata coloidal e de células não tratadas, sugerindo que a parte da população celular Huh-7 tratada com o sobrenadante apresentou um fenótipo que pouco difere das células controle. Os agrupamentos foram avaliados usando uma matriz de confusão e a distância entre os centroides (figuras 2S e 3S). Isso pode indicar que as células afetadas pelo tratamento já tenham sofrido morte celular durante as 24h de tratamento, e, dessa forma, assemelham-se ao controle por não apresentarem mais danos evidentes.

Na etapa seguinte, utilizamos os dados do perfil fenotípico para determinar detalhes sobre o mecanismo de toxicidade induzido pela prata coloidal. Usando o LDA, selecionamos as 10 principais variáveis (figura 4S), entre as quais o núcleo foi o principal responsável pela separação dos grupos, totalizando 53,33% das variáveis obtidas. O *Random Forest* selecionou 309 das 517 variáveis originais que explicavam 95% da variação total (figura 5SA), tendo uma acurácia de 0,8 (figura 5SB). Essas variáveis foram organizadas de acordo com suas localizações funcionais: núcleo, citoplasma e célula (figura 6SA). Dentro dessas categorias, foi feita uma subdivisão adicional que mostrou que o nucléolo foi o mais alterado, com predominância de alterações relacionadas à forma e à área (figura 6SC e 7S), achado reforçado pelas principais features selecionadas pelo LDA e *Random Forest* (figura 8SA).

DISCUSSÃO

Dado o uso crescente e a facilidade de acesso à prata coloidal, frequentemente adquirida sem regulamentação ou orientação médica adequada, buscamos avaliar seus possíveis efeitos citotóxicos, visando aos riscos à saúde associados ao consumo dessas formulações. Os resultados deste estudo indicam que a toxicidade observada nas formulações de prata coloidal está fortemente relacionada à presença de íons Ag⁺. Observamos que o sobrenadante, rico em Ag⁺, apresentou toxicidade significativamente maior em comparação ao *pellet*, que contém, predominantemente, AgNPs. Esses achados sugerem que os íons de prata desempenham um papel central nos efeitos citotóxicos observados. Esse comportamento está alinhado com estudos prévios que destacam a contribuição crítica de Ag⁺ para as respostas toxicológicas em diversos modelos experimentais, frequentemente excedendo os efeitos atribuídos unicamente às AgNPs²⁴⁻²⁶. A presença não declarada desses íons Ag⁺ em produtos comercializados como nanopartículas puras levanta preocupações sobre rotulagem e aumenta os riscos à saúde, especialmente em produtos vendidos sem uma regulamentação adequada.

Outro aspecto crítico na avaliação da segurança das formulações de prata coloidal é a alta variabilidade entre os produtos disponíveis comercialmente⁷. Diferenças no tamanho e na concentração de AgNPs dificultam a padronização e a comparação dos resultados em diferentes estudos. Em nossos experimentos, a formulação testada revelou AgNPs com tamanhos variados, diferindo significativamente das informações indicadas na

7 Citotoxicidade da prata coloidal em células de hepatocarcinoma humano

rotulagem do produto. Essa heterogeneidade pode levar a respostas biológicas distintas, variando de acordo com a marca do produto. É amplamente reconhecido que nanopartículas menores tendem a ser mais tóxicas devido à maior área de superfície e reatividade química^{27,28}. Além disso, as diferenças nas concentrações efetivas de prata ingerida, muitas vezes não informadas nos rótulos, representam um risco adicional ao consumidor, reforçando a necessidade de uma regulamentação mais rigorosa e transparente.

Nós demonstramos que a determinação do perfil fenotípico baseado em imagens de microscopia de fluorescência, nesse caso usando o ensaio do *Live Cell Painting*, constitui uma ferramenta eficaz e muito informativa, possibilitando uma avaliação detalhada das alterações morfológicas e funcionais nas células expostas a nanopartículas de prata coloidal. Como foi observado, uma das principais alterações foi no tamanho e na forma do nucléolo, podendo ser indicativos de mudanças significativas no metabolismo celular. O aumento no tamanho dos nucléolos está frequentemente associado a uma síntese ribossomal aumentada, o que sugere uma maior atividade de transcrição de RNA ribossômico²⁹. Alterações no tamanho dos nucléolos podem, portanto, servir como indicadores importantes de senescência celular, desregulação da expressão gênica e reorganização da estrutura da cromatina³⁰. Dessa forma, foram identificadas estruturas celulares que caracterizam os efeitos moleculares causados pela prata coloidal, e esses achados podem ser usados para detectar alterações mesmo em baixas concentrações de prata coloidal.

CONCLUSÕES

Nossos resultados indicam que a formulação de prata coloidal apresenta níveis de toxicidade preocupantes. Além disso, demonstramos que o sobrenadante é o maior responsável pelos efeitos citotóxicos, sugerindo que sejam causados pelos íons

de Ag⁺. A análise de alto conteúdo usando o método do Live Cell Painting identificou o nucléolo como um possível marcador molecular da citotoxicidade causada por essa formulação. Isso sugere que esse método pode ser uma ferramenta promissora para monitorar as respostas celulares e explorar mecanismos de ação de nanopartículas, abrindo portas para novas perguntas biológicas e ideias de abordagens experimentais. Embora nosso estudo tenha revelado importantes aspectos sobre os efeitos citotóxicos da prata coloidal, ainda há diversas áreas que necessitam de investigações mais aprofundadas, como ensaios em modelos mais complexos e eventualmente em humanos, levando em consideração que algumas pessoas têm uma exposição prolongada a essas formulações. Por fim, os achados deste estudo reforçam a necessidade de regulamentação mais rigorosa, considerando os riscos potenciais associados ao uso dessas formulações no consumo humano.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processos nº 2023/06143-0 e 2020/01218-3), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pelo Fundo de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão – FAEPEX – UNICAMP (processos nº 2633/17, 2421/20, 2237/21, 2178/22 e 2534/23).

DISPONIBILIDADE DOS DADOS

Os dados que fundamentam este estudo estão disponíveis no Repositório de Dados de Pesquisa da Unicamp, acessível em <https://doi.org/10.25824/redu/NJWOBD>, sob o número de referência NJWOBD (Menna, Bruno Losi; de Jesus, Marcelo Bispo, 2025, High content analysis of colloidal silver in Huh-7 cells, V1).

REFERÊNCIAS

1. Chaudhry Q, Scotter M, Blackburn J, Ross B, Boxall A, Castle L, et al. Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 2008 Mar; 25(3): 241-58. doi: 10.1080/02652030701744538.
2. Morais LO, Macedo EV, Granjeiro JM, Delgado IF. Critical evaluation of migration studies of silver nanoparticles present in food packaging a systematic review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2020; 60(18): 3083-102. doi: 10.1080/10408398.2019.1676699.
3. Ong WTJ, Nyam KL. Evaluation of silver nanoparticles in cosmeceutical and potential biosafety complications. *Saudi J Biol Sci*. 2022 Apr; 29(4): 2085-94. doi: 10.1016/j.sjbs.2022.01.035.
4. Durán N, Durán M, de Jesus MB, Seabra AB, Fávoro WJ, Nakazato G. Silver nanoparticles a new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine*. 2016; 12(3): 789-99.
5. Gherasim O, Puiu RA, Bîrcă AC, Burduşel AC, Grumezescu AM. An updated review on silver nanoparticles in biomedicine. *Nanomaterials (Basel)*. 2020; 10(11): 2318.
6. Griffith RD, Simmons BJ, Yazdani Abyaneh MA, Bray FN, Falto-Aizpurua LA, Nouri K. Colloidal silver dangerous and readily available. *JAMA Dermatol*. 2015 Jun; 151(6): 667-8. doi: 10.1001/jamadermatol.2015.120.
7. Kumar A, Goia DV. Comparative analysis of commercial colloidal silver products. *Int J Nanomedicine*. 2020 Dec; 15: 10425–34. doi: 10.2147/IJN.S287730.
8. Smith JN, Thomas DG, Jolley H, Kodali VK, Littke MH, Munusamy P, et al. All that is silver is not toxic: silver ion and particle kinetics reveals the role of silver ion aging and dosimetry on the toxicity of silver nanoparticles. *Part Fibre Toxicol*. 2018 Dec; 15(1): 47. doi: 10.1186/s12989-018-0283-z.
9. Eom HJ, Choi J. p38 MAPK activation, DNA damage, cell cycle arrest and apoptosis as mechanisms of toxicity of silver nanoparticles in Jurkat T cells. *Environ Sci Technol*. 2010 Nov; 44(21): 8337–42. doi: 10.1021/es1020668.
10. Kim S, Choi JE, Choi J, Chung K-H, Park K, Yi J, et al. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicol In Vitro*. 2009 Sep; 23(6): 1076–84. doi: 10.1016/j.tiv.2009.06.001.
11. Rohde MM, Snyder CM, Sloop J, Solst SR, Donati GL, Spitz DR, et al. The mechanism of cell death induced by silver nanoparticles is distinct from silver cations. *Part Fibre Toxicol*. 2021 Oct; 18(1): 37. doi: 10.1186/s12989-021-00430-

8 Citotoxicidade da prata coloidal em células de hepatocarcinoma humano

12. Garcia-Fossa F, Moraes-Lacerda T, Rodrigues-da-Silva M, Diaz-Rohrer B, Singh S, Carpenter AE, et al. Live Cell Painting: image-based profiling in live cells using Acridine Orange. *Mol Bio Cell*. 2025 Jul; 36(7). doi: <https://doi.org/10.1091/mbc.E24-07-0308>.
13. Dao D, Fraser AN, Hung J, Ljosa V, Singh S, Carpenter AE. CellProfiler Analyst: interactive data exploration, analysis and classification of large biological image sets. *Bioinformatics*. 2016 Oct; 32(20): 3210–3212. doi: [10.1093/bioinformatics/btw390](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw390).
14. Stirling DR, Swain-Bowden MJ, Lucas AM, Carpenter AE, Cimini BA, Goodman A. CellProfiler 4: improvements in speed, utility and usability. *BMC bioinformatics*. 2021 Sep; 22(1): 433. doi: [10.1186/s12859-021-04344-9](https://doi.org/10.1186/s12859-021-04344-9).
15. Pachitariu M, Stringer C. Cellpose 2.0: how to train your own model. *Nat Methods*. 2022 Dec; 19(12): 1634–1641. doi: [10.1038/s41592-022-01663-4](https://doi.org/10.1038/s41592-022-01663-4).
16. Serrano E, Chandrasekaran SN, Bunten D, Brewer KI, Tomkinson J, Kern R, et al. Reproducible image-based profiling with Pycytominer. *Nat Methods*. 2025 Apr; 22(4): 677–680. doi: [10.1038/s41592-025-02611-8](https://doi.org/10.1038/s41592-025-02611-8).
17. Garcia-Fossa F, Cruz MC, Haghighi M, de Jesus MB, Singh S, Carpenter AE, et al. Interpreting image-based profiles using similarity clustering and single-cell visualization. *Curr Protoc*. 2023 Mar; 3(3): e713. doi: [10.1002/cpz1.713](https://doi.org/10.1002/cpz1.713).
18. Behdenna A, Colange M, Haziza J, Gema A, Appé G, Azencott CA, Nordor A. pyComBat, a Python tool for batch effects correction in high-throughput molecular data using empirical Bayes methods. *BMC Bioinformatics*. 2023 Dec; 24(1): 459. doi: [10.1186/s12859-023-05578-5](https://doi.org/10.1186/s12859-023-05578-5).
19. Fisher EM. Linear Discriminant Analysis. *Statistics & Discrete Methods of Data Sciences*. 1936; 392: 1–5.
20. Breiman L. Random Forests. *Machine Learning*. 2001 Oct; 45: 5–32.
21. Aueviriyavit S, Phummiratch D, Maniratanachote R. Mechanistic study on the biological effects of silver and gold nanoparticles in Caco-2 cells – Induction of the Nrf2/HO-1 pathway by high concentrations of silver nanoparticles. *Toxicol Lett*. 2014; 224(1): 73–83. doi: [10.1016/j.toxlet.2013.09.020](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.09.020).
22. Fageria L, Pareek V, Dilip RV, Bhargava A, Pasha SS, Laskar IR, et al. Biosynthesized Protein-Capped Silver Nanoparticles Induce ROS-Dependent Proapoptotic Signals and Prosurvival Autophagy in Cancer Cells. *ACS omega*. 2017; 2(4): 1489–1504. doi: [10.1021/acsomega.7b00045](https://doi.org/10.1021/acsomega.7b00045).
23. Zielinska E, Zauszkiewicz-Pawlak A, Wojcik M, Inkielewicz-Stepniak I. Silver nanoparticles of different sizes induce a mixed type of programmed cell death in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2017 Nov; 9(4): 4675–4697. doi: [10.18632/oncotarget.22563](https://doi.org/10.18632/oncotarget.22563).
24. Miura N, Shinohara Y. Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticles in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Dec; 390(3): 733–737.
25. Li P-W, Kuo T-H, Chang J-H, Yeh J-M, Chan W-H. Induction of cytotoxicity and apoptosis in mouse blastocysts by silver nanoparticles. *Toxicol Lett*. 2010 Aug; 197(2): 82–87. doi: [10.1016/j.toxlet.2010.05.003](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.05.003).
26. Milić M, Leitinger G, Pavičić I, Zebić Avdičević M, Dobrović S, Goessler W, et al. Cellular uptake and toxicity effects of silver nanoparticles in mammalian kidney cells. *J Appl Toxicol*. 2015 Jun; 35(6): 581–592. doi: [10.1002/jat.3081](https://doi.org/10.1002/jat.3081).
27. Gliga AR, Skoglund S, Wallinder IO, Fadeel B, Karlsson HL. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Part Fibre Toxicol*. 2014 Feb; 11:11. doi: [10.1186/1743-8977-11-11](https://doi.org/10.1186/1743-8977-11-11).
28. Zhang B, Liu N, Liu QS, Zhang J, Zhou Q, Jiang G. Silver nanoparticles induce size-dependent and particle-specific neurotoxicity to primary cultures of rat cerebral cortical neurons. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2020 Jul; 198: 110674. doi: [10.1016/j.ecoenv.2020.110674](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110674).
29. Montanaro L, Treré D, Derenzini M. Nucleolus, ribosomes, and cancer. *Am J Pathol*. 2008; 173(2): 301–310. doi: [10.2353/ajpath.2008.070752](https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070752).
30. Bahadori M. New Insights into Connection of Nucleolar Functions and Cancer. *Tanaffos*. 2019 Mar; 18(3): 173–179.

Como citar este artigo/ How to cite this article:

Menna BL, Tasic L, Cunha MP, de Jesus MB. Perfil de citotoxicidade da prata coloidal em células de hepatocarcinoma humano (Huh-7). *J Health Biol Sci*. 2025; 13(1): e5727.