

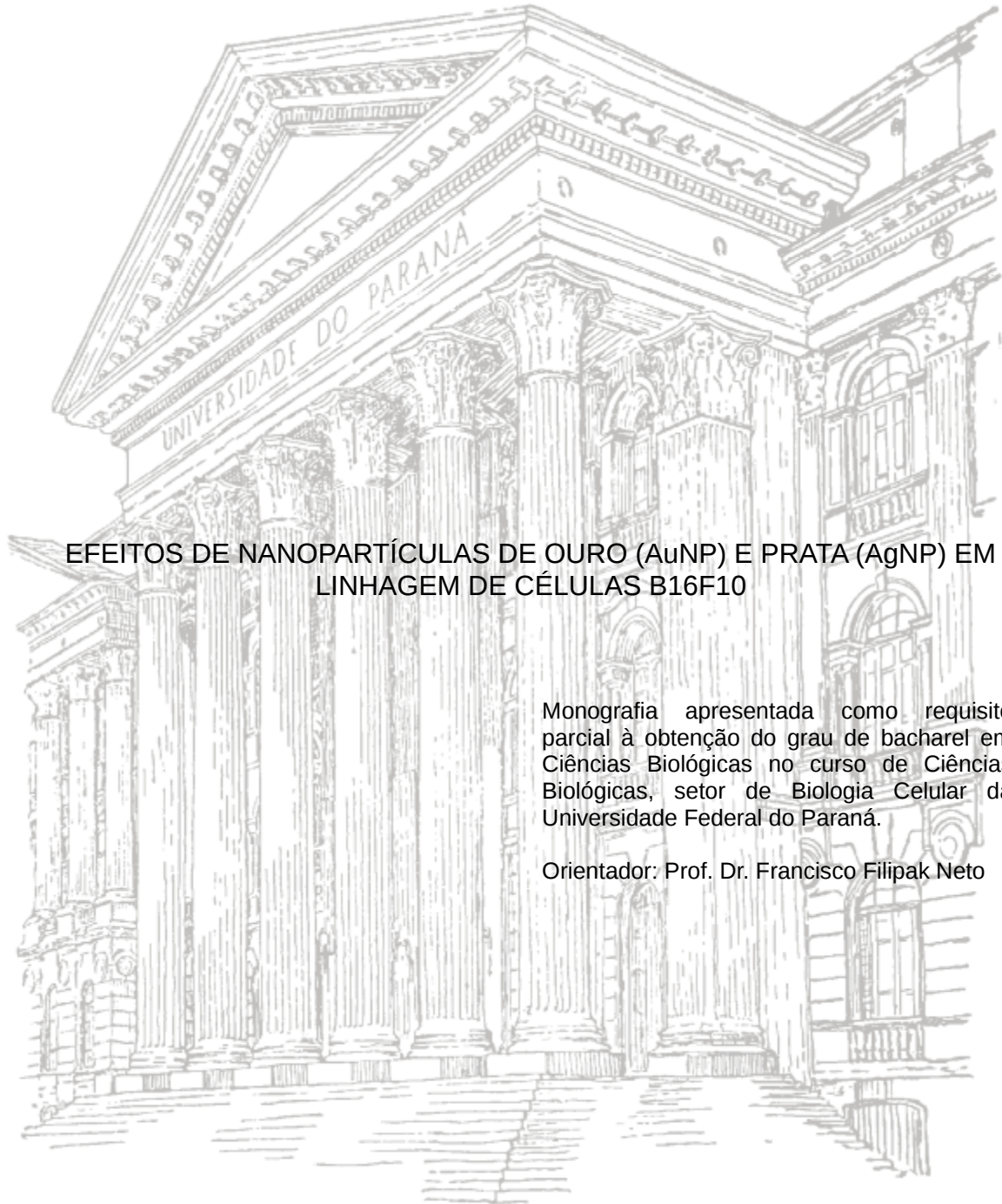
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JESSICA ZABLOCKI DA LUZ

EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS DE OURO (AuNP) E PRATA (AgNP) EM
LINHAGEM DE CÉLULAS B16F10

CURITIBA
2016

JESSICA ZABLOCKI DA LUZ



EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS DE OURO (AuNP) E PRATA (AgNP) EM LINHAGEM DE CÉLULAS B16F10

Monografia apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas no curso de Ciências Biológicas, setor de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Filipak Neto

CURITIBA
2016

AGRADECIMENTOS

Ao meu professor e orientador Francisco por me aprovar na seleção de Iniciação Científica e me orientar durante os últimos dois anos com muita dedicação, sendo para mim o maior exemplo de conduta na pesquisa.

Às mestras Yvanna e Andressa por me ensinarem com muita dedicação e carinho as técnicas de cultivo celular e a toda equipe do Laboratório de Toxicologia Celular pela colaboração.

Ao mestre Daniel do Laboratório de Investigação de Polissacarídeos Sulfatados por conceder as células utilizadas nos experimentos.

Aos meus pais Marlei e Hélia por construírem juntos a nossa família, com ideais e valores que foram os maiores responsáveis pelo que eu e meus irmãos/melhores amigos, Janaina e Eliton, somos hoje.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Programa de Benefícios Econômicos para Manutenção aos Estudantes de Graduação e Ensino Profissionalizante da Universidade Federal do Paraná (PROBEM) pelo apoio financeiro.

Ao Lar da Acadêmica de Curitiba (LAC) por ser minha casa nesse último ano e por me proporcionar conhecer pessoas incríveis.

Aos amigos Jeniffer, Helyandra, Carlos, Juliana e Karine por todos os bons (e às vezes difíceis) momentos vividos juntos nesses últimos seis anos de graduação.

*The most exciting phrase to hear in science,
the one that heralds new discoveries, is not
'Eureka!' but 'That's funny...'*

Isaac Asimov

RESUMO

Nanopartículas (NPs) têm sido produzidas em larga escala devido ao grande avanço da nanotecnologia nos últimos anos. NPs de prata (AgNP) e ouro (AuNP) são amplamente utilizadas para fins industriais e biomédicos. As AgNP destacam-se por sua atividade antimicrobiana e as AuNP são usadas para fins estéticos e terapêuticos. Contudo, estudos têm mostrado que essas moléculas podem iniciar toxicidade ao nível subcelular, celular e tecidual em diversos modelos experimentais. O melanoma cutâneo é um tipo de câncer ocasionado pela transformação de melanócitos, representando 4% das neoplasias malignas de pele no Brasil. Embora a incidência não seja alta, o melanoma apresenta alta capacidade metastática. As AgNP e AuNP são empregadas em muitos produtos que são aplicados diretamente sobre a pele, como bandagens e cosméticos, mas há poucos estudos do efeito destas NPs sobre células tumorais, como as de melanoma. Assim, este estudo objetivou determinar os efeitos das AgNP e AuNP sobre a malignidade de células de melanoma murino B16F10, através das análises de Ciclo celular, Morte Celular e *Scratch*. As células foram cultivadas em meio DMEM, alta glicose, com 10% de soro fetal bovino e antibióticos, a 37°C e 5% pCO₂. Para exposição, o meio de cultura foi substituído por novo meio contendo 10 e 100 ng.ml⁻¹ de AuNP e AgNP e as células foram mantidas sob as mesmas condições durante 24 e 48 h. Após exposição, as células foram fixadas em etanol 70%, incubadas com Iodeto de propídio (PI) e analisadas em citometria de fluxo para o ensaio de Ciclo Celular. Para o ensaio de Morte Celular as células foram incubadas com anexina V e PI, e analisadas em citometria de fluxo. Para o ensaio *Scratch*, um risco na monocamada celular foi realizado com uso de ponteira de 10 µl, as células foram mantidas por 48 h e o fechamento do risco foi analisado com uso do *software ImageJ*. As AgNP e AuNP alteram o ciclo celular, particularmente após 48 h de exposição, com aumento do percentual de células na fase S (≥49%) e redução na fase G1 (≥14%). Como houve redução da proliferação das células B16F10 após exposição a estas concentrações de ambas NPs (ensaio de Cristal Violeta) em estudo anterior, acredita-se que esteja havendo retenção das células em fase S. A exposição às AgNP na maior concentração (100 ng.ml⁻¹) resultou em aumento de células em final de apoptose/necrose de 26% (24 h) e 7% (48 h). AuNP, na menor concentração (10 ng.ml⁻¹), parecem ter efeito protetor em 24 h (aumento de células viáveis e redução de células em apoptose/necrose), enquanto que aumento de células no início de apoptose ocorre para ambas as NPs em 48 h. A exposição a concentração 100 ng.ml⁻¹ também reduziu a capacidade de fechamento do risco. Com base nesses resultados, não há evidências de que as AgNP e AuNP provoquem aumento da malignidade das células B16F10.

Palavras-chave: Melanoma. Nanopartículas de ouro. Nanopartículas de prata. Ciclo celular. Morte celular. *Scratch*.

ABSTRACT

Nanoparticles (NP) have been produced in large scale due to the recent advance of nanotechnology. Silver NP (AgNP) and gold NP (AuNP) are widely used in industrial and biomedical fields. AgNP are notable for their antimicrobial activity and AuNP are used for aesthetic and therapeutic purposes. However, studies have shown that these particles can initiate toxicity at the subcellular, cellular and tissue levels in several experimental models. Skin melanoma is a type of cancer caused by the transformation of melanocytes, representing 4% of malignant neoplasms of skin in Brazil. Although the incidence is not high, melanoma has high metastatic capacity. AgNP and AuNP are used in many products that are applied directly on the skin, such as bandages and cosmetics, but there are few studies about the effect of these NP on tumor cells, such as melanoma cells. Thus, this study aimed to determine the effects of AgNP and AuNP on the malignancy of murine melanoma cells B16F10, through the Cell Cycle, Cell Death and Scratch assays. Cells were cultured in DMEM medium, high glucose, 10% fetal bovine serum and antibiotics, at 37 °C and 5% pCO₂. For exposure, the culture medium was replaced with a new medium containing 10 and 100 ng.ml⁻¹ of AuNP and AgNP and the cells were kept under the same conditions for 24 and 48 h. For the Cell Cycle assay, the cells were fixed in 70% ethanol, incubated with propidium iodide (PI) and analyzed in flow cytometry. For the Cell Death assay the cells were incubated with annexin V and PI and analyzed in flow cytometry. For the Scratch assay, the cell monolayer was scratched with a 10 µl micropipette tip, the cells were kept for 48 h in the incubator and the area of scratch was analyzed at t=0 and t=48 h using ImageJ software. AgNP and AuNP affected the cell cycle, particularly after 48 h of exposure, with an increase of the percentage of cells in S phase (≥49%) and decrease in G1 phase (≥14%). We had observed a decrease of cell proliferation (Violet Crystal assay) in a previous study, so cells may be arrested in phase S. Exposure to AgNP at the highest concentration (100 ng.ml⁻¹) resulted in increased percentage of cells in late apoptosis/necrosis by 26% (24 h) and 7% (48 h). AuNP at the lowest concentration (10 ng.ml⁻¹) appears to have protective effect at 24 h (increase of viability and a reduction of cells in apoptosis/necrosis), while increase of cells in early apoptosis occurs for both NPs at 48 h. Exposure to 100 ng.ml⁻¹ concentration also reduced scratch closing. Based on the results, there is no evidence that AgNP and AuNP lead to increased malignancy of B16F10 cells.

Keywords: Melanoma. Gold nanoparticles. Silver nanoparticles. Cell cycle. Cell death. Scratch.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Nanopartículas encontradas na composição dos produtos listados no CPI.....	10
Figura 2. Micrografia de células da linhagem B16F10.....	12
Figura 3. Esquema da montagem utilizada para realização da ablação a laser	14
Figura 4. Viabilidade celular após 24h e 48h de exposição.....	16
Figura 5. Metabolismo mitocondrial após 24h e 48h de exposição.....	16
Figura 6. Proliferação celular após 24h e 48h de exposição.....	17
Figura 7. Ciclo celular após 24 h e 48 h de exposição.....	20
Figura 8. Morte celular após 24 h e 48 h de exposição.....	22
Figura 9. Migração celular após 24 h de exposição.....	23

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ANOVA – *Analysis of Variance*

AgNP – Nanopartícula de Prata

AuNP – Nanopartícula de Ouro

ATCC – *American Type Culture Collection*

CPI – *Nanotechnology Consumer Products Inventory*

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's médium*

DNA – *Deoxyribonucleic Acid*

EDTA – *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*

EPA – *Environmental Protection Agency*

GSH – Glutathione

INCA – Instituto Nacional do Câncer

LANSEN – Laboratório de Nanoestruturas para Sensores

MTT – Brometo de 3-metil [4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5 difeniltetrazólio

NP – Nanopartícula

PBS – *Phosphate-buffered Saline*

SFB – Soro Fetal Bovino

SOD – Superóxido dismutase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1. NANOPARTÍCULAS.....	9
2.1.1. Nanopartículas de Prata (AgNP).....	11
2.1.2. Nanopartículas de Ouro (AuNP).....	11
2.2. MELANOMA.....	11
2.3. LINHAGEM DE CÉLULAS B16F10.....	12
3. OBJETIVO GERAL	12
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS	13
4.1. CULTIVO DAS CÉLULAS DA LINHAGEM B16F10.....	13
4.2. SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS.....	13
4.3. ENSAIOS ANTERIORES.....	14
4.3.1. Métodos.....	14
4.3.2. Resultados.....	15
4.4. GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	17
4.5. CICLO CELULAR.....	17
4.6. MORTE CELULAR.....	18
4.7. <i>SCRATCH</i>	19
4.8. ANÁLISE DOS DADOS.....	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5.1. CICLO CELULAR.....	20
5.2. MORTE CELULAR.....	21
5.3. <i>SCRATCH</i>	22
6. CONCLUSÃO	24
7. REFERÊNCIAS	25

1. INTRODUÇÃO

Durante a última década, as nanopartículas (NPs) têm sido muito estudadas devido as suas potenciais aplicações na medicina, indústria e produtos de consumo graças as suas propriedades físico-químicas vantajosas (MADDEN e HOCELLA JR, 2005; VANCE et al., 2015). O avanço da nanotecnologia para uso terapêutico tem incitado interesse pelo conhecimento das possíveis consequências toxicológicas das NPs em sistemas biológicos e para o ambiente, visto que estudos têm mostrado que essas partículas podem iniciar toxicidade a nível subcelular, celular e tecidual em diversos modelos experimentais (MAYNARD ET AL., 2011; STEBOUNOVA ET AL., 2012; STERN ET AL., 2012; DUAN E LI, 2013; LARSON ET AL., 2014). As AgNP e AuNP são empregadas em muitos produtos que são aplicados diretamente sobre a pele, como bandagens e cosméticos, de modo que o contato dérmico é a principal via de exposição (VANCE et al., 2015). Contudo há poucos estudos do efeito destas NPs sobre células tumorais, como as de melanoma. Tendo em vista este problema, este estudo avaliou se a exposição às AgNP e AuNP causam algum efeito sobre a malignidade de células de melanoma.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. NANOPARTÍCULAS

As NPs são materiais sólidos com tamanho em duas ou três dimensões superior a 1 nanômetro e menor que 100 nanômetros e que podem apresentar propriedades físicas e reatividade específicas em função do tamanho (MADDEN e HOCELLA Jr, 2005). São formadas espontaneamente na natureza como produtos da combustão incompleta de combustíveis fósseis e erupção vulcânica (NOWACK e BUCHELI, 2007). No entanto, nas duas últimas décadas NPs vêm sendo produzidas industrialmente e em larga escala, graças ao desenvolvimento da nanotecnologia (EPA, 2007).

Há uma grande variedade de NPs sendo desenvolvidas e aplicadas. Estas aplicações vão desde a indústria eletrônica, passando pela cosmética e têxtil, até a biomédica. O “Nanotechnology Consumer Products Inventory” (CPI), criado em 2005, enumera atualmente 1814 produtos de consumo de 622 empresas em 32 países. As nanopartículas de prata são utilizadas em 435 produtos, sendo portanto as mais utilizadas (Figura 1). Cerca de 29% do CPI

(528 produtos) contêm nanopartículas suspensas em uma variedade de meios líquidos e o contato dérmico é a via de exposição mais provável (VANCE et al., 2015).

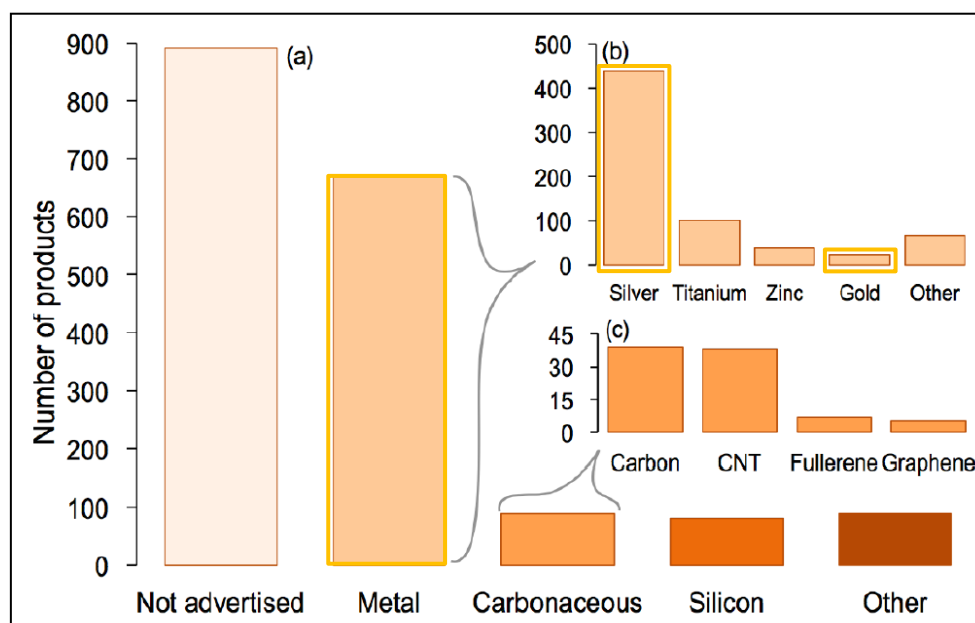


Figura 1. Nanopartículas encontradas na composição dos produtos listados no CPI, divididos em 5 grupos: não anunciado, metais, nanopartículas carbonadas, nanopartículas à base de silício e outros. (b) Nanopartículas metálicas encontradas na composição dos produtos, em que AgNP e AuNP aparecem em um grande número de produtos. FONTE: (VANCE et al., 2015).

A indústria biomédica tem levantado a possibilidade do emprego das nanopartículas de ouro (AuNP) e prata (AgNP), tanto no diagnóstico quanto no tratamento do câncer (RAVINDRAN et al., 2013; MUKHERJEE et al., 2016; PATIL e YAKHMI, 2016; VLĂSCEANU et al., 2016; ZHANG et al., 2016). Contudo, o comportamento destas NPs em sistemas biológicos ainda não é totalmente esclarecido. Devido ao fato dos primeiros trabalhos com nanotecnologia serem ainda recentes, os efeitos crônicos das nanopartículas sobre a saúde humana e ambiental são quase desconhecidos (YIN et al., 2015). O que se sabe é que a mesma propriedade que as tornam úteis tem o potencial para torná-las tóxicas. As nanopartículas são capazes de atravessar a membrana plasmática por endocitose. Além disso, suas propriedades físico-químicas, que variam drasticamente em função do tamanho, permitem

complexação com outros compostos que podem eventualmente ser carregados para o interior celular (NOWACK e BUCHELI, 2007; RAVINDRAN et al., 2013).

1.1.1. Nanopartículas de Prata (AgNP)

As AgNP são utilizadas em mais de quatrocentos produtos nanotecnológicos sendo comercializados e destacam-se por sua atividade antimicrobiana (VANCE et al., 2015). Com tantas aplicações, a preocupação com seus efeitos no organismo faz-se presente. Estudos in vitro demonstraram que células expostas a AgNP apresentaram alterações morfológicas, sinais claros de estresse oxidativo (redução de níveis de glutathiona (GSH) e atividade da superóxido dismutase (SOD), bem como o aumento da peroxidação lipídica, além de fragmentação de DNA), sendo detectada apoptose inclusive em grupos expostos a concentrações baixas (ARORA et al., 2008; RINNA et al., 2015).

1.1.2. Nanopartículas de Ouro (AuNP)

Soluções coloidais de ouro para fins estéticos e terapêuticos vêm sendo usadas há muitos anos e atualmente AuNP também têm sido usadas para tratamento de água e em produtos tecnológicos (LEE et al., 2011). O uso potencial de AuNP na medicina, especialmente para imagens, diagnóstico e terapia requer, no entanto, que sua toxicidade seja cuidadosamente examinada. A citotoxicidade de AuNP tem sido de fato examinada por diversos grupos de pesquisa (BOISSELIER e ASTRUC, 2009; PAN et al., 2012; NAHA et al., 2015).

1.2. MELANOMA

No Brasil, a frequência do câncer de pele é de 30% entre todos os tumores malignos registrados, com predominância em adultos de pele clara. Embora represente apenas 4% das neoplasias malignas de pele, o melanoma é considerado o mais agressivo destas neoplasias devido a sua alta capacidade metastática (INCA, 2016).

A taxa de incidência do melanoma no Brasil é de 3,03 (homens) e 2,85 (mulheres) a cada 100 mil habitantes, sendo a região Sul do país a mais afetada por esta doença. O prognóstico desse tipo de câncer pode ser

considerado bom se o diagnóstico e tratamento ocorrerem nos estágios iniciais; porém, quando já avançado, isto é, quando há metástases, a sobrevida estimada é de 6-9 meses e a estratégia de tratamento para a doença deve ter então como objetivo aliviar os sintomas e melhorar a qualidade de vida do paciente (INCA, 2016).

1.3. LINHAGEM DE CÉLULAS B16F10

As células B16F10 foram isoladas a partir de melanoma de camundongo (*Mus musculus*) da linhagem C57BL/6J. São células epiteliais fusiformes e aderentes (Figura 2) com alta capacidade metastática (ATCC, 2014).

Estas células são muito utilizadas em estudos *in vitro* e por possuírem alta capacidade de invasão, são também empregadas como modelo de estudo de metástase *in vivo*, através da inoculação em camundongos (FIDLER, 1973; BOBEK et al., 2010). {Fidler, 1973, Selection of successive tumour lines for metastasis}

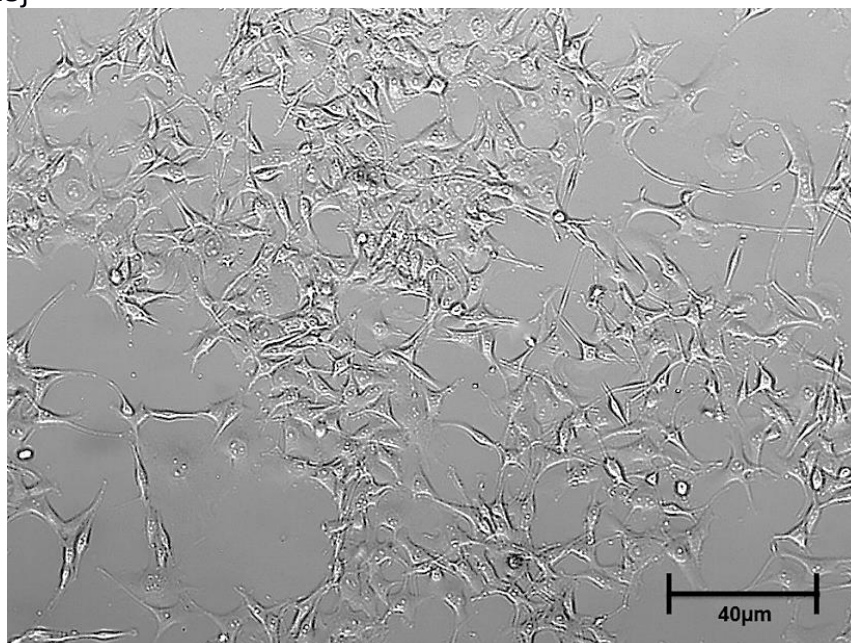


Figura 2. Micrografia de células da linhagem B16F10. Fonte: Autora.

2. OBJETIVO GERAL

- Investigar se as nanopartículas de prata e ouro exercem alguma influência sobre a malignidade das células de melanoma.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a distribuição de células em diferentes estágios do ciclo celular por citometria de fluxo.
- Investigar a ocorrência de morte celular por citometria de fluxo.
- Investigar a capacidade de fechamento de área disponível através do ensaio *scratch*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. CULTIVO DAS CÉLULAS DA LINHAGEM B16F10

Alíquotas de células da linhagem B16F10 (Banco de Células do Rio de Janeiro) foram cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm², com meio DMEM (*Dulbecco's Minimum Essential Medium*, pH 7,4; 4500 mg.l⁻¹ de glicose; 3700 mg.l⁻¹ de bicarbonato de sódio), esterilizado por filtração em membrana 0,22 µm e suplementado com 10% de soro fetal bovino, estreptomicina (10 µg.ml⁻¹) e penicilina (10 U.ml⁻¹).

Para o crescimento e adesão, as células permaneceram em incubadora a 37 °C e pCO₂ de 5%, com trocas de meio realizadas a cada 48 h. Para os experimentos, as células foram desaderidas com o uso de tripsina-EDTA (0,25% de tripsina, 0,02% de EDTA) por um período de 2 a 5 min, contadas, plaqueadas e cultivadas durante 24 h até a realização da exposição às NPs e então expostas por 24 e 48 h até a realização dos ensaios.

Todos os reagentes usados nos procedimentos foram pré-aquecidos em banho-maria a 37 °C.

3.2. SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS

As NPs foram obtidas através da colaboração existente com pesquisador Arandi G. Bezzerra Jr. da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Estas NPs foram sintetizadas pelo método de ablação a laser em meio líquido, que permite a produção de nanoestruturas de forma rápida e com impacto ambiental reduzido, evitando a formação de resíduos, pois dispensa a utilização de reagentes químicos. Esta técnica consiste na focalização de um feixe de laser pulsado de alta potência na superfície de um alvo sólido com alto grau de pureza (Ag e Au, neste caso) imerso em solvente (água bidestilada estéril) (TEIXEIRA ROSA, 2014). O esquema da montagem experimental é exibido na Figura 3.

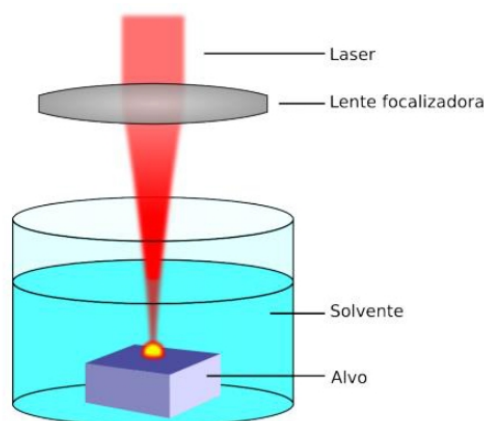


Figura 3. Esquema da montagem utilizada para realização da ablação a laser. (TEIXEIRA ROSA, 2014).

Depois de sintetizadas as AgNP e AuNP, que apresentam coloração amarela e roxa, respectivamente, foram caracterizadas pelas técnicas de Espectroscopia Ultravioleta-visível, Espalhamento Dinâmico de Luz e potencial zeta. As NPs apresentavam formato aproximadamente esférico, estreita distribuição de tamanho, com maior prevalência entre 1 nm e 2 nm, chegando até a 4 nm, e relativa estabilidade, sem haver precipitação ou agregação mesmo após 6 meses de armazenamento.

3.3. ENSAIOS ANTERIORES

3.3.1. Métodos

Os ensaios anteriores realizados em uma Iniciação Científica no ano de 2015 foram Vermelho Neutro, MTT e Cristal Violeta.

O ensaio de Vermelho Neutro baseia-se na capacidade das células viáveis de incorporar, assimilar e manter o corante dentro dos endossomos e lisossomos. É um corante catiônico fraco, que atravessa a bicamada lipídica das membranas e acumula intracelularmente nos compartimentos de lúmen ácido. Xenobióticos podem alterar a membrana lisossomal, o que resulta na diminuição da retenção do Vermelho Neutro. Dessa forma, é possível inferir se as células estão viáveis, danificadas ou mortas, uma vez que a quantidade de corante incorporado nas células é diretamente proporcional ao número de células com endossomos/lisossomos intactos, sendo quantificado por espectrofotometria (SVENDSEN et al., 2004; REPETTO et al., 2008).

O ensaio do MTT baseia-se na capacidade de células viáveis reduzirem enzimaticamente o MTT (3 - [4,5-dimetil-2-il] -2, brometo de 5-difenil tetrazólio) formando cristais de formazan, que possuem cor roxa ao serem dissolvidos em DMSO, podendo ser quantificados por espectrofotometria. Como as desidrogenases mitocondriais são as principais responsáveis pela reação de redução, há a necessidade de que a célula esteja viável e suas mitocôndrias funcionais para que esta reação ocorra (MOSMANN, 1983; REILLY et al., 1998).

O Cristal Violeta (cloreto de pararosanilina), também conhecido como violeta de Genciana, é um corante básico que cora o núcleo das células, de forma que o número de células aderidas, consequência da taxa de crescimento celular, pode ser determinado colorimetricamente (GILLIES et al., 1986).

Para a realização desses ensaios foram selecionadas 5 concentrações (0,01; 0,1; 1; 10 e 100 ng.ml⁻¹) para ambas as NPs.

De acordo com Larese Filon et al. (2015) a barreira cutânea é composta por duas camadas: a epiderme e a derme. Na derme é que estão os melanócitos. As AuNPs e AgNPs podem atravessar a camada córnea da epiderme, atingindo a derme, porém em quantidade muito inferior a presente nos produtos com NPs. Com isso, o estudo realizado simula duas situações de exposição possíveis. Na primeira, as concentrações mais baixas de NPs utilizadas nos ensaios anteriores (0,01; 0,1; 1 ng.ml⁻¹) representam as concentrações encontradas no ambiente (0,01-0,03 e 0,14 ng.l⁻¹ para AgNP e AuNP respectivamente (PÉREZ et al., 2009), considerando haver bioacumulação. Na segunda, as concentrações mais altas de NPs (10 e 100 ng.ml⁻¹) simulam concentrações possíveis caso haja aplicação direta de produtos com NPs na pele, visto que as concentrações encontradas em produtos, como bandagens e cosméticos, varia de 22 a 30 ppm (22-30 µg.ml⁻¹) e de 8 a 30 ppm (8-30 µg.ml⁻¹) para AgNP e AuNP, respectivamente (THE NANODATABASE, 2013).

3.3.2. Resultados

A exposição às NPs causou aumento dos parâmetros relacionados à viabilidade celular, verificado através dos ensaios Vermelho Neutro e MTT (Figuras 4 e 5), mas causou uma queda na proliferação, verificado através do ensaio do cristal violeta (Figura 6).

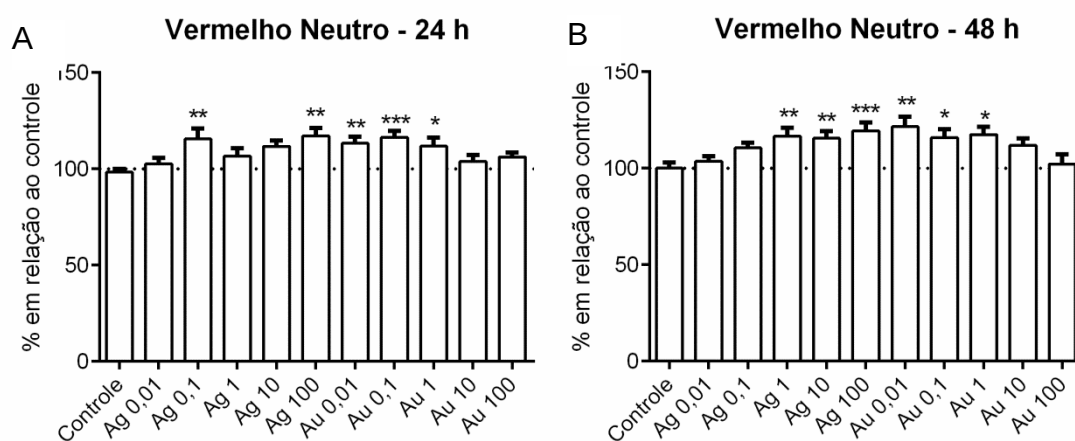


Figura 4. Viabilidade celular após 24h de exposição (A) e 48h de exposição (B) sob diferentes concentrações de AgNP e AuNP. Média \pm erro padrão. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

FONTES - Gráfico A: SILVA (2014). Gráfico B: Autora.

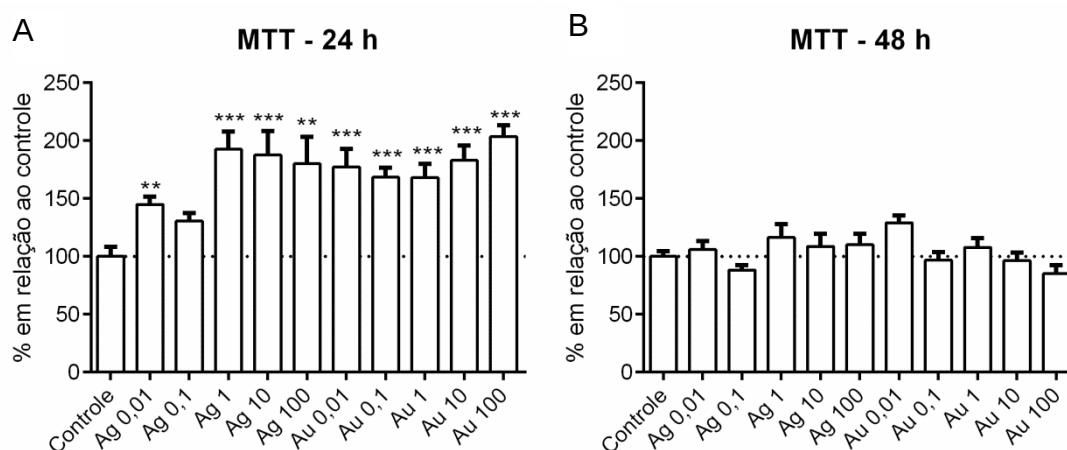


Figura 5. Metabolismo mitocondrial após 24h de exposição (A) e 48h de exposição (B) sob diferentes concentrações de AgNP e AuNP. Média \pm erro padrão. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. FONTES - Gráfico A: Silva (2014). Gráfico B: Autora.

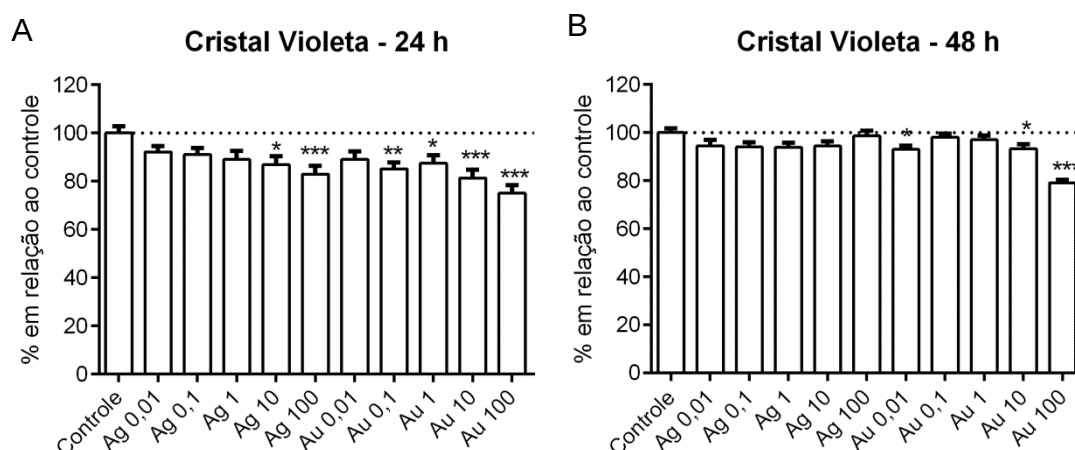


Figura 6. Proliferação celular após 24h de exposição (A) e 48h de exposição (B) sob diferentes concentrações de AgNP e AuNP. Média \pm erro padrão. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. FONTES - Gráfico A: SILVA (2014). Gráfico B: Autora.

Para as análises de Vermelho Neutro e Cristal Violeta os dados foram testados quanto à normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov (e analisados através de ANOVA de uma Via, seguidos pelo pós-teste de Dunnett's (para comparação dos grupos expostos versus controle). Para as análises de metabolismo (MTT) os dados não passaram no teste de normalidade mesmo depois de transformados, e então foram feitas análises não-paramétricas (Kruskal-Wallis), seguidas pelo pós-teste de Dunn's.

3.4. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Como foi verificado nos ensaios anteriores uma queda significativa na proliferação e aumento dos parâmetros normalmente associados à viabilidade celular (ensaios do MTT e Vermelho Neutro), as concentrações mais altas de AuNP e AgNP (10 e 100 ng.ml^{-1}), que apresentaram os resultados mais significativos, foram selecionadas para os ensaios de Ciclo celular, Morte celular e *Scratch*.

3.5. CICLO CELULAR

A perda do controle sobre a taxa de proliferação e morte celular está relacionada a doenças como o câncer. Ao estimar a quantidade de DNA da célula estimam-se as distribuições de fase do ciclo celular, visto que a quantidade de DNA muda durante as fases. O DNA das células pode ser

quantificado por citometria de fluxo, com o uso do corante iodeto de propídio, que é fluorescente e intercalante de DNA (CECCHINI et al., 2012).

As células foram cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm² expostas a 10 e 100 ng.ml⁻¹ de AuNP e AgNP por 24 e 48 h, desaderidas com o uso de tripsina-EDTA (0,25% de tripsina, 0,02% de EDTA) e fixadas em álcool 70%. As células (~10⁶ células) foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas com iodeto de propídio (PI) e RNase em 500 µl de *staining buffer* (PBS com SFB 2%). A análise foi realizada em citômetro de fluxo *BD FACSCalibur*, com 4 aquisições de 20000 eventos cada por experimento, em 2 experimentos independentes.

3.6. MORTE CELULAR

Estudos de apoptose celular foram afetados significativamente desde a introdução da citometria de fluxo (RIEGER et al., 2011). Iodeto de propídio (PI) é amplamente usado juntamente com anexina V para determinar se as células estão viáveis, em apoptose ou necrose através de diferenças na integridade da membrana plasmática e permeabilidade. Células que estão em apoptose têm o fosfolípido fosfatidilserina (PS) deslocado da monocamada interna da bicamada lipídica da membrana plasmática para a monocamada externa, com a exposição de PS ao ambiente externo. A anexina V é uma proteína dependente de cálcio que tem uma grande afinidade por PS; esta característica é usada para identificar células em apoptose com a exposição de PS. O iodeto de propídio (PI) é usado para distinguir células viáveis das não viáveis. Em células viáveis, o PI não é capaz de atravessar a membrana, enquanto que em células mortas ou danificadas ele pode entrar nas células e intercalar no DNA. Células que são positivas para Anexina V e negativas para PI estão em início de apoptose. Células que são positivas para Anexina V e PI estão no final de apoptose, em necrose ou completamente mortas. Células que são negativas para Anexina V e PI estão viáveis (RIEGER et al., 2011).

Células foram plaqueadas em placa de 24 poços na razão de 60000 e 30000 células/poço para os tempos de 24 h e 48 h de exposição respectivamente. Então as células foram expostas a 10 e 100 ng.ml⁻¹ de AuNP e AgNP, lavadas uma vez com PBS, desaderidas com o uso de tripsina-EDTA (0,25% de tripsina, 0,02% de EDTA), lavadas duas vezes com PBS e ressuspendidas em 200 µl de tampão de ligação (10⁵ células). Então foi

adicionado 5 μl da solução de marcação em cada tubo, e os tubos foram mantidos à temperatura ambiente (25 °C) por 15 min, protegidos da luz. Por fim, 200 μl de PBS foram adicionados em cada tubo e as células analisadas em citômetro de fluxo, com 3 aquisições de 10000 eventos por experimento, em 2 experimentos independentes.

3.7. SCRATCH

O ensaio *scratch* tem baixo custo e é um método muito utilizado para verificar o fechamento de área livre de células, processo que depende da migração/proliferação celular. Os passos básicos envolvem a criação de um risco em uma monocamada de células confluentes, e captura de imagens no início e em intervalos regulares. Comparando as imagens é possível verificar a porcentagem de fechamento do risco ou tempo necessário para o completo fechamento. Uma das grandes vantagens deste método simples é que ele mimetiza até certo ponto a migração de células *in vivo*, por exemplo, a remoção de parte do endotélio dos vasos sanguíneos induz a migração de células endoteliais para a área aberta para fechar a ferida. Além disso, os padrões de migração, tanto em células frouxamente ligadas (p. ex. fibroblastos) ou mais firmemente ligadas (p. ex. células epiteliais e células endoteliais) também imitam o comportamento dessas células durante a migração *in vivo* (LIANG et al., 2007). No câncer, a migração celular desempenha um papel central para o estabelecimento de metástases (GLAß et al., 2012).

Células foram plaqueadas em placas de 96 poços na razão de 30000 células/poço e expostas às concentrações de 10 e 100 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AuNP e AgNP. Após 24 h de exposição, o meio de cultura foi descartado e meio sem os contaminantes foi adicionado. Com o auxílio de ponteiros 10 μl foi feito um “risco” com a ponta da ponteira no meio de cada poço. O meio foi novamente descartado e os poços lavados duas vezes com meio para retirada de células soltas. Após esses procedimentos, 200 μl de meio sem SFB foram adicionados em cada poço. Os poços da placa foram observados e fotografados em microscópio invertido nos tempos 0 h e 48 h, e então foi analisado o percentual de fechamento do risco em cada grupo exposto através do *software ImageJ*. Foram feitos dois experimentos independentes.

3.8. ANÁLISE DOS DADOS

Para a análise dos ensaios de Ciclo Celular, Morte Celular e *Scratch* foi utilizada análise não paramétrica (Kruskal-Wallis), seguidas pelo pós-teste de Dunn's.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CICLO CELULAR

As AgNP e AuNP alteram o ciclo celular, particularmente após 48 h de exposição, com aumento do percentual de células na fase S ($\geq 49\%$) e redução na fase G1 ($\geq 14\%$) (Figura 7). Como houve redução da proliferação das células B16F10 após exposição a estas concentrações de ambas NPs (ensaio de cristal violeta) em estudo anterior, acredita-se que esteja havendo retenção das células em fase S.

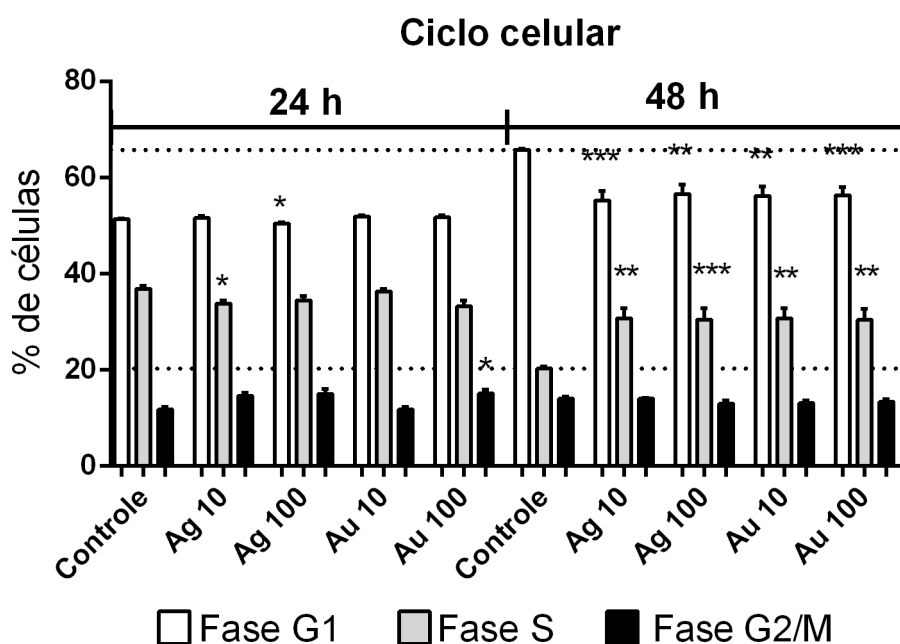


Figura 7. Ciclo celular após 24 h e 48 h de exposição sob diferentes concentrações de AgNP e AuNP. Média \pm erro padrão. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Em outros estudos com células tumorais humanas de mama e pulmão também foi verificado que as AgNP e AuNP alteram o ciclo celular. Ramalingam et al. (2016) verificaram que houve aumento do percentual de células tumorais humanas de pulmão, linhagem A549, em S e G0/G2 após exposição à AuNP

em $\geq 18\%$. Já Choi et al. (2012), que também estudaram os efeitos de AuNP na linhagem celular A5A9, verificaram aumento da proporção de células na fase G1. Chairuangkitti et al. (2013) também verificaram que as AgNP causam retenção das células A5A9 na fase S. Para células tumorais humanas de mama MCF7, houve um aumento progressivo no número de células positivas para PI após exposição às AgNP (GAJENDRAN et al., 2014) e de células em G2/M após exposição a AuNP (KONDATH et al., 2014).

A retenção das células na fase S e a redução da proliferação celular são efeitos importantes do ponto de vista terapêutico, com possibilidade de aplicação dessas NPs no tratamento do melanoma.

4.2. MORTE CELULAR

Foi observado aumento de células em final de apoptose/necrose no grupo exposto a 100 ng.ml^{-1} de AgNP em relação ao grupo controle (26% em 24 h e 7% em 48 h de exposição). Além disso, em 48 h de exposição os quatro grupos expostos apresentaram aumento de células em início de apoptose em relação ao grupo controle (Figura 8).

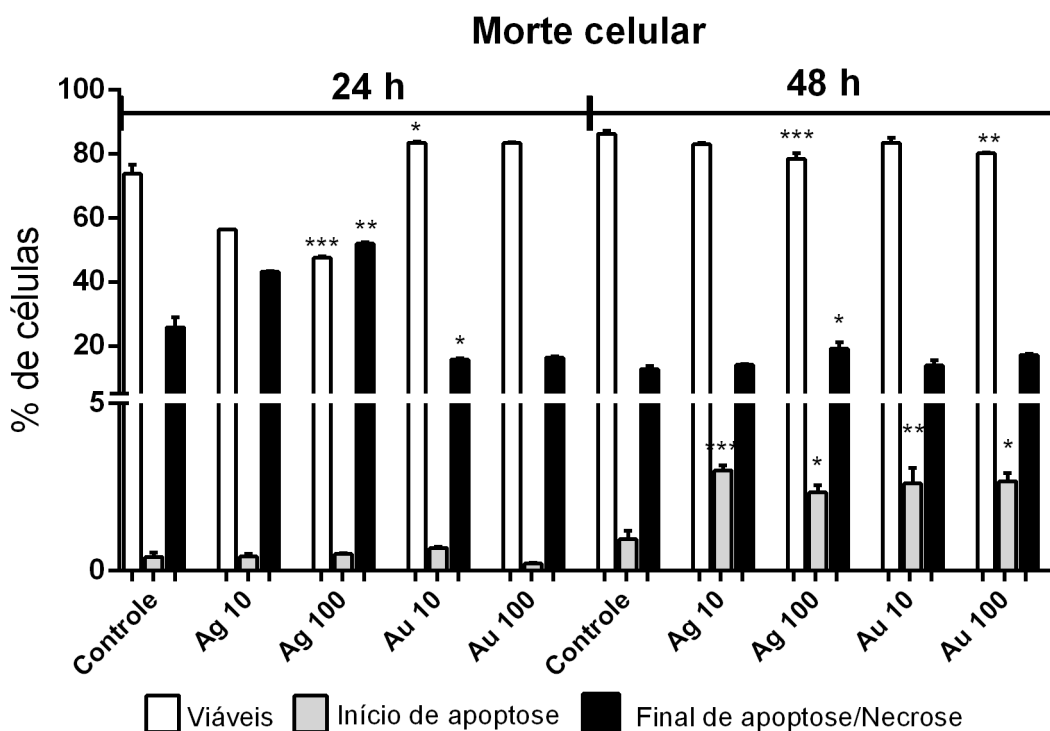


Figura 8. Morte celular após 24 h e 48 h de exposição sob diferentes concentrações de AgNP e AuNP. Média \pm erro padrão. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Em outros estudos com células tumorais humanas também foi verificado que as AgNP e AuNP causam morte celular. Kovács et al. (2016) verificaram um aumento da proporção de células de osteosarcoma da linhagem Saos-2 positivas para Anexina V e PI, após 24 h de exposição às AgNP. Austin et al. (2015) verificaram aumento de apoptose e necrose em células de carcinoma humano, linhagem HSC-3, expostas às AgNP, enquanto que células expostas às AuNP tiveram um pequeno aumento somente de necrose.

Em outro estudo com célula não-tumoral, kumar et al. (2015) verificaram aumento de morte celular nas células de fibroblastos de rato, linhagem L929, expostas a $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de AgNP por 24 h (aumento de 22 vezes na percentagem de células apoptóticas e de 33 vezes na percentagem de células necróticas).

4.3. *SCRATCH*

Foi observado no grupo exposto a 100 ng.ml^{-1} de AuNP um menor fechamento do risco em relação ao grupo controle, nos outros grupos não houve diferença significativa (Figura 9). Esse resultado corrobora o resultado encontrado no ensaio do cristal violeta, em que essa concentração também foi a que mais diminuiu a proliferação celular.

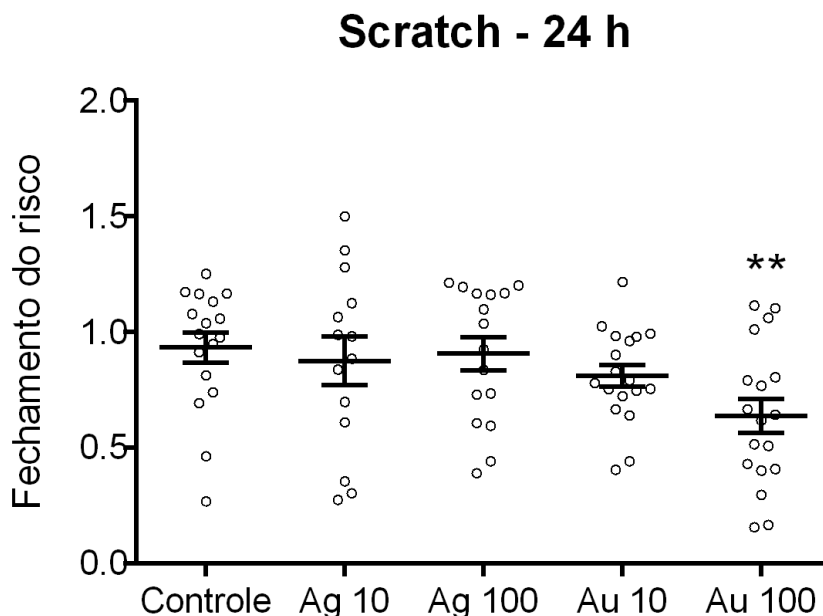


Figura 9. Migração celular após 24 h de exposição sob diferentes concentrações de AgNP e AuNP. Média \pm SEM. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Estudos como de Kalishwaralal et al. (2011) e Kalishwaralal et al. (2009) mostraram que as AuNP e AgNP inibiram a migração de células endoteliais da retina bovina. Outro estudo de Karuppaiya et al. (2013) mostrou que a exposição a AuNPs também pode diminuir a migração de fibrossarcoma humano, linhagem HT-1080. Porém, estudos como de Choo et al. (2016) sugerem que a exposição crônica às AgNP pode induzir migração celular e invasão em células epiteliais brônquicas humanas, linhagem BEAS-2B, o que mostra a necessidade de mais estudos para avaliar a citotoxicidade dessas NPs.

5. CONCLUSÃO

A exposição das células B16F10 às AgNP e AuNP alterou o ciclo celular, aumentando o percentual de células na fase S. Como no ensaio do Cristal Violeta e *Scratch* foi observado que a exposição às NPs também reduziu a proliferação/migração das células, acredita-se que esteja havendo retenção das células em fase S. No grupo exposto a maior concentração de AgNP foi observado aumento de células em final de apoptose/necrose. Além disso, em 48 h de exposição os quatro grupos expostos apresentaram aumento de células em início de apoptose. Desta forma, não há indícios que as AgNP e AuNP alteram o fenótipo de células B16F10 ao ponto de torná-las mais agressivas/malignas.

6. REFERÊNCIAS

- ARORA, S. et al. Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. *Toxicol Lett*, v. 179, n. 2, p. 93-100, Jun 2008. ISSN 0378-4274. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18508209> >.
- ATCC. American Type Culture Collection. 2014. Disponível em: < >. Acesso em: 07/06.
- AUSTIN, L. A. et al. Cytotoxic effects of cytoplasmic-targeted and nuclear-targeted gold and silver nanoparticles in HSC-3 cells – A mechanistic study. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 4, p. 694-705, 2015. ISSN 0887-2333. Disponível em: <>.
- BOBEK, V. et al. A clinically relevant, syngeneic model of spontaneous, highly metastatic B16 mouse melanoma. **Anticancer Res**, v. 30, n. 12, p. 4799-803, Dec 2010. ISSN 1791-7530. Disponível em: <>.
- BOISSELIER, E.; ASTRUC, D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. **Chem Soc Rev**, v. 38, n. 6, p. 1759-82, Jun 2009. ISSN 0306-0012. Disponível em: <>.
- CECCHINI, M. J.; AMIRI, M.; DICK, F. A. Analysis of cell cycle position in mammalian cells. **J Vis Exp**, n. 59, 2012. ISSN 1940-087X. Disponível em: <>.
- CHAIRUANGKITTI, P. et al. Silver nanoparticles induce toxicity in A549 cells via ROS-dependent and ROS-independent pathways. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 1, p. 330-338, 2013. ISSN 0887-2333. Disponível em: <>.
- CHOI, S. Y. et al. In vitro toxicity of serum protein-adsorbed citrate-reduced gold nanoparticles in human lung adenocarcinoma cells. **Toxicol In Vitro**, v. 26, n. 2, p. 229-37, Mar 2012. ISSN 1879-3177. Disponível em: <>.
- CHOO, W. H. et al. Long-term exposures to low doses of silver nanoparticles enhanced in vitro malignant cell transformation in non-tumorigenic BEAS-2B cells. **Toxicology in Vitro**, v. 37, p. 41-49, 2016. ISSN 0887-2333. Disponível em: < >.
- DUAN, X.; LI, Y. Physicochemical characteristics of nanoparticles affect circulation, biodistribution, cellular internalization, and trafficking. *Small*, v. 9, n. 9-10, p. 1521-32, May 2013. ISSN 1613-6829. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23019091> >.
- EPA. Nanotechnology White Paper. US Environmental Protection Agency Report EPA 100/B-07/001. Washington, 2007. Disponível em: <>. Acesso em: 07/06.

FIDLER, I. J. Selection of successive tumour lines for metastasis. **Nat New Biol**, v. 242, n. 118, p. 148-9, Apr 1973. ISSN 0090-0028. Disponível em: <>.

GAJENDRAN, B. et al. Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles from *Datura innoxia* and its apoptotic effect on human breast cancer cell line MCF7. **Materials Letters**, v. 122, p. 98-102, 2014. ISSN 0167-577X. Disponível em: <>.

GILLIES, R. J.; DIDIER, N.; DENTON, M. Determination of cell number in monolayer cultures. **Anal Biochem**, v. 159, n. 1, p. 109-13, Nov 1986. ISSN 0003-2697. Disponível em: < >.

GLAß, M. et al. Cell migration analysis: Segmenting scratch assay images with level sets and support vector machines. **Pattern Recognition**, v. 45, n. 9, p. 3154-3165, 2012. ISSN 0031-3203. Disponível em: <>.

INCA. Associação Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Tipos de Câncer de Pele: Melanoma, 2016. Disponível em: <>. Acesso em: 07/06.

KALISHWARALAL, K. et al. Silver nanoparticles inhibit VEGF induced cell proliferation and migration in bovine retinal endothelial cells. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 73, n. 1, p. 51-7, Oct 2009. ISSN 1873-4367. Disponível em: < >.

KALISHWARALAL, K. et al. Gold nanoparticles inhibit vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability via Src dependent pathway in retinal endothelial cells. **Angiogenesis**, v. 14, n. 1, p. 29-45, Mar 2011. ISSN 1573-7209. Disponível em: <>.

KARUPPAIYA, P. et al. Anti-metastatic activity of biologically synthesized gold nanoparticles on human fibrosarcoma cell line HT-1080. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 110, p. 163-170, 2013. ISSN 0927-7765. Disponível em: <>.

KONDATH, S. et al. Synthesis and characterisation of morin reduced gold nanoparticles and its cytotoxicity in MCF-7 cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 78-88, 2014. ISSN 0009-2797. Disponível em: <>.

KOVÁCS, D. et al. Silver nanoparticles defeat p53-positive and p53-negative osteosarcoma cells by triggering mitochondrial stress and apoptosis. **Sci Rep**, v. 6, p. 27902, 2016. ISSN 2045-2322. Disponível em: <>.

KUMAR, G. et al. Flow cytometry evaluation of in vitro cellular necrosis and apoptosis induced by silver nanoparticles. *Food and Chemical Toxicology*, v. 85, p. 45-51, 2015. ISSN 0278-6915. Disponível em: <>.

LARESE FILON, F. et al. Nanoparticles skin absorption: New aspects for a safety profile evaluation. *Regul Toxicol Pharmacol*, v. 72, n. 2, p. 310-22, Jul 2015. ISSN 1096-0295. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25979643>>.

LARSON, J. K.; CARVAN, M. J.; HUTZ, R. J. Engineered nanomaterials: an emerging class of novel endocrine disruptors. ***Biol Reprod***, v. 91, n. 1, p. 20, Jul 2014. ISSN 1529-7268. Disponível em: <>.

LEE, G. et al. 2011 International Conference on Physics Science and Technology (ICPST 2011) Gold Nanoparticles: Synthesising, Characterizing and Reviewing Novel Application in Recent Years. ***Physics Procedia***, v. 22, p. 203-208, 2011. ISSN 1875-3892. Disponível em: <>.

LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. ***Nat Protoc***, v. 2, n. 2, p. 329-33, 2007. ISSN 1750-2799. Disponível em: <>.

MADDEN, A. S.; HOCELLA JR, M. F. A test of geochemical reactivity as a function of mineral size: Manganese oxidation promoted by hematite nanoparticles. ***Geochimica et Cosmochimica Acta***, v. 69, n. 2, p. 389-398, 2005. ISSN 0016-7037. Disponível em: <>.

MAYNARD, A. D.; WARHEIT, D. B.; PHILBERT, M. A. The new toxicology of sophisticated materials: nanotoxicology and beyond. *Toxicol Sci*, v. 120 Suppl 1, p. S109-29, Mar 2011. ISSN 1096-0929. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21177774>>.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. ***J Immunol Methods***, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 1983. ISSN 0022-1759. Disponível em: <>.

MUKHERJEE, B. et al. Chapter 7 - Multifunctional drug nanocarriers facilitate more specific entry of therapeutic payload into tumors and control multiple drug resistance in cancer A2 - Grumezescu, Alexandru Mihai. In: (Ed.). ***Nanobiomaterials in Cancer Therapy***: William Andrew Publishing, 2016. p.203-251. ISBN 978-0-323-42863-7.

NAHA, P. C.; CHHOUR, P.; CORMODE, D. P. Systematic in vitro toxicological screening of gold nanoparticles designed for nanomedicine applications. **Toxicol In Vitro**, v. 29, n. 7, p. 1445-53, Oct 2015. ISSN 1879-3177. Disponível em: <>.

NOWACK, B.; BUCHELI, T. D. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. **Environmental Pollution**, v. 150, n. 1, p. 5-22, 2007. ISSN 0269-7491. Disponível em: <>.

PAN, Y. et al. Chapter eleven - Cytotoxicity of Gold Nanoparticles. In: (Ed.). **Methods in Enzymology**: Academic Press, v. Volume 509, 2012. p.225-242. ISBN 0076-6879.

PATIL, K. C.; YAKHMI, J. V. Chapter 13 - Nanotechnology for cancer therapy: Invading the mechanics of cancer A2 - Grumezescu, Alexandru Mihai. In: (Ed.). **Nanobiomaterials in Cancer Therapy**: William Andrew Publishing, 2016. p.395-470. ISBN 978-0-323-42863-7.

PÉREZ, S.; FARRÉ, M. L.; BARCELÓ, D. Analysis, behavior and ecotoxicity of carbon-based nanomaterials in the aquatic environment. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 6, p. 820-832, 2009. ISSN 0165-9936. Disponível em: <>.

RAMALINGAM, V. et al. Biogenic gold nanoparticles induce cell cycle arrest through oxidative stress and sensitize mitochondrial membranes in A549 lung cancer cells. **RSC Advances**, v. 6, n. 25, p. 20598-20608, 2016. Disponível em: <>.

RAVINDRAN, A.; CHANDRAN, P.; KHAN, S. S. Biofunctionalized silver nanoparticles: Advances and prospects. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 105, p. 342-352, 2013. ISSN 0927-7765. Disponível em: <>.

REILLY, T. P. et al. Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. **Biochem Pharmacol**, v. 55, n. 6, p. 803-10, Mar 1998. ISSN 0006-2952. Disponível em: <>.

REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nat Protoc**, v. 3, n. 7, p. 1125-31, 2008. ISSN 1750-2799. Disponível em: <>.

RIEGER, A. M. et al. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. **J Vis Exp**, n. 50, 2011. ISSN 1940-087X. Disponível em: <>.

RINNA, A. et al. Effect of silver nanoparticles on mitogen-activated protein kinases activation: role of reactive oxygen species and implication in DNA damage. **Mutagenesis**, v. 30, n. 1, p. 59-66, Jan 2015. ISSN 1464-3804. Disponível em: <>.

SILVA, L. C. D. **Efeitos de nanopartículas de ouro e prata em melanócitos murinos B16F10**. 2014. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

STEBOUNOVA, L. V. et al. Health and safety implications of occupational exposure to engineered nanomaterials. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, v. 4, n. 3, p. 310-21, 2012 May-Jun 2012. ISSN 1939-0041. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22131295>>.

STERN, S. T.; ADISESHAI AH, P. P.; CRIST, R. M. Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. *Part Fibre Toxicol*, v. 9, p. 20, Jun 2012. ISSN 1743-8977. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22697169>>.

SVENDSEN, C. et al. A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker? **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 57, n. 1, p. 20-9, Jan 2004. ISSN 0147-6513. Disponível em: <>.

TEIXEIRA ROSA, R. G. **Caracterização de nanopartículas de Bi produzidas por ablação a laser**. 2014. (Mestrado). Setor de Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, Universidade Federal do Paraná, PR, Brasil.

NANODATABASE. 2013. Disponível em: <<http://nanodb.dk/en/>>.

VANCE, M. E. et al. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. **Beilstein J Nanotechnol**, v. 6, p. 1769-80, 2015. ISSN 2190-4286. Disponível em: <>.

VLĂSCĂNU, G. M. et al. Chapter 2 - Silver nanoparticles in cancer therapy. In: (Ed.). **Nanobiomaterials in Cancer Therapy**: William Andrew Publishing, 2016. p.29-56. ISBN 978-0-323-42863-7.

YIN, Y. et al. Water chemistry controlled aggregation and photo-transformation of silver nanoparticles in environmental waters. **J Environ Sci (China)**, v. 34, p. 116-25, Aug 2015. ISSN 1001-0742. Disponível em: <>.