

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARCELLE DE LIMA CHIESA

CITOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO E DIÓXIDO DE
TITÂNIO EM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO EXPOSTAS À LUZ UV



CURITIBA

2017

MARCELLE DE LIMA CHIESA

CITOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO E DIÓXIDO DE
TITÂNIO EM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO EXPOSTAS À LUZ UV

Dissertação de Mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Filipak Neto

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Chiesa, Marcelle de Lima.

Citotoxicidade de nanopartículas de óxido de zinco e dióxido de titânio em células de melanoma murino expostas à luz UV. / Marcelle de Lima Chiesa. – Curitiba, 2017.

74 f. : il.

Orientador: Francisco Filipak Neto.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Melanoma. 2. Toxicologia. 3. Nanopartículas. 4. Pele - Câncer. 5. Filtro solar (Cosméticos). 6. Zinco – Efeito fisiológico. 7. Dióxido de titânio. I. Título. II. Filipak Neto, Francisco. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (22. ed.) 547.642

Programa de Pós-graduação Biologia Celular e Molecular

Departamento de Biologia Celular
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná



UFPR

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

Examinador/Afiliação

Assinatura

Prof. Dr. Francisco Filipak Neto
Orientador e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná

Francisco Filipak Neto

Profa. Dra. Márcia Helena Appel
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Márcia Helena Appel

Profa. Dra. Glaucia Regina Martinez
Universidade Federal do Paraná

Glaucia Regina Martinez

Suplente:

Profa. Dra. Katya Naliwaiko
Universidade Federal do Paraná

Após arguir a mestranda **Marcelle de Lima Chiesa**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Citotoxicidade de nanopartículas de óxido de zinco e dióxido de titânio em células de melanoma murino expostas à luz UV", são de parecer favorável à APROVAÇÃO da acadêmica, habilitando-a ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular. A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 23 de Fevereiro de 2017

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que me permitiu fazer este trabalho com muito afincio;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco Filipak Neto, o qual levarei como exemplo de profissional por toda vida, por todas as orientações no presente trabalho;

À minha família, que é a base de tudo em minha vida, sempre me apoiando em todos os aspectos;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa durante todo o período de realização do meu mestrado;

Aos meus amigos do Laboratório de Toxicologia Celular;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

RESUMO

No Brasil, o câncer de pele é o mais frequente e corresponde a 30% de todos os tumores malignos. A principal causa é a exposição à luz solar, a qual contém radiações ultravioletas danosas para os seres humanos. A melhor prevenção deste tipo de câncer é o uso de protetor solar, o que tem levado ao aumento da utilização destes produtos. Dentre os componentes dos protetores, as nanopartículas de ZnO e TiO₂ (filtros físicos) são os mais eficientes. Contudo, há poucos estudos que evidenciam os efeitos biológicos dessas NPs, principalmente no melanoma já formado. Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi verificar a influência das NPs, com e sem exposição simultânea da luz UV sobre células de melanoma murino (B16F1). Para isso, foram realizados testes para verificar a citotoxicidade dessas NPs, individualmente e na forma de misturas. As células foram cultivadas e expostas a diferentes concentrações das NPs individuais (1, 5, 10, 30 e 50 µg.ml⁻¹) e misturas (1, 5 e 10 µg.ml⁻¹) durante 24h. Para o experimento com a luz UV, logo após a exposição às NPs, um aparato com a luz foi colocado sobre as placas de cultura contendo as células, com exposição das células a luz por 60 min (45 mJ/cm²). Nenhuma das NPs promoveu efeito na migração e no ciclo das células B16F1. As concentrações de 30 e 50 µg.ml⁻¹ de ZnO-NP promoveram redução da viabilidade, proliferação, produção de espécies reativas de oxigênio e atividade dos transportadores de efluxo de drogas, com e sem a exposição simultânea da luz UV. Com a exposição UV, a ZnO-NP também levou a redução da viabilidade e proliferação nas concentrações 5 e 1 µg.ml⁻¹, respectivamente. A TiO₂-NP, sem a exposição à luz UV, não levou à alteração na viabilidade, proliferação, produção de espécies reativas de oxigênio em nenhuma das concentrações, mas causou aumento na atividade dos transportadores de efluxo de drogas na maior concentração (50 µg.ml⁻¹). Já com a exposição à luz UV, a TiO₂-NP levou a redução na proliferação nas concentrações 10, 30 e 50 µg.ml⁻¹; na redução produção de ROS nas concentrações 30 e 50 µg.ml⁻¹; e redução na atividade dos transportadores na menor concentração (1 µg.ml⁻¹). Com relação às misturas, houve efeito de mistura com aumento da viabilidade das células na menor concentração (1 µg.ml⁻¹) em relação às NPs sozinhas. Houve também um aumento na atividade dos transportadores de efluxo de drogas na concentração intermediária (5 µg.ml⁻¹). Além disso, a exposição UV também reduziu a proliferação em todas as concentrações (1, 5 e 10 µg.ml⁻¹); reduziu a produção de espécies reativas de oxigênio na menor concentração (1 µg.ml⁻¹); e promoveu efeito de interação das NPs na menor concentração (1 µg.ml⁻¹). Dessa maneira, os resultados obtidos e os pontos apresentados neste trabalho reafirmam a necessidade de haver mais estudos sobre as nanopartículas ZnO e TiO₂, uma vez que já existem indícios de que estas podem causar vários danos ao organismo, principalmente quando expostas à luz UV.

Palavras-chave: Melanoma. B16F1. ZnO. TiO₂. Nanopartículas. UV. Toxicologia. Viabilidade. Proliferação. MDR. Espécies reativas de oxigênio.

ABSTRACT

In Brazil, skin cancer is the most frequent and accounts for 30% of all malignant tumors. The main cause is exposure to sunlight, which contains harmful ultraviolet radiation for humans. The best prevention of this type of cancer is the use of sunscreen so that the use of these products has been growing. Among the components of the shields, the nanoparticles of ZnO and TiO₂ (physical filters) are the most efficient. However, there are few studies on the biological effects of these NPs, especially in the melanoma cells. This way, the aim of this study was to verify the influence of NPs, with and without simultaneous exposure of UV light on cells of a murine melanoma (B16F1). For this, tests were performed to verify the cytotoxicity of these NPs, individually and in the form of mixtures. Cells were cultured and exposed to different concentrations of the individual NPs (1, 5, 10, 30 and 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) and mixtures (1, 5 and 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) for 24h. For the experiment with UV light, after exposure to the NPs, the cell microplate was placed under an apparatus with light for 60 min (45 mJ / cm^2). The concentrations of 30 and 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ of ZnO-NP promoted a decrease of viability, proliferation, reactive oxygen species production and activity of drug-efflux transporters, with and without simultaneous exposure of UV light. With UV exposure, ZnO-NP also reduced the viability and proliferation at concentrations 5 and 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectively. TiO₂-NP, without exposure to UV light, did not lead to alteration of cell viability, proliferation, production of reactive oxygen species (ROS) at any of the concentrations, but caused increased activity of efflux transporters at the highest concentration (50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). With the exposure to UV light, TiO₂-NP led to reduction of cell proliferation at concentrations of 10, 30 and 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, reduction of ROS levels at 30 and 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; and reduction of efflux transporters activity at the lowest concentration (1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). In the mixtures, there was an increase of the activity of the efflux transporters at the intermediate concentration (5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). In addition, UV exposure also reduced cell proliferation at all concentrations (1, 5 and 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$); reduced ROS production at the lowest concentration (1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), and promoted interaction effect of the NPs in the lowest concentration (1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). In this way, although the results obtained refute the initial hypothesis concerning increase of malignancy of the melanoma cells, this study reaffirms the need for more studies on ZnO and TiO₂ nanoparticles, since there are already indications that these NPs cause various cytotoxic effects particularly when therei coexposed with UV light.

Keywords: Melanoma. B16F1. ZnO. TiO₂. Nanoparticles. UV. Toxicology. Viability. Proliferation. MDR. ROS.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	7
1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 PELE	11
2.2 RADIAÇÃO SOLAR	12
2.3 ASPECTOS GERAIS SOBRE O CÂNCER	15
2.4 CÂNCER DE PELE	16
2.4.1 Câncer de pele não melanoma	17
2.4.2 Melanoma	17
2.4.3 Tratamento	18
2.5 PROTETOR SOLAR	19
2.5.1 Histórico	19
2.5.2 Características do Protetor Solar	20
2.5.3 Filtros Físicos	21
2.6 Efeitos das Nanopartículas de ZnO e TiO ₂	23
3 PROBLEMA	25
4 HIPÓTESE	25
5 OBJETIVOS	25
5.1 OBJETIVO GERAL	25
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS E METAS	25
6 JUSTIFICATIVA	26
7 MATERIAIS E MÉTODOS	27
7.1 DESENHO EXPERIMENTAL	27
7.1.1 Modelo de Estudo	27
7.1.2 Cultivo das células	28
7.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	28
7.3 SCREENING DAS CONCENTRAÇÕES DE NPs	31
7.4 LÂMPADA UV	34
7.4.1 Ensaio com a Lâmpada UV	35
7.4.2 Comparação das fluências	37
7.5 PARÂMETROS CELULARES	39
7.5.1 Internalização do Vermelho Neutro	40
7.5.2 Proliferação Celular	41
7.5.3 Atividade De Transportadores do Efluxo de Drogas	41
7.5.4 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio	42
7.5.5 Ensaio do <i>SCRATCH</i>	42
7.5.6 Ensaio de Ciclo Celular	43

8 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
8.1 VIABILIDADE CELULAR.....	45
8.2 PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	47
8.3 ATIVIDADE DOS TRANSPORTADORES DE EFLUXO DE DROGAS	50
8.4 PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS)	52
8.5 ENSAIO DO <i>SCRATCH</i>	55
8.6 CICLO CELULAR.....	57
8.7 RESUMO DOS RESULTADOS.....	58
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
10 CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o câncer de pele é o mais frequente e corresponde a 30% de todos os tumores malignos registrados no país, sendo o melanoma um dos mais letais (INCA, 2016). Estes dados tornam-se preocupantes, haja vista que as células que o compõe podem migrar para gânglios linfáticos e órgãos internos e, assim, formar metástases. Em casos de metástase, a expectativa de vida dos pacientes é reduzida, podendo chegar a apenas seis meses (NICOLSON; BRUNSON; FIDLER, 1978; BRAUD *et al.*, 2003; GARBE *et al.*, 2011).

O melanoma pode ter várias etiologias, porém as causas geralmente estão relacionadas aos hábitos de vida do indivíduo, ao meio ambiente e à genética. Esses fatores podem interagir de várias formas, aumentando ou diminuindo a probabilidade do surgimento de tumores. Dentre os fatores de risco, a exposição ao Sol é a principal causa do surgimento do melanoma e também a de mais fácil prevenção (THOMPSON; SCOLYER; KEFFORD, 2005; MANCEBO; HU; WANG, 2014).

Atualmente, conscientização da proteção contra radiação solar é cada vez maior. Dessa forma, o protetor solar é uma das formas mais utilizadas na prevenção contra os efeitos causados pelo Sol, como envelhecimento cutâneo e o câncer de pele. Isto ocorre em virtude da presença de filtros inorgânicos em sua composição, como as nanopartículas de óxido de zinco (ZnO-NP) e nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂-NP), as quais são as mais utilizadas nos protetores. Além disso, as indústrias cosméticas estão revolucionando o mercado de beleza com produtos multifuncionais de ampla atuação, associando produtos de beleza com filtro solar para a proteção contra os danos solares (NEWMAN; STOTLAND; ELLIS, 2009; MANCEBO; HU; WANG, 2014; MCSWEENEY, 2016).

Porém, mesmo com a ampla utilização de protetores solares e, com isso, a alta exposição às NPs, ainda há poucos estudos que evidenciam os efeitos biológicos dessas nanopartículas (NPs). Um fator a se considerar é a exposição das NPs à luz UV, já que esta pode ser um fator determinante na toxicidade das NPs. Além disso, a influência dessas NPs na sobrevida e eficiência do tratamento em indivíduos já acometidos pelo melanoma tem sido negligenciada (BURNETT; WANG, 2011). Desta maneira, percebe-se a necessidade de verificar a influência das NPs sobre células de um melanoma já formado.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos das ZnO-NPs e TiO₂-NPs no fenótipo de células de melanoma murino B16F1 cultivadas, com ou sem exposição simultânea à luz UV, com ênfase em parâmetros celulares.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PELE

A pele é o maior órgão do corpo humano, funcionando como importante barreira e meio de comunicação com o meio exterior. O organismo é recoberto inteiramente por este órgão (MAIO *et al.*, 2011; D'ORAZIO *et al.*, 2013). A pele tem como funções a proteção contra agressões externas, a produção de vitamina D, a termorregulação, a secreção de ferormônios, a percepção do meio externo e a defesa imunológica (MAIO *et al.*, 2011).

A área mais superficial da pele é a epiderme, um tecido epitelial multiestratificado. Logo abaixo, encontra-se a derme, constituída de tecido conjuntivo não modelado com fibras colágenas, fibroblastos e macrófagos (MAIO *et al.*, 2011).

Dentre as células presentes na epiderme, há os melanócitos e queratinócitos. Os melanócitos estão presentes, predominantemente, nos olhos e na pele, sendo responsáveis pela coloração destes locais (MAIO *et al.*, 2011). Na pele, essas células residem na camada basal da epiderme (FIGURA 1). A quantidade de melanócitos na epiderme varia bastante entre indivíduos bem como no organismo, tendo sua maior densidade nas regiões da cabeça e do antebraço (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007; D'ORAZIO *et al.*, 2013).

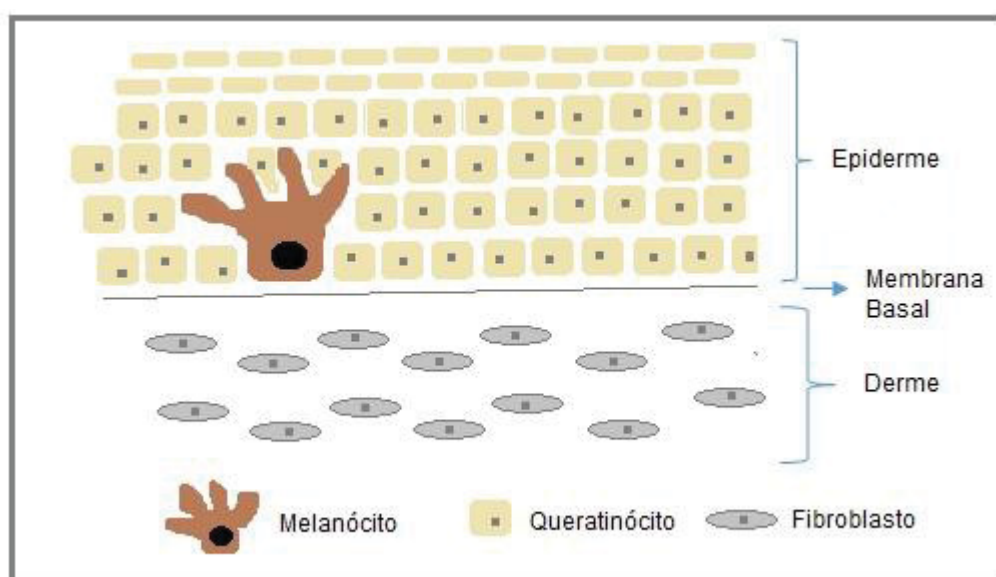


FIGURA 1. Principais células presentes na pele. Fonte: A autora

Os melanócitos têm como função principal a síntese da melanina a qual é transferida para os queratinócitos, onde permanece. Melanossomos são organelas presentes nos melanócitos responsáveis pela síntese e secreção da melanina. Dentre suas principais funções, pode-se citar a coloração da epiderme, a qual é responsável por sua proteção; e a participação nos processos inflamatórios. A pigmentação da pele ocorre de duas maneiras: decorrente de informações genéticas, sem influência de fatores externos; e a pigmentação facultativa, a qual ocorre por influência de vários fatores, como a radiação UV, desequilíbrios hormonais e processos inflamatórios (HEARING, 2011; MCSWEENEY, 2016).

A melanina é sintetizada a partir da tirosina que, após várias reações, é transformada em dois diferentes tipos de melanina: eumelanina (marrom escuro) ou feomelanina (coloração amarelo/alaranjado). Dessa forma, a fotoproteção depende dos tipos de melanina sintetizados bem como sua distribuição no tecido epitelial (HEARING, 2011; SLOMINSKI, 2011).

2.2 RADIAÇÃO SOLAR

A radiação solar é essencial para o corpo humano. Estudos mostram que a radiação pode, além de aumentar os níveis de vitamina D no organismo, melhorar o humor e prolongar o tempo de vida dos seres humanos (WRIGHT; WELLER, 2015). A vitamina D é uma das vitaminas mais importantes do organismo e sua deficiência está relacionada com o surgimento de alguns tipos de câncer, doenças cardiovasculares e doenças relacionadas aos ossos (SIVAMANI; CRANE; DELLAVALLE, 2009; BALOGH *et al.*, 2011; BURNETT; WANG, 2011; WRIGHT; WELLER, 2015).

Os espectros da luz solar são amplos e incluem a luz visível para humanos, o infravermelho e o ultravioleta (FIGURA 2). Apesar de seus benefícios, a exposição à radiação ultravioleta (UV) é a principal responsável pelo surgimento do melanoma. Isto foi sugerido, pela primeira vez, por Robert Bowles em 1893 (ROELANDTS *et al.*, 2007). A por estimulação dos constituintes celulares da pele para produzir fatores de crescimento; e pela ação de espécies reativas de oxigênio que podem causar danos

no DNA e suprimir a apoptose (THOMPSON; SCOLYER; KEFFORD, 2005; BURNETT; WANG, 2011; D'ORAZIO *et al.*, 2013; OLIVER *et al.*, 2016).

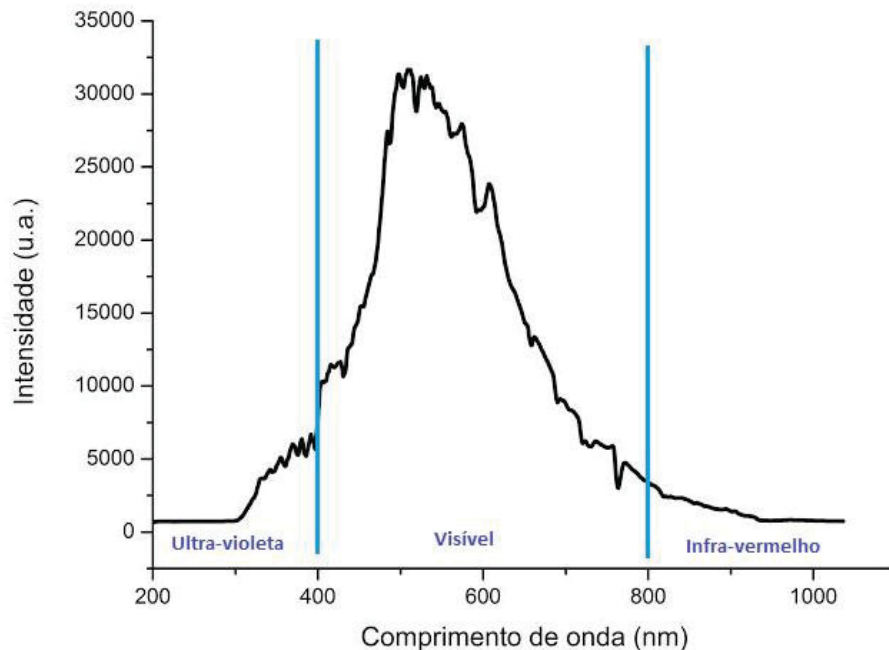


FIGURA 2. Espectro da luz solar. Fonte: BERLIM *et al.*, 2014

A luz UV, com comprimento de onda que varia entre 100 a 400 nm, é comumente dividida em três grupos: UVC (100-290 nm), UVB (290-320 nm) e UVA (320-400 nm) (EPSTEIN *et al.*, 1990; KULLAVANIJAYA; LIM, 2005; BAILLO; LIMA, 2012; MCSWEENEY, 2016).

Dentre as radiações ultravioletas, as UVC são as que têm maior energia, sendo as mais danosas para os organismos vivos. Contudo, são totalmente absorvidas pela camada de ozônio, não atingindo a biosfera. Dessa forma, apenas UVA e UVB são as radiações ultravioletas com impacto para a saúde humana (KULLAVANIJAYA; LIM, 2005; BAILLO; LIMA, 2012; MCSWEENEY, 2016).

As radiações UVB estão predominantes na superfície terrestre no período entre 10 e 14 horas. Por possuírem alta energia, são as grandes responsáveis por ocasionar queimaduras solares e também podem induzir danos e mutações no DNA (KULLAVANIJAYA; LIM, 2005; BAILLO; LIMA, 2012; MCSWEENEY, 2016).

Já as radiações UVA são as de maior abundância na superfície terrestre (95%), pois quase não são absorvidas pela camada de ozônio. Possuem o maior

comprimento de onda e são menos energéticas. Por isso, a capacidade em induzir lesões na pele é aproximadamente mil vezes menor do que a UVB, porém penetram mais profundamente na derme, formando o efeito “bronzado” e induzindo danos DNA. Estas radiações desempenham um papel importante no surgimento do melanoma, uma vez que se apresentam como principais responsáveis pelo dano solar a longo prazo (FIGURA 3; WOLF *et al.*, 2001; FLOR; DAVOLOS, 2007; PALM; O`DONOGHUE, 2007; QUATRANO; DINULOS, 2013; MCSWEENEY, 2016).

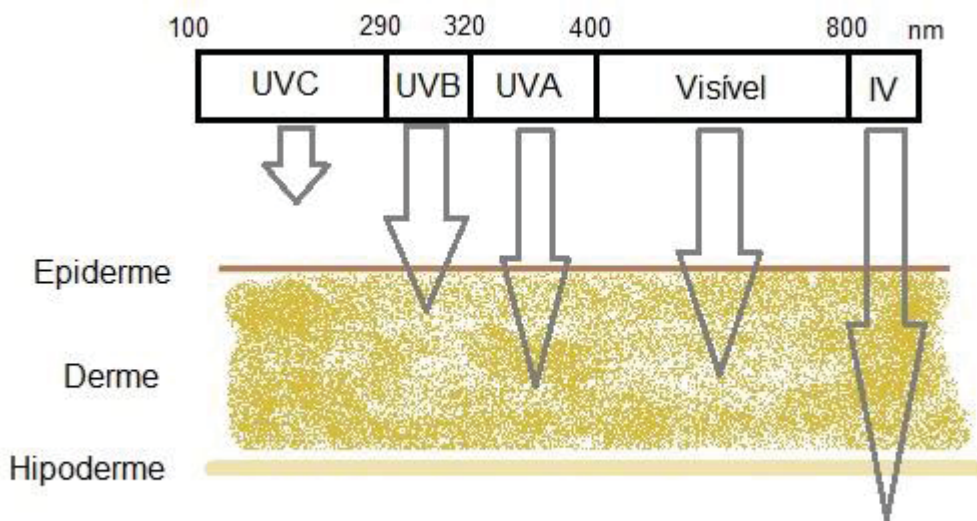


FIGURA 3. Radiação solar e seus efeitos sobre a pele. Fonte: a autora

Uma vez em contato com a pele, as radiações UV são absorvidas por diversos cromóforos como: melanina, DNA, RNA, proteínas, aminoácidos aromáticos, entre outros (FLOR; DAVOLOS, 2007; GONZÁLEZ; FERNÁNDEZ; GILABERTE, 2008; COELHO; MARCOS; APETATO, 2016).

A luz UV pode danificar o DNA de maneira direta ou indiretamente. Na primeira, o DNA absorve fótons da luz UVB e forma ligações covalentes de dímeros de pirimidinas, o que gera mutações no DNA. Já de forma indireta, as moléculas cromóforas absorvem os fótons da luz UVA e os transferem para as moléculas de oxigênio, criando o radical hidroxila, que pode causar danos no DNA. Esta maneira indireta é responsável por mais de 50% das causas de melanoma (PANICH, U. G.; RATHVIBOON, S. N; JIRAWATNOTAI, S., 2016; COELHO; MARCOS; APETATO, 2016).

Existem várias formas de proteção da pele contra a luz ultravioleta, como agentes fotoprotetores ambientais (camada de ozônio, poluentes, nuvens e névoa), agentes biológicos (cromóforos epidérmicos), agentes físicos (vestuário, chapéus, maquiagens, óculos escuros e vidros nas janelas) e filtros de luz ultravioleta (ingredientes de proteção solar e agentes de bronzeamento artificial) (KULLAVANIJAYA; LIM, 2005). Alguns estudos também sugerem a suplementação nutricional com carotenoides e probióticos como uma forma complementar da fotoproteção ao preparar a pele antes da exposição solar (KULLAVANIJAYA; LIM, 2005; TEXEIRA, 2015). Porém, pesquisas apontam o protetor solar como principal forma de proteção contra a radiação UV, as lesões causadas pela radiação solar, o foto-envelhecimento e, até mesmo, o surgimento do câncer de pele (NOHYNEK; SCHAEFER, 2001; NOHYNEK; DUFOUR, 2012; COELHO; MARCOS; APETATO, 2016).

2.3 ASPECTOS GERAIS SOBRE O CÂNCER

Tumor é um aumento do número de células alteradas em uma região do organismo (*American Cancer Society*, 2015; INCA, 2016). Quando este aumento ocorre devido ao crescimento no número de células alteradas, dá-se o nome de neoplasia. As neoplasias podem ser benignas, as quais possuem células que se multiplicam mais lentamente e são mais semelhantes às originais; e malignas, cujas células tendem a ser mais agressivas, podendo migrar e invadir outros tecidos e órgãos, formando o câncer. A capacidade de invadir tecidos e estabelecer colônias em órgão distantes são definidos como uma característica de neoplasias malignas, e a esse processo dá-se o nome de metástase. Para que ocorra a metástase, é necessário que haja várias etapas sequencias: desprendimento das células do seu local de origem; migração dessas células para circulação; invasão em tecidos adjacentes; colonização e proliferação em outros tecidos ou órgãos (THOMPSON; SCOLYER; KEFFORD, 2005). Dessa forma, os tumores benignos raramente podem ser considerados como um fator de risco à vida (*American Cancer Society*, 2015; INCA, 2016).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer, câncer é definido como um conjunto de mais de 100 doenças em que há o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos e podem espalhar-se para outras regiões do corpo, formando metástase (INCA, 2016).

As células cancerosas têm como características principais a proliferação desenfreada e a invasão de tecidos adjacentes (INCA, 2016). Para que estas células consigam adquirir estas características, é preciso contornar alguns mecanismos de controle da própria célula. A expressão de reguladores antiapoptóticos, a indução da angiogênese e a perda de adesão célula-célula e célula-matriz extracelular são alguns processos que devem ocorrer para aumentar a patogenicidade do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O câncer pode ter várias origens, os tipos derivados de células epiteliais são denominados carcinomas e são os mais comuns em humanos (ALBERTS *et al.*, 2010).

2.4 CÂNCER DE PELE

O câncer de pele pode ter várias células como origem, uma delas são os melanócitos transformados, originando o melanoma (*American Cancer Society*, 2015). No melanoma, alguns estímulos externos podem induzir a proliferação dos melanócitos. Em indivíduos expostos à radiação solar, por exemplo, os queratinócitos aumentam a secreção de fatores que regulam a sobrevivência dos melanócitos. Isto promove a diferenciação, proliferação e o aumento da produção de melanina. Assim, os melanócitos têm um papel fundamental na proteção contra danos causados por radiação solar na epiderme e, conseqüentemente, prevenindo o surgimento do câncer de pele (HEARING, 2011; *Nacional Cancer Institute*, 2016).

O câncer de pele pode ser do tipo melanoma ou do tipo não melanoma. O último decorre da transformação de outros tipos celulares da pele que não o melanócito (*American Cancer Society*, 2015).

2.4.1 Câncer de pele não melanoma

O câncer de pele do tipo não melanoma é o mais comum, porém o menos letal. Caracteriza-se pela proliferação descontrolada de outras células da epiderme que não o melanócito e tem como principais subtipos o carcinoma de células escamosas (SCC) e o carcinoma de células basais (BCC) (MANCIBO; HU; WANG, 2014; *Nacional Cancer Institute*, 2016).

O carcinoma de células basais (BCC) é o mais frequente, sendo responsável por 80% dos casos. Este tipo de câncer ocorre geralmente em locais menos expostos ao sol como cabeça e pescoço, mas acomete também regiões como nariz e lábios. Este tipo de câncer tem progressão baixa, porém caso não seja tratado, as células cancerosas podem invadir os tecidos adiposo, muscular e ósseo (D'ORAZIO *et al.*, 2013; PITTAYAPRUEK *et al.*, 2016).

O carcinoma de células escamosas (SCC) é o segundo tipo câncer de pele mais comum. É caracterizado pela proliferação desenfreada de queratinócitos. As causas do surgimento podem ser intrínsecas (fatores genéticos, fototipo¹ da pele, imunossupressão e infecção por papiloma vírus) e extrínsecas (como exposição à radiação UV e exposição a substâncias químicas presentes no cigarro). Ao contrário do carcinoma de células escamosas, o carcinoma de células basais tem uma progressão relativamente alta, havendo maiores chances de ocorrer metástases (D'ORAZIO *et al.*, 2013; PITTAYAPRUEK *et al.*, 2016).

2.4.2 Melanoma

O melanoma corresponde ao estágio final da carcinogênese melanocítica que se origina da transformação de melanócitos em células com capacidade proliferativa e de invasão aumentadas. Essas células transformadas, em sua maioria, ainda produzem melanina, de modo que os tumores de melanoma são geralmente castanhos ou negros. (*American Cancer Society*, 2015). A localização do melanoma pode variar levemente entre mulheres e homens. Nas mulheres, o melanoma

¹ Classificações da pele, de acordo com Fitzpatrick, que avalia a suscetibilidade da pele para os efeitos danosos da radiação solar.

normalmente se desenvolve nas extremidades, mais comumente nos membros inferiores, enquanto que nos homens, o melanoma é mais encontrado na área entre os ombros e quadris. Em ambos os sexos, o melanoma é mais comum nas palmas das mãos ou solas dos pés e unhas (VOLKOVOVA *et al.*, 2012; *American Cancer Society*, 2015). Além disso, segundo a Sociedade Americana do Câncer, o melanoma é 20 vezes mais comum em brancos do que em afro-americanos (*American Cancer Society*, 2015).

Os principais fatores que aumentam o risco do melanoma cutâneo são: características individuais, como o histórico familiar, número de nevos típicos e atípicos (manchas marrons características ou não do melanoma), cor da pele, incapacidade de bronzeamento e lesões de câncer de pele não melanoma; exposição à radiação ultravioleta, podendo ser tanto a exposição ao Sol como câmara de bronzeamento etc; doenças imunossupressoras e; exposição a substâncias cancerígenas (*American Cancer Society*, 2015).

O aparecimento de casos de câncer do tipo melanoma vem aumentando gradativamente no mundo todo, principalmente nos Estados Unidos (*Nacional Cancer Institute*, 2016). O melanoma é mais susceptível de se espalhar para os tecidos próximos e outras partes do corpo. A alta taxa metastática do melanoma torna-o muito letal. Além disso, é um dos tipos de câncer com maior dificuldade de cura. Dessa maneira, prevenir e tratar este tipo de câncer precocemente pode ajudar a prevenir a morte por melanoma (*Nacional Cancer Institute*, 2016).

2.4.3 Tratamento

Quando o câncer de pele é diagnosticado em sua fase inicial, ocorre a retirada cirúrgica do tumor e geralmente o paciente é curado, porém em casos avançados, menos de 5% dos pacientes sobrevivem mais de 5 anos (MILLER; MIHM, 2006; GRAY-SHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007).

Atualmente, os tratamentos para pessoas diagnosticadas com câncer de pele do tipo melanoma é a quimioterapia e a radioterapia. Na quimioterapia, são utilizados medicamentos citotóxicos para células tumorais, em sua maioria, induzindo a morte celular por apoptose (GRAY-SHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007; NIJENHUIS,

2013; WILKES; BARTON-BURKE, 2015). Porém, muitos pacientes não são bem responsivos a estes tratamentos, o que torna a taxa de mortalidade alta (*Nacional Cancer Institute*, 2016). Isto ocorre porque células tumorais podem desenvolver resistência às drogas quimioterápicas. Um possível motivo para esta resistência é o aumento na síntese de proteínas transportadoras de membrana, denominadas transportadores ABC, responsáveis por expulsar substâncias tóxicas do interior das células. Estas proteínas são naturalmente sintetizadas em células normais, porém é potencializada nas tumorais. Assim, este mecanismo é denominado de mecanismo de multirresistência a drogas ou xenobióticos (MDR/MXR) (SCHINKEL; JONKER, 2003; (WILKES; BARTON-BURKE, 2015).

2.5 PROTETOR SOLAR

2.5.1 Histórico

Durante a antiguidade, o padrão de beleza incluía ter pele clara, pois pele bronzeada era relacionada com trabalho braçal. Porém, após a Primeira Guerra Mundial, a palidez passou a ser associada às pessoas que apenas trabalhavam e que não tinham tempo para o lazer ao ar livre. A partir desta época, as pessoas começaram a se bronzear cada vez mais (WOLF *et al.*, 2001).

Atualmente, a população está mais consciente dos efeitos nocivos da exposição acentuada à luz solar e, por isso, cresceu a necessidade das medidas preventivas de fotoproteção. Assim, percebe-se algumas alterações comportamentais da sociedade, com maior prevenção pelas mulheres, a fim de evitar a exposição ao sol como o uso de vestimentas adequadas; e o aumento do uso de fotoprotetores tópicos (KULLAVANIJAYA; LIM, 2005; CHEN *et al.*, 2016).

Fotoprotetores são produtos constituídos por moléculas de compostos aromáticos conjugados com um grupo carbonila. Essas moléculas são capazes de absorver ou refletir comprimentos de onda na faixa do UV (MAIO *et al.*, 2011).

Em 1928, surgiu o primeiro filtro solar comercialmente disponível nos Estados Unidos da América. Contudo, sua popularização ocorreu apenas na década de 70

com filtros químicos e na década de 90 com filtros físicos (ROELANDTS *et al.*, 2007; URBACH *et al.*, 1976).

2.5.2 Características do Protetor Solar

Segundo a definição clássica de Pathak, o protetor solar é um produto destinado a bloquear a luz solar e proteger células viáveis da pele contra efeitos potencialmente danosos da radiação ultravioleta, como a queimadura solar e o câncer de pele (PATHAK; LOWE; SHAATH, 1997). Para que a fotoproteção ocorra, o protetor deve ser composto por filtros UV com capacidade de interagir com a radiação incidente entre 290 e 400 nm (SCHALKA; REIS, 2011). Estes filtros podem ser divididos em filtros inorgânicos (físicos), que refletem a luz UV, ou orgânicos (químicos), que absorvem a luz UV e que podem transformá-la em radiações energéticas inofensivas ao organismo humano (KULLAVANIJAYA; LIM, 2005; MANCEBO; HU; WANG, 2014). Estes produtos podem ser encontrados na forma de loções hidroalcoólicas, óleos, géis oleosos, aerossóis, entre outras (BALOGH *et al.*, 2011; SOHN *et al.*, 2015).

Além de bloquear a radiação ultravioleta, um fotoprotetor deve ainda 1) ser estável na pele humana, ao calor e sob a luz do Sol; 2) resistente à água (mantido na pele após 40 min de imersão, na água, da área do corpo recoberta pelo protetor); 3) inodoro e incolor; e 4) compatível com formulações cosméticas, não podendo ser irritante, sensibilizante ou tóxico (FLOR; DAVOLOS, 2007; NOHYNEK; SCHAEFER, 2001; SAMBANDAN; RATNER, 2011).

Para que haja uma proteção completa da pele, o FDA (*Food and Drug Administration*) Americano recomenda que seja aplicado 2 mg/cm² de protetor (STENBERG; LARKO, 1985). Porém, a quantidade média aplicada pelas pessoas é em torno de 0,5 mg/cm² e os protetores são aplicados de forma incorreta no que se refere à frequência do uso, escolha do produto adequado a cada tipo de pele, forma de aplicação, entre outros fatores (CRUZ *et al.*, 2007; BECHTHOMSEN; WULF, 1992; AUTIER *et al.*, 2001; SAMBANDAN; RATNER, 2011).

2.5.3 Filtros Físicos

Os filtros físicos ZnO e TiO₂ são óxidos cuja característica é refletir luz no espectro do UV em virtude de seus altos índices de refração. Por isso, no início da década de 90, ZnO e TiO₂ passaram a ser incorporados aos protetores solares e, atualmente, são os mais utilizados para a proteção da luz solar (WOLF *et al.*, 2001; MCSWEENEY, 2016). Esses filtros são geralmente mais seguros do que os orgânicos, sendo comumente considerados atóxicos e indicados para pacientes com hipersensibilidade. Em particular, ZnO e TiO₂ estão na lista de ingredientes ativos seguros para uso em protetores solares, sendo inclusive, os filtros solares recomendados para uso infantil (PALM; O'DONOGHUE, 2007; QUATRANO; DINULOS, 2013). Sendo assim, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) listou os filtros inorgânicos permitidos no Brasil, bem como suas porcentagens máximas permitidas (tabela 1; BRASIL, 2002; BRASIL, 2006).

Tabela 1 – Filtros inorgânicos permitidos pela ANVISA e suas concentrações

Substâncias	% máxima permitida
Óxido de Zinco	5-25%
Dióxido de Titânio	5-25%
Subcarbonato de bismuto	5-10%
Subgalato de bismuto	5-10%
Subsalicisilato de bismuto	5-10%
Estearato de magnésio	10-20%
Talco	10-20%

Fonte: BRASIL, 2006

Um ponto negativo da utilização dos filtros ZnO e TiO₂ é a tendência destas partículas deixarem a superfície da pele esbranquiçada, o que não é muito aceito pelos consumidores. Porém, nos últimos anos, empresas buscaram diminuir o tamanho das partículas, da escala micromométrica para nanométrica, sem alterar sua eficácia e proteção. Desta forma, estas partículas foram reduzidas a nanopartículas (NPs) com tamanhos na faixa de 70 a 200 nm, uma vez que o seu tamanho reduzido

origina preparações mais transparentes, o que é esteticamente mais aceito pelos consumidores (FLOR; DAVOLOS, 2007; BAILLO; LIMA, 2012; MCSWEENEY, 2016).

Contudo, as mesmas propriedades que tornam estas NPs atrativas, como o pequeno tamanho e a elevada área de superfície, podem ser também responsáveis por efeitos nocivos no organismo (SANTOS, 2012). Pesquisadores já mostraram que estes compostos na escala nanométrica podem atravessar a primeira camada da epiderme e chegar a locais que são inacessíveis para partículas de maior tamanho (COELHO *et al.*, 2016). Um estudo que comparou ZnO com ZnO-NPs demonstrou que o óxido na escala nanométrica é mais tóxico do que ZnO (ROY *et al.*, 2011). Além disso, outra característica preocupante dessas NPs é sua fotoativação, permitindo que promovam a produção de espécies reativas de oxigênio e causem danos ao organismo. Em virtude disto, as formas de nanopartículas de ZnO e TiO₂ presentes nos protetores solares são geralmente encapsuladas, o que promove outros benefícios além de impedir a fotoativação, como: aumento da estabilidade; liberação controlada; direcionamento para locais específicos; promoção da penetração cutânea (SANTOS, 2012).

2.6 ÓXIDO DE ZINCO E DIÓXIDO DE TITÂNIO

O titânio está entre os dez elementos mais comuns da crosta terrestre. Contudo, sua alta afinidade pelo oxigênio e outros elementos não permite que seja encontrado na forma pura. Em sua forma nanométrica, o TiO₂ mantém suas propriedades de espalhamento e reflexão de raios UV; por isso é largamente utilizado em protetores solares. As TiO₂-NPs podem existir em três formas cristalinas: rutilo, anatásio e brookita. Mas, apenas as formas rutilo e anatásio são utilizadas na forma comercial (IAVICOLI; LESO; BERGAMASCHI, 2012). A forma rutilo é a que apresenta maior eficácia na proteção contra os raios UV, uma vez que é a mais estável termodinamicamente (SHI *et al.*, 2013). Além disso, pesquisas mostram que a forma anatásio é mais tóxica do que a rutilo (XUE *et al.*, 2010). Contudo, geralmente não há especificações de qual forma está sendo utilizada e a maioria das NPs possuem a mistura da forma anatásio e rutilo (IAVICOLI; LESO; BERGAMASCHI, 2012; SHI *et al.*, 2013).

O óxido de zinco é um óxido metálico amplamente utilizado na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética. ZnO possui uma coloração branca, altamente opaca e com grande poder de reflexão da luz, o que justifica sua aplicação como em protetores solares (LU *et al.*, 2015). ZnO pode ser encontrado como nanoestruturas em diferentes morfologias como nanobastões nanofios, nanotubos, nanoesferas (LU *et al.*, 2015).

2.6 Efeitos das Nanopartículas de ZnO e TiO₂

Apesar das ZnO-NPs e TiO₂-NPs estarem na lista de filtros permitidos pela ANVISA, ainda há poucos estudos que relacionam os efeitos dessas NPs nos organismos vivos. Já é evidente que as nanopartículas dos filtros inorgânicos apresentam propriedades químicas, mecânicas, elétricas e ópticas diferentes das dos seus homólogos maiores (BURNETT; WANG, 2011). Dessa forma, a grande preocupação é a possível penetração destas nanopartículas na pele e, por conseguinte, a seu transporte pela circulação sanguínea para vários órgãos. Uma vez no interior do organismo, as NPs podem interagir com vários tipos celulares, pois células não fagocitárias também têm a propensão de internalizar partículas, e interferir na homeostase celular. Além disso, essas alterações celulares significativas podem ativar vias que irão promover o surgimento do câncer (ARAÚJO; LIMA, 2007; LU *et al.*, 2015).

Essas NPs já foram descritas como agentes indutores de danos no DNA em células epiteliais A431, células de hepatocarcinoma (HepG2) e em macrófagos; além de diminuírem a viabilidade e aumentarem o estresse oxidativo nestas células (SHARMA *et al.*, 2009; SHARMA; ANDERSON; DHAWAN, 2012; SHUKLA *et al.*, 2011; PATI *et al.*, 2016). Em células de melanoma A375, as ZnO-NPs provocaram um aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio, depleção de glutatona e uma consequente indução de apoptose via caspase-3. Desta forma, estudos sugerem que estas NPs podem ser citotóxicas e genotóxicas para diversos tipos celulares (ALARIFI *et al.*, 2013). Em fibroblastos de rato (L929) e células de carcinoma de cólon humano, ZnO-NPs também foram apontadas como indutoras de um aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio e redução da viabilidade (liberação da lactato

desidrogenase do citosol por rompimento da membrana plasmática) (JIN *et al.*, 2008; BERARDIS *et al.*, 2010).

Além disso, estudos também apontam a luz UV como causadora de danos no DNA de vários tipos celulares como célula de fígado epitelial humano (HEK293), células embrionárias de fibroblasto (NIH/3T3) e queratinócitos imortalizados. Ainda, essas células, na exposição simultânea das ZnO-NPs e TiO₂-NPs e luz UV, tiveram esses danos aumentados (DEMIR *et al.*, 2014; TYAGI *et al.*, 2016).

3 PROBLEMA

A exposição de pessoas com melanoma às NPs presentes no protetor solar é capaz de afetar características das células associadas ao prognóstico do câncer.

4 HIPÓTESE

A exposição de células tumorais às nanopartículas de óxido de zinco e dióxido de titânio, e exposição simultânea a luz UV, afeta sua malignidade ao torná-las mais resistentes, podendo influenciar a progressão da doença.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Verificar se as nanopartículas presentes em protetores solares, com e sem exposição UV, afetam características de células de melanoma murino B16F1 *in vitro* associadas a malignidade destas células.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS E METAS

- Expor células de melanoma murino B16F1 a ZnO-NP e TiO₂-NP, e associação de ambas nanopartículas para verificar:
 - Viabilidade celular através do ensaio de Vermelho Neutro;
 - Proliferação celular por meio do ensaio de Cristal Violeta;
 - Atividade de transportadores ABC envolvidos com o mecanismo de resistência a multidrogas (MDR);
 - Produção de espécies reativas de oxigênio;
 - A capacidade de interferência das NPs no ciclo celular;
 - Migração e proliferação celular através do ensaio de *scratch*;
 - Interferência da luz UV nos ensaios supramencionados.

6 JUSTIFICATIVA

Segundo o Instituto Nacional do Câncer, o câncer é a maior causa de morbidade e mortalidade na Terra, representando cerca 14 milhões de novos casos e 8 milhões de mortes notificados em 2012 (INCA, 2015). Historicamente, a partir de 1960, doenças infecciosas e parasitárias deixaram de ser a principal causa de morte e deram lugar a doenças do aparelho circulatório e neoplasias. Caso a ocorrência do câncer continue a aumentar, estima-se que no ano de 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas, anualmente, com câncer (INCA, 2015).

O aumento da incidência do câncer resulta de três fatores principais: o aumento da expectativa de vida, a melhoria dos métodos diagnósticos e o aumento da exposição a agentes etiológicos (LAGES *et al.*, 2012). Um dos agentes etiológicos que mais aumenta a incidência do câncer de pele é a exposição solar. Assim, atualmente, há várias campanhas de prevenção e maior conhecimento e responsabilidade das pessoas para utilizarem protetores solares por isso, há o aumento da utilização dos protetores solares e a exposição às substâncias que os compõem. Dentre essas substâncias, as ZnO-NPs e TiO₂-NPs são as mais presentes nos protetores atuais. Contudo, a influência das NPs presentes no protetor solar sob a fisiologia de células tumorais e a eficiência do tratamento em indivíduos já acometidos pelo melanoma não têm sido investigadas.

7 MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 DESENHO EXPERIMENTAL

7.1.1 Modelo de Estudo

Células de linhagem de melanoma murino B16F1 foram selecionadas para o presente estudo, em virtude desta linhagem já ser bem estabelecida e ter a possibilidade de complementação dos dados através de estudos *in vivo* (PETER *et al.*, 2001; OVERWIJK; RESTIFO, 2001). Essa linhagem foi isolada do camundongo *Mus Musculus* (C57BL/6J), sendo a B16F1 menos metastática e a B16F10 mais metastática e também com maior taxa de proliferação (FIDLER, 1973; DANCIU *et al.*, 2013). Para este trabalho, a linhagem menos metastática, B16F1, foi selecionada porque é possível observar efeitos de maior malignidade causados pelas NPs, o que seria mais difícil em células que estão no limite da agressividade tumoral.

A linhagem B16F1 possui algumas características específicas (FIGURA 4), como a morfologia típica estelar e a grande produção de melanina (ATCC, 2015; BCRJ, 2015).

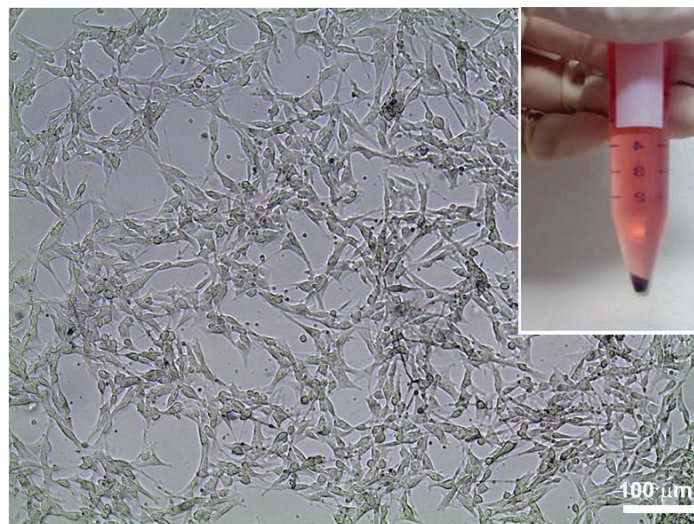


FIGURA 4. Células B16F1 e pellet de células mostrando que as células estão produzindo melanina.
Fonte: A autora

7.1.2 Cultivo das células

As células foram cultivadas, seguindo os métodos de cultivo celular estabelecidos pela ATCC e Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), em garrafas com meio DMEM (Dulbecco's Minimum Essential Medium) (Cultilab), pH 7,4; 4500 mg.l⁻¹ de glicose; 1500 mg.l⁻¹ de bicarbonato de sódio), 4 mM de L-glutamina, 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Cultilab), 40 µg.ml⁻¹ de gentamicina, e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ até a confluência de 70% (ATCC, 2015; BCRJ, 2015).

A fim de tentar padronizar o número de passagens das células utilizadas nos experimentos, as células foram expandidas e estocadas. Para isso, culturas com confluência entre 70% foram congeladas em meio de congelamento contendo 40% SFB, 50% de meio DMEM e 10% de DMSO. A densidade das células criopreservadas foi de 1x10⁶ células por ml, que foram armazenados em nitrogênio líquido.

7.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

As ZnO-NPs (SIGMA-ALDRICH) e TiO₂-NPs (PARSOL® TX) foram caracterizadas em parceria com o professor pesquisador Arandi G. Bezzerra Jr. (Universidade Tecnológica Federal do Paraná).

A espectroscopia UV-Vis pode ser utilizada para caracterizar materiais de maneira qualitativa, identificando componentes presentes na amostra, e de maneira quantitativa, informando as quantidades dos componentes presentes. Isto ocorre em virtude da interação da luz com a amostra dentro da faixa do espectro que vai de 200 nm a 1025 nm. Inicialmente, é medido o espectro da luz transmitida pelo solvente, no qual as partículas foram produzidas, contido em uma cubeta de quartzo para que seja utilizado como referência. Após isto, é medido o espectro da luz transmitida através do coloide em estudo. Então, a quantidade de luz absorvida é dada em densidade óptica ou absorbância.

A técnica do Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS, *Dynamic Light Scattering*) é utilizada para mostrar o tamanho das partículas suspensas em meio líquido. Estas medidas são necessárias para a determinação da estabilidade de emulsões e a caracterização de nanopartículas.

As ZnO-NPs são transparentes nessas concentrações utilizadas enquanto as TiO₂-NPs são leitosas e uma leve coloração azul.

A absorbância das suspensões ZnO-NP, TiO₂-NP e suas misturas foi medida através do método UV-Vis. A ZnO-NP apresentou faixa de absorção entre 200 nm e 400 nm (região UV), com um pico em torno de 250 nm. A TiO₂-NP também apresentou absorção entre 200 nm e 400 nm, contudo apresentou maior absorção entre 300 nm e 400 nm, na região UVA (FIGURA 6).

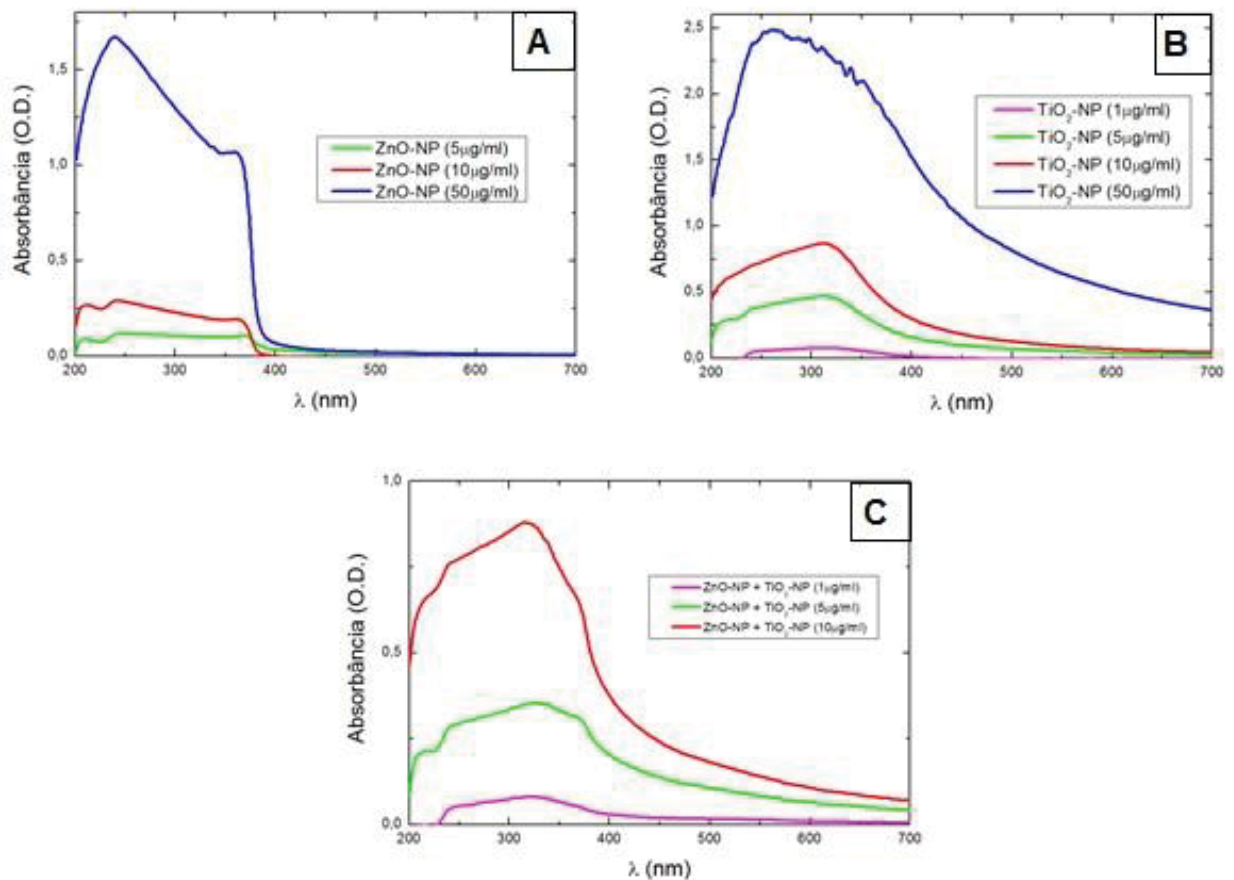


FIGURA 6. Espectro de absorção UV/Vis da amostra de ZnO-NP (A), TiO₂-NP (B) e ZnO-NP + TiO₂-NP (1:1) (C) em água. Eixo “y” representa o número de partículas, e eixo “x” o comprimento de onda.

Além da análise por UV-vis, as amostras também foram submetidas ao aparelho DLS para medição do tamanho médio das NP. As suspensões de ZnO-NP apresentaram a média de tamanho de aproximadamente 50 nm e as amostras de TiO₂-NP de 130 nm (FIGURA 7).

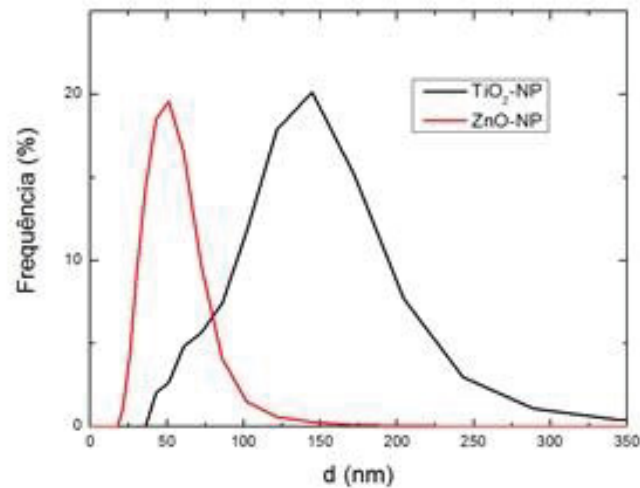


FIGURA 7. DLS de uma amostra de ZnO-NP e TiO₂-NP. ZnO-NP com faixas de tamanhos com maior frequência entre 25 e 75 nm e TiO₂-NP entre 100 e 200 nm.

A caracterização realizada mostra que as NPs absorvem luz na região UV, como era o esperado, visto que estas NPs são utilizadas para a proteção contra esta faixa de radiação. Além disso, conforme verificado na figura 6, quanto maior a concentração das NPs, maior a absorção da luz e assim, maior a proteção da pele. As TiO₂-NPs possuem uma faixa de absorção da luz maior do que as ZnO-NPs, o que indica que as TiO₂-NPs são mais eficientes na proteção contra UV, como foi constatado por Tyagi *et al.* (2016) em um estudo que comparou a eficiência de ambas NPs.

O tamanho é uma das características mais importantes das NPs (HOU *et al.*, 2013; FELTIS *et al.*, 2015). Há estudos que relatam que a toxicidade aumenta com a diminuição de seu tamanho (FELTIS *et al.*, 2015). Para as ZnO-NPs e TiO₂-NP, há uma tendência de utilizá-las com tamanhos cada vez menores para que não haja o efeito “esbranquiçado” indesejado pelos consumidores. Por isso, averiguar o tamanho destas NPs é de extrema importância para este trabalho. Assim, é utilizado, tanto em trabalhos da literatura como nos protetores solares, NPs com média de 20 a 200 nm (JIN *et al.*, 2008; SHARMA *et al.*, 2009; NAGELREITERA; VALENTA, 2013; AKHTAR *et al.*, 2015; FELTIS *et al.*, 2015; LU *et al.*, 2015). Neste trabalho, como pode ser visualizado pela figura 7, foi utilizado, em sua maioria, tamanhos entre 25 e 75 nm para as ZnO-NPs e 100 e 200 nm para as TiO₂-NPs. Logo, os parâmetros aqui apresentados estão de acordo com os utilizados na prática.

Quanto à aglomeração das NPs, não se pode afirmar que não há aglomerados, mas podemos inferir que não há agregados, uma vez que não houve discrepância na média de tamanhos das NPs. Porém, para confirmar esta suposição, seriam necessários mais experimentos.

Esses parâmetros analisados das NPs são essenciais para avaliar o potencial citotóxico das NPs, possibilitar que os experimentos apresentados sejam reprodutíveis.

7.3 SCREENING DAS CONCENTRAÇÕES DE NPs

As concentrações-teste foram selecionadas considerando a concentração máxima de nanopartículas permitida pela ANVISA (25%) e concentração de protetor solar indicada pelo FDA para uma proteção eficiente (2 mg/cm²), bem como a concentração de fato utilizada pelos consumidores (0,5 mg/cm²)². Assim, as seguintes concentrações foram selecionadas para a realização de um *screening* de viabilidade, utilizando o método do vermelho neutro, através do ensaio do vermelho neutro: 0 (controle), 1, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 400, 600, 800 e 1000 µg NP/ml.

Com base nos resultados do *screening*, foram selecionadas 5 concentrações diferentes de ZnO-NP e TiO₂-NPe 3 concentrações com a interação dessas NPs, uma vez que estão geralmente associadas nos protetores solares: 1, 5, 10, 30, 50 de ZnO-NPs; 1, 5, 10, 30, 50 de TiO₂-NPs; e 1, 5, 10 de ZnO-NPs + TiO₂-NPs µg NP/ml. Ao todo são 13 grupos expostos às NPs e 1 controle.

² Concentração máxima de NPs permitida pela ANVISA: 25% x 2 mg/cm² = 500 µg/cm². Como cada poço de microplaca de 96 poços (utilizada nos ensaios) possui área de 0,3 cm², para se manter a relação de 500 µg/cm², a quantidade de NPs a ser adicionada por poço deveria ser de 150 µg num volume total de 200 µl (volume de meio de cultura adicionado a cada poço). Assim, uma suspensão de nanopartículas a 750 µg/ml proverá 500 µg de NPs por cm², se 200 µl de volume desta suspensão fosse adicionado a cada poço de uma microplaca de 96 poços.

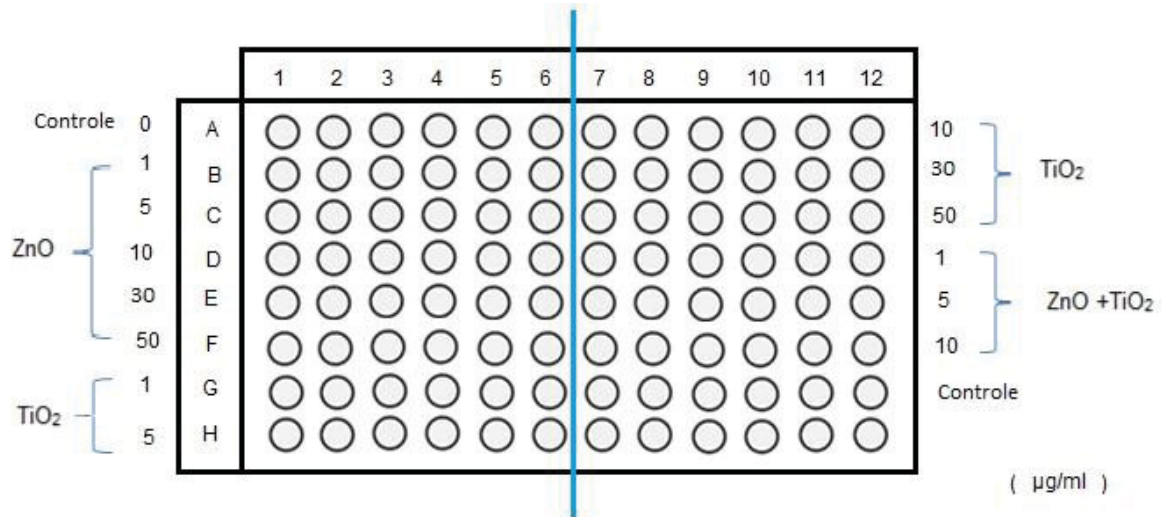


FIGURA 5. Figura representativa da disposição das concentrações utilizadas na placa de 96 poços. Fonte: A autora

Para o *screening*, tanto da ZnO-NP quanto da TiO₂-NP, foram selecionadas 12 concentrações, de acordo com os cálculos apresentados no desenho experimental, de maneira que iniciasse em uma concentração bem baixa ($1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) e chegasse próximo à concentração presente nos protetores solares ($1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Para as ZnO-NPs, as concentrações entre 50 e $400 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ causaram redução da viabilidade de 40 a 50% (FIGURA 8). Um resultado semelhante foi encontrado na exposição dessas NPs em queratinócitos, em que houve redução de 45% da viabilidade das células na concentração $40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (TYAGI *et al.*, 2016).

As concentrações acima de $600 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ apresentaram um leve aumento da retenção do vermelho neutro em relação às concentrações entre 50 e $400 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, o que pode ser uma possível interferência das NPs neste ensaio. Nestas concentrações muito altas, foi observado que as NPs utilizadas neste trabalho precipitam e agregam-se. Isto poderia ocasionar o aumento da absorbância observado.

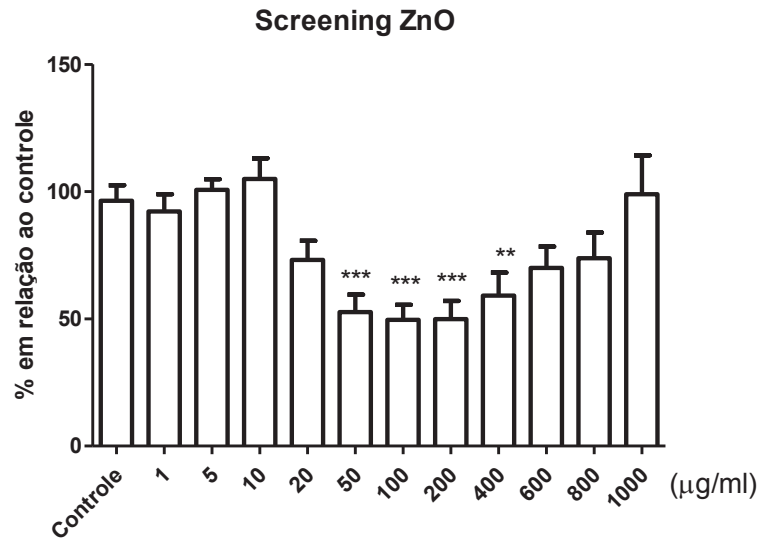


FIGURA 8. *Screening* das concentrações de ZnO-NP após 24h de exposição. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Para as TiO₂-NPs, as concentrações a partir de 100 µg.ml⁻¹ provocaram redução da viabilidade celular de 60 a 70% (FIGURA 9). Em células de fibroblastos pulmonares, as TiO₂-NPs também não reduziram a viabilidade em 50 µg.ml⁻¹. Contudo, ao contrário do ocorrido nas B16F1, não houve efeito algum em 100 µg.ml⁻¹ para a exposição em 24 h. Houve redução significativa da viabilidade apenas em 48 h de exposição (PERIASAMY et al., 2014). Isto poderia sugerir um estudo futuro em células B16F1 com exposição de 48 h às TiO₂-NPs.

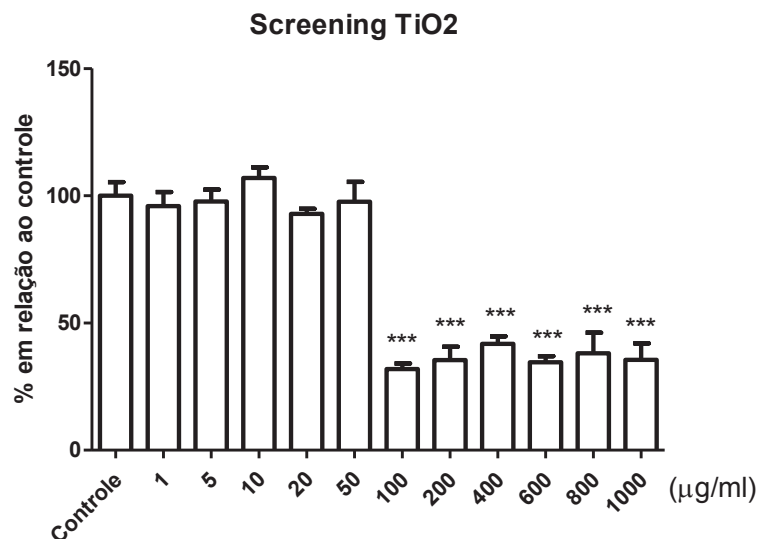


FIGURA 9. *Screening* das concentrações de TiO₂-NP após 24h de exposição. *** $p < 0,001$.

Após a realização do *screening*, estabelecemos um limite máximo de concentração para este trabalho em virtude do comportamento das NPs em altas concentrações. Para utilizar a concentração máxima de $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ foi necessário fazer a solução-estoque com $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (20x concentrada) e percebemos que nesta concentração, as suspensões estavam no limite da saturação. Além disso, foi realizado um levantamento bibliográfico das concentrações em diversos estudos com essas NPs, em sua maioria, as concentrações mais utilizadas foi entre 1 e $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (WANG *et al.*, 2013; DEMIR *et al.*, 2014; PERIASAMY *et al.*, 2014; AKHTAR *et al.*, 2015; ROY *et al.*, 2015; ANNANGI *et al.*, 2016; AUDE-GARCIA *et al.*, 2016; TYAGI *et al.*, 2016).

Dessa maneira, as concentrações de 1, 5, 10, 30 e $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ foram selecionadas para os ensaios subseqüentes, levando-se em consideração os resultados do *screening*, as concentrações presentes nos protetores, o comportamento das NPs em suspensões e as concentrações utilizadas em outros trabalhos. Apesar de não ter ocorrido redução significativa na concentração mais alta de $\text{TiO}_2\text{-NP}$, outros parâmetros celulares podem ser influenciados nessas concentrações escolhidas.

Além destas concentrações selecionadas das NPs em suas formas individuais, foram incluídas no estudo as três menores concentrações selecionadas (1, 5 e $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) para misturas (1:1) das ZnO-NPs e $\text{TiO}_2\text{-NPs}$. O efeito das associações é importante, uma vez que estas NPs estão juntas nas formulações da maioria dos protetores solares.

7.4 LÂMPADA UV

Considerando que os protetores são aplicados sobre a pele e esta é exposta a luz solar, é importante testar a influência da luz UV sobre o efeito das NPs. Para isso, escolhemos uma lâmpada que emitisse radiação semelhante a algumas faixas da luz solar para verificar se havia efeitos das NPs nas células B16F1 após serem expostas à luz UV.

A lâmpada utilizada neste trabalho foi a LIFE-GLO 15W de amplo espectro. Para confirmar seu espectro foi utilizada também a espectroscopia UV-Vis.

Com base nos dados da literatura, foram pré-selecionadas as fluências³ entre 30 mJ/cm² e 50 mJ/cm² para a exposição da luz UV logo após adicionar as NPs aos poços (KRUEGER *et al.*, 1995; STADLER *et al.*, 2009; YAMAMOTO *et al.*, 2013; OLIVER *et al.*, 2016). Dessa maneira, a fim de padronizar a emissão de energia da lâmpada para as microplacas, foi medida a potência da lâmpada com o aparelho *μjoule meter*, o qual é utilizado para medir pequenos pulsos de energia.

Para todos os experimentos com a lâmpada UV foi utilizado um controle sem a exposição da luz UV concomitantemente à exposição das células à lâmpada.

7.4.1 Ensaio com a Lâmpada UV

Para que houvesse mimetização da luz solar nos experimentos subsequentes, foi imprescindível medir o espectro da lâmpada UV, para que pudéssemos verificar o quão próximo ela era da luz do Sol. Este espectro foi medido pelo método UV-Vis. Como o esperado, a lâmpada LIFE-GLO 15W é semelhante ao espectro da luz solar, nos comprimentos de onda da luz UV desejada (290-400 nm) (FIGURA 10). Os picos presentes na FIGURA 10 aproximadamente nos comprimentos de onda 310 nm e 370 nm, são provavelmente devido ao mercúrio presente nas lâmpadas (RAPOSO *et al.*, 2003). A diferença de intensidade entre o espectro da luz do Sol e o da lâmpada não foi relevante, pois a fluência incidida na placa foi padronizada. Dessa forma, é possível verificar a interferência da luz UV em mecanismos celulares das B16F1 em exposição simultânea às ZnO-NPs e TiO₂-NPs.

³ Fluência: muito utilizada para descrever a taxa de energia que está incidindo em tecidos biológicos. Leva em consideração a irradiância (potência pela área) e o tempo de exposição.

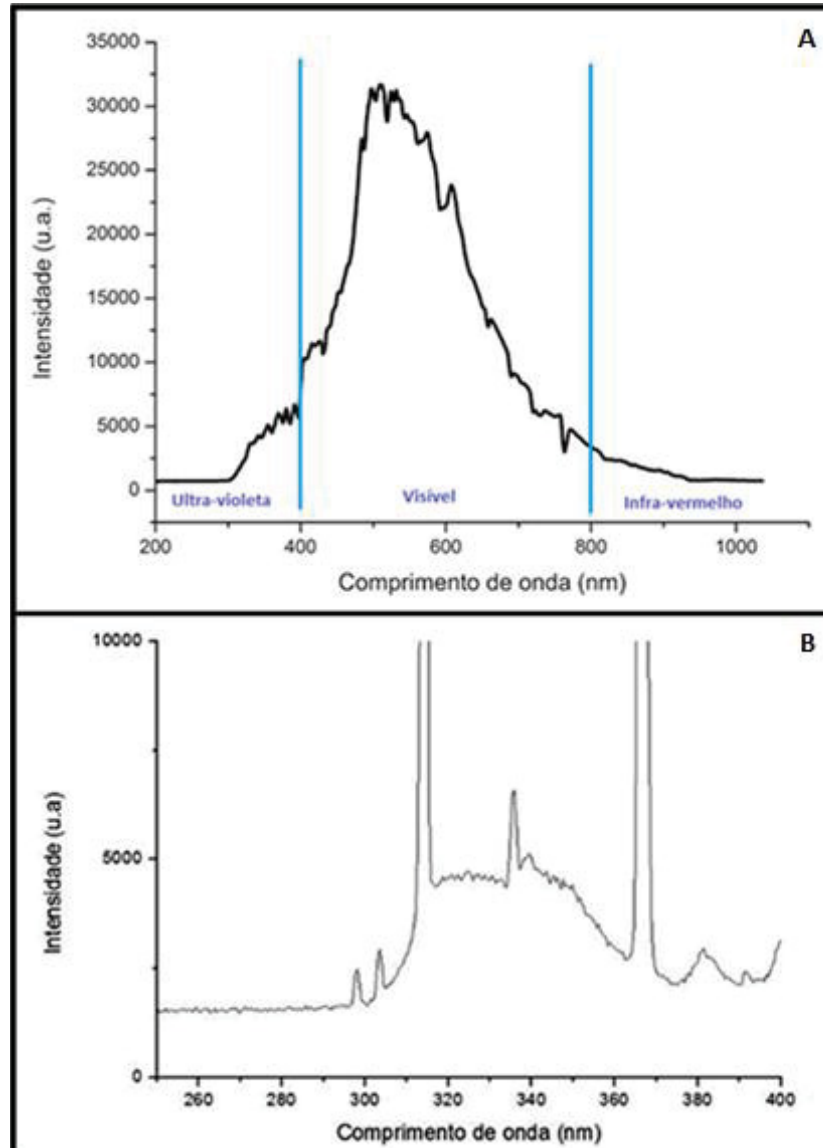


FIGURA 10. A: Espectro da luz solar. B: Espectro da lâmpada UV LIFE-GLO 15W. Fonte: Adaptada de BERLIM *et al.*, 2014.

Primeiramente, a potência da lâmpada foi medida com o aparelho *μjoule meter* o qual foi posicionado logo abaixo da lâmpada, na mesma distância (5 cm) onde estaria a placa de cultura (FIGURA 11). Foram disparados 50 tiros em diferentes tempos para que pudesse ser feita a média da potência da luz em J/s. A média calculada foi $3,8 \times 10^{-6}$ J/s. Com base nessa média, foi possível calcular⁴ o tempo de

⁴ Fórmula utilizada: $F (30 \text{ mJ/cm}^2) = P (3,8 \times 10^{-6} \text{ J/s}) / \text{área} (0,3 \text{ cm}^2) \times \text{tempo}$. Com isso, chegamos no tempo aproximado de 40 min para 30 mJ/cm^2 e 60 min para 45 mJ/cm^2 .

exposição das células à luz UV, sempre tendo como padrão a distância entre a placa e a luz.

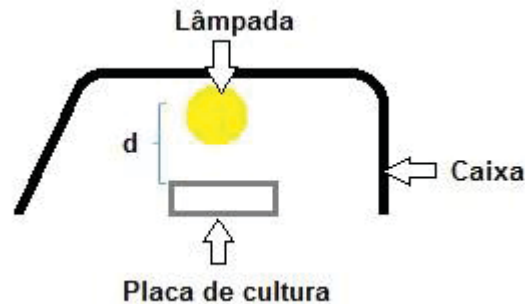


FIGURA 11. Exposição das células à luz UV. Fonte: a autora.

Diante dos cálculos realizados, foram selecionadas as fluências 30 e 45 mJ/cm^2 , pois estabelecemos o máximo de 60 min para a exposição das células à lâmpada UV visto que, para a exposição as células ficaram fora da incubadora. Dessa forma, para as fluências serem testadas, foi realizado o ensaio do vermelho neutro com normalização pelas células não expostas à luz UV. Para todos os ensaios com a exposição UV foi realizado um controle sem exposição UV, concomitantemente, para a normalização posterior.

Uma vez decido a fluência, todos os ensaios realizados sem a exposição UV foram repetidos expondo as células à luz UV logo após adicionar as NPs nos poços. Assim, poderemos verificar se quando expostas à luz UV juntamente com as NPs, ocorre alteração nas respostas celulares das células B16F1 quando comparadas com células sem exposição UV.

7.4.2 Comparação das fluências

Foi realizado um ensaio piloto para comparar as fluências pré-selecionadas (30 e 45 mJ/cm^2). O objetivo foi verificar se haveria diferença em alguma concentração quando comparada com o controle e se essas fluências não seriam muito letais para as células (FIGURA 12 e 13). Ambas fluências geraram efeitos em alguns dos grupos expostos. Optamos pela fluência de 45 mJ/cm^2 , expondo as células a 60 min à luz UV.

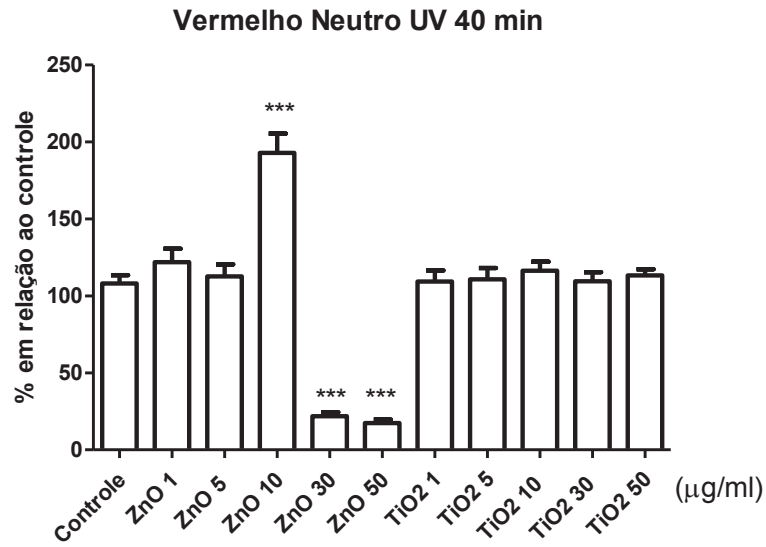


FIGURA 12. Vermelho neutro com exposição de 40 min. à luz UV após 24h de exposição em diferentes concentrações de TiO₂-NP, ZnO-NP e TiO₂-NP + ZnO-NP.

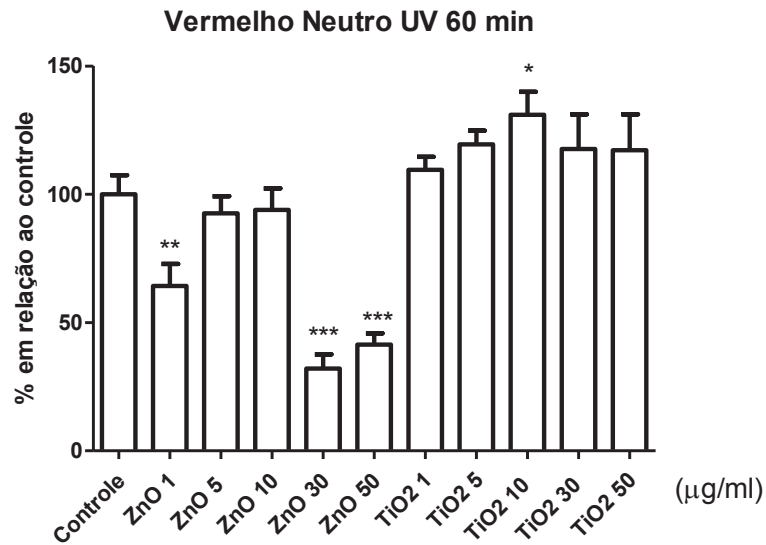


FIGURA 13. Vermelho neutro com exposição de 60 min. à luz UV após 24h de exposição em diferentes concentrações de TiO₂-NP, ZnO-NP e TiO₂-NP + ZnO-NP.

Para a confirmação dos efeitos da fluência 45 mJ/cm², o gráfico foi normalizado com relação ao controle sem exposição UV (FIGURA 14).

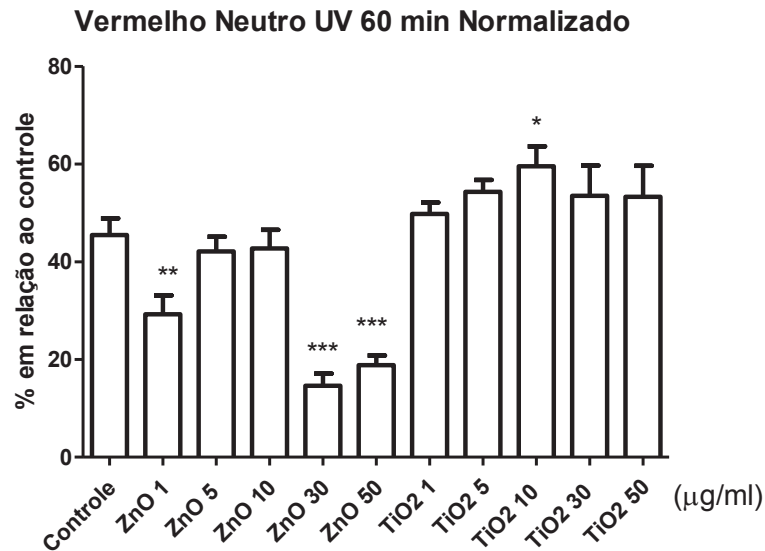


FIGURA 14. Exposição com 60 min à luz UV. Gráfico normalizado com o controle sem a exposição UV (100%). Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

Dessa maneira, o gráfico normalizado (FIGURA 14) mostrou que a fluência selecionada (45 mJ/cm^2) não foi letal para as células e, por isso, optamos por expor as células por mais tempo na UV (60 min). Contudo, a exposição das células à fluência de 30 mJ/cm^2 não seria completamente descartada, podendo ser interessante para futuros ensaios.

7.5 PARÂMETROS CELULARES

Para os ensaios do vermelho neutro, cristal violeta, MXR e espécies reativas de oxigênio, após expansão, as células foram plaqueadas em microplacas de 96 poços, com uma média de 10.000 células por poço, em $200 \mu\text{l}$ de meio. Para o *scratch*, 15.000 células foram plaqueadas por poço, também $200 \mu\text{l}$ de meio em microplacas de 96 poços; e para o ciclo, utilizou-se placas de 24 poços com uma média de $1,25 \times 10^5$ por poço, em 1 ml de meio. Para a contagem das células, foi necessário utilizar uma solução enzimática de tripsina a 0,25% e EDTA a 0,02% em PBS para dissociá-las da superfície da garrafa de cultivo. Em seguida, foi acrescentado meio de cultura suplementado com soro fetal bovino para a inativação da tripsina. Após isto, a solução com as células foi centrifugada e ressuspensa para a contagem na câmara de *Neubauer* em um microscópio de luz invertido.

Após 24 h do plaqueamento, as células foram expostas às NPs pelo período de 24 h. Para a exposição, as concentrações-estoques das NPs (20X concentradas) foram diluídas no momento da exposição.

7.5.1 Internalização do Vermelho Neutro

Para avaliar o potencial citotóxico das NPs, é necessário verificar se após 24 h de exposição às NPs as células continuam viáveis. Dessa forma, foi utilizado o ensaio colorimétrico do vermelho neutro.

O ensaio do vermelho neutro baseia-se na capacidade dos endossomos e lisossomos das células viáveis reterem o corante após internalização. O vermelho neutro é um corante catiônico fraco que penetra rapidamente nas células através das membranas celulares por difusão e é aprisionado intracelularmente nos lisossomos, devido ao seu conteúdo mais ácido. Mudanças na superfície celular ou na membrana lisossômica, causadas por contaminantes químicos, por exemplo, resultam na diminuição da retenção do corante. Dessa maneira, é possível verificar a viabilidade das células, uma vez que a quantidade de corante internalizado é diretamente proporcional ao número de células viáveis (SVENDSEN *et al.*, 2004).

Após o tempo de exposição às NPs, o meio de cultura foi substituído por outro contendo $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de vermelho neutro e incubado por 2 h. Após incubação, as placas foram lavadas três vezes com solução de formol (0,5%) e de cloreto de cálcio em água (0,1%) para remoção do corante não incorporado e fixação das células. Para extração do corante, 300 μl de uma solução contendo ácido acético (1%) e etanol (50%) foi utilizada. Após 15 min de repouso, o conteúdo dos poços foi homogeneizado para ressuspensão do corante. Após 5 min de repouso para a precipitação dos restos celulares, 200 μl do sobrenadante da solução foi transferida a uma microplaca para leitura no espectrofotômetro a 540 nm (BORENFREUND; PUERNER, 1985; SHUKLA *et al.*, 2011).

7.5.2 Proliferação Celular

O ensaio do cristal de violeta foi empregado para avaliar a capacidade das NPs de inibir ou aumentar a proliferação das células B16F1. O cristal violeta (cloreto de pararosanilina) é um corante básico capaz de corar o núcleo das células em cultura, de forma que a taxa de crescimento celular é refletida pela determinação colorimétrica das células coradas. Para isso, as células foram incubadas por 24 h na presença de NPs em meio de cultura contendo 2% de SFB, visto que o SFB contém grande quantidade de mitógenos, o que pode mascarar um efeito pró-proliferativo das NPs. Após exposição, as células foram lavadas com 100 µl de PBS, fixadas em 50 µl de paraformaldeído 4% por 30 min em gelo e coradas por meio da adição de 100 µl de solução cristal violeta (0,25 mg.ml⁻¹ em H₂O) por 10 min em temperatura ambiente. Após a incubação, os poços foram lavados com 150 µl de dH₂O e adicionados 100 µl de ácido acético 33% em cada poço para extração do corante durante 30 min, sob agitação. Após isso, foi realizada a leitura da absorbância em comprimento de onda de 570 nm (VEGA-AVILA, E.; PUGSLEY, 2011).

7.5.3 Atividade De Transportadores do Efluxo de Drogas

Muitas células cancerosas apresentam resistência a alguns quimioterápicos. Isto ocorre porque estas células são capazes de expressar grande quantidade de transportadores que podem expulsar ativamente certas drogas, evitando seu acúmulo intracelular (SCHINKEL; JONKER, 2003). As proteínas transportadoras do sistema MDR pertencem a superfamília ABC, sendo dependentes de ATP e devido a isso, muitas células tumorais são frequentemente associadas com um consumo muito alto de ATP. Existem várias subfamílias ABC, contudo a subfamília BCR vem sendo bastante caracterizada como a principal relacionada com a resistência a quimioterápicos (LESLIE *et al.*, 2005). Dessa maneira, a expulsão de substâncias do interior da célula tumoral é responsável pela resistência à quimioterapia. Este fenômeno é conhecido como fenótipo de resistência a multidrogas ou MDR. Para verificar a atividade dos transportadores MDR, o meio de cultura das células expostas às NPs foi removido e adicionados 200 µl de PBS contendo 1 µM de

rodamina B. Após 30 min de incubação, os poços foram lavados duas vezes com PBS e adicionados 250 µl de PBS para leitura em um espectrofluorímetro, utilizando o comprimento de onda de excitação de 540 nm e o comprimento de onda de emissão de 580 nm (LIEBEL *et al.*, 2015).

7.5.4 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio

Uma vez no interior da célula, as NPs podem gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) e provocar estresse oxidativo. Esta condição gera um desequilíbrio redox no qual a defesa antioxidante da célula não é capaz de conter estas espécies pró-oxidantes, causando alterações em vias de sinalização celular ou disfunção celular (PASCHOALINO *et al.*, 2010). No caso específico das células B16, há indícios de que as EROs podem influenciar na produção de melanina dessas células (LIU *et al.*, 2012).

Para verificar a produção de EROs a sonda diclorofluoresceína diacetato (H₂DCFDA) foi utilizada. Após o tempo de exposição, o meio de cultura foi descartado e 200 µl de meio DMEM com H₂DCFDA a 10 µM foram adicionados. As células foram incubadas por 15 min a 37 °C e lavadas uma vez com PBS. Após isso, 200 µl de PBS foram adicionados e a placa seguiu para medição da fluorescência em leitor de microplaca a 488 nm (excitação) e 530 nm (emissão) (SHUKLA *et al.*, 2011).

7.5.5 Ensaio do *SCRATCH*

A capacidade de migração das células neoplásicas pode aumentar em relação às células normais. Para isso, este parâmetro também foi avaliado nas células B16 pelo ensaio *scratch*, que consiste na geração de um espaço sem células numa cultura confluenta através da realização de um risco (*scratch*) que remove parte das células. As células vizinhas ao espaço sem células tendem a fechar este espaço, através de migração e proliferação. Após 24 h de exposição, uma linha da placa foi raspada com uma ponteira P-200 no meio do poço. As células desaderidas no risco foram então removidas juntamente com o meio de cultura. Meio DMEM sem soro fetal bovino foi

adicionado. Para a análise, verificou-se a área sem células no tempo 0 (logo após a realização do risco) e após 48 h de cultura em imagens panorâmicas (objetiva de 4X) capturadas em microscópio invertido e analisadas com o software livre ImageJ® (<http://imagej.nih.gov/ij/>). (LIANG; PARK; GUAN, 2007; YANG *et al.*, 2015).

7.5.6 Ensaio de Ciclo Celular

Este ensaio é importante para verificar se as NPs, nas concentrações utilizadas, interferem, de alguma maneira, no ciclo celular das células B16F1.

Para este ensaio, foram plaqueadas 125.000 células por poço em placas de 24 poços, utilizando dois poços por grupo para, no final, totalizar 1 milhão de células. Após 24 h, as células foram expostas às NPs por 24 h. Findado o tempo de exposição, o meio foi retirado, o poço lavado com PBS e as células soltas com tripsina 0,25% e EDTA 0,02% em PBS. Todo este conteúdo foi transferido para um tubo falcon (15 ml), o material centrifugado por 3 min, o sobrenadante descartado e o material fixado em etanol 70% e mantido a 4 °C. Para a análise, as células foram centrifugadas, lavadas com PBS, centrifugadas novamente e adicionado o staining buffer (PBS com 2% de SFB). Então, o sedimento de células foi ressuscitado em 0,25 ml de PBS, adicionado o material foi novamente centrifugado e o sobrenadante descartado e então adicionado 500 µl de Iodeto de propídio (PI) (BD Pharmingen). Após 15 min de incubação, protegida da luz, as células coradas foram analisadas através do citômetro de fluxo (BD FACS Calibur) (BOQUEST, 1999). Os dados gerados foram analisados através do programa *Flowing* (www.flowingsoftware.com/). (BOQUEST, 1999).

7.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Foram realizados três ou quatro experimentos independentes de cada ensaio. Os dados obtidos foram testados quanto à normalidade. Dados com distribuição normal foram comparados através da Análise de Variância de uma Via (*one-way ANOVA*), seguida pelo pós-teste de Dunnett, quando aplicável. Dados sem distribuição normal foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-

teste Dunn's. Os seguintes grupos foram comparados: controle vs grupos expostos à ZnO-NP ($1-50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$); controle vs grupos expostos ao TiO₂-NP ($1-50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$); controle vs misturas (TiO₂-NP + ZnO-NP). Interação toxicológica foi verificada através da comparação das misturas de NPs vs as concentrações correspondentes de ZnO-NP e TiO₂-NP naquelas misturas.

8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1 VIABILIDADE CELULAR

No ensaio sem a exposição UV, houve redução de 80% da viabilidade das células expostas a 30 e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ da ZnO-NPs, como pode ser observado pelos asteriscos no gráfico (*). Isto pôde ser observado pela redução de retenção do vermelho neutro pelas células. Houve também efeito de interação, representado pelo sustenido (#) no gráfico, das ZnO-NPs e TiO₂-NPs a 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, com aumento de aproximadamente 30% da retenção do vermelho neutro. Esta retenção está relacionada com a viabilidade celular, pois quanto mais danificadas as células, menor a retenção deste corante.

Nos demais grupos, não houve diferença significativa em relação ao controle bem como interação das NPs quando comparadas isoladamente (FIGURA15).

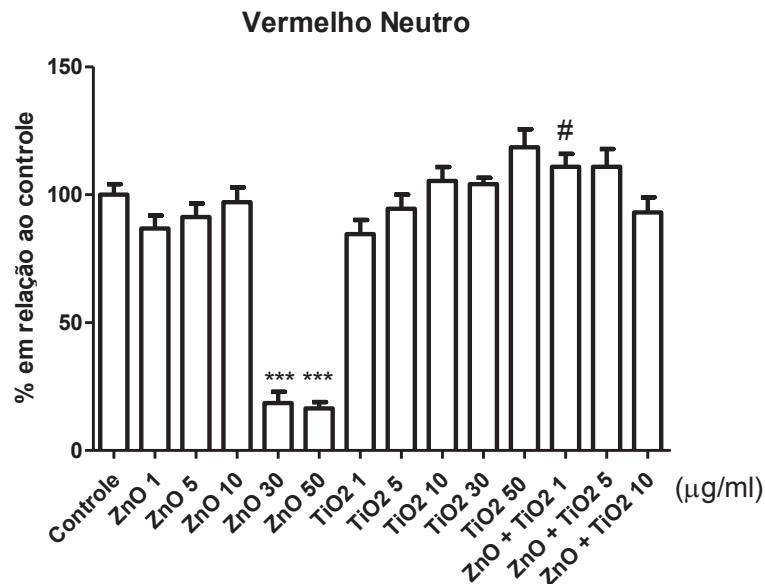


FIGURA 15. Viabilidade celular após 24 h de exposição em diferentes concentrações de TiO₂-NP, ZnONP e TiO₂-NP + ZnO-NP. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle. *** $p < 0,001$. Sustenido (#) indica interação toxicológica entre as NPs.

Já no grupo exposto à luz UV, houve a mesma redução do grupo sem a exposição UV nas concentrações 30 e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ da ZnO-NP. Além disso, o grupo que

houve efeito de interação das NPs com aumento de viabilidade não apresentou diferença no experimento com exposição UV. Ainda, houve também redução de 37% e 27%, respectivamente, da viabilidade dos grupos 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de ZnO-NP e 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de TiO₂-NP (FIGURA 16).

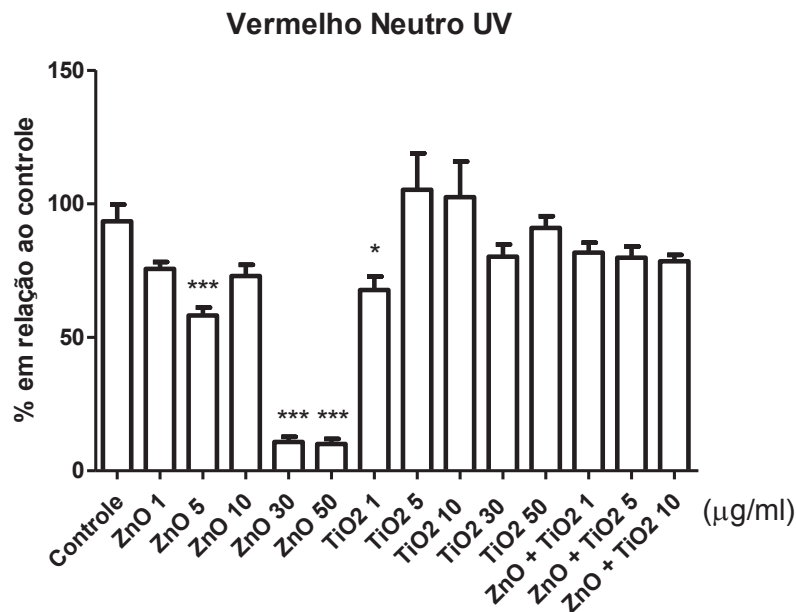


FIGURA 16. Viabilidade celular com exposição à luz UV após 24 h de exposição em diferentes concentrações de TiO₂-NP, ZnONP e TiO₂-NP + ZnO-NP. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Comparando os resultados sem a exposição UV e com a exposição, pode-se perceber que a luz UV resultou em uma redução da captação de vermelho neutro de dois grupos que não houve no experimento sem a luz. Além disso, não houve o aumento da viabilidade da mistura, quando comparados com as NPs individualmente. Contudo, este resultado de interação, sem a exposição UV, pode ser devido a um aumento da capacidade endocítica das células. Um estudo mostrou que as NPs podem entrar nas células por endocitose mediada por clatrina, caveolina e por macropinocitose (THURN *et al.*, 2011). Após a entrada nas células, permanecem em vesículas no citoplasma. Estes métodos de entrada podem interferir na via endocítica das células expostas à NPs (THURN *et al.*, 2011). Assim, a mistura da NPs, na menor concentração, pode ter interferido na via endocítica das B16F1, mas não necessariamente ter aumentado sua viabilidade. Contudo isto ocorreu apenas na exposição das NPs sem a luz UV, o que poderia indicar que a luz UV também poderia estar interferindo na via endocítica das células de melanoma murino.

Corroborando com os resultados obtidos neste trabalho, sem a exposição UV, TiO₂-NP nas concentrações de 0.008-80 µg.ml⁻¹ não alteram a viabilidade de células epidermais (A431) após 24 h de exposição. Mas, houve redução da viabilidade após 48 h (SHUKLA *et al.*, 2011). Isto sugere que a exposição mais prolongada das células B16F1 poderia reduzir a viabilidade quando expostas à NP-TiO₂. Nas mesmas células, houve redução de viabilidade celular na concentração 20 µg.ml⁻¹ de ZnO-NP (SHARMA *et al.*, 2009). Em células de câncer de mama (MCF-7) a ZnO-NP também reduziu a viabilidade nas concentrações 25, 50 e 100 µg.ml⁻¹ (AKHTAR *et al.*, 2015). Isto mostra, que a ZnO-NP pode ser mais tóxica do que a TiO₂-NP, como sugeriu outro estudo que comparou estas NPsem células epiteliais H376 (BEST *et al.*, 2015).

Contudo, ao contrário dos resultados mostrados neste trabalho, sem exposição UV, TiO₂-NP a concentração de 25 µg.ml⁻¹ promoveu uma redução na viabilidade em células de ovário de hamster (CHO-K1) (VIRGILIO *et al.*, 2010). Este resultado pode indicar que células CHO-K1 podem ser mais sensíveis às TiO₂-NP em relação às células B16F1, havendo alteração do sistema endolisossomal.

Já com relação à interação das NPs, houve provavelmente uma alteração na capacidade endocítica das células, e talvez da viabilidade, em relação às células expostas às NPs separadamente, de maneira que as células B16F1, sem a exposição UV, internalizaram maior quantidade do corante vermelho neutro. Este dado é muito importante haja vista que não há na literatura ensaios de viabilidade celular que misturam essas NPs, apresentando apenas resultados separadamente.

Semelhante ao resultado deste trabalho, outro estudo mostrou uma redução de 45% na viabilidade de células imortalizadas de queratinócitos quando expostas a 20 mJ/cm² da luz UVB na concentração de 40 µg.ml⁻¹ de ZnO-NP. Contudo, mostrou também a mesma redução em 40 µg.ml⁻¹ de TiO₂-NP, ao contrário das B16F1, que não ocorreu redução nem na concentração maior (50 µg.ml⁻¹; TYAGI *et al.*, 2016).

8.2 PROLIFERAÇÃO CELULAR

Houve redução de 52% e 82% da proliferação celular nas concentrações 30 e 50 µg.ml⁻¹, no ensaio sem a exposição UV de ZnO-NPs (FIGURA 17). Contudo, comparando com o resultado do ensaio de viabilidade celular, provavelmente esta

redução está diretamente associada à diminuição da viabilidade celular observada no ensaio do vermelho neutro. Nos demais grupos, não houve diferença significativa.

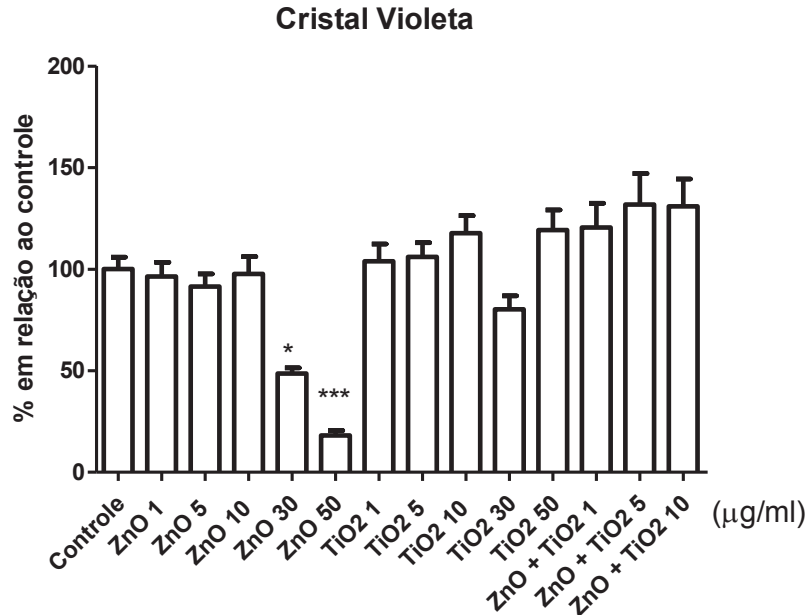


FIGURA 17. Proliferação celular após 24 h de exposição em diferentes concentrações de TiO₂-NP, ZnONP e TiO₂-NP + ZnO-NP. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle. *p<0,05; *** p<0,001.

Relacionando os dados apresentados com os dados obtidos na literatura, verifica-se uma inibição da proliferação e aumento de apoptose nas células da veia umbilical humana e células gliais na concentração de TiO₂-NPs mais alta do que a maior concentração utilizada neste trabalho (50 µg.ml⁻¹; RAMÍREZ *et al.*, 2012).

Já em mastócitos BMMC (FELTIS *et al.*, 2015) e células de adenocarcinoma colorretal (SONG *et al.*, 2013), houve inibição da proliferação na concentração de 30 e 50 µg.ml⁻¹ de ZnO-NP, respectivamente, como ocorreu nas células B16F1 neste trabalho. Este dado torna-se relevante visto que diferentes células podem responder de maneira semelhante frente a mesma concentração de um tipo de nanopartícula.

A exposição simultânea à luz UV promoveu redução da proliferação em vários grupos de ambas as NPs. A ZnO-NP nas concentrações de 1, 30 e 50 µg.ml⁻¹, reduziu em 61%, 67% e 62%, respectivamente, a proliferação celular. Já a TiO₂-NP, reduziu em 58% e 60% a proliferação celular nas concentrações de 10 e 30 µg.ml⁻¹. Com relação às misturas, todas as concentrações promoveram uma redução na

proliferação 52%, 60% e 46%, respectivamente, quando comparados com o controle, porém não houve efeito das misturas (FIGURA 18).

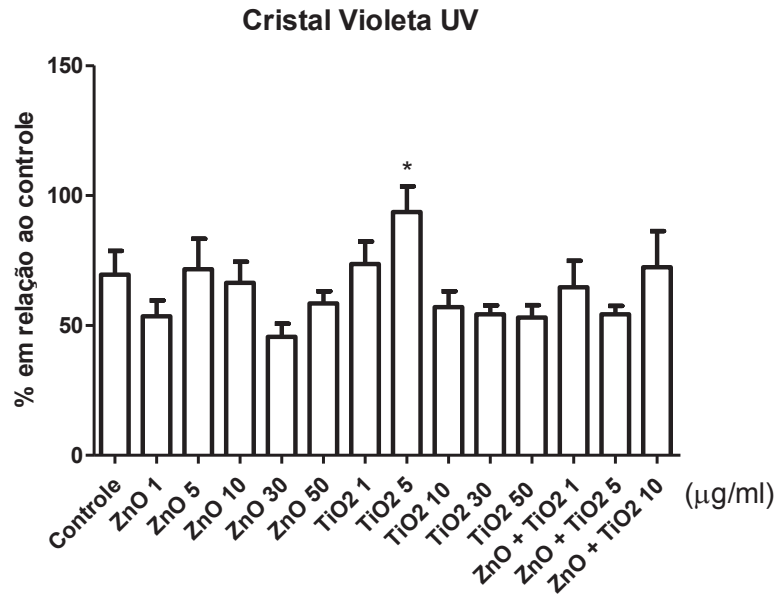


FIGURA 18. Proliferação celular com exposição à luz UV após 24 hde exposição em diferentes concentrações de TiO₂-NP, ZnONP e TiO₂-NP + ZnO-NP. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle. *p<0,05; **p<0,01; *** p<0,001.

Em células epiteliais HLEC, a exposição UVB levou a uma acentuada redução na proliferação quando expostas a partir de 5 µg.ml⁻¹ de ZnO-NPs quando comparadas com a exposição sem a UV, ao contrário do resultado obtido no presente estudo, pois houve redução nas concentrações 1, 30 e 50 µg.ml⁻¹, mas não houve em 5 µg.ml⁻¹ (WANG *et al.*, 2013).

Nestes dados da exposição à UV, verificou-se que a luz influenciou significativamente na proliferação das células B16F1. Quando comparados os gráficos com e sem exposição UV, percebe-se que a maioria das concentrações foi capaz de reduzir a proliferação apenas quando há exposição simultânea à radiação. Este efeito é muito importante, uma vez que outros processos podem ser desencadeados com a diminuição da proliferação. As TiO₂-NPs (7,5 µg/ml⁻¹) induziram a morte celular via inibição da proliferação em células de veia umbilical humana (HUVEC) (MONTIEL-DAVALOS *et al.*, 2012). Desta forma, a luz UV pode, indiretamente, induzir a morte das células B16F1 pela inibição da proliferação destas células.

8.3 ATIVIDADE DOS TRANSPORTADORES DE EFLUXO DE DROGAS

Para o experimento sem exposição UV, as NPs afetaram a atividade dos transportadores de efluxo de drogas. A ZnO-NP, na concentração de 30 e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ promoveu um aumento de 38% e 580%, respectivamente, no acúmulo de rodamina B. Isto pode ter ocorrido em virtude da diminuição da viabilidade celular nesta concentração, diminuindo assim a atividade dos transportadores ABC. Contudo, não está claro, ainda, se a diminuição da atividade dos transportadores ABC decorre da redução da viabilidade ou se a redução da viabilidade das células é decorrente da diminuição da atividade dos transportadores ABC. Dessa maneira, esta relação entre viabilidade e atividade destes transportadores deve ser investigada.

De forma contrária, aTiO₂-NP, também na concentração máxima (50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) promoveu uma diminuição de 30% no acúmulo da rodamina B. Esta redução também ocorreu com a mistura das NPs na concentração de 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (37%) (FIGURA 19).

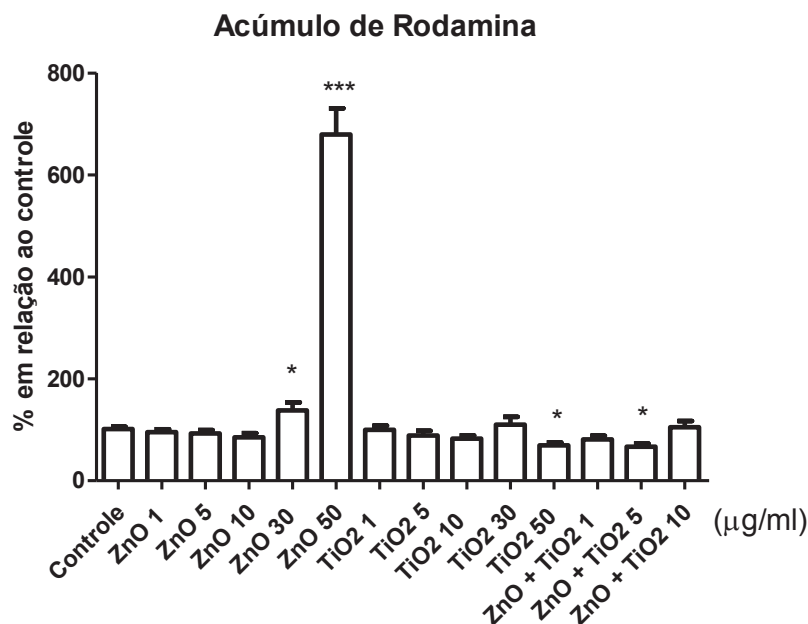


FIGURA 19. Acúmulo de rodamina B após 24 h de exposição em diferentes concentrações de TiO₂-NP, ZnO-NP e TiO₂-NP + ZnO-NP. Quanto maior o acúmulo da rodamina, menor a atividade dos Transportadores de Efluxo de Drogas. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle. *p<0,05; *** p<0,001.

Para o ensaio com exposição à luz, houve aumento no acúmulo da rodamina B nas concentrações 30 e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de ZnO-NPs (57% e 62%). As TiO₂-NPs também promoveram um aumento de 92% no acúmulo da rodamina B, na concentração mais baixa (1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Neste ensaio, também houve efeito de interação das NPs na concentração mais baixa (1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), com redução de 45% no acúmulo de rodamina B, quando comparado às NPs isoladamente (FIGURA 20).

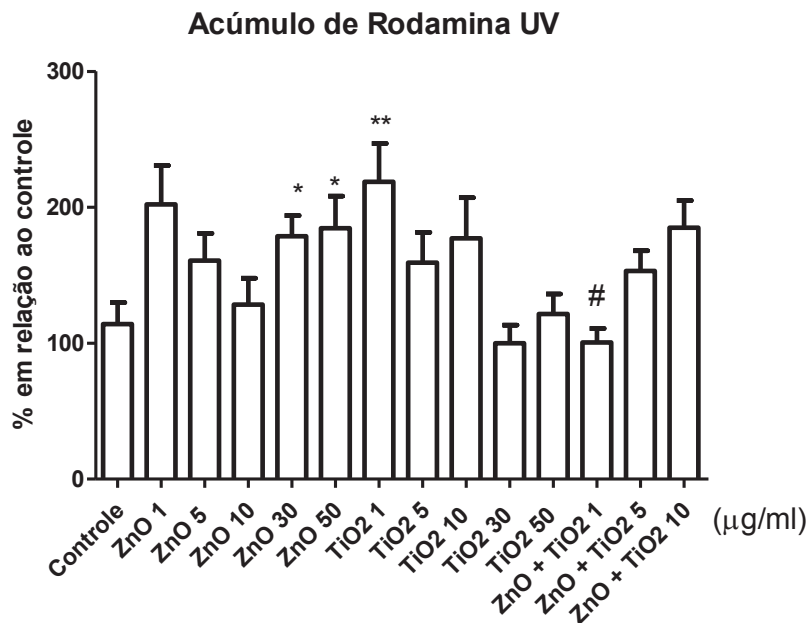


FIGURA 20. Acúmulo de rodamina B com exposição à luz UV após 24 h de exposição em diferentes concentrações de TiO₂-NP, ZnO-NP e TiO₂-NP + ZnO-NP. Quanto maior o acúmulo da rodamina, menor a atividade dos Transportadores de Efluxo de Drogas. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle. *p<0,05; ** p<0,01.

Esta redução do acúmulo de rodamina mostra que a TiO₂-NP na concentração 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ e a mistura 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ estão, de alguma maneira, promovendo uma maior atividade nos transportadores ABC. Este resultado indica que as células de melanoma murino, ao entrar em contato com essas concentrações de TiO₂-NPs podem aumentar sua malignidade e piorar o tratamento do câncer de pele. Este mecanismo torna as células mais resistentes aos quimioterápicos ao impedir que estes permaneçam e sejam letais para as células cancerosas.

Ao contrário do encontrado neste trabalho, em células de ouriço-do-mar, a ZnO-NP mostrou uma redução concentração-dependente (1–10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) na atividade dos transportadores (WU *et al.*, 2015). Em células gliais, a exposição a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ZnO-

NP diminuiu os níveis de RNAm desses transportadores após 4h, porém não houve influência após 24 h (BRUN; CARRIÈRE; MABONDZO, 2012). O resultado da exposição das células gliais a $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ZnO-NP em 4h pode ser um indício que a exposição de B16F1 na concentração de $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de ZnO-NP em 24 h do presente trabalho também pode ter níveis de RNAm diminuídos.

Corroborando com dados obtidos neste trabalho, células de adenocarcinoma colorretal também mostraram um aumento dos níveis de RNAm após 48 h de exposição e aumento nos níveis proteicos do transportador ABC em 6 h de exposição, quando expostas a $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de TiO_2 -NP (DORIER *et al.*, 2015). Em virtude disso, averiguar a expressão de RNAm e níveis proteicos do transportador ABC pode ser um ensaio relevante no futuro, para confirmar se está ocorrendo aumento da expressão de genes que codificam para os transportadores ABC nas concentrações $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de TiO_2 -NP e $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ da mistura.

8.4 PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS)

Houve redução de (60% e 78%) da produção de espécies reativas de oxigênio nas células expostas a 30 e $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de ZnO-NP, para o experimento sem a exposição UV (FIGURA 21). Esta redução deve ser devido à redução de viabilidade das células B16F1 nos referidos grupos.

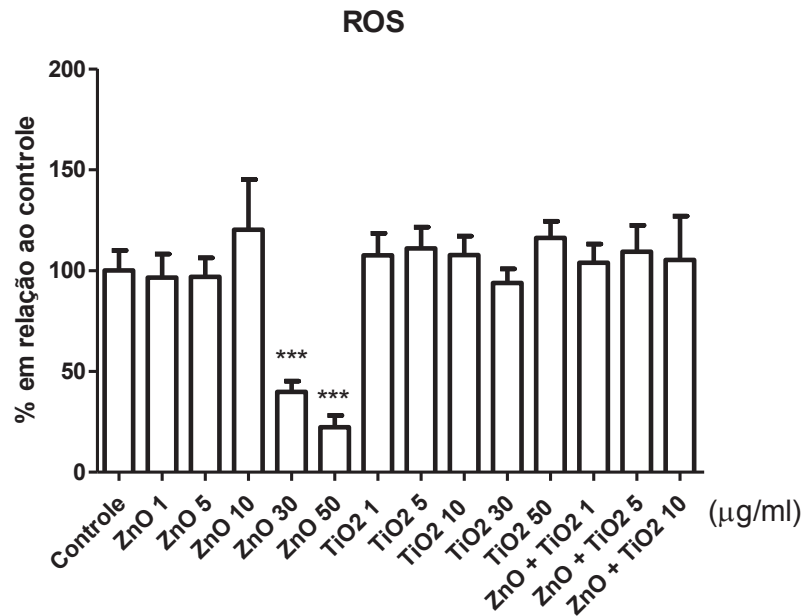


FIGURA 21. Produção de espécies reativas de oxigênio após 24 h de exposição em diferentes concentrações de $\text{TiO}_2\text{-NP}$, ZnO-NP e $\text{TiO}_2\text{-NP} + \text{ZnO-NP}$. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle. *** $p < 0,001$.

Com a exposição UV, as concentrações 30 e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ demonstraram a mesma resposta do experimento sem a exposição. Nenhuma outra concentração de ZnO-NP obteve diferença. Houve também redução na produção de espécies reativas de oxigênio nos grupos de 55% nas concentrações 30 e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de $\text{TiO}_2\text{-NP}$. Nos grupos das misturas, houve redução apenas na concentração mais baixa ($1\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) de 51% (FIGURA 22).

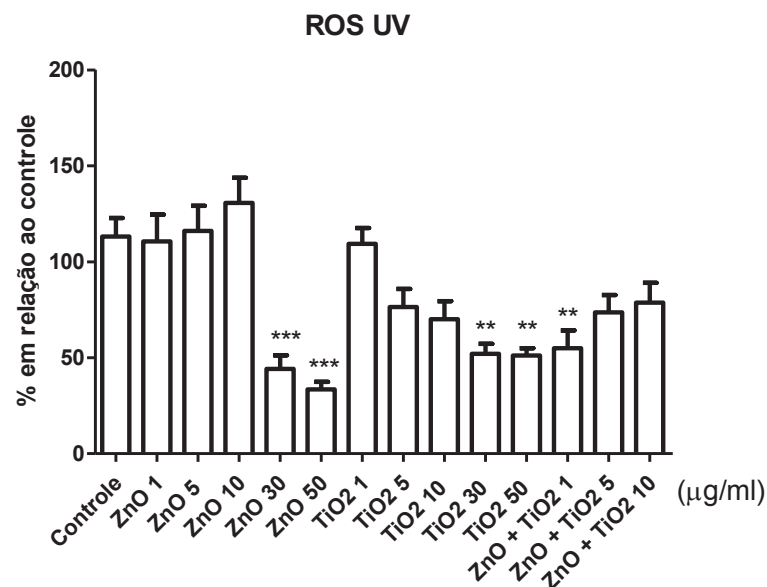


FIGURA 22. Produção de espécies reativas de oxigênio com exposição à luz UV após 24 h de exposição em diferentes concentrações de TiO₂-NP, ZnO-NP e TiO₂-NP + ZnO-NP. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle. *p<0,05; **p<0,01; *** p<0,001.

A partir do aumento da produção dessas espécies reativas, muitos processos celulares podem ser desencadeados como a morte celular, ativação da cascata de inflamação, aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial, regulação de fatores de transcrição, entre outros processos (TYAGI *et al.*, 2016). Um estudo realizado por Periasamy *et al.* (2014) constatou que TiO₂-NP aumentava a produção de espécies reativas de oxigênio via citocromo P450 e o marcador inflamatório TNF (fator de necrose tumoral), sem interferência na produção de nenhuma enzima antioxidante.

Em células de carcinoma cervical humano, a exposição às ZnO-NP promoveu um aumento da produção de espécies reativas que levou ao aumento de apoptose (PANDURANGAN; ENKHTAIVAN; KIM, 2016).

Ao contrário dos resultados apresentados neste trabalho, estudos com podócitos de camundongos (XIAO *et al.*, 2016) e células de linhagem monocítica (THP-1) (SENAPATI *et al.*, 2015) mostraram aumento na produção de ROS quando expostas às ZnO-NP nas concentrações de 10, 50 e 100 µg.ml⁻¹ e entre 15 e 20 µg.ml⁻¹ respectivamente. Já as células da veia umbilical humana (HUVECs) expostas às TiO₂-NP não apresentaram aumento na produção de ROS em nenhuma das concentrações testadas (20, 50 e 100 µg.ml⁻¹) (ALINOVI *et al.*, 2015).

Há muitos estudos que mostram aumento da produção de ROS em diferentes células quando expostas às ZnO-NP e TiO₂-NP através do ensaio com a sonda DCF (SHARMA *et al.*, 2009; BERARDIS *et al.*, 2010; SHUKLA *et al.*, 2011; HALAMODA *et al.*, 2012; RAMÍREZ *et al.*, 2012; ALARIFI *et al.*, 2013; DORIER *et al.*, 2015; SENAPATI *et al.*, 2015; PANDURANGAN; ENKHTAIVAN; KIM, 2016; XIAO *et al.*, 2016). Em exposição à UV outros estudos encontraram aumento da produção de ROS em células HaCaT expostas à 2 µg.ml⁻¹ de ZnO-NP e TiO₂-NP e células HLEC em todas as concentrações utilizadas (2,5, 5 e 10 µg.ml⁻¹) (WANG *et al.*, 2013; TYAGI *et al.*, 2016).

Um possível aumento das defesas antioxidantes nas células B16F1, quando expostas às ZnO-NP e TiO₂-NP, poderia explicar a ausência de aumento de ROS medida pelo ensaio da diclorofluoresceína, o que não foi investigado neste trabalho.

8.5 ENSAIO DO SCRATCH

Não houve diferença na taxa de migração/proliferação das células para a área do risco nas diferentes concentrações das NPs e suas misturas. Dessa maneira, foi comparada a área do risco logo após o final da exposição e 48 h após (FIGURA 23 e 24).

Para este ensaio, não foram utilizadas as concentrações $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ e $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ em virtude dos ensaios prévios que mostraram a morte de mais de 50% das células.

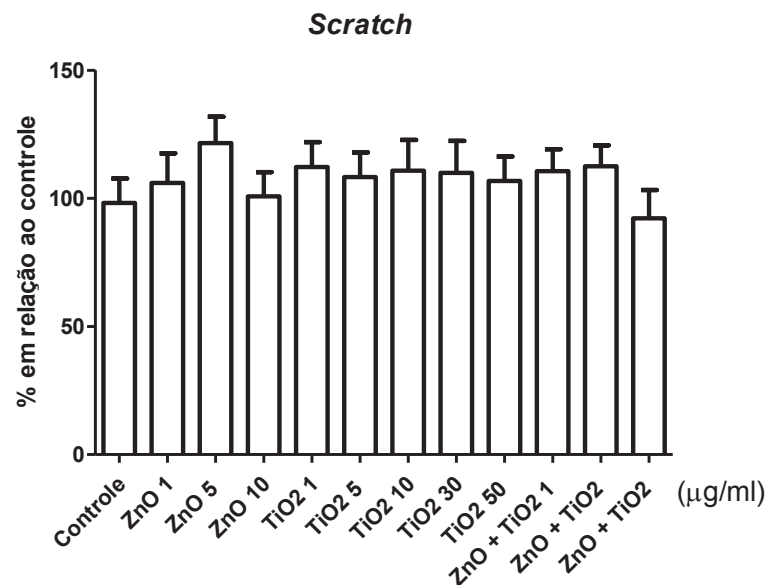


FIGURA 23. Ensaio do scratch após 24 h de exposição em diferentes concentrações de TiO₂-NP, ZnONP e TiO₂-NP + ZnO-NP.

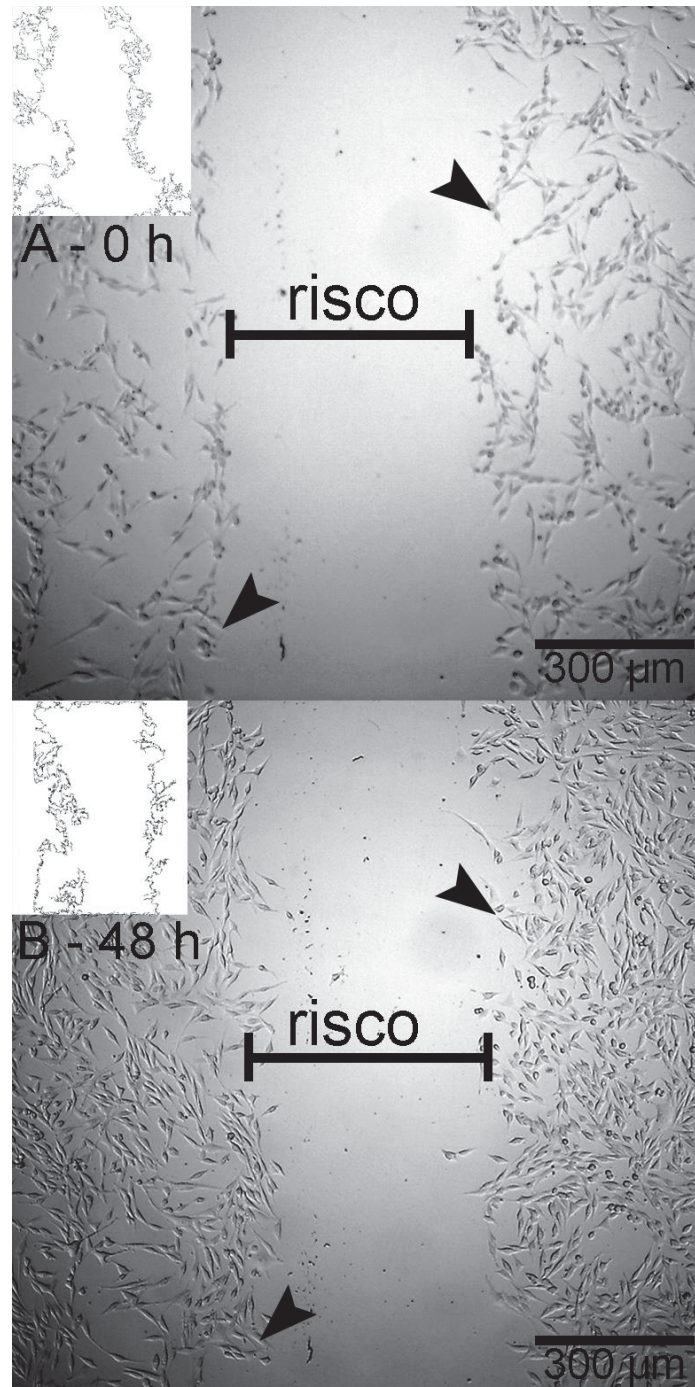


FIGURA 24. Ensaio *scratch*. É possível observar que não houve fechamento completo do risco no tempo 0 h (A) e 48 h (B) em células de melanoma murino em microscópio invertido (imagem central). As imagens pequenas nos cantos esquerdos superiores de cada imagem representam parte da análise no programa ImageJ®.

Outro estudo expõe células-tronco mesenquimais a 0,1 mg/ml de TiO₂-NP, por 4 h, constatou uma redução na migração das células. Mostrou também que quanto maior as NPs, menor é a migração das células (HOU *et al.*, 2013). Este efeito encontrado pode ter sido em virtude da concentração utilizada e tempo de exposição,

pois a exposição durou apenas 4 h, pois seria provavelmente inviável a exposição por 24 h como visto no *screening* deste estudo.

Contudo, os dados apresentados corroboram com os resultados no ensaio de proliferação: não houve diferença em nenhum dos grupos utilizados no ensaio do *scratch*. Esta comparação é necessária, uma vez que não foi utilizada nenhum agente inibidor da proliferação. Logo, o ensaio do *scratch* realizado verifica tanto a proliferação como a migração das células B16F1.

Com relação à nossa hipótese inicial, o fato de nenhuma concentração interferir na migração das células refuta a ideia de tornar as células mais malignas. Contudo, é importante analisar todos os parâmetros celulares para concluir o real efeito das NPs estudadas.

8.6 CICLO CELULAR

No ensaio do ciclo celular, a exposição às ZnO-NPs, TiO₂-NPs e ZnO-NP + TiO₂-NP não houve interferência em nenhuma das fases (G1, S e G2) no ciclo da célula B16F1 (FIGURA 25).

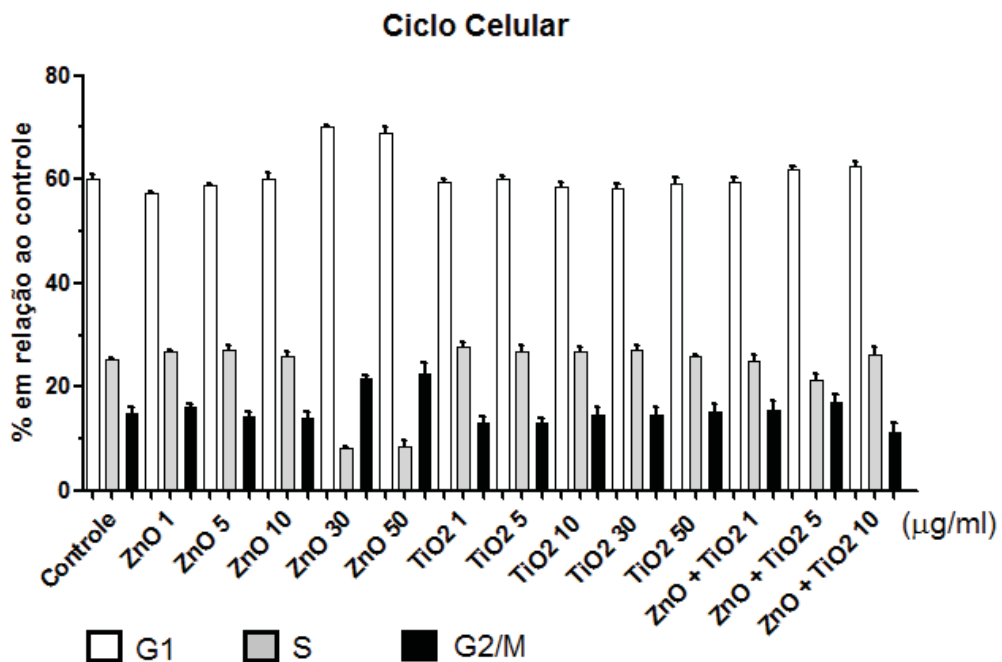


FIGURA 25. Ensaio do ciclo celular após 24 h de exposição em diferentes concentrações de TiO₂-NP, ZnO-NP e TiO₂-NP + ZnO-NP.

Na mesma linha do resultado apresentado, células-tronco mesenquimais não sofreram influência das TiO₂-NPs em seu ciclo, mesmo em concentrações maiores (0,1 mg/ml) (HOU *et al.*, 2013). Também, em célula de fibroblasto pulmonar (WI-38) a exposição de TiO₂-NPs na concentração de 50 µg.ml⁻¹ não influenciou no ciclo celular, porém na concentração de 200 µg.ml⁻¹ promoveu um aumento da fase G0 (PERIASAMY *et al.*, 2014).

Apesar das NPs interferirem em vários parâmetros das células B16F1, nenhuma das concentrações foi capaz de afetar o ciclo celular. Uma possibilidade é de concentrações maiores das NPs alterar o ciclo celular como ocorreu nos fibroblastos pulmonares (PERIASAMY *et al.*, 2014). Contudo, não seria possível realizar este ensaio em concentrações maiores nas células B16F1, pois, como verificado anteriormente no *screening* das concentrações, estas concentrações são letais para as células B16F1.

8.7 RESUMO DOS RESULTADOS

Para melhor compreensão do estudo desenvolvido, a Tabela 1 mostra um resumo dos resultados obtidos neste trabalho.

TABELA 1 – Resumo dos resultados.

ENSAIO		ZnO	TiO ₂	MISTURA
Viabilidade	Sem UV	↓ 30 e 50 µg.ml ⁻¹	=	↑ 1# µg.ml ⁻¹
	Com UV	↓ 5, 30 e 50 µg.ml ⁻¹	↓ 1	=
Proliferação	Sem UV	↓ 30 e 50 µg.ml ⁻¹	=	=
	Com UV	↓ 1, 30 e 50 µg.ml ⁻¹	↓ 10, 30 e 50 µg.ml ⁻¹	↓ 1, 5 e 10 µg.ml ⁻¹

Produção de ROS	Sem UV	↓ 30 e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	=	=
	Com UV	↓ 30 e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	↓ 30 e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	↓ 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
Atividade dos Transportadores ABC	Sem UV	↓ 30 e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	↑ 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	↑ 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
	Com UV	↓ 30 e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	↓ 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	↑ 1 [#] $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
Scratch		=	=	=
Ciclo celular		=	=	=

TABELA 1 – Resumo dos resultados. = ausência de diferença significativa. ↑: aumento e ↓: diminuição em relação ao controle; seguido das concentrações que apresentaram diferença significativa. #: diferença em relação às NPs individuais.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A nanotecnologia é a aplicação de materiais em escala nanométrica na tecnologia ou ciência (RITTNER; ABRAHAM *et al.*, 1998). A utilização da nanotecnologia vem crescendo a cada ano e as nanopartículas de óxidos metálicos são as mais utilizadas (DJURISC *et al.*, 2014). As NPs de ZnO e TiO₂, além de estarem na composição da maioria dos filtros em virtude de serem altamente inertes, são também muito utilizadas na terapia de vários tipos de câncer e implantes intra-ósseos, respectivamente (NIINOMI, 2008; AKHTAR *et al.*, 2015). Contudo, há muitas controvérsias na literatura a respeito dos efeitos que essas NPs podem causar no organismo. Neste estudo, utilizamos como base a aplicação dessas NPs como filtros físicos em protetores solares. A concentração das NPs estabelecida, a radiação UV seleciona, bem como os ensaios escolhidos foram pensados em situações que se aproximassem da verdadeira utilização nos protetores solares.

Os resultados obtidos neste trabalho e o levantamento na literatura confirmam o efeito citotóxico das NPs, tanto isoladas como na mistura, e uma toxicidade acentuada pela exposição UV. A exposição das células B16F1 às ZnO-NP, tanto com ou sem exposição simultânea UV, promoveu uma redução da viabilidade, proliferação, produção de espécies reativas de oxigênio e atividade dos transportadores ABC nas maiores concentrações utilizadas (30 e 50 µg.ml⁻¹). Com a exposição UV, houve também redução da viabilidade e proliferação nas concentrações 5 e 1µg.ml⁻¹, respectivamente.

Em relação às TiO₂-NP, sem a exposição à luz UV, as células não tiveram diferença na viabilidade, proliferação, produção de espécies reativas de oxigênio em nenhuma das concentrações quando comparadas ao controle. Contudo, causou aumento na atividade dos transportadores ABC na maior concentração (50 µg.ml⁻¹). Já com a exposição à luz UV, houve redução na proliferação nas concentrações 10, 30 e 50 µg.ml⁻¹; na produção de ROS nas concentrações 30 e 50 µg.ml⁻¹; e redução na atividade dos transportadores ABC na menor concentração (1µg.ml⁻¹).

Já a exposição das células B16F1 às misturas, houve efeito de mistura com aumento da viabilidade das células na menor concentração (1 µg.ml⁻¹) em relação às NPs sozinhas. Houve também um aumento na atividade dos transportadores ABC na concentração intermediária (5 µg.ml⁻¹). Além disso, a exposição UV também reduziu

a proliferação em todas as concentrações (1, 5 e 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$); reduziu a produção de ROS na menor concentração (1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$); e promoveu efeito de interação das NPs na menor concentração (1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Comparando os resultados das duas NPs, podemos perceber que aparentemente a ZnO-NP é mais tóxica do que a TiO₂-NP, pois na mesma concentração (50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) houve uma grande redução na viabilidade (80%) das células expostas às ZnO-NPs, enquanto que não houve alteração nas células expostas às TiO₂-NPs. Isto foi sugerido por outro estudo que fez a comparação dessas NPs expondo em células epiteliais H376 (BEST *et al.*, 2015). Ainda, um estudo comparou o fator de proteção das duas NPs na mesma concentração e constatou que a TiO₂-NP é mais eficiente do que a ZnO-NP, tornando a primeira mais indicada para a utilização nos protetores (TYAGI *et al.*, 2016).

Estudos mostram que essas NPs são endocitadas por vários tipos de células: HCECs; fibroblasto; CHO-K1; células epidermais; células da glia; células endoteliais e CaCo-2 (JIN *et al.*, 2008; VIRGILIO *et al.*, 2010; SHUKLA *et al.*, 2011; RAMÍREZ *et al.*, 2012; HALAMODA *et al.*, 2012; MONTIEL-DAVALOS *et al.*, 2012; DORIER *et al.*, 2015). Desta maneira, pode-se sugerir que células B16F1 tem este mesmo comportamento. Logo, investigações futuras podem utilizar a microscopia eletrônica de transmissão para confirmar se há endocitose. Além da internalização, as NPs podem ser encontradas aderidas nas membranas das células, o que leva a mudanças morfológicas celulares e que estão diretamente ligadas à citotoxicidade (SHARMA *et al.*, 2009; DORIER *et al.*, 2015).

Assim, apesar de alguns estudos apontarem que essas NPs não penetram no organismo e o comitê europeu *Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR's)* concluir que até o momento não há evidências que comprovem a penetração das NPs no organismo, um estudo realizado por Gulson *et al.*, (2010) encontrou ZnO-NPs no sangue e urina de pessoas após 5 dias da aplicação do protetor solar (GULSON *et al.*, 2010; MCSWEENEY, 2016). Caso haja essa penetração, além dos resultados e levantamento bibliográfico demonstrados neste trabalho, outras pesquisas mostraram que essas NPs podem causar danos no DNA, alterar a homeostase do cálcio, induzir apoptose, alterar expressões gênicas, reduzir atividade mitocondrial entre outras e, ainda, esses efeitos serem agravados pela exposição UV (WANG *et al.*, 2013; DEMIR *et al.*, 2014; PERIASAMY *et al.*, 2014;

AKHTAR *et al.*, 2015, ANNANGI *et al.*, 2016; AUDE-GARCIA *et al.*, 2016; TYAGI *et al.*, 2016).

A divergência de resultados na literatura utilizando NPs de mesma composição é grande, mesmo em se tratando do mesmo modelo biológico. Isto ocorre porque NPs de mesma composição podem possuir características divergentes, que promovem respostas celulares diferentes (RAMPAUL; A.; PARKIN, I.; CRAMER, 2007; LIU; LIN; ZHAO, 2013).

Um estudo comparou várias formas de TiO₂-NPs sozinhas e em conjunto com ZnO-NPs, com vários tipos de encapsulamento. Como resultado foi constatado uma maior estabilidade das NPs, e menor indução na produção de ROS e citotoxicidade para TiO₂-NPs na forma rutilo em comparação com outras formas, e para TiO₂-NPs e ZnO-NPs encapsuladas em comparação às não-encapsuladas (RAMPAUL; A.; PARKIN, I.; CRAMER, 2007). Relacionando estes dados com os do presente estudo, uma possível explicação para as TiO₂-NPs não promoverem citotoxicidade nas células B16F1 é a forma rutilo utilizada. Isto pode ser confirmado pela técnica de raio-x. Ao compararmos outros resultados que verificaram uma citotoxicidade das TiO₂-NPs, foram utilizadas a forma anatásio ou a mistura destas formas (RAMÍREZ *et al.*, 2012; PERIASAMY *et al.*, 2014).

Contudo, apesar da nossa hipótese inicial ser refutada e as NPs apresentarem citotoxicidade para as células de melanoma, fica evidente a necessidade de haver mais estudos sobre as nanopartículas de ZnO e TiO₂, uma vez que essas NPs podem não ser citotóxicas apenas para células tumorais, mas também para células saudáveis. Artigos sugerem a utilização dessas NPs no tratamento contra o câncer, uma vez que existem alguns estudos que demonstram que essas NPs são citotóxicas apenas para células cancerosas (AKHTAR *et al.*, 2015; PANDURANGAN; ENKHTAIVAN; KIM, 2016) e que a alteração na expressão de alguns genes após exposição às ZnO-NPs é similar *in vitro* e *in vivo* (ZHANG *et al.*, 2016).

Além disso, embora cosméticos e protetores solares contendo estas NPs sejam normalmente usados em pele intacta, fatores como lesões ocasionais na pele, espessura e descamação da pele podem influenciar na toxicidade (RAMPAUL; A.; PARKIN, I.; CRAMER, 2007).

Dessa forma, é evidente a importância dos resultados obtidos no presente estudo, uma vez que os pontos apresentados são indícios de que estas NPs podem

causar danos celulares os quais podem interferir no organismo como um todo, principalmente quando expostas à radiação UV. Ressalta-se, ainda, que este estudo apresenta uma novidade científica, uma vez que não há na literatura outro estudo que expõe estas NPs em células de melanoma com exposição simultânea à luz UV. Assim, estudos *in vivo* poderiam obter maiores resultados dos danos dessas NPs, juntamente com a luz UV, em modelos induzidos com melanoma. Além disso, verifica-se a necessidade de maior regularização das NPs que serão utilizadas nos protetores, uma vez, que as características das NPs irão definir os reais efeitos na saúde humana.

10 CONCLUSÕES

- As ZnO-NPs são mais citotóxicas do que as TiO₂-NPs em células B16F1;
- As maiores concentrações de ZnO-NPs (30 e 50 µg.ml⁻¹) afetaram a viabilidade, proliferação, produção de espécies reativas e atividade dos transportadores da B16F1 com e sem exposição simultânea à luz UV;
- Apesar de as TiO₂-NPs não apresentarem citotoxicidade em nenhuma concentração sem a luz UV, apresentou um aumento na atividade dos transportadores ABC na concentração de 1 µg.ml⁻¹;
- A luz ultra-violeta aumenta a citotoxicidade das NPs ZnO-NPs e TiO₂-NPs;
- Nenhuma das NPs, nas concentrações utilizadas, interferiram no ciclo celular ou na capacidade de migração da B16F1;
- As misturas apresentaram efeitos de interação com ou sem a exposição simultânea da luz UV;
- Há necessidade de haver mais regularização das NPs presentes nos protetores.

REFERÊNCIAS

- AKHTAR, M. J.; ALHADLAQ, H. A.; ALSHAMSAN, A.; KHAN, M. A. M. Aluminum doping tunes band gap energy level as well as oxidative stress-mediated cytotoxicity of ZnO nanoparticles in MCF-7 cells. **Nature**, v. 5, p. 13876, 2015.
- ALARIFI, S.; ALI, D.; ALKAHTANI, S.; VERMA, A.; AHAMED, M.; ALHADLAQ, H. A. Induction of oxidative stress, DNA damage, and apoptosis in a malignant human skin melanoma cell line after exposure to zinc oxide nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 983–993, 2013.
- ALINOVI, R.; GOLDONI, M.; PINELLI, S.; CAMPANINI, M.; ALIATIS, I.; BERSANI, D.; LOTTICI, P. P.; IAVICOLI, S.; PETYX, M.; MOZZONI, P.; MUTTI, A. Oxidative and proinflammatory effects of cobalt and titanium oxide nanoparticles on aortic and venous endothelial cells. **Toxicology in Vitro**, v. 29, p. 426–437, 2015.
- American Cancer Society: Melanoma Skin Cancer*, 2015 [S.l.; s.n].
- ANNANGI, B.; RUBIO, L.; ALARABY, M.; BACH, J. Acute and long-term in vitro effects of zinc oxide nanoparticles. **Archives of Toxicology**, v. 90, n. 9, p. 2201-2213, 2016.
- ATCC. **American Type Culture Collection**. 2014. Disponível em <http://www.atcc.org/products/all/CRL-6475.aspx>> Acesso em: 5/05/2014.
- AUDE-GARCIA, C.; DALZON, B.; RAVANAT, J.; COLLIN-FAURE, V.; CARRIÈRE, M.; RABILLOUD, T. A combined proteomic and targeted analysis unravels new toxic mechanisms for zinc oxide nanoparticles in macrophages. **Journal of Proteomics**, v. 134, p. 174–185, 2016.
- AUTIER, P.; BONIOL, M.; SEVERI, G.; DORE, J.F. Quantity of sunscreen used by European students. **British Journal of Dermatology**, v. 2, n. 144, p. 288-91, 2001.
- BAILLO, V. P.; LIMA, A. C. Nanotecnologia aplicada à fotoproteção. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 93(3), p. 271-278, 2012.
- BALOGH, T.S.; VELASCO, M. V. R.; PEDRIALI, C. A.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.4, n.86, p.732–742, 2011.
- BERARDIS, B.; CIVITELLI, G.; CONDELLO, M.; LISTA, P.; POZZI, R.; ARANCIA, G.; MESCHINI, S. Exposure to ZnO nanoparticles induces oxidative stress and cytotoxicity in human colon carcinoma cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 246, p. 116–127, 2010.

- BERLIM, L.S.; GONÇALVES, H.A.; DE OLIVEIRA, V.S.; MATTOSO, N.; PRUDENTE, A.S.; BEZERRA JR, A.G.; SCHREINER, W.H. *Syngonanthus nitens*: Why it looks like spun gold. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 597–602, 2014.
- BEST, M.; PHILLIPS, G.; FOWLER, C.; ROWLAND, J., ELSOM, J. Characterisation and cytotoxic screening of metal oxide nanoparticles putative of interest to oral healthcare formulations in non-keratinised human oral mucosa cells in vitro. **Toxicology in Vitro**, v. 30 p. 402–411, 2015.
- BCRJ. **Banco de Células do Rio de Janeiro**. 2015. Disponível em: <http://bcRJ.org.br/catalogo/cellprint/?celula=B16F10-Nex2-Transfect-MelanomaMouse&pdf=true>. Acesso em: 04/05/2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 237, de 22 de agosto de 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 47, de 16 de março de 2006.
- BRAUD, F.; KHAYAT, D.; KROON, B. B.R.; VALDAGNI, R.; BRUZZI, P.; CASCINELLI, N. Malignant Melanoma. **Oncology/Hematology**, v.47, p. 35- 63, 2003.
- BRUN, E.; CARRIÈRE, M.; MABONDZO, A. In vitro evidence of dysregulation of blood-brain barrier function after acute and repeated/long-term exposure to TiO₂ nanoparticles. **Biomaterials**, v. 33, p. 886-896, 2012.
- BOQUEST, A. C.; DAY, B. N.; RANDALL, S. Prather Flow Cytometric Cell Cycle Analysis of Cultured Porcine Fetal Fibroblast Cells. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 1013–1019, 1999.
- BORENFREUND, E.; PUERNER, J.A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicology Letters**. v. 24, p. 119–124, 1985.
- BURNETT, M. E.; WANG, S. Q.; Current sunscreen controversies: a critical review. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 27, p. 58-67, 2011.
- CHEN; J.; SHIH; J.; TRAN, A.; MULLANE, A.; THOMAS, C.; AYDIN, N.; MISRA, S. Gender-Based Differences and Barriers in Skin Protection Behaviors in Melanoma Survivors. **Journal of Skin Cancer**, 2016.
- COELHO, M. M. V.; MATOS, T. R.; APETATO, M. The dark side of the light: mechanisms of photocarcinogenesis. **Clinics in Dermatology**, n. 5, v. 34, p. 563-570, 2016.
- COMISSÃO DE NORMATIZAÇÃO – SIBI/UFPR. **Orientação para Normatização de Trabalhos Acadêmicos** – Modelo de dissertação; disponível em: http://www.portal.ufpr.br/tutoriais_normaliza/modelo_dissertacao_junho_2012.pdf

- CRUZ, V.M.F.R.; AVALOS, D. A.; BARJA, P.R.; Protetor Solar: Como se usa e como se deve usar. **Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento**, p. 1451-1454, 2007.
- DANCIU, C.; FALAMAS, A.; DEHELAN, C.; SOICA, C.; RADEKE, H.; BARBUTUDORAN, L.; BOJIN, F.; PÎNZARU, C.; MUNTEANU, M. F. A characterization of four B16 murine melanoma cell sublimes molecular fingerprint and proliferation behavior. **Cancer Cell International**, p. 13-75, 2013.
- DEMIR, E.; AKCA, H.; KAYA, B.; BURGUCU, D.; TOKGÜN, O.; TURNA, F.; AKSAKAL, S.; VALES, G.; CREUS, A.; MARCOS, R. Zinc oxide nanoparticles: Genotoxicity, interactions with UV-light and cell-transforming potential. **Journal of Hazardous Materials**, v. 264, p. 420– 429, 2014.
- D'ORAZIO, J.; JARRETT, S.; ORTIZ, A. A.; SCOTT, T. UV Radiation and The Skin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 12222-12248, 2013.
- DORIER, M.; BRUN, E.; VERONESI, G.; BARREAU, F.; PERNET-GALLAY, K.; DESVERGNE, C.; RABILLOUD, T.; CARAPITO, C.; HERLIN-BOIME, N.; CARRIÈRE, M. Impact of anatase and rutile titanium dioxide nanoparticles on uptake carriers and efflux pumps in Caco-2 gut epithelial cells. **Nanoscale**, v. 7, p. 7352–7360, 2015.
- DJURISIC, A. B.; LEUNG, Y. H.; NG, A. M.; XU, X. Y.; LEE, P. K.; DEGGER, N.; WU, R.S. Toxicity of metal oxide nanoparticles: mechanisms, characterization, and avoiding experimental artefacts. **Small**, n.11, v.1, p.26-44, 2014.
- EPSTEIN, J.H.; LOWE, N.; SHAATH, M. A.; PATHAK, M. A Biological effect of sunlight. **Sunscreens: development, evaluation and regulatory aspect**, 2ed. New York: Marcel Dekker, p. 83-93, 1990.
- FELTIS, B. N.; ELBAZ, A.; WRIGHT, P. F. A.; MACKAY, G. A.; TURNEY, T. W.; LOPATA, A. L. Characterizing the inhibitory action of zinc oxide nanoparticles on allergic-type mast cell activation. **Molecular Immunology**, v. 66, p. 139–146, 2015.
- FIDLER, I. J. Selection of Successive Tumour Lines for Metastasis. **Nature**, v. 242, p. 148-149.
- FLOR, J.; DAVOLOS, M.R. Protetores solares. **Quimica Nova**, v. 30, p. 153-158, 2007.
- GARBE, C.; EIGENTLER, T. K.; KEILHOLZ, U.; HAUSCHIKD, A.; KIRKWOOD, J. M. Systematic Review of Medical Treatment in melanome: Current Status and Future Prospects. **The Oncologist**, v. 6, n.1, p. 5-24, 2011.
- GONZÁLEZ, S.; FERNÁNDEZ, L. M.; GILABERTE, C Y. The latest on skin photoprotection. **Clinics in Dermatology**, v. 26, p. 614-26, 2008.

- GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanome Biology and New Targeted Therapy. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 851-857, 2007.
- GULSON, B.; MCCALL, M; KORSCH, M. Small amounts of zinc from zinc oxide particles in sunscreens applied outdoors are absorbed through human skin. **Toxicological Sciences**, v. 118, n.1 p. 140–49, 2010.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, 2011.
- HEARING, V. J. Determination of melanin synthetic pathways. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, p. E8-E11, 2011.
- HOU, Y.; Cai, K.; Li, J.; Chen, X.; Lai, M.; Hu, Y.; Luo, Z.; Ding, X.; Xu, D. Effects of titanium nanoparticles on adhesion, migration, proliferation, and differentiation of mesenchymal stem cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 3619-3630, 2013.
- HSIAO, I.; HUANG, Y. Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO₂ nanoparticles toward human lung epithelial cells. **Science of the Total Environment**, v. 409, p. 1219–1228, 2011.
- IAVICOLI, I.; LESO, V.; BERGAMASCHI, A. Toxicological effects of titanium dioxide nanoparticles: a review of in vivo studies. **Journal of Nanomaterials**, v. 5, 2012.
- INCA. Incidência 2015: Estimativa de Câncer no Brasil [S.l.; s.n.]
- JIN, C.; ZHU, B.; WANG, X.; LU, Q. Cytotoxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles in Mouse Fibroblast Cells. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, p. 1871–1877, 2008.
- KULLAVANIJAYA, P.; LIM, H.W. Photoprotection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 52, p. 937-958, 2005.
- LAGES, R. B.; BARBOSA, P. B.; ALMEIDA, I. P.; LOPES, L. R. S.; FILHO, L. L. L. Detecção precoce do câncer de pele: experiência de campanha de prevenção no Piauí-Brasil. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v. 25, n. 2, p. 221–227, 2012.
- LESLIE, E. M.; DEELEY, R. G.; COLE, S. P. C. Multidrug resistance proteins: role of Pglycoprotein , MRP1 , MRP2 , and BCRP (ABCG2) in tissue defense. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 204, p. 216–237, 2005.
- 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. **Nature**, v. 2, n. 2, p. 329-33, 2007.

- LIEBEL, S.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; SILVA, R.C.; RAMSDORF, W.A.; CESTARI, M.M.; MAGALHAES, V.F.; GARCIA, J.R.; ESQUIVEL, B.M.; FILIPAK NETO, F. Cellular responses of *Prochilodus lineatus* hepatocytes after cylindrospermopsin exposure. **Toxicology In Vitro**, v. 25, n. 7, p. 1493-1500, 2015.
- LINDEE, M. S. The Culture of Cell Culture. **Science**, p. 316, 2007.
- LIU, W. K.; CHEUNG, F. W. K.; GUO, J.; LING, Y. H.; CHE, C. T. Anti-Melanogenic Property of Geoditin A in Murine B16 Melanoma Cells. **Marine Drugs**, v. 1, p. 465-476, 2012.
- LIU, K.; LIN, X.; ZHAO, J. Toxic effects of the interaction of titanium dioxide nanoparticles with chemicals or physical factors. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 2509-20, 2013.
- LU, P.; HUANG, S.; CHEN, Y.; CHIUUEH L.; SHIH D. Y. Analysis of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in cosmetics. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, p. 587-594, 2015.
- MAIO, M.; GARCIA, C. R. C.; ISAAC, C.; RUIZ, R. O. Tratado de Medicina Estética. 2 ed. São Paulo: ROCA, 2011. p. 16 a 45.
- MANCEBO, S. E.; HU, J. Y.; WANG, S. Q. Sunscreens: A Review of health Benefits, Regulations, and Controversies. **Dermatologic Clinics**, v. 32, p. 427-430, 2014.
- MCSWEENEY, P. C. The safety of nanoparticles in sunscreens: An update for general practice. **Clinical**, v. 45, n.6, p. 397-399, 2016.
- MONTIEL-DAVALOS, A.; VENTURA-GALLEGOS, J. L.; ALFARO-MORENO, E.; SORIA-CASTRO, E.; GARCÍA-LATORRE, E.; CABAÑAS-MORENO, J. G.; RAMOS-GODINEZ, M. P.; LOPEZ-MARURE, R. TiO₂ Nanoparticles Induce Dysfunction and Activation of Human Endothelial Cells. **Chemical Research in Toxicology**, v., 25, p. 920-930, 2012.
- Nacional Cancer Institute*. PDQ Screening and Prevention Editorial Board. Skin Cancer Prevention (PDQ®). PDQ Cancer Information Summaries, 2016
- NAGELREITERA, C.; VALENTA, C. Size analysis of nanoparticles in commercial O/W sunscreens. **International Journal of Pharmaceutics**, n. 2, v. 456, p. 517-19, 2013.
- NEWMAN, M. D.; STOTLAND, M.; ELLIS, J. I. The safety of nanosized particles in titanium dioxide- and zinc oxide-based sunscreens. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 61, n. 4 p. 685-692, 2009.
- NG, K. W.; KHOO, S. P.K.; HENG, B. C.; SETYAWATI, M. I.; TAN, E. C.; ZHAO, X.; XIONG, S.; FANG, W.; LEONG, D. T.; LOO, J. S.C. The role of the tumor

suppressor p53 pathway in the cellular DNA damage response to zinc oxide nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, p. 8218-8225, 2011.

NICOLSON, G. L.; BRUNSON, K. W.; FIDLER, I. J. Specificity of Arrest, Survival, and Growth of Selected Metastatic Variant Cell Lines. **Cancer Research**, v. 38, p. 4105-11, 1978.

NIINOMI M. Mechanical biocompatibilities of titanium alloys for biomedical applications. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 1, n.1, p. 30–42, 2008.

NOHYNEK, G.J.; SCHAEFER, H. Benefit and risk of organic ultraviolet filters. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 33, p. 285-299, 2001.

NOHYNEK, G. J.; DUFOUR, E. K. Nano-sized cosmetic formulations or solid nanoparticles in sunscreens: A risk to human health? **Archives of Toxicology**, v. 86, p. 1063-1075, 2012.

OLIVIER, E.; DUTOTA, M.; REGAZZETTIA, A.; DARGÈREA, D.; AUZEILA, N.; LAPRÉVOTEA, O.; RAT, P. Lipid deregulation in UV irradiated skin cells: Role of 25hydroxycholesterol in keratinocyte differentiation during photoaging. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, 2016.

OVERWIJK, W.W; RESTIFO, N. B16 as a Mouse Model for Human Melanoma. **Current Protocols in Immunology**, 2001.

PALM, M.D.; O'DONOGHUE, M.N. Update on photoprotection. **Dermatology and Therapy**, v. 20, p.360-76, 2007.

PANDURANGAN, M.; ENKHTAIVAN, G.; KIM, D. H. Anticancer studies of synthesized ZnO nanoparticles against humancervical carcinoma cells. **Journal of Photochemistry & Photobiology**, v. 158, p. 206–211, 2016.

PANICH, U. G.; RATHVIBOON, S. N; JIRAWATNOTAI, S. Ultraviolet RadiationInduced Skin Aging: The Role of DNA Damage and Oxidative Stress in Epidermal Stem Cell Damage Mediated Skin Aging. **Stem Cells International**, 2016.

PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P. S.; JARDIM, W. F. Os Nanomateriais e a questão ambiental. **Quimica Nova**, v. 33, n. 2, p. 421-430, 2010.

PATHAK, M. A; LOWE, N. J.; SHAATH, N. A. Photoprotection against harmful effects ofSolar UVB and UVA radiation: An Update. **Sunscreens: Development, evaluation, and regulatory aspects**, 2nd ed. New York: Marcel Dekker, p. 59-79,1997.

PATI, R.; DAS, I.; MEHTA, R. K.; SAHU, R.; SONAWANE, A. Zinc-oxide nanoparticles exhibit genotoxic, clastogenic, cytotoxic and actin depolymerization effects by

- inducing oxidative stress responses in macrophages and adult mice. **Toxicology**, v. 150, p. 454-472, 2016.
- PERIASAMY, V. S.; ATHINARAYANAN, J.; AL-HADI, A. M.; JUHAIMI, F. A.; MAHMOUD, M. H.; ALSHATWI, A. A. Identification of titanium dioxide nanoparticles in food products: Induce intracellular oxidative stress mediated by TNF and CYP1A genes in human lung fibroblast cells. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 39, p. 176-86, 2014.
- PETER, I.; MEZZACASA, A.; LEDONNE, P.; DUMMER, R.; HEMMI, S. Comparative analysis of immunocritical melanoma markers in the mouse melanoma cell lines B16, K1735 and S91-M3. **Melanoma Research**, v. 11, p. 21-30, 2001.
- PITTAYAPRUEK, P.; MEEPHANSAN, J.; PRAPAPAN, O.; KOMINE, M.; OHTSUKI, M. Role of Matrix Metalloproteinases in Photoaging and Photocarcinogenesis. **Internacional Journal of Molecular Science**, v. 17; n. 868, p. 1-20, 2016.
- QUATRANO, N.; DINULOS, J. G. Current principles of sunscreen use in children. **Office pediatrics**, v. 25, p. 122-9, 2013.
- RAMÍREZ, S. G. M.; BUENROSTROC, N. L. D.; CHIRINOC, Y. I.; IGLESIAS, G. G.; MARURE, R. L. Titanium dioxide nanoparticles inhibit proliferation and induce morphological changes and apoptosis in glial cells. **Toxicology**, v. 302, p.146–156, 2012.
- RAMPAUL; A.; PARKIN, I.; CRAMER, L. P. Damaging and protective properties of inorganic components of sunscreens applied to cultured human skin cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 191, p. 138-148, 2007.
- RAPOSO, C.; WINDMÖLLER, C.C.; DURÃO, Jr., W. A. Mercury speciation in fluorescent lamps by thermal release analysis. **Waste Management**, v. 23, p. 879-886, 2003.
- RITTNER, M. N.; ABRAHAM, T. Nanostructured materials: an overview and commercial analysis. **Journal of the Minerals Metals & Materials Society**, v. 50, p. 37-8, 1998.
- ROELANDTS, R.; LIM, H.W.; HÖNIGSMANN, H.; HAWK, J. L. M. History of human photobiology. **Photodermatology**, p. 1-13, 2007.
- ROY, R.; TRIPATHI, A.; DAS, M.; DWIVEDI, P.D. Cytotoxicity and uptake of zinc oxide nanoparticles leading to enhanced inflammatory cytokines levels in murine macrophages: comparison with bulk zinc oxide. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 7, p.110–111, 2011.
- SAMBANDAN, D.; RATNER, D. Sunscreens: An overview and update. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 64, n. 4, p. 748-758, 2011.

- SANTOS, C. M. P. **Nanoencapsulação de ingredientes ativos em cosmetologia**. Universidade Fernando Pessoa, Faculdade de Ciências da Saúde. Porto, 2012. DISSERTAÇÃO
- SCHALKA, S.; REIS, V. M. S. Fator de proteção solar: significado e controvérsias. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86(3), p. 507–515, 2011.
- SCHINKEL, A. H.; JONKER, J. W. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 3–29, 2003.
- SENAPATI, V. A.; KUMAR, A.; GUPTA, G. S.; PANDEY, A. K.; DHAWAN, A. ZnO nanoparticles induced inflammatory response and genotoxicity in human blood cells: A mechanistic approach. **Food and Chemical Toxicology**, v. 85, p. 61-70, 2015.
- SHARMA, V.; SHUKLA, R. K.; SAXENA, N.; PARMAR, D.; DAS, M. DHAWAN, A. DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. **Toxicology Letters**, v. 185, p. 211-218, 2009.
- SHARMA, V.; ANDERSON, D.; DHAWAN, A. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2). **Apoptosis**, v. 17, p. 852–870, 2012.
- SHI, H.; MAGAYE, R.; CASTRANOVA, V.; ZHAO, J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. **Particle and Fibre Toxicology**, p. 10-15, 2013.
- SHUKLA, R. K.; SHARMA, V.; PANDEYA, A. K.; SINGH, S.; SULTANA, S.; DHAWAN, A. ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. **Toxicology in Vitro**, v. 25, p. 231–241, 2011.
- SIVAMANI, R. K.; CRANE, L. A.; DELLAVALLE, R. P. The Benefits and Risks of Ultraviolet Tanning and Its Alternatives: The Role of Prudent Sun Exposure. **Dermatologic Clinics**, v.27, p. 149–154, 2009.
- SLOMINSKI, A.; ZMIJEWSKI, M. A.; PAWELEK, J. L-tyrosine and L-dihydroxyphenylalanine as hormone-like regulators of melanocyte functions. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 25, p. 14-27, 2011.
- SOHN, M.; HERZOG, B.; OSTERWALDER, U.; IMANIDIS, G. Calculation of the sun protection factor of sunscreens with different vehicles using measured film thickness distribution. **Photochemistry and Photobiology**, v. 15, p. 1011-1344, 2015.

- SONG, Y.; GUAN, R.; LYU, F.; KANG, T.; WU, Y.; CHEN, X. In vitro cytotoxicity of silver nanoparticles and zinc oxide nanoparticles to human epithelial colorectal adenocarcinoma (Caco-2) cells. **Mutation Research**, v. 769, p.113–118, 2014.
- STADLER, K.; FREY, B.; MUNOZ, L.E.; FINZEL, S.; RECH, J.; FIETKAU, R.; HERRMANN, M.; HUEBER, A.; GAJPL, U.S. Photopheresis with UV-A light and 8-methoxypsoralen leads to cell death and to release of blebs with anti-inflammatory phenotype in activated and non-activated lymphocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 386, p. 71–76, 2009.
- STENBERG, C.; LARKO, O. Sunscreen application and its importance for the sun protection factor. **Archives of Dermatological Research**, v. 11, p. 1400-1402, 1985.
- SVENDSEN, C; SPURGEON, D.J; HANKARD, P.K; *et al.* A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.57, n.1, p. 20–29, 2004.
- TEXEIRA, S. P. Fotoproteção. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 67, p. 1-6, 2015.
- THOMPSON, J. F.; SCOLYER, R. A.; KEFFORD, R. F. Cutaneous Melanoma. **Lancet**, v. 365, p.687–701, 2005.
- THURN, K., ARORA, H., PAUNESKU, T., WU, A., BROWN, E., DOTY, C., KREMER, J., WOLOSCHAK, G. Endocytosis of titanium dioxide nanoparticles in prostate cancer PC-3M cells. **Nanomedicine**, v. 7, p. 123–130, 2011.
- TYAGI, N.; 1, SRIVASTAVA, S. K.; ARORA, S.; OMAR, Y.; IJAZ, Z. M.; AL-GHADHBAN, A.; DESHMUKH, S. K.; CARTER, J. E.; SINGH, A. P.; SINGH, S. Comparative analysis of the relative potential of silver, Zinc-oxide and titanium-dioxide nanoparticles against UVB-induced DNA damage for the prevention of skin carcinogenesis. **Cancer Letters**, n. 1, v. 383, p. 53-61, 2016.
- URBACH, F.; FORBES, P. D.; DAVIES, R. E.; BERGER, D. Cutaneous photobiology: past, present, and future. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 67, p. 209-224, 1976.
- VEGA-AVILA, E.; PUGSLEY, M. K. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. **Proceedings of the Western Pharmacology Society**, v.54, p. 10–4, 2011.
- VIRGILIO, A. L.; REIGOSA, D. M.; ARNAL, P. M; MELE, M. F. L. Comparative study of the cytotoxic and genotoxic effects of titanium oxide and aluminium oxide nanoparticles in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. **Journal of Hazardous Materials**, v. 177, p. 711–718, 2010.
- VOLKOVOVA, K.; BILANICOVA, D.; BARTONOVA, A.; LETASIOVÁ, S.; DUSINSKA, M. Associations between environmental factors and incidence of cutaneous melanoma. Review. **Environmental health**, v. 11, n. 1, p. 12, 2012.

- XIAO, L.; LIU, C.; CHEN, X.; YANG, Z. **Food and Chemical Toxicology**, v. 90, p. 76-83, 2016.
- XUE, C.; WU, J.; LAN, F.; LIU, W.; YANG, X.; ZENG, F.; XU, H. Nano titanium dioxide induces the generation of ROS and potential damage in HaCaT cells under UVA irradiation. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 10, p. 8500-8507, 2010.
- WANG, D.; GUO, D.; BI, H.; WU, Q.; TIAN, Q.; DU, Y. Zinc oxide nanoparticles inhibit Ca²⁺-ATPase expression in human lens epithelial cells under UVB irradiation. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 8, p. 2117-2126, 2013.
- WILKES, G. M.; BARTON-BURKE, M. **Oncology Nursing Drug Handbook**. 19^a edição p. 17-18, 2015.
- WOLF, R.; WOLF D.; MORGANTI, P., RUOCCO, V. Sunscreens. **Clinics in Dermatology**, v. 19, p. 452-459, 2001.
- WRIGHT, F.; WELLER, R. B. Risks and benefits of UV radiation in older people: More of a friend than a foe? **Maturitas**, v. 81, p. 425-431, 2015.
- WU, B.; TORRES-DUARTE, C.; COLE, B. J.; CHERR, G. N. Copper Oxide and Zinc Oxide Nanomaterials Act as Inhibitors of Multidrug Resistance Transport in Sea Urchin Embryos: Their Role as Chemosensitizers. **Environmental Science & Technology**, v. 49, p. 5760-5770, 2015.
- YAMAMOTO, T.; AKIYOSHI, H.; YOSHIKIYOA, K.; TAKAHASHI, T.; TANABE, Y.; KUDOHD, S.; IMURAD, S.; YAMAMOTO, N. A spectroscopic study on the effect of ultra-violet solar radiation in Antarctica on the human skin fibroblast cells. **Geoscience Frontiers**, v. 4, p. 647-653, 2013.
- YANG, F.; YU, Y.; LEI, Q.; ZENG, A.; LI, Y.; XIE, Y.; YE, T.; WEY, Y.; Lobaplatin arrests cell cycle progression, induces apoptosis and impairs migration and invasion in B16F10 melanoma cell line *in vitro*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 69 p. 402-408, 2015.
- ZHANG, W.; ZHAO, Y.; ZHANG, H.; WANG, S.; HAO, Z.; LIU, J.; YUAN, Y.; ZHANG, P.; YANG, H. Alteration of gene expression by zinc oxide nanoparticles or zinc sulfide *in vivo* and comparison with *in vitro* data: a harmonious case. **Theriogenology**, v. 86, p. 850-861, 2016.